

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN**  
**FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA**  
**FACULTAD DE AGRONOMÍA**



**TESIS**

**VALORACIÓN DEL CULTIVO LÍQUIDO LIGADO  
A PCR TIEMPO REAL PARA AUMENTAR LA SENSIBILIDAD  
DEL DIAGNÓSTICO DE LA TUBERCULOSIS BOVINA**

**PRESENTA**

**MVZ. CHRISTIAN ITZEL ORTEGA HERNÁNDEZ**

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO  
DE MAESTRÍA EN CIENCIA ANIMAL**

**J U L I O, 2019**

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN**  
**FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA**  
**FACULTAD DE AGRONOMÍA**



**TESIS**

**VALORACIÓN DEL CULTIVO LÍQUIDO LIGADO  
A PCR TIEMPO REAL PARA AUMENTAR LA SENSIBILIDAD  
DEL DIAGNÓSTICO DE LA TUBERCULOSIS BOVINA**

**PRESENTA**

**MVZ CHRISTIAN ITZEL ORTEGA HERNÁNDEZ**

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE:  
MAESTRÍA EN CIENCIA ANIMAL**

**J U L I O, 2019**

VALORACIÓN DEL CULTIVO LÍQUIDO LIGADO  
A PCR TIEMPO REAL PARA AUMENTAR LA SENSIBILIDAD  
DEL DIAGNÓSTICO DE LA TUBERCULOSIS BOVINA

PRESENTA

MVZ CHRISTIAN ITZEL ORTEGA HERNÁNDEZ

Aprobación por el

**Comité de Tesis**



---

Dr. Alfredo Wong González

Presidente



---

Dr. Ramiro Ávalos Ramírez

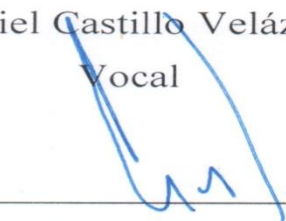
Secretario



---

Dr. Uziel Castillo Velázquez

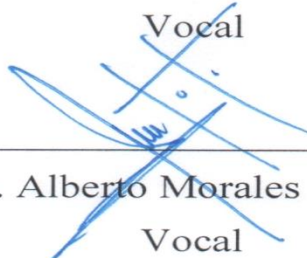
Vocal



---

Dr. Gustavo Moreno Degollado

Vocal



---

Dr. Alberto Morales Loredó

Vocal

VALORACIÓN DEL CULTIVO LÍQUIDO LIGADO  
A PCR TIEMPO REAL PARA AUMENTAR LA SENSIBILIDAD  
DEL DIAGNÓSTICO DE LA TUBERCULOSIS BOVINA

PRESENTA

MVZ CHRISTIAN ITZEL ORTEGA HERNÁNDEZ

**Dirección de Tesis**



---

Dr. Alfredo Wong González

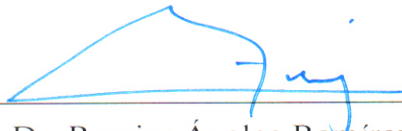
Director de tesis



---

Dr. Alberto Morales Loredó

Director externo



---

Dr. Ramiro Ávalos Ramírez

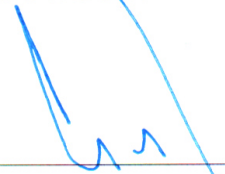
Co-Director



---

Dr. Uziel Castillo Velázquez

Co-Director



---

Dr. Gustavo Moreno Degollado

Co-Director

## **AGRADECIMIENTO**

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por brindarme apoyo económico en el transcurso de mis estudios de Posgrado para obtener el grado de Maestría.

Al Laboratorio Central Regional del Norte (LCRN), en especial a la MVZ. Patricia Flores Montiel y al Dr. Alberto Morales Loredó por permitirme la entrada al Laboratorio de Diagnóstico en Salud Animal para la realización de este proyecto de tesis.

Al Dr. Ramiro Ávalos Ramírez por su recomendación al LCRN, que sin él no hubiese podido llevar a cabo esta experiencia con este proyecto de tesis.

Del LCRN, al MC Joel Delgadillo por compartir sus conocimientos en la parte experimental de este proyecto de tesis; y al Técnico del laboratorio, Raymundo Colorado Velázquez, por brindar su apoyo durante la ejecución de los experimentos dentro del mismo Laboratorio.

A la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia (FMVZ) de la Universidad Autónoma de Nuevo León (UANL), a sus docentes: Doctores, Asesores y Maestros, por transmitirme sus conocimientos durante las clases y prácticas de laboratorio.

Al Laboratorio de Microbiología de la FMVZ – UANL en especial al Dr. Jaime Escareño por sus insaciables ganas de compartir todos sus conocimientos en el área experimental, permaneciendo siempre entusiasta ante los fracasos de sus alumnos, alentándome a seguir adelante y enseñándome que ‘los resultados negativos o desfavorables, también son resultados.

Al Dr. Alfredo Wong por todo el apoyo brindado en el transcurso de la maestría, por el apoyo en las altas y bajas, muchas gracias Doctor.

A la Dra. Diana Zamora por darme el apoyo, una mano amiga en tiempos difíciles, este agradecimiento es para usted.

Al MVZ Luis Botello por su colaboración en las tinciones de histopatología.

## DEDICATORIA

### *A la Ciencia,*

A quien dedico mi primer granito de arena y a quien espero seguir dedicando más en mis años de vida.

### *A mi Familia,*

Por su apoyo incondicional, por darme la vida, el cariño, la fuerza, sobre todo la fuerza para levantarme y seguir cuando ya no podía.

### *A mis bellas mascotas,*

Quienes me alegraban en los momentos más difíciles, simplemente gracias por existir.

### *A mi Psiquiatra*

El Dr. Felipe Corpus por su paciencia y dedicación en mi caso.

### *A la Lic. En Psicología Carolina Aguirre,*

Por su apoyo incondicional durante estos dos años de psicoterapia.

### *A mis colegas,*

Que este trabajo les aporte en el futuro.

### *A mis futuros colegas,*

No se rindan. Esta tesis, también va por y para ustedes.

## ÍNDICE DE CONTENIDO

|   |    |
|---|----|
| 1. INTRODUCCIÓN .....   | 15 |
| 1.1 JUSTIFICACIÓN.....  | 16 |
| 1.2 HIPÓTESIS .....   | 17 |
| 1.3 OBJETIVOS.....  | 17 |
| 2. ANTECEDENTES.....  | 18 |
| 2.1 TAXONOMÍA DE <i>Mycobacterium</i> spp. ....   | 18 |
| 2.2. PATOGENIA DE LA TUBERCULOSIS BOVINA .....  | 19 |
| 2.3 MÉTODOS DE AISLAMIENTO DEL COMPLEJO <i>Mycobacterium tuberculosis</i><br>.....                      | 21 |
| 2.3.1 Métodos bacteriológicos .....   | 21 |
| 2.4 MÉTODOS MOLECULARES PARA DETECCIÓN DE <i>Mycobacterium bovis</i> .....                              | 24 |
| 2.5 DIAGNÓSTICO DE TUBERCULOSIS BOVINA EN MÉXICO .....  | 24 |
| 3. MATERIALES Y MÉTODOS .....   | 28 |
| 3.1 LUGAR DE ESTUDIO .....  | 28 |
| 3.2 MUESTRAS.....   | 28 |
| 3.3 MEDIOS SÓLIDOS .....  | 28 |
| 3.4 MEDIOS LÍQUIDOS.....  | 29 |
| 3.5 CALIFICACIÓN DE LA MUESTRA .....  | 31 |
| 3.6 LAVADO DE LAS MUESTRAS .....  | 31 |
| 3.7 MACERADO DE LAS MUESTRAS .....  | 32 |
| 3.8 DESCONTAMINACIÓN POR LA VARIANTE ÁCIDO-ALCALÍ DEL<br>MÉTODO DE PETROFF .....                        | 32 |
| 3.9 AISLAMIENTO BACTERIOLÓGICO EN MEDIOS SÓLIDOS .....  | 32 |
| 3.10 EQUIPO BACTEC™ MGIT™ 320.....  | 32 |
| 3.11 SUPLEMENTOS DEL MEDIO DE CULTIVO PARA BACTEC™ MGIT™<br>320 .....                                   | 33 |
| 3.12 AISLAMIENTO BACTERIOLÓGICO EN MEDIOS LÍQUIDOS .....  | 33 |
| Aislamiento de micobacterias en el sistema BACTEC™ MGIT™ 320 con medio<br>líquido 7H10 modificado. .... | 33 |
| 3.13 BACILOSCOPIA .....   | 33 |

|  |    |
|--|----|
| 3.14 PREPARACIÓN DE LA MUESTRA Y EXTRACCIÓN DE ADN<br>MICOBACTERIANO PARA PCR DIRECTA. ....                                      | 33 |
| 3.15 PREPARACIÓN DE LA MUESTRA PARA PCR DIRECTA. ....  | 34 |
| 3.16 PCR TIEMPO REAL .....   | 34 |
| 3.17 PCR TIEMPO REAL PARA DETECCIÓN DE ESPECIES DEL COMPLEJO<br><i>Mycobacterium tuberculosis</i> (CMTB) Y <i>M. bovis</i> ..... | 34 |
| 4. VALIDACIÓN DEL SISTEMA ANALITICO DE CULTIVO LIQUIDO. ....   | 35 |
| 4.1 SENSIBILIDAD ANALÍTICA DE CULTIVO LÍQUIDO EN EL SISTEMA<br>MGIT 320.....   | 35 |
| 4.2 ANÁLISIS DE VARIABLES CUALITATIVAS.....  | 35 |
| 4.3 VALOR DE SIGNIFICANCIA (P VALUE) .....   | 35 |
| 4.4 ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS RESULTADOS .....   | 35 |
| 5. RESULTADOS .....  | 36 |
| 5.1 MUESTRAS ANALIZADAS Y PROCEDENCIA. ....  | 36 |
| 5.2 AISLAMIENTO BACTERIANO EN MEDIOS SÓLIDOS .....   | 36 |
| 5.3 AISLAMIENTO BACTERIANO EN MEDIO LÍQUIDO.....   | 37 |
| 5.4 BACILOSCOPIA MEDIANTE TINCIÓN DE ZIEHL-NEELSEN.....  | 37 |
| 5.5 HISTOPATOLOGÍA .....   | 39 |
| 6. ANÁLISIS DE RESULTADOS .....  | 43 |
| 6.1. Distribución de resultados acorde a la condición clínica del animal y prueba<br>diagnóstica. ....                           | 43 |
| 7. DISCUSIÓN .....   | 48 |
| 8. CONCLUSIONES .....  | 50 |
| 9. LITERATURA CITADA.....  | 51 |
| 10. ANEXOS .....   | 56 |
| SOP-MB-0080. Detección de las especies del Complejo <i>Mycobacterium tuberculosis</i><br>mediante PCR Tiempo real. ....          | 56 |
| Propósito .....  | 56 |
| Precauciones de seguridad. ....  | 56 |
| Procedimiento .....  | 57 |
| Preparación del informe y análisis de datos.....   | 62 |
| Procedimientos de Control de Calidad. ....   | 63 |



|   |    |
|---|----|
| Propósito.....  | 65 |
| Precauciones de seguridad .....   | 65 |
| Procedimiento .....   | 65 |
| Preparación .....   | 66 |
| Muestreo de tejidos.....  | 66 |
| Extracción y Purificación - Método de placa de 96 pocillos. ....  | 67 |
| Extracción y Purificación - Método de columna. ....   | 68 |
| Control de calidad.....   | 68 |
| SOP-MB-0059. Aislamiento de micobacterias utilizando el sistema MGIT 960. ....  | 69 |
| Propósito .....   | 69 |
| Procedimiento .....   | 69 |
| Suplementación para cada tubo MGIT™ .....   | 69 |
| Método de prueba .....  | 70 |
| Procedimientos de Control de Calidad .....  | 70 |
| Análisis de datos, cálculos y resolución de problemas.....  | 71 |
| Resultado .....   | 72 |
| Diagrama esquemático del suplemento regular de MGIT™ .....  | 73 |
| Diagrama esquemático del suplemento regular de MGIT-Malachite Green .....   | 73 |
| WI-MB-0077. Preparación de muestras para PCR directa.....   | 74 |
| Preparación de tubos de ruptura de perlas .....   | 74 |
| Muestreo de tejidos.....  | 74 |
| NOM-056-ZOO-1995 Especificaciones técnicas para las pruebas diagnósticas que realicen los laboratorios de pruebas aprobados en materia zoosanitaria ..... | 78 |
| Capítulo 13 de la NOM-056-ZOO-1995. Tuberculosis Bovina .....   | 78 |

## ÍNDICE DE TABLAS

|  |    |
|--|----|
| <b>Tabla 1.</b> Taxonomía de Mycobacterium .....   | 18 |
| <b>Tabla 2.</b> Relación entre la condición clínica con los distintos métodos de análisis para detectar MTB en muestras de bovinos faenados en rastros TIF remitidos al LCRN (2008).....                                     | 44 |
| <b>Tabla 3.-</b> Análisis comparativo entre las proporciones de animales positivos (%) con la condición clínica y el análisis diagnóstico empleado basado en Chi-cuadrada. ....  | 45 |
| <b>Tabla 4.-</b> Análisis comparativo entre la proporción de animales positivos a MTB con la sensibilidad de la prueba diagnóstica en muestras con linfadenopatía de bovinos faenados en rastros TIF remitidos al LCRN. .... | 46 |
| <b>Tabla 5.-</b> Nivel de concordancia entre el aislamiento con pruebas de diagnóstico. ....   | 47 |
| <b>Tabla 6.</b> Set de primers para M. bovis .....   | 58 |
| <b>Tabla 7.</b> Set de primers para MTBC.....  | 59 |
| <b>Tabla 8.</b> Buffers .....  | 76 |

## ÍNDICE DE FIGURAS

|  |           |
|--|-----------|
| <b>Figura 1. Diagrama de flujo de los procedimientos de laboratorio.....</b>   | <b>29</b> |
| <b>Figura 2. SOP-MB-0080. Detección del Complejo <i>Mycobacterium tuberculosis</i> mediante PCR tiempo real .....</b>  | <b>30</b> |
| <b>Figura 3. Medios de cultivo sólidos con crecimiento bacteriano. A. Medio de cultivo Stonebrink con aislados de <i>M. bovis</i>. B. Medio de cultivo Lowenstein-Jensen (LJ) con aislados de <i>M. tuberculosis</i>. C. Medio de cultivo LJ con aislados de <i>M. gordonae</i>.....</b> | <b>37</b> |
| <b>Figura 4. Medio de cultivo Middlebrook 7H10 y Tubo MGIT™ suplementado, es evidente el crecimiento bacteriano (flecha).....</b>  | <b>38</b> |
| <b>Figura 5. Tinción de Ziehl-Neelsen del medio Middlebrook 7H10. BAAR positivo. ....</b>  | <b>38</b> |
| <b>Figura 6. Granuloma en Nódulo linfático. Tinción H&amp;E. 10x.....</b>  | <b>39</b> |
| <b>Figura 7. Granuloma en nódulo linfático. Tinción H&amp;E. 20x. ....</b>   | <b>40</b> |
| <b>Figura 8. Células de Langhans. Tinción H&amp;E. 100x. ....</b>  | <b>41</b> |
| <b>Figura 9. Nódulo linfático. Tinción Ziehl-Neelsen positiva. 100x. ....</b>  | <b>43</b> |

## ABREVIATURAS

|          |  |
|----------|--|
| μL       | Microlitros  |
| μm       | Micrómetros  |
| ANOVA    | Análisis de varianza   |
| BACTEC™  | Equipo radiométrico  |
| CBS-III  | Campana de bioseguridad nivel III  |
| CENASA   | Centro Nacional de Salud Animal  |
| CMTB     | Complejo <i>Mycobacterium tuberculosis</i>   |
| DNA      | Ácido desoxirribonucleico, por sus siglas en inglés  |
| DOF      | Diario Oficial de la Federación  |
| Mb       | <i>Mycobacterium bovis</i>   |
| MGIT™    | Mycobacteria Growth Indicator Tube (Tubo indicador del Crecimiento de Mycobacterias)                   |
| mm       | Milímetros   |
| NaClO    | Hipoclorito de sodio   |
| NOM      | Norma Oficial Mexicana   |
| PANTA™   | Polymyxin B, Amphotericin B, Nalidixic acid, Trimethoprim and Azlocillin (mezcla de antibióticos)      |
| PCR      | Polimerase Chain Reaction, Reacción en cadena de la Polimerasa   |
| qPCR     | PCR cuantitativa   |
| SENASICA | Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria                                      |
| SOP      | System Operative Procedures (Procedimiento Operativo Estandar)   |
| TB       | Tuberculosis bovina  |
| USDA     | United States Department of Agriculture (Departamento de Agricultura de los Estados Unidos de América) |
| RCF      | Fuerza centrífuga relativa o Fuerza G  |
| "U"      | Indeterminado (no se generó ningún valor Ct)   |
| IC       | Control interno (Control de extracción de ADN, Quasar 670®)  |
| BAAR     | Bacilo Ácido-Alcohol Resistente  |
| NL       | Nuevo León   |

## RESUMEN

La tuberculosis bovina (TB) causada por *Mycobacterium bovis*, es una enfermedad infectocontagiosa reemergente de importancia mundial que afecta a animales domésticos, particularmente a ganado bovino, fauna silvestre y humano. Dada la biología de esta bacteria y a la naturaleza crónica de la infección el diagnóstico puntual preciso y específico se constituye como la piedra angular para su control y erradicación en las zonas endémicas. En el presente estudio, se recogieron y analizaron un total de 43 muestras de tejido linfático de ganado bovino, procedentes de rastros durante el año 2018, para valorar la efectividad del uso de un medio cultivo líquido comercial acoplada a PCR-Tiempo Real (PCR-rt) en el diagnóstico de la tuberculosis bovina. Valores altos de positividad de entre 80 a 100% fueron observados con todas las técnicas de diagnóstico empleadas. Siendo mayor y constante en animales reactivos a la prueba de tuberculina ( $P > 0.05\%$ ). La PCR-rt usada a partir de las muestras de tejido macerado mostró una mayor sensibilidad, valor predictivo positivo, valor predictivos negativo y fiabilidad en comparación con la condición clínica, histopatología y PCR-rt usada a partir del cultivo líquido comercial. El cálculo del nivel de concordancia basado en el coeficiente kappa entre el aislamiento de *Mycobacterium bovis*, independientemente de la condición clínica, fue igualmente alto en el PCR-rt a partir de tejidos linfáticos (0.78), seguido del medio de cultivo líquido comercial (0.44). Para la condición clínica e histopatología se obtuvieron valores muy bajos con 0.11 y 0.33, respectivamente. No obstante, no se encontró diferencia ( $p < 0.5$ , NC 95%) entre las proporciones animales positivos a *Mycobacterium bovis* ya sea de animales reactivos o animales no reactivos con las pruebas de diagnóstico empleadas. Con lo anterior, fue evidente la limitación parcial del cultivo líquido comercial para detectar animales positivos a *Mycobacterium bovis*. No obstante, aparentemente una multitud de factores no previstos pudieron sesgar los resultados por lo que es recomendado realizar estudios clínicos controlados para confirmar los resultados obtenidos.

## SUMMARY

Bovine tuberculosis (BTB) is caused by *Mycobacterium bovis*, BTB is a reemerging infectious disease of global importance and it affects domestic animals, particularly cattle, wildlife and humans. Given the biology of this bacteria and the chronic nature of the infection the precise and specific punctual diagnosis is constituted as the cornerstone for its control and eradication in endemic areas. The present study showed a total of 43 samples of lymphatic tissue from cattle were collected and analyzed, during 2018, to assess the effectiveness of the use of a commercial liquid culture medium coupled to PCR-rt in the diagnosis of BTB. High values of positivity between 80 and 100% were observed with all the diagnostic techniques used. Being older and constant in animals reactive to the tuberculin test ( $P > 0.05\%$ ). The PCR-rt used from the macerated samples showed greater sensitivity, positive predictive value, negative predictive value and reliability compared to the clinical condition, histopathology and PCR-rt used from the commercial liquid culture. The calculation of the level of concordance based on the kappa coefficient between *Mycobacterium bovis* isolation, regardless of clinical condition, was equally high in rt-PCR from lymphatic tissues (0.78), followed by commercial liquid culture medium (0.44). For the clinical condition and histopathology, very low values were obtained with 0.11 and 0.33, respectively. However, no difference ( $p < 0.5$ , NC95%) was found between the animal proportions positive to *Mycobacterium bovis* of either reactive animals or non-reactive animals with the diagnostic tests used. With the above, the partial limitation of commercial liquid culture to detect *Mycobacterium bovis* positive animals was evident. However, apparently a multitude of unforeseen factors were able to skew the results, so it is recommended to conduct controlled clinical studies to confirm the results obtained.

## 1. INTRODUCCIÓN

La tuberculosis bovina (TB) es una enfermedad infecciosa, crónica, debilitante, causada por *Mycobacterium bovis* que se manifiesta con la formación de granulomas en casi cualquier tejido del organismo, con frecuencia, se observan lesiones en ganglios linfáticos (en concreto en la cabeza y el tórax), los pulmones, el intestino, el hígado, el bazo, la pleura y el peritoneo, la bacteria tiende a infectar ganado bovino, animales domésticos y algunas especies salvajes de vida libre o en cautividad. La presencia de *M. bovis* en muestras clínicas y tomadas *post-mortem* podría demostrarse por frotis teñidos o cortes de tejido y realizar una confirmación mediante cultivo del microorganismo en medios de aislamiento primario (Cousins, 2012).

Actualmente en México, la prevalencia de TB depende de los trabajos de control y erradicación, el 17 de enero del 2019 se ha registrado que el 85.77% del territorio nacional se encuentra en fase de erradicación con una prevalencia menor al 0.5%. Por otra parte, el Departamento de Agricultura de los Estados Unidos de América (USDA) ha reconocido 29 regiones de baja prevalencia de TB, de las cuales 13 regiones pueden exportar con una sola prueba de tuberculina del lote, 15 regiones con prueba de lote y prueba de hato de origen y una región (Sonora) no requiere pruebas de tuberculina para exportar ganado castrado de México hacia los Estados Unidos (Servicio Nacional de Sanidad, 2016; 2017; 2019).

Como medida de control, el sector ganadero deberá realizar pruebas de tuberculina en animales que estuvieron o pudieron estar expuestos a la bacteria para que en base a los resultados, se puedan proveer datos epidemiológicos que presentarán un modelo para el diseño de cuarentenas de hato y despoblaciones (Milán, *et al.*, 2018).

## 1.1 JUSTIFICACIÓN

La TBb es una zoonosis reemergente transmisible al hombre al momento de ingerir productos lácteos contaminados y no pasteurizados o al mantener contacto con animales infectados. En el ganado provoca la disminución de la producción láctea, así como pérdidas por el decomiso de canales o partes de ellas, debido a la presencia de lesiones causadas por esta enfermedad afectando la economía en el sector ganadero.

Desafortunadamente realizar el diagnóstico de TB tarda semanas en arrojar resultados, dado el lento crecimiento de la bacteria, y a pesar de las medidas de control (programas de erradicación, inspección sanitaria, vigilancia epidemiológica y tratamiento térmico de la leche), se continúa la declaración de casos de tuberculosis zoonótica, por lo que la enfermedad continúa siendo un riesgo para la salud pública.

Al exportar ganado en pie, el Departamento de Agricultura de Estados Unidos realiza nuevamente exámenes de laboratorio y tienden a tener mejores resultados con mayor sensibilidad analítica en menor tiempo, si los comparamos con los resultados que se obtienen en territorio mexicano.

Lo antes expuesto, es debido a que cuentan con nueva tecnología capaz de reducir el tiempo de aislamiento de la bacteria, de semanas, a días, con un aparato radiométrico llamado BACTEC™ MGIT™, el cual mide la presencia de micobacterias en el tubo MGIT™ suplementado según la fluorescencia emitida mandando una señal sonora o impresa con la hora y fecha en que fue detectada la fluorescencia; además de detectar el agente etiológico con el uso de la PCR Tiempo real utilizando las sondas L3 para *M. bovis* y la IS6110 para complejo *M. tuberculosis*.



## **1.2 HIPÓTESIS**

El uso de medio de cultivo líquido comercial en conjunto con PCR tiempo real reduce el tiempo usado para el diagnóstico de la infección por *M. bovis* en bovino y muestra mayor sensibilidad y fiabilidad para el diagnóstico de tuberculosis bovina.

## **1.3 OBJETIVOS**

1. Mejorar la sensibilidad y rapidez del diagnóstico de tuberculosis bovina.
2. Implementar el cultivo líquido para el aislamiento de *M. bovis* a partir de tejidos de bovinos utilizando el sistema BACTEC-MGIT 320.
3. Implementar la técnica de PCR en tiempo real para la detección del complejo *Mycobacterium tuberculosis* y *M. bovis* a partir de tejidos de bovinos.
4. Comparar los métodos de aislamiento basados en la NOM-056-ZOO-1995 Especificaciones técnicas para las pruebas diagnósticas que realicen los laboratorios de pruebas aprobados en materia zoosanitaria, en relación al cultivo líquido/PCR tiempo real.

## 2. ANTECEDENTES

### 2.1 TAXONOMÍA DE *Mycobacterium* spp.

El género *Mycobacterium* comprende una amplia variedad de especies que podría decirse, se encuentran superiores a otros microorganismos a nivel evolutivo. Se ubican como único género dentro de la familia *Mycobacteriaceae*, por lo que su estudio se centra dentro de la microbiología como una sub-rama llamada micobacteriología (Murray *et al.*, 2016; Alderwick *et al.*, 2015).

**Tabla1. Taxonomía de *Mycobacterium***

|          |                          |
|----------|--------------------------|
| Dominio  | <i>Bacteria</i>          |
| Filo     | <i>Actinobacteria</i>    |
| Orden    | <i>Actinomycetales</i>   |
| Suborden | <i>Corynebacterineae</i> |
| Familia  | <i>Mycobacteriaceae</i>  |
| Género   | <i>Mycobacterium</i>     |

El género *Mycobacterium* asedia parásitos obligados, saprófitos y oportunistas. *Mycobacterium bovis* causa tuberculosis en el ganado, los humanos y animales salvajes. *Mycobacterium africanum* causa tuberculosis humana en África, representa una forma intermedia entre *M. tuberculosis* y *M. bovis*. *Mycobacterium microti* causa tuberculosis en roedores, lesiones locales en cobayas y conejos. Sin embargo, cualquier miembro del complejo de *M. tuberculosis* puede producir la enfermedad en el hombre (Murray *et al.* 2016).

Las micobacterias son bacilos aerobios que no forman esporas y deben su nombre a su similitud con los hongos (*myces*, hongos; *bakterium* pequeña barra) debido a que su crecimiento ocasionalmente es de tipo filamentosos. También son consideradas como bacterias ácido-alcohol resistentes (BAAR's), una de sus principales características es la morfología de la pared celular, la cual les confiere su tan conocida patogenicidad y resistencia farmacológica (Alderwick *et al.* 2015).

Cuando hablamos de la pared celular del género *Mycobacterium*, nos referimos a un mecanismo de defensa único y superior si lo comparamos con la de otras bacterias, aunque en su estructura presenta cierta similitud a bacterias gramnegativas; las micobacterias reemplazan la capa más externa de lipopolisacáridos (LPS) por ácidos

micólicos. Los ácidos micólicos determinan la resistencia ante soluciones acuosas y a ambientes en los cuales se ven propensas a desecarse puesto a que forman una capa densa de cera que las protege del medio en el que se encuentran, permitiéndoles sobrevivir a ambientes hostiles (Chiaradia *et al.* 2017).

De este modo son pocos los antimicrobianos capaces de penetrar esta espesa pared celular

De igual forma, cualquier nutriente capaz de mantener viable a la micobacteria, penetra con lentitud esta capa de ácidos micólicos; y gracias a esto tenemos una de las mayores problemáticas para su cultivo, el aislamiento. La lentitud con la que crece una colonia de micobacterias oscila entre las 6 y 8 semanas en un agar adecuado, principalmente, aquellas como las pertenecientes al complejo *Mycobacterium tuberculosis* (Cardona, 2018).

## **2.2. PATOGENIA DE LA TUBERCULOSIS BOVINA**

La tuberculosis bovina comienza ante la inhalación de micobacterias, estas pueden viajar libremente en el aire a través de los campos y contagiar hatos con facilidad. Las partículas de tamaño superior a 10 µm quedan retenidas en la barrera mucosa de las vías respiratorias superiores y son eliminadas por el sistema defensivo mucociliar. Aquellas partículas que se encuentran entre 1 a 5 µm son capaces de viajar a través de las vías respiratorias y alojarse en los alvéolos, a esta etapa se le llama infección primaria (Lozano, 2002).

Lo que ocurre a continuación, es la fagocitosis de las micobacterias por el macrófago alveolar (MA), aunque el MA funge como una célula que se encarga de la limpieza del alvéolo tiene capacidad de destruir ciertos agentes contaminantes y patógenos, no obstante, esta actividad se ve interrumpida por la secreción del péptido ESAT-6 (Early Secretory Antigenic Target) evitando que el fagosoma se una al lisosoma e inhibiendo la apoptosis abriéndose paso al citoplasma de la célula (Cardona, 2018).

Por lo pronto, la micobacteria se beneficia de este único MA multiplicándose a una velocidad aproximada de cinco a seis ciclos de división celular, durante un período de cinco a seis días (un ciclo cada 24 h) consiguiendo concentraciones de hasta 64 bacilos ocasionando la inevitable necrosis de este desafortunado macrófago (Cardona, 2018).

Dada la necrosis del MA, las micobacterias son expulsadas al espacio extracelular y se diseminan a otros alvéolos mediante el drenaje generado por el movimiento de inspiración y espiración, así, las micobacterias vuelven a ser fagocitadas por los MA y comienza nuevamente el ciclo de reproducción (Cardona, 2018).

Este ciclo llega a generar un aproximado de 1,000 bacilos que durante la necrosis del MA se han liberado las suficientes quimiocinas para producir la respuesta inflamatoria. La inflamación comienza a generar exudado en los capilares destruyendo la estructura alveolar para permitir la entrada de células polimorfonucleares (PMN), por lo general son neutrófilos y monocitos los que acuden ante la señalización, aunque otros pudiesen presentarse, según sea el tipo de quimiocinas y citosinas secretadas por los MA. Ante esto, el drenaje de los alvéolos infectados se torna riguroso, permitiendo la entrada de la infección hacia los nódulos linfáticos a través de los capilares linfáticos aferentes, infectando a los macrófagos de los nódulos linfáticos produciendo linfadenitis (Cardona, 2018).

En ese momento comienzan a reaccionar los tejidos frente al patógeno, de tal manera, se generan el complejo primario, en el cual, aparecen lesiones en el órgano afectado y en nódulos linfáticos regionales. Podemos nombrar estos complejos dependiendo de la localización de las lesiones, de este modo tenemos que, para una infección respiratoria, nombraremos complejo primario respiratorio a la afección. Las micobacterias también pueden alojarse en sistema digestivo (Complejo primario digestivo), el intestino y sus nódulos linfáticos regionales suelen ser el sitio de infección, y por último, pueden alojarse en vía oronasal (Lozano, 2002; Cardona 2018).

Hasta este punto, la enfermedad puede progresar o ingresar en un periodo de latencia, en donde el complejo primario (oronasal, respiratorio o digestivo) se encapsula y comienza la precipitación de sales de calcio (Ca) en los focos caseificados de la lesión, formándose un granuloma caseoso (Lozano, 2002).

Por otra parte, si el animal no cuenta con la inmunidad adecuada, la infección progresará con rapidez a partir del sitio de infección primario vía linfohematógena, produciendo tuberculosis extrapulmonar. Cuando la infección penetra los bronquios, intestinos, entre otros órganos, se dice que se produjo la difusión intracanicular. Comúnmente se presenta la formación de granulomas tuberculosos en diferentes órganos, principalmente en riñón,

hígado, bazo y pulmones, a esta infección se le conoce como tuberculosis miliar (Lozano, 2002; Cardona 2018).

Posteriormente, ocurre lo que se llama, el complejo postprimario, este proceso sucede en animales que tuvieron con inmunidad adquirida que se desarrolló durante la primera infección, respondiendo ante infecciones subsecuentes de diferente manera. Estas infecciones pueden ser debido a micobacterias que logran penetrar hacia los focos primarios que antes permanecían inactivos. Pudiendo originar otra forma de la enfermedad conocida como tuberculosis crónica en un órgano en específico, en el cual, solo existe la difusión intracanicular y las lesiones se mantienen sin granulomas tuberculosos (Lozano, 2002; Cardona 2018).

## **2.3 MÉTODOS DE AISLAMIENTO DEL COMPLEJO *Mycobacterium tuberculosis***

### **2.3.1 Métodos bacteriológicos**

#### **Medios de cultivo sólidos**

El cultivo, aislamiento e identificación de *M. bovis* se realiza sembrando una pequeña porción del tejido sospechoso en diversos medios de cultivo, los cuales nutrirán a los microorganismos sembrados esperando observar colonias bacterianas. Estos nutrientes utilizan fuentes de carbono como el glicerol (se metaboliza a piruvato), el cual resulta difícil de metabolizar; por otro lado, es preferente utilizar directamente el piruvato o bien, glutamato de sodio para fomentar la adecuada nutrición. Un medio de cultivo rico en albúmina conforma el valor agregado para que la micobacteria se desarrolle con mayor facilidad. La albúmina puede provenir directamente del huevo de gallina o albúmina sérica de bovino. Estos son medios de cultivo muy utilizados por ser fáciles de preparar y suelen ser de bajo costo. Además, se agregan fuentes de nitrógeno como la asparagina o iones de amonio y ocasionalmente adicionan biotina y catalasa para ayudar a aquellos bacilos que han sido dañados por la descontaminación para que puedan reproducirse en el medio. Todo esto se conjuga en un agar gelatinoso o en un medio líquido, los cuales se incuban, en este caso a 37 °C para dar paso a la reproducción de

microorganismos del género *Mycobacterium* (Organización Panamericana de la Salud, 2008; Delgadillo, 2017).

Los medios sólidos más comunes para el cultivo de micobacterias pueden o no contener huevo, el cual mencionábamos anteriormente, propicia el desarrollo de las micobacterias inoculadas. Entre los medios de cultivo sólidos adecuados para aislar micobacterias se encuentran el medio de Herrold más comúnmente utilizado para la detección de Paratuberculosis; en el medio Lowenstein-Jensen las micobacterias comienzan a reproducirse a partir de las dos semanas, pero el aislamiento se consigue hasta la sexta semana, a partir de esta se pueden observar colonias en el agar; el medio Middlebrook es más rico en nutrientes, por lo tanto el tiempo de aislamiento se reduce a tres semanas o menos; el medio Petragnani se utiliza para aislar micobacterias procedentes de muestras contaminadas con otras bacterias; en el medio Stonebrink las micobacterias se desarrollan a partir de la quinta semana, este medio es selectivo para *M. bovis* debido a que carece de glicerina. Por otra parte, la glicerina es utilizada en distintos medios de cultivo, en especial aquellos donde se pretende aislar *M. tuberculosis* y otras micobacterias; el medio de la American Thoracic Society o ATS solo contiene 0,02 g/100 mL de verde malaquita, es el más recomendado para muestras estériles (líquido cefalorraquídeo, líquido pleural y biopsias) (Delgadillo, 2017; Rovid *et al.* 2010; Koneman *et al.* 2008; Samper *et al.* 2018)

Siendo los más comunes el Lowenstein-Jensen y el Stonebrink en México y según las Especificaciones técnicas para las pruebas diagnósticas que realicen los laboratorios de pruebas aprobados en materia zoosanitaria presentes en la NOM-056-ZOO-1995.

#### Medios de cultivo líquidos

Entre los medios líquidos más comunes se encuentran el Middlebrook 7H9, Dubos, Youmans o Proskauer-Beck, entre otros. El medio Middlebrook 7H9 es el más utilizado. Algunos de los medios de cultivo líquidos se encuentran semiautomatizados y se basan en el uso de incubadora que detectan el crecimiento bacteriano según sea el consumo de oxígeno (O<sub>2</sub>) o de dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>), estos aparatos mantienen un monitoreo constante de los tubos que contienen el medio líquido con la muestra. El medio Middlebrook 7H9 usualmente se complementa con suplementos y antibióticos, esto

último ayuda a neutralizar bacterias que hayan sido capaces de resistir los procesos de descontaminación previos al aislamiento (Samper *et al.* 2018).

Esta mejoría en la detección de la bacteria, se ha estudiado mediante la comparación del desempeño de distintos medios de cultivo, demostrando que el tiempo medio de detección para los sistemas radiométricos es menor que el de los métodos convencionales ofreciendo una promesa como método para la detección rápida del crecimiento de micobacterias en conjunto con métodos de cultivo convencionales. Aunque se ha evaluado el desempeño de los sistemas BACTEC y MGIT encontrándose diferencia en la sensibilidad de la recuperación de *M. bovis* entre estos dos sistemas e incluso algunos de los medios sólidos, relacionándose directamente con tasas de contaminación de los medios de cultivo el sistema MGIT ofrece altas tasas de aislamiento de la micobacteria en comparación con los medios sólidos y el sistema BACTEC (Gormley *et al.* 2014; Robbe-Austerman *et al.* 2013)

Los métodos automatizados más comunes utilizados en los laboratorios son:

- VersaTREK™ (Thermo Fisher Scientific, Oakwood Village, OH, US).

Contiene esponjas de celulosa dentro del medio líquido las cuales ofrecen la superficie de cultivo sólida necesaria para el aislamiento. Este sistema posee sensores de presión que detectan cuando hay crecimiento en los tubos si el O<sub>2</sub> comienza a disminuir.

- BacT/ALERT® 3D (BioMerieux, Marcy l'Etoile, Francia).

Sus sensores registran los cambios de color que se presentan en las botellas y son dados gracias a la producción de CO<sub>2</sub>.

- BD BACTEC™ MGIT™ 960 ó BD BACTEC™ MGIT™ 320 (Becton Dickinson, Sparks, MD, US).

Este sistema utiliza tubos con un fondo de silicona en donde se encuentra incrustado el Rutenio (Tris 4, 7-difenil-1,10-fenantrolina cloruro de rutenio pentahidratado), un compuesto que emite fluorescencia frente a los cambios de consumo de O<sub>2</sub>.

En comparación con los medios sólidos que se monitorean semanalmente, estos sistemas monitorizan periódicamente los cultivos para detectar en ese preciso momento alguna muestra emitiendo fluorescencia o cambios de color.

Como en todo, la dosis inoculada se relaciona al porcentaje de sensibilidad presente en los medios de cultivo está relacionada con la carga bacteriana de la muestra. Claro está que el mejor rendimiento al momento de obtener aislados de micobacterias en estos sistemas se observa con el uso de cultivos líquidos automatizados ya que pueden arrojar resultados positivos a partir de la primera semana e inclusive hasta la tercer semana con una media de 14 días, además la sensibilidad se incrementa hasta un 20% con menor tiempo de detección mediante el uso de medios líquidos para el crecimiento de *M. tuberculosis* (Teran *et al.* 2015; Samper *et al.* 2018).

## **2.4 MÉTODOS MOLECULARES PARA DETECCIÓN DE *Mycobacterium bovis***

Los métodos moleculares se basan en la amplificación y detección de ácidos nucleicos suelen ser técnicas más rápidas y con mayor índice de sensibilidad si la comparamos con los métodos bacteriológicos. La amplificación de estas secuencias se da a partir de sondas, en el caso del complejo MTB se utilizan principalmente la 16S ARNr, IS6110 o el gen *rpoB*. Es recomendable el uso de técnicas comerciales ya que se encuentran estandarizadas y mantienen porcentajes altos de sensibilidad.

El método automatizado Xpert MTB/RIF (Cepheid, Sunnyvale, CA, Estados Unidos) consiste en una PCR anidada a tiempo real del gen *rpoB*, que codifica para la subunidad de la ARN polimerasa. Utiliza 5 sondas genéticas del tipo “molecular beacon”, cada una marcada con un fluoróforo distinto. Cubre totalmente la zona de 81 pares de bases, entre los codones 426 y 452 del gen *rpoB* y la generación de los resultados se da en tres horas (García *et al.* 2017; Samper *et al.* 2018).

Otro procedimiento para la detección bacteriana se realiza mediante la PCR en Tiempo real ya que resulta ser una manera rápida detectar micobacterias y mejorar la sensibilidad y especificidad (Surat *et al.* 2014; Thakur *et al.* 2016)

## **2.5 DIAGNÓSTICO DE TUBERCULOSIS BOVINA EN MÉXICO**

El Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria (SENASICA) ha establecido un Plan Estratégico que contempla a la investigación científica para sustentar actividades de campaña (Clifford & Delgadillo, n.d.), entre las cuales se encuentra la “Campaña Nacional Contra la Tuberculosis Bovina (*Mycobacterium bovis*)”, quien determina que el diagnóstico de la TB se lleva a cabo por medio de pruebas de



tuberculina, histopatología y análisis bacteriológico, el cual consiste en un examen directo (cultivo, tinción de Ziehl-Neelsen o de nueva fucsina) y un examen indirecto (aislamiento e identificación de la bacteria). Un animal que resulta positivo a la prueba de tuberculina doble comparativa se considera reactor. (Federación, D. O. de la., 1996, NOM-031-ZOO-1995).

Para reducir el impacto de la TB, la Dirección General de Sanidad Animal de la SENASICA determina que aquellos animales considerados reactores a la prueba de tuberculina se envían a rastro para su sacrificio, en donde se inspeccionan y se toman muestras de tejidos con lesiones granulomatosas (Federación, D. O. de la., 1996, NOM-031-ZOO-1995). Las muestras se envían a laboratorio, donde, a pesar del tiempo de incubación, descontaminación, requisitos de los medios, contaminación dada por otros microorganismos, uno de los métodos más importantes para diagnosticar la TB es el cultivo bacteriológico (Robbe-Austerman *et al.* 2013; Surat *et al.* 2014)

El cultivo bacteriológico se realiza mediante el aislamiento primario, donde el sedimento suele inocularse en un conjunto de medios sólidos basados en huevo, como el de Lowenstein-Jensen, Coletsos o Stonebrink; estos medios deben contener piruvato o piruvato y glicerol. También puede utilizarse un medio basado en agar como el de Middlebrook 7H10 o 7H11 o el medio de agar basado en sangre (Cousins, 2012)

Los característicos patrones de crecimiento y la morfología de las colonias pueden servir para llegar a un diagnóstico provisional de *M. bovis*. Es necesario diferenciar *M. bovis* de los otros miembros del “Complejo tuberculoso”, algunas veces pueden aislarse *M. avium* u otras micobacterias ambientales de lesiones tipo tuberculosis en ganado bovino. En estos casos, es necesaria una cuidadosa identificación, y debe excluirse una infección mixta con *M. bovis*. Pueden identificarse cepas determinando las propiedades clásicas de cultivo y bioquímicas (Cousins, 2012)

No obstante, se recomienda la combinación de medios sólidos y líquidos para aislar micobacterias en conjunto con sistemas radiométricos automatizados para obtener promedios de positividad que pueden oscilar entre los 7 y 10 días (para sistemas radiométricos automatizados (Marcano-Vásquez *et al.* 2016)

En la última década la TB se ha convertido en una barrera no arancelaria para el comercio de ganado. Una gran dificultad en el diagnóstico de la TB es que no se cuenta

con una prueba simple y sensible que determine la viabilidad de la bacteria en animales; en laboratorio, los cultivos pueden presentar bajo porcentaje de aislamiento si la muestra proviene de un animal reactor a la prueba de la tuberculina sin presentar lesión visible, predisponiendo la presencia de una baja cantidad de bacterias en el tejido (Milián Suazo *et al.* 2018)

Las últimas modificaciones a la NOM-031-ZOO-1995 se realizaron en el año 1998, sin embargo, desde esa fecha se han desarrollado y utilizado nuevos métodos de envío de muestras y descontaminación. Se han desarrollado alrededor del mundo métodos para mejorar el aislamiento, pero en México no se pueden utilizar como sustitutos del método establecido en las Normas Oficiales Mexicanas puesto que no se cuenta con información suficiente sobre la eficacia y eficiencia que pudieran presentar estos medios al ser utilizados en el procesamiento de las muestras para el aislamiento bacteriológico (Federación, D. O. de la. NOM-056-ZOO-1995, 1999).

También en laboratorio, una de las desventajas del cultivo en medios sólidos es el lento crecimiento de la bacteria, que puede tomar de ocho a nueve semanas. La sensibilidad del aislamiento bacteriológico depende de los métodos de descontaminación (Teran, *et al.* 2015; Robbe-Austerman *et al.*, 2013).

Por otra parte, el uso de medios líquidos contiene tasas de contaminación más altas en comparación con los medios sólidos; el sistema MGIT 320 utiliza medios líquidos y arroja una tasa de contaminación del 0.8%, en el medio Middlebrook 7H10 modificado, la tasa de contaminación es más baja en el medio Lowenstein-Jensen (Duque *et al.* 2013).

Estas diferencias entre el tiempo de aislamiento y métodos de descontaminación han dado pauta a la actualización de procedimientos para la detección de *M. bovis* incluyendo la realización de PCR tiempo real de tejidos por el Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (USDA) (Clifford, J. & Delgadillo Álvarez s/f)

En el caso de bacteriología se plantea el manejo del equipo automatizado MGIT 320 mediante el cual se puede lograr el crecimiento de *M. bovis* en medio líquido (Dykema, 2014, SOP-MB-0059).

Si tomamos como referencia los procesos de detección de tuberculosis en otros países, notamos la innovación al día y la implementación de nuevas técnicas diagnósticas (Clifford, J. & Delgadillo Álvarez s/f).

### **3. MATERIALES Y MÉTODOS**

#### **3.1 LUGAR DE ESTUDIO**

El presente estudio se realizó en el Laboratorio Central Regional del Norte, S. A. de C. V. (LCRN), ubicado en Av. Pdte. Benito Juárez 940, Centro de Guadalupe, Código postal 67100, Municipio de Guadalupe, N. L. El LCRN es un laboratorio con pruebas acreditadas ante la Entidad Mexicana de Acreditación (EMA) y autorizado ante la SADER - SENASICA.

#### **3.2 MUESTRAS**

Se procesaron 43 muestras durante el año 2018 provenientes de rastros de los estados de Nuevo León y Coahuila. Las muestras fueron transportadas o enviadas al LCRN por Médico Veterinario Responsable Autorizado que participan con el SENASICA en la Campaña Nacional contra la Tuberculosis Bovina (*Mycobacterium bovis*) acorde a la NOM-031-ZOO-1995. En el LCRN las muestras fueron calificadas en base a los parámetros establecidos en las reuniones de homologación de criterios convocadas por el Centro Nacional de Salud Animal (CENASA) de la Dirección General de Salud Animal del SENASICA para su ingreso a análisis histopatológico y bacteriológico y acorde a la NOM-031-ZOO-1995. La muestra para el proceso de aislamiento se recibe en un frasco con una solución de borato de sodio al 6%. El frasco debe estar rotulado con los datos de la identificación de la muestra, número de arete y debe evaluarse según su coloración y presencia de contaminantes externos a la muestra (DOF de la NOM-056-ZOO-1995, 1999). En la [Figura 1](#) se muestra el diagrama general del proceso de la muestra en el laboratorio.

#### **3.3 MEDIOS SÓLIDOS**

Acorde a la NOM-056-ZOO-1995 (Ver Anexo [8.7](#)) se utilizaron los medios de cultivo Lowenstein-Jensen y Stonebrink y para los Procedimientos Operativos Estándar (SOP) ([Figura 2](#)) (Ver Anexos [8.1-8.3](#)) se utilizó el medio Middlebrook 7H10.

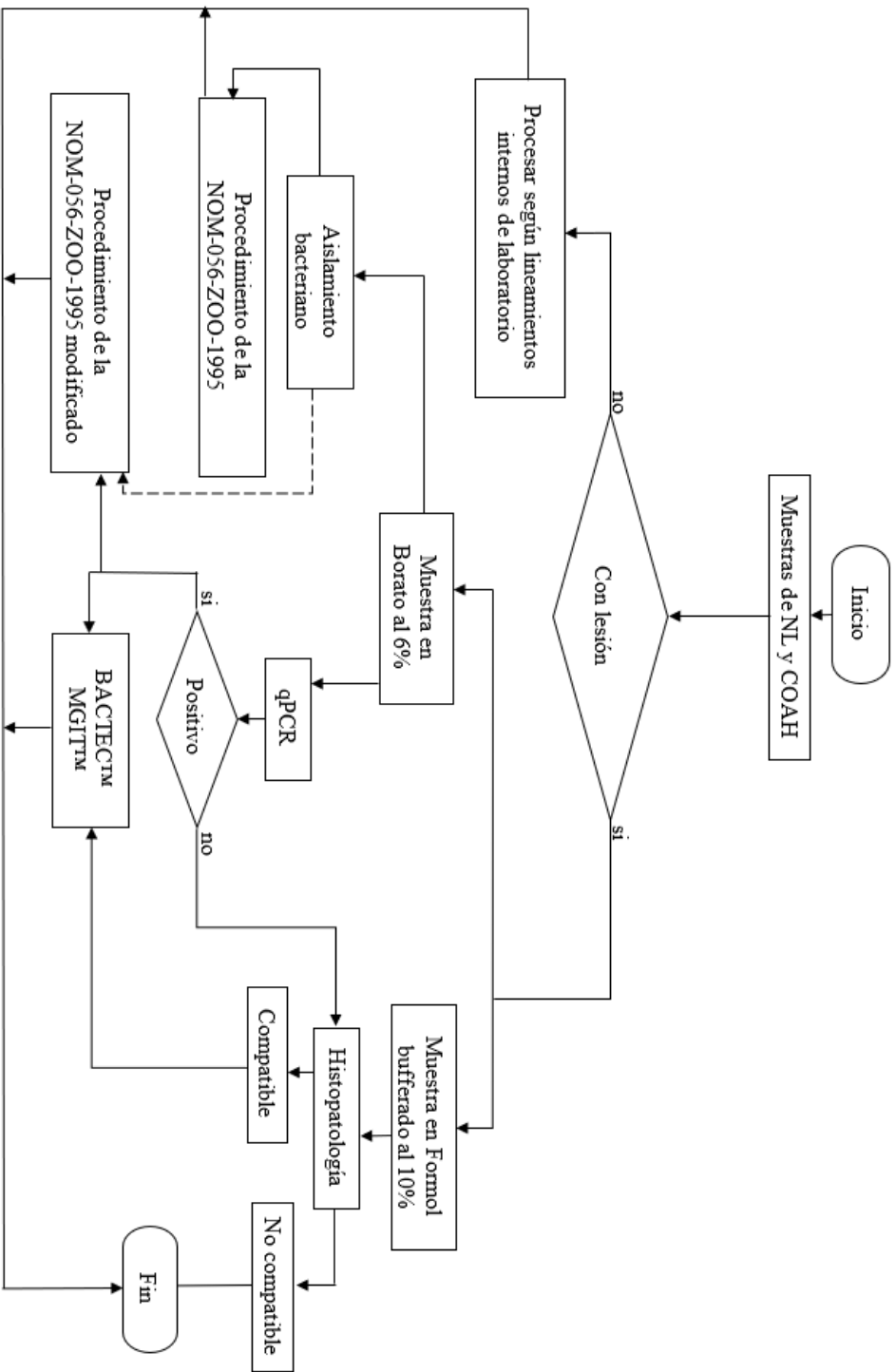


Figura 1. Diagrama de flujo de los procedimientos de laboratorio

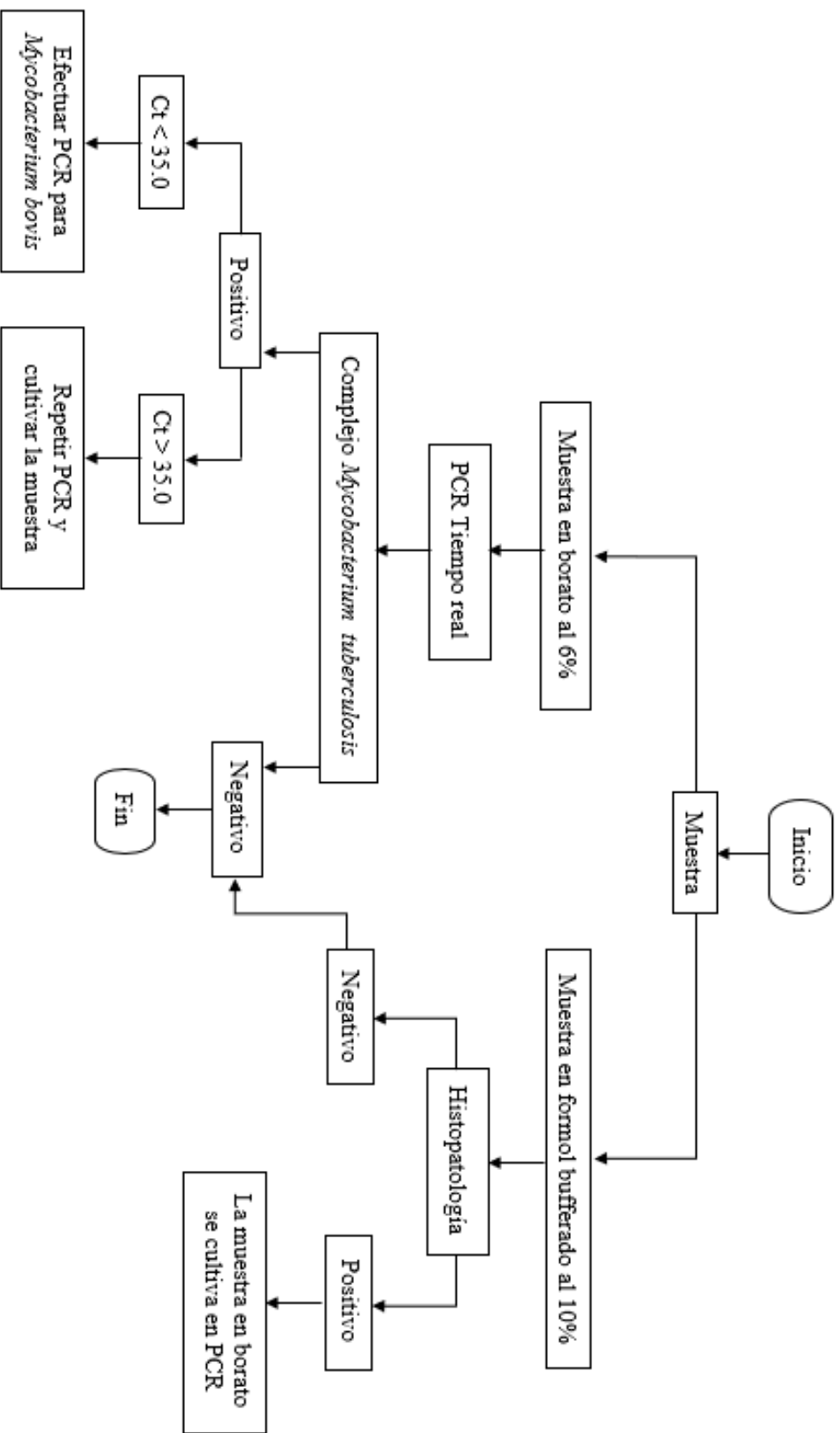


Figura 2. SOP-MB-0080. Detección del Complejo *Mycobacterium tuberculosis* mediante PCR tiempo real

### **3.4 MEDIOS LÍQUIDOS**

El medio de cultivo Middlebrook 7H10 se utilizó como parte del procedimiento de los SOP para su cultivo en el BACTEC® MGIT™.

### **3.5 CALIFICACIÓN DE LA MUESTRA**

Las muestras en borato se calificaron acorde a lo siguiente:

El color del borato, es decir, según el tiempo de vida del borato, el cual comienza a observarse más oscuro a medida que transcurren los días, incluso hasta tener una coloración marrón, cuando el borato se encuentra recién colocado en el envase, se observa transparente. Para lo anterior, se tiene de control un envase al cual se le vierte borato al 6%, fungiendo como el comparativo entre los envases con muestras. El borato tiene la función de ser un desinfectante, lo que permite reducir la microflora externa del tejido. A medida que transcurren los días la acción desinfectante se ve afectada, pudiendo así, dar paso a la proliferación de microorganismos contaminantes, dado que, si queremos aislar una micobacteria, su crecimiento se verá afectado porque otros microorganismos están haciendo uso de los nutrientes que la micobacteria necesita, por ende, tenemos menores probabilidades de aislarlas en los medios de cultivo (Samper *et al.* 2018).

El tamaño de la muestra en relación a la cantidad de líquido, nos referimos a que el tejido dentro del envase debe estar completamente cubierto de borato al 6%. Al mover el envase, colocarlo al revés y posicionarlo horizontal, por lo mencionado en el párrafo anterior, ninguna porción debe quedar sin estar cubierta de este líquido (Samper *et al.* 2018).

### **3.6 LAVADO DE LAS MUESTRAS**

El procedimiento se realizó en una CBS-III; el borato contenido en los frascos se decantó en otro recipiente para, posteriormente, agregar con pipeta poca cantidad de NaClO (1:100), los frascos se cerraron posterior a esto para ser agitados y nuevamente el líquido es decantado en un recipiente para lavar la muestra con agua destilada la cual también fue decantada, quedando en los frascos, únicamente las muestras lavadas.

### **3.7 MACERADO DE LAS MUESTRAS**

De las muestras lavadas, se inspeccionaron con pinzas de disección las piezas en busca de lesiones y se dividieron por la mitad. Una de las mitades se procesó según la SOP-MB-0079 ([Anexo 8.2](#)) y la otra mitad se procesó según la NOM-056-ZOO-1995 ([Anexo 8.7](#)). Procurando guardar en el congelador réplicas de cada muestra.

### **3.8 DESCONTAMINACIÓN POR LA VARIANTE ÁCIDO-ALCALÍ DEL MÉTODO DE PETROFF**

Se removió con tijeras una porción de tejido sin lesión junto con la lesión para su posterior macerado. Otra porción igual se utilizó para el análisis de PCR- tiempo real. Esta porción de tejido se colocó en tubos tipo eppendorf conteniendo fenol-cloroformo (400 µL). Para el macerado, las muestras se colocaron en vasos de licuadora de 250 mL.

### **3.9 AISLAMIENTO BACTERIOLÓGICO EN MEDIOS SÓLIDOS**

Para el método de la Norma Oficial Mexicana se inocularon muestras en tres tubos con medio de cultivo sólido. Un tubo del medio Lowenstein-Jensen y dos tubos del medio Stonebrink. El sedimento, del macerado descontaminado, se tomó con una pipeta Pasteur 1 mL de la muestra y ésta fue sembrada en la superficie de los tubos de medio de cultivo.

Los tubos se incubaron a 37 °C en posición horizontal con los tapones sin apretar durante el primer día para permitir que el sedimento cubra toda la superficie del medio. Al segundo día se cambiaron a una posición vertical para mantenerlos incubando en gradillas. Los tubos se inspeccionaron por semana durante 9 semanas. En caso de existir contaminación de todos los tubos, estos se desechan y se procesa la réplica (DOF, NOM-056-ZOO-1995, 1999).

### **3.10 EQUIPO BACTEC™ MGIT™ 320**

Se utilizó el protocolo que desarrolló en la USDA (Animal and Plant Health Inspection Service, Veterinary Services, National Veterinary Services Laboratories, Mycobacteria and Brucella Section, Ames, IA) mediante el uso de medios de cultivo líquido en el equipo BACTEC™ MGIT™ 320. Se evaluaron con controles positivos y muestras



biológicas en las que previamente se ha logrado aislamiento en cultivo líquido en este equipo.

### **3.11 SUPLEMENTOS DEL MEDIO DE CULTIVO PARA BACTEC™ MGIT™ 320**

La homogeneización del suplemento MGIT™ PANTA™ se realizó en una CBS-III que ha sido previamente desinfectada (Dykema, 2013, WI-MB-0024).

### **3.12 AISLAMIENTO BACTERIOLÓGICO EN MEDIOS LÍQUIDOS**

Las muestras procesadas se han inoculado en el medio líquido Middlebrook 7H10 y han sido procesadas por el sistema BACTEC™ MGIT™ 320.

Aislamiento de micobacterias en el sistema BACTEC™ MGIT™ 320 con medio líquido 7H10 modificado.

La manipulación de la muestra se realizó en un área del laboratorio nivel de Bioseguridad 3. Todas las inoculaciones se realizaron en una campana de flujo laminar CBS-III. La manipulación de las muestras y aislados se realizaron con pipetas calibradas. El inóculo fue transferido al suplemento en el tubo MGIT™ el cual fue descontaminado durante diez minutos antes de salir de la CBS-III (Dykema, 2014, SOP-MB-0059).

### **3.13 BACILOSCOPIA**

Del sedimento con el que fue realizada la siembra, se realizó un frotis mismo que fue fijado en frío para proceder a efectuar la tinción de Ziehl-Neelsen, con la intención de evidenciar bacilos alcohol ácido resistentes (BAAR).

### **3.14 PREPARACIÓN DE LA MUESTRA Y EXTRACCIÓN DE ADN MICOBACTERIANO PARA PCR DIRECTA.**

La muestra se preparó según Beckwith (2014) en WI-MB-0077 ([Anexo 8.5](#)); el control negativo se colocó cada cinco muestras por las primeras 20 muestras analizadas. La muestra para la PCR se extrajo y se purificó según Beckwith (2014) SOP-MB-0079 ([Anexo 8.2](#)).

### **3.15 PREPARACIÓN DE LA MUESTRA PARA PCR DIRECTA.**

Las muestras se rotularon para distinguir los controles positivos (para *M. tuberculosis* y para *M. bovis*) con los negativos, los controles negativos se usaron en un orden secuencial entre muestras. Con unas pinzas se extrajo el tejido del recipiente donde se almacenó, se tomó una muestra evitando tomar tejido fibroso, se homogeneizó la muestra, de la cual se transfirieron 100 µL con una pipeta Pasteur hacia los tubos control según el tipo de muestra (Beckwith, 2014, WI-MB-0077).

### **3.16 PCR TIEMPO REAL**

Se evaluaron los componentes de la reacción de PCR con controles positivos para optimizar el proceso.

### **3.17 PCR TIEMPO REAL PARA DETECCIÓN DE ESPECIES DEL COMPLEJO *Mycobacterium tuberculosis* (CMTB) Y *M. bovis*.**

Los oligonucleótidos a utilizarse en la reacción de PCR fueron tomados de los reportados en el SOP-MB-0080 ([Anexo 8.1](#)) (Dykema, 2014). Las muestras de tejido para PCR tiempo real se procesaron utilizando la sonda IS6110 con los iniciadores 5'-CAGGACCACGATCGCTGATC-3' a 67 °C, 3'- CTGCCCAGGTCGACACATAG-5' a 66.8 °C y 'CGTCCCGCCGATCTCGTCCA' a 72 °C.

## **4. VALIDACIÓN DEL SISTEMA ANALITICO DE CULTIVO LIQUIDO.**

### **4.1 SENSIBILIDAD ANALÍTICA DE CULTIVO LÍQUIDO EN EL SISTEMA MGIT 320.**

La sensibilidad analítica se evaluó seleccionando un tejido (nódulo) negativo a aislamiento y negativo a PCR. El tejido fue inoculado en 4 diferentes concentraciones de Unidades Formadoras de Colonias (UFC) de *M. bovis* (cepa de referencia AN5) con 5 repeticiones. El tejido inoculado se sometió a preparación, extracción (Beckwith, 2014, SOP-MB-0079), detección (Dykema, 2014, SOP-MB-0080), preparación de la muestra (Beckwith, 2014, WI-MB-0077) y aislamiento de micobacterias usando el sistema MGIT™ 320 con medio líquido 7H11 (Beckwith, 2014, WI-MB-0077).

### **4.2 ANÁLISIS DE VARIABLES CUALITATIVAS**

Las variables cualitativas hacen referencia a los resultados positivos y negativos, así como aquellos que muestran compatibilidad y no compatibilidad ante la tuberculosis bovina. Se analizaron con el coeficiente de Kappa para medir la concordancia entre variables del mismo tipo.

### **4.3 VALOR DE SIGNIFICANCIA (P VALUE)**

Se asignó el 95% de probabilidad para el valor de  $p$  ( $p \leq 0.05$ ), valores menores a 0.05 fueron tomados en cuenta para aceptar la hipótesis nula.

$H_0$ = Hay relación entre las variables

$H_a$ = No hay relación entre las variables

### **4.4 ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS RESULTADOS**

Los análisis comparativos entre las pruebas usadas, su asociación con la condición clínica, el cálculo de la sensibilidad y especificidad, así como los valores predictivos positivos (VPP) y negativos (VPN), el índice de Youden y la fiabilidad de las pruebas fueron realizados usando la plataforma cooperativa WinEpi2.0 (de Blas *et al.*, 2006). Todos los cálculos se realizaron a un nivel de significancia del 95% y acorde a los criterios, recomendaciones e interpretación establecidos en WinEpi2.0.

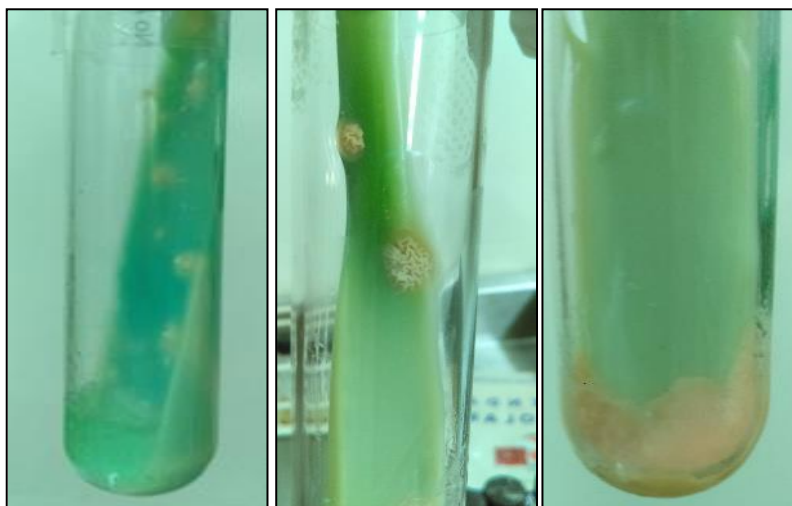
## 5. RESULTADOS

### 5.1 MUESTRAS ANALIZADAS Y PROCEDENCIA.

Se procesaron 43 muestras durante el año 2018 provenientes de rastros los cuales se observan en la tabla 2, no obstante, previamente se describen las observaciones realizadas para el aislamiento bacteriano en medio sólido y líquido, así como la histopatología y el método de tinción a partir de muestras representativas.

### 5.2 AISLAMIENTO BACTERIANO EN MEDIOS SÓLIDOS

Las colonias de *M. bovis* que crecieron en el medio Stonebrink se observaron con relativa abundancia y estas fueron generalmente pequeñas, blancas, que sobresalieron del medio y casi siempre dispersas. (Figura 3, A). En el medio de Lowenstein Jensen las colonias de *M. bovis* se observaron colonias blanquecinas pequeñas y rugosas (Figura 3, B). En el medio de Lowenstein Jensen también se observaron características fenotípicas (datos no mostrados) de distintas de micobacterias atípicas. En este medio *M. gordonae* fue la mayor frecuencia de observación, esta micobacteria, suelen presentar una coloración que oscila entre el naranja y el amarillo y tienen una consistencia visible que aparentemente parece cremosa (Figura3, C) (Federación, D. O. de la. NOM-056-ZOO-1995, 1999).



**Figura 3. Medios de cultivo sólidos con crecimiento bacteriano. A. Medio de cultivo Stonebrink con aislados de *M. bovis*. B. Medio de cultivo Lowenstein-Jensen (LJ) con aislados de *M. tuberculosis*. C. Medio de cultivo LJ con aislados de *M. gordonae*.**

### 5.3 AISLAMIENTO BACTERIANO EN MEDIO LÍQUIDO

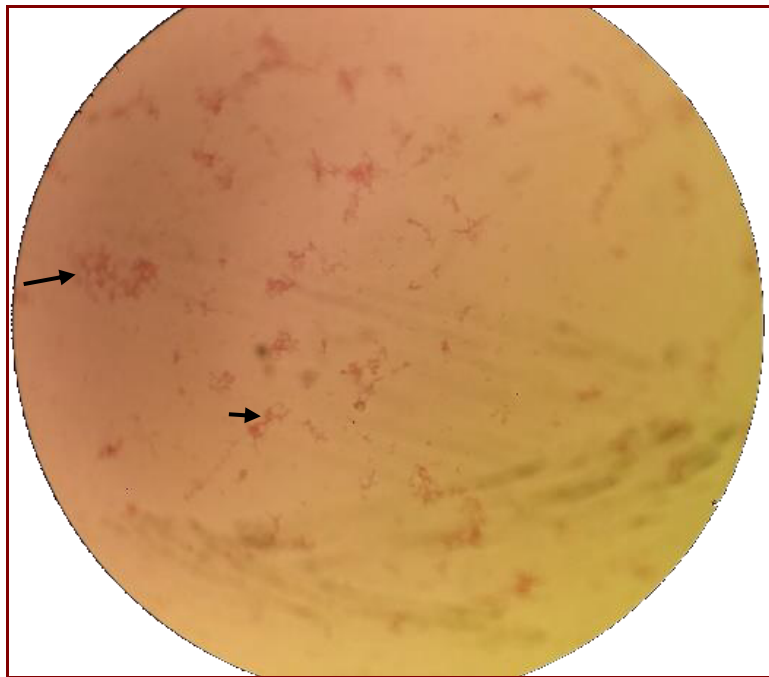
El sistema BACTEC™MGIT™ permite el crecimiento de *Mycobacterium* spp y no es específica de especie o cepa. Se observó que en todos los casos cuando el sistema emitió la alerta de multiplicación, el crecimiento bacteriano se observó con una coloración blanquecina sobre un fondo amarillo del agar (Figura 4). La muestra de la figura 4 de uno de los aislados correspondió con *M. bovis*.



**Figura 4.** Medio de cultivo Middlebrook 7H10 y Tubo MGIT™ suplementado, es evidente el crecimiento bacteriano (flecha).

#### **5.4 BACILOSCOPIA MEDIANTE TINCIÓN DE ZIEHL-NEELSEN**

Todas colonias de morfología típica en medio sólido y todas las muestras positivas en el sistema BACTEC™MGIT™ fueron analizados mediante tinción de Ziehl-Neelsen para evidenciar la presencia de Bacilos Acido Alcohol Resistentes (BAAR). Este proceso también fue realizado a muestras con lesiones granulomatosas sugestivas o sospechosas de micobacteria. La imagen típica de bacterias Ziehl-Neelsen positiva se muestran en la figura 5 la cuál corresponde a bacterias del complejo MTB. En esta se observan bacilos largos BAAR positivos de color rosa-rojizos en un fondo amarillo-naranja tenue y en ciertas zonas agregados de bacterias con la formación de cordones (flechas).

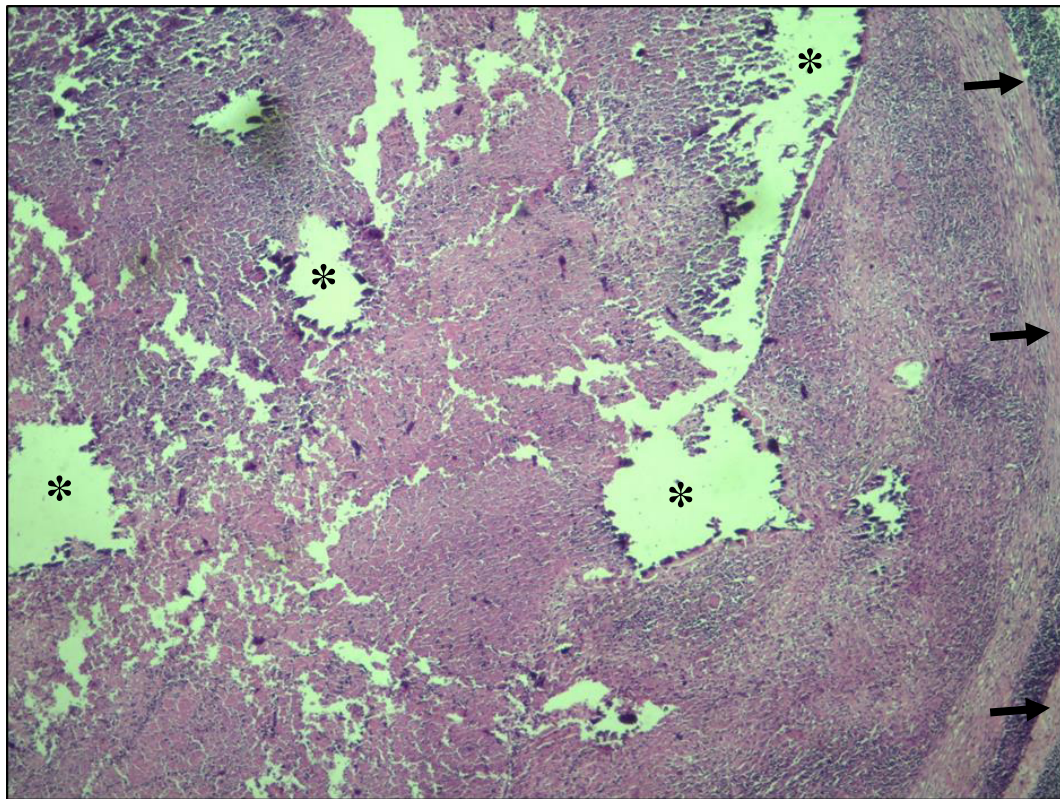


**Figura 5. Tinción de Ziehl-Neelsen del medio Middlebrook 7H10. BAAR positivo.**

## 5.5 HISTOPATOLOGÍA

El proceso histopatológico y su descripción se realizó acorde a la NOM-056-ZOO-1995. y a criterios de análisis para histopatología diagnóstica. Los tejidos fueron clasificados como compatibles y no compatibles. Los tejidos compatibles mostraban la morfología típica del granuloma tomando en cuenta la presencia de necrosis caseosa con o sin caseificación, células gigantes de Langhans y tejido fibroso entre otras estructuras histológicas. Las lesiones no compatibles correspondían a tejido sano, aparentemente sano o con lesiones diferentes a granuloma y en su mayoría consistentes con Actinomicosis o Actinobacilosis. La diferenciación fue un criterio importante para los subsecuentes análisis.

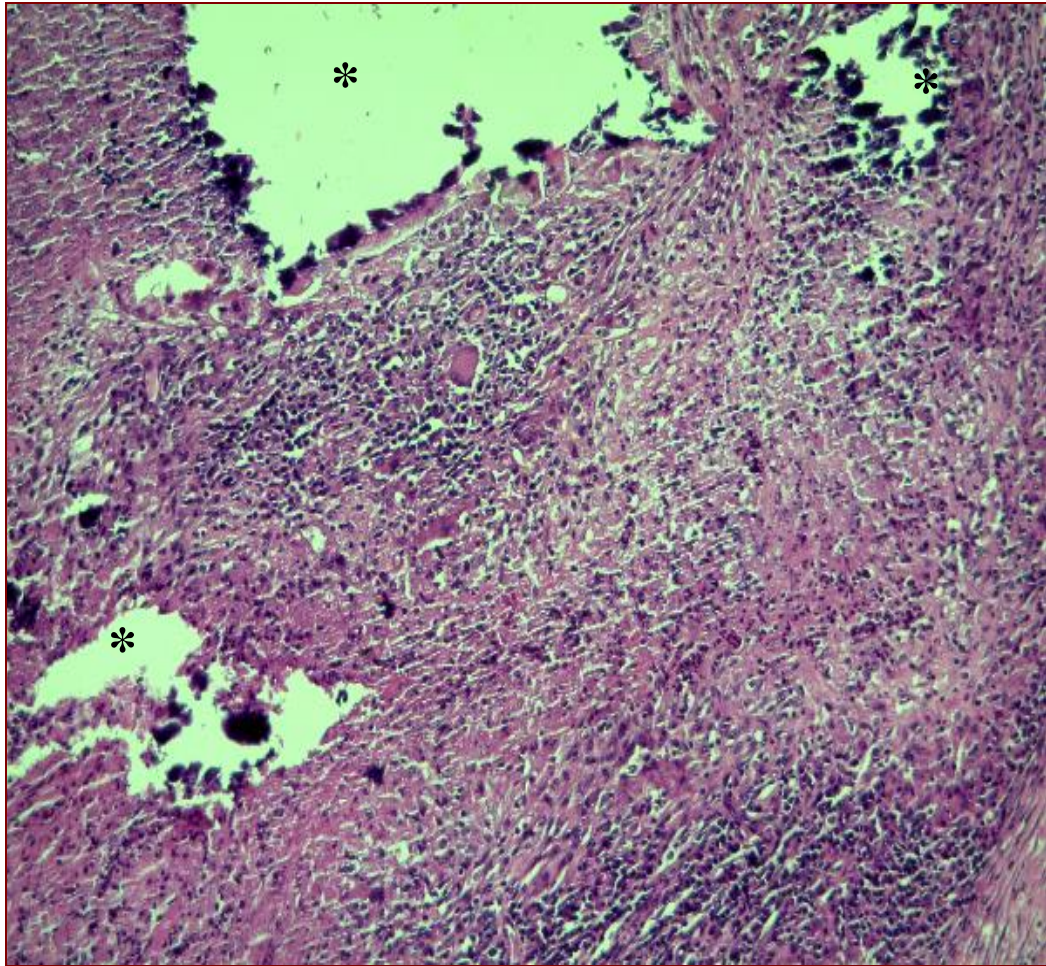
La figura 6 muestra un ejemplo de un corte histológico de un nódulo linfático teñido en Hematoxilina & Eosina con la presencia necrosis caseosa (asteriscos) y tejido fibroso en la periferia (flechas) a una ampliación de 10x



**Figura 6. Granuloma en Nódulo linfático. Tinción H&E. 10x.**

En la figura 7 se muestra una sección del granuloma con aumento de 20x; se muestra con mayor claridad la necrosis caseosa (asteriscos).

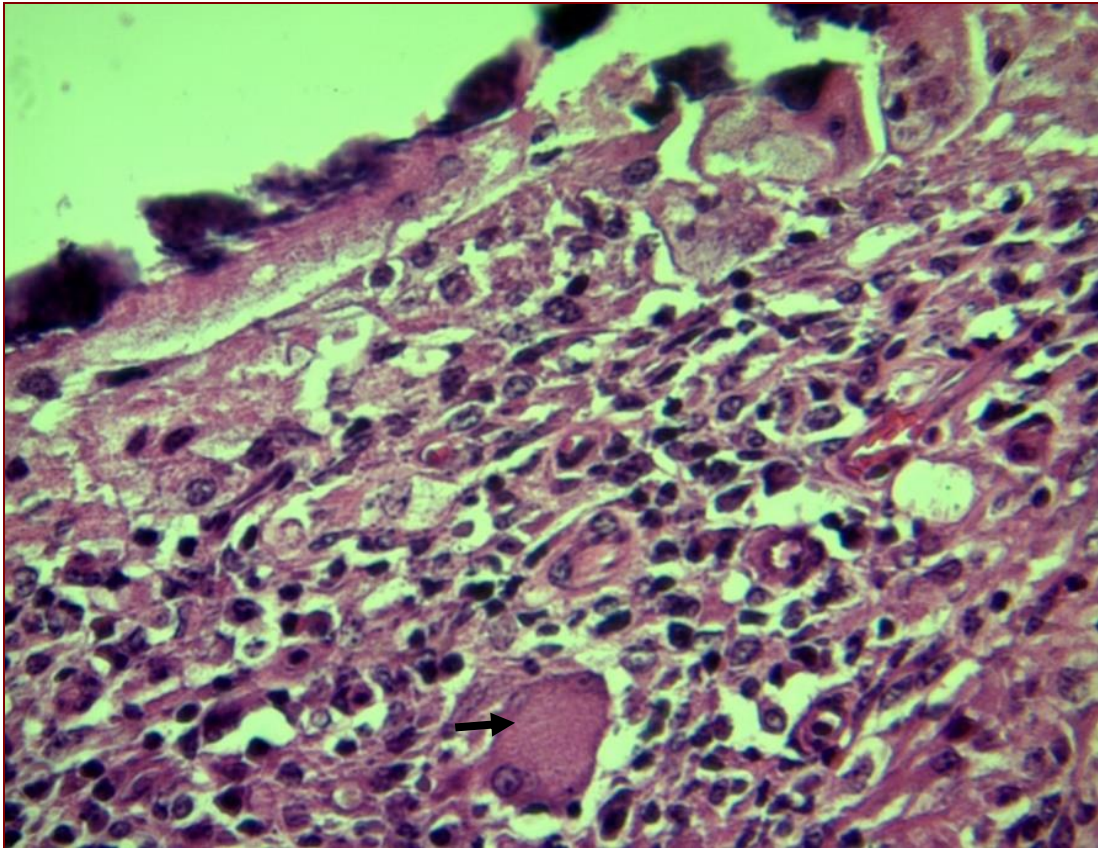




**Figura 7. Granuloma en nódulo linfático. Tinción H&E. 20x.**

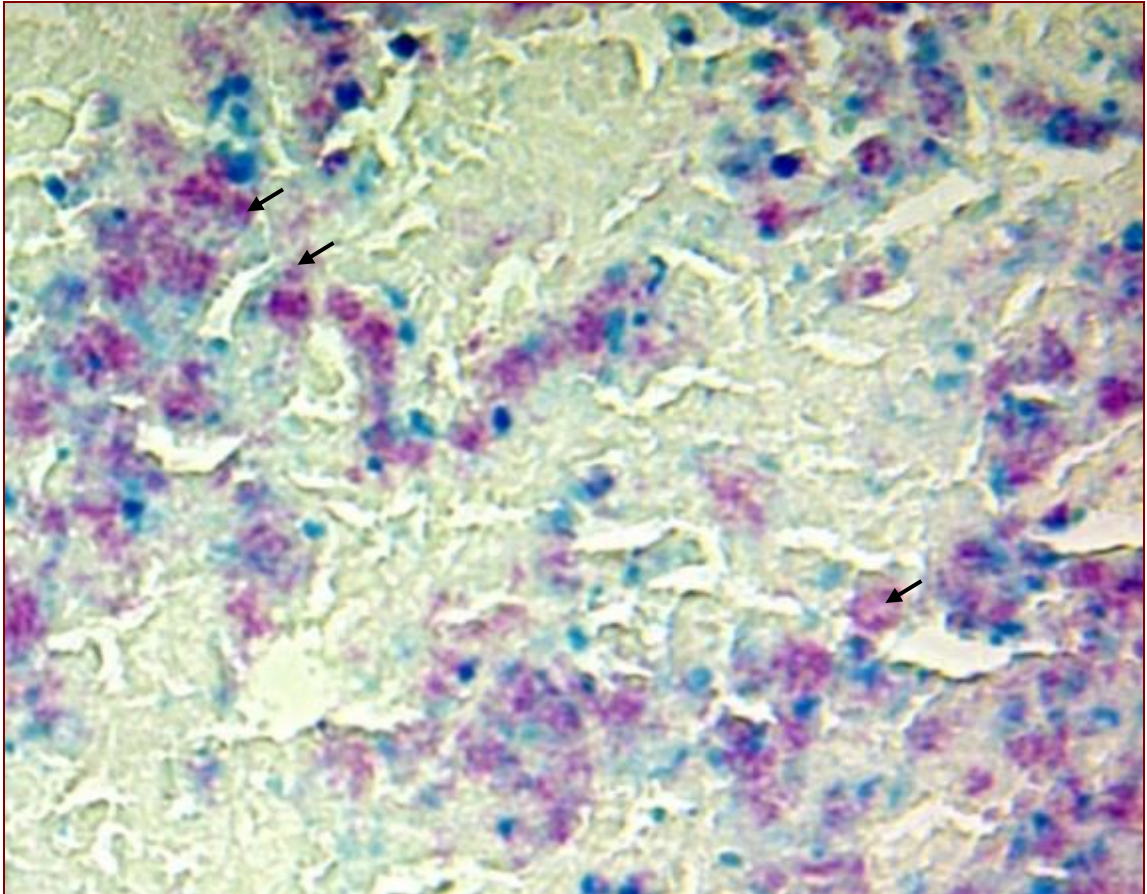


En la figura 8 se muestra con mayor claridad la presencia de células de Langhans (flecha negra) en la periferia del tejido necrosado.



**Figura 8. Células de Langhans. Tinción H&E. 100x.**

La siguiente imagen muestra un corte histológico ampliado a 40x decolorado con la tinción de Ziehl-Neelsen, presentando colonias BAAR de color rosa-violeta (flechas).



**Figura 9. Nódulo linfático. Tinción Ziehl-Neelsen positiva. 100x.**

## 6. ANÁLISIS DE RESULTADOS

### 6.1. Distribución de resultados acorde a la condición clínica del animal y prueba diagnóstica.

Se analizaron un total de 43 muestras de tejido linfoide obtenidos a partir de animales durante la inspección macroscópica en rastros TIF. Las 43 muestras se sometieron a los cuatro análisis diagnósticos del presente estudio. Las muestras fueron distribuidas en 8 procedentes de animales reactivos (positivos a la prueba de tuberculina) y 35 de animales obtenidos para inspección regular (CCR) o con linfadenopatía. La relación de resultados entre la condición clínica ya sea reactivos o CCR se muestra en la tabla 2.

Se realizaron 35 aislamientos de cepas del CMtb de las cuales 7 (7/8, 87.5%) correspondieron a animales reactivos y 28 (28/35, 80%) para animales de CCR. Solo en un animal reactor (1/8) (positivo a la prueba de tuberculina) no fue posible el aislamiento de bacterias del CMtb. De 28 animales CCR en 14 (14/28, 64.2%) se logró aislamiento puro de MTB y en 9 (9/28, 32.1%) se aisló MTB en conjunción con otras micobacterias, solo en 5 muestras (5/28, 17.9%) se encontraron bacterias que no correspondieron a *Mycobacterium bovis* (datos no mostrados).

Los análisis histopatológicos detectaron 38 animales con lesiones compatibles a granuloma de los 43 estudiados. La distribución acorde a la condición clínica fue 7/8 (87%) de animales reactivos y 31/35 (88.5%) de animales de CCR. Un animal del grupo de reactivos (1/8) resultó con lesiones no compatibles con granuloma mientras que de los animales con CCR 4 /35 (11.4%) resultaron negativos a lesiones granulomatosas.

El uso del PCR en tiempo real (PCR-rt) a partir de macerados de tejido linfoide de animales reactivos o con CCR arrojó 42 (97.7%) positivos de los 43 analizados. Una muestra procedente de un animal reactor resultó negativa a PCR-rt mientras que de 35 muestras de animales CCR todas las resultaron positivas a este proceso.

Del análisis complementario, realizado entre el cultivo con la metodología del BACTEC™ MGIT™ acoplado a la PCR-rt, se encontró que 36 muestras de 43 (83.7%) resultaron positivas y 7 (16.3%) negativas, siendo de las positivas un total de 7 muestras provenientes de animales reactivos (7/8, 87.5%) y 29 (29/35, 82.9%) de animales con

CCR; para los resultados negativos se obtuvieron un total de 7 muestras, una proveniente de animales reactivos (1/8, 12.5%) y 6 (6/35, 17.1% de animales con CCR.

**Tabla 2. Relación entre la condición clínica con los distintos métodos de análisis para detectar MTB en muestras de bovinos faenados en rastros remitidos al LCRN (2018)**

| Análisis                  | Resultado | Condición clínica        |                      | Total (%)    |
|---------------------------|-----------|--------------------------|----------------------|--------------|
|                           |           | Reactor                  | Regular <sup>1</sup> |              |
| Aislamiento               | +         | 7<br>(87.5) <sup>2</sup> | 28<br>(80.0)         | 35<br>(81.4) |
|                           | -         | 1<br>(12.5)              | 7<br>(20)            | 8<br>(18.6)  |
| Histopatología            | +         | 7<br>(87.5)              | 31<br>(88.6)         | 38<br>(88.3) |
|                           | -         | 1<br>(12.5)              | 4<br>(11.4)          | 5<br>(11.6)  |
| PCR-rt                    | +         | 7<br>(87.5)              | 35<br>(100)          | 42<br>(97.7) |
|                           | -         | 1<br>(12.5)              | 0<br>(0)             | 1<br>(2.3)   |
| BACTEC™ MGIT™ /<br>PCR-rt | +         | 7<br>(87.5)              | 29<br>(82.6)         | 36<br>(83.7) |
|                           | -         | 1<br>(12.5)              | 6<br>(17.1)          | 7<br>(16.3)  |
| Total (%)                 |           | 8<br>(18.6)              | 35<br>(81.4)         | 43<br>(100)  |

1.- Muestras obtenidas de animales sometidos a inspección en el rastro denominada “regular” y detectados con linfadenopatía.

2.- Porcentaje dentro de la condición clínica

De los datos anteriores a un nivel de confianza de 95% no se encontró diferencia estadística significativa entre la proporción de positivos ya sea de reactivos ( $X^2 = 0.88$ ,  $p = 0.82$ ) o animales en CCR ( $X^2 = 7.69$ ,  $p = 0.052$  con las pruebas diagnósticas. Datos similares fueron obtenidos bajo análisis de contingencia de  $X^2$  entre la condición clínica con la prueba diagnóstica de manera individual (Tabla 3).

**Tabla3.- Análisis comparativo entre las proporciones de animales positivos (%) con la condición clínica y el análisis diagnóstico empleado basado en Chi-cuadrada.**

| Valor                    | Análisis diagnóstico |                |        |                        |
|--------------------------|----------------------|----------------|--------|------------------------|
|                          | Aislamiento          | Histopatología | PCR-rt | BACTEC™ MGIT™ / PCR-rt |
| X <sup>2</sup> Calculada | 0.242                | 0.007          | 4.47   | 0.103                  |
| P                        | 0.6                  | 0.93           | 0.03   | 0.74                   |

## 6.2 Análisis comparativo de la sensibilidad de las pruebas diagnósticas para detectar *Mycobacterium bovis* en muestras con linfadenopatía de bovinos sacrificados en rastros remitidos al LCRN.

De las muestras analizadas fueron seleccionadas 18 muestras para delimitar los valores de sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivos (VPP) y valor predictivo negativo (VPN) de cada uno de los métodos diagnósticos. De estas muestras 9 fueron definidos como verdaderos positivos (animales enfermos) en base a que resultaron positivos al aislamiento con generación de colonias típicas de *Mycobacterium bovis* y que subsecuentemente fueron identificados como positivos en la PCR-rt y BACTEC™+PCR-rt los cuales emplean oligonucleótidos y sondas específicas de MTB. Los resultados de estos análisis en conjunto con la prevalencia real, prevalencia aparente, análisis de J – Youden y la fiabilidad de las pruebas empleadas se muestran en la tabla 4. Acorde a estos datos y análisis, la PCR-rt a partir de macerados sin aislamiento mostró la mayor sensibilidad con 88.9%, seguido del uso de BACTEC™+PCRrt con 55.6%. La aplicación de la histopatología a muestras con linfadenopatía mostró 44.4% de sensibilidad seguido de 22.2% la condición clínica. Todos los análisis de diagnóstico mostraron una especificidad de 88.9%. No obstante, el valor predictivo positivo (VPP) de las pruebas fue de 88.9%, 83.3%, 80.05% y 66.7% para PCR-rt, BACTEC™+PCRrt, Histopatología y la condición clínica, respectivamente. Por otra parte, el análisis arrojó que el valor predictivo negativo (VPN) de las pruebas fue de 88.9% PCR-rt a partir de macerados, 66.7% para el aislamiento con BACTEC™ y uso de PCR-rt, 61.5% para el análisis de histopatología y de 53.3% basado en la condición clínica del animal.

El cálculo del índice de Youden (J-Youden), para calcular el rendimiento de una prueba de diagnóstico (Youden WJ, 1950), mostró valores de 77.8% para la PCR-rt a partir de macerados de tejido linfadenopático, mientras que a partir de esas mismo muestras BACTEC™ + PCR-rt, Histopatología y la condición clínica arrojaron valores de 44.4%, 33.3% y 11.1%, respectivamente. El cálculo de fiabilidad de la prueba mostró valores decrecientes de 88.9% para la PCR-rt a partir de macerados, 72.2% para BACTEC™+PCR-rt, 66.7% para la histopatología y de 55.6% para la condición clínica.

**Tabla 4.- Análisis comparativo entre la proporción de animales positivos a *Mycobacterium bovis* con la sensibilidad de la prueba diagnóstica en muestras con linfadenopatía de bovinos sacrificados en rastros remitidos al LCRN.**

|               | Condición clínica             | Histopatología               | BACTEC™+PCR-rt               | PCR-rt                       |
|---------------|-------------------------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|
| Sensibilidad  | <b>22.2</b><br>(-13.5, 57.9)  | <b>44.4</b><br>(1.8, 87.1)   | <b>55.6</b><br>(12.9, 98.2)  | <b>88.9</b><br>(61.9, 115.9) |
| Especificidad | <b>88.9%</b><br>(61.9, 115.9) | <b>88.9</b><br>(61.9, 115.9) | <b>88.9</b><br>(61.9, 115.9) | <b>88.9</b><br>(61.9, 115.9) |
| VPP           | 66.7%<br>(-3.4, 136.8)        | 80.0<br>(33.9, 126.1)        | 83.3<br>(44.1, 122.5)        | 88.9<br>(61.9, 115.9)        |
| VPN           | 53.3%<br>(20.2, 86.5)         | 61.5<br>(26.8, 96.3)         | 66.7<br>(31.6, 101.7)        | 88.9<br>(61.9, 115.9)        |
| J Youden      | 11.1%<br>(-33.6, 55.9)        | 33.3<br>(-17.1, 83.8)        | 44.4<br>(-6.0, 94.9)         | 77.8<br>(39.6, 115.9)        |
| Fiabilidad    | 55.6%<br>(25.4, 85.7)         | 66.7<br>(38.0, 95.3)         | 72.2<br>(45.0, 99.4)         | 88.9<br>(69.8, 108.0)        |

\*Los valores de la tabla se represen en porcentaje.

VPP : Valor Predictivo Positivo

VPN: Valor Predictivo Negativo

La concordancia existente entre el aislamiento de MTB con las pruebas de diagnóstico usadas fue calculada mediante el coeficiente kappa de Cohen para ajustar el efecto del azar acorde a la proporción observada (Blas *et al.*, 2006, Smeeton N.C. 1985). Este calculó determinó una concordancia adecuada (0.778) para PCR-rt y moderada (0.444) para BACTEC™ + PCRrt, pero débil (0.333) para la histopatología y escasa (0.111) para la condición clínica (Tabla 5).

**Tabla 5.- Nivel de concordancia entre el aislamiento con pruebas de diagnóstico.**

|                    | <b>PCR-rt</b> | <b>BACTEC™ + PCRrt</b> | <b>Histopatología</b> | <b>Condición Clínica</b> |
|--------------------|---------------|------------------------|-----------------------|--------------------------|
| Coefficiente kappa | 0.778         | 0.444                  | 0.333                 | 0.111                    |
| Rango              | Adecuado      | Moderado               | Débil                 | Escaso                   |

## 7. DISCUSIÓN

Las infecciones asociadas a bacterias del complejo tuberculosis (CMT) continúan como uno de los principales problemas de salud pública y animal, especialmente en áreas endémicas y en países de bajo ingreso económico. Acorde a lo observado en el presente estudio, se confirma y ratifica el carácter endémico del CMT en bovinos de la zona noreste de México (Millian-Suazo, 2018). Dado el comportamiento biológico de la infección la detección y el diagnóstico del CMT, particularmente para *Mycobacterium tuberculosis* (MTB), continua como uno de los retos primarios debido al carácter re-emergente de la enfermedad y también al hecho de que los sistemas de vigilancia de la salud humana y animal no se adoptan e integran para diagnosticar la infección (Sweetline, A. *et al.*, 2017). En el presente trabajo prácticamente todos los bovinos inmunoreactores a *Mycobacterium bovis* fueron positivos a las pruebas de diagnóstico empleadas, sin embargo, también fue revelado que una gran proporción mayor a 80% de bovinos destinados al monitoreo (matanza regular) resultaron positivos a *Mycobacterium bovis*. El cultivo en sólido de micobacterias continua como la prueba de referencia en el diagnóstico microbiológico de la enfermedad y de posibles infecciones asociadas por micobacterias atípicas o no pertenecientes al CMT (Samper y González-Martín, 2018). La posibilidad de seleccionar colonias con características fenotípicas de bacterias del CMT y su subsecuente caracterización microbiológica y molecular aumentan la sensibilidad de la detección específica (Cruciani, M. *et al.*, 2004), lo cual fue detectado en el presente trabajo. No obstante, acorde a lo observado, se requieren al menos 2-3 semanas y hasta 24 semanas para descartar la presencia bacterias del CMT. Tal situación, puede comprometer la eficacia de los sistemas de vigilancia e interpretación de la epidemiología de las infecciones por *Mycobacterium bovis*. En el año 2007 la OMS certificó y recomendó el uso de los medios líquidos para el diagnóstico e identificación de bacterias del complejo *Mycobacterium tuberculosis* (CMT) en países de bajo y medio ingreso (WHO, 2007). Sin embargo, no deja de ser importante el cultivo en medio sólido ya que permite ver la morfología de la colonia, reconocer la presencia mixta de cepas y permite cuantificar el crecimiento, sobre todo ante la evidencia de que algunas cepas del CMT solo se multiplican en el medio sólido; por ello, la recomendación es



realizar al mismo tiempo los cultivos sólido y líquido (Samper, 2018; Azevedo-Issa *et al.*, 2017). Por otra parte se ha descrito una relación positiva entre el uso de medios líquidos comerciales (BACTEC™) y sólidos con los métodos de detección molecular basado en PCR lo cual aumenta la velocidad, sensibilidad y fiabilidad del diagnóstico (Heifets H. *et al.*, 2000; Pfyffer *et al.*, 1997, Kanchana *et al.*, 2000). En el presente trabajo se concuerda parcialmente a estas observaciones dada la sensibilidad, valor predictivo positivo (VPP), índice de Youden, nivel de concordancia entre las pruebas y el análisis comparativo de los animales afectados con las pruebas diagnósticas empleadas (Heifets H. *et al.*, 2000; Soares-Filho *et al.*, 2019; Jung-Jung *et al.*, 2016). No obstante, estas observaciones pueden estar sesgadas y relacionadas con una multitud de factores entre los que destacan la población seleccionada para estudio, la prevalencia de la enfermedad en la región, imprecisiones inherentes de cada técnica y su ejecución entre otras (Downs S.H. *et al.*, 2018; Mekonnen, G. A. *et al.*, 2019). En el presente estudio, la definición de animales o tejidos con (verdaderamente infectados) o sin (verdaderamente no infectados) la presencia de bacterias del CMT aparentemente fue un factor decisivo para obtener los resultados aquí señalados. Probablemente, en estudios clínicos controlados los parámetros puedan tener variaciones ligeras en los detectados en el presente estudio en una población de riesgo o con sospecha de infección. Para el aislamiento primario de *Mycobacterium bovis* es significativamente influenciada por el medio de cultivo, el proceso de descontaminación de las muestras y el tiempo de incubación (Corner *et al.* 2012; de Azevedo-Issa *et al.*, 2017). En el presente trabajo se observó una relativa baja proporción de muestras positiva al cultivo líquido pero negativa a *Mycobacterium bovis* en el análisis de la PCR-rt. Este factor fue importante en la relativa baja sensibilidad (55%) calculada de este método versus PCR-rt acoplado a macerado de tejidos (88.9%). Esto se debió tal vez a las características del medio líquido dado que permite el crecimiento de bacterias del CMT y a los criterios de diagnóstico establecidos por el fabricante (Heifets H. *et al.*, 2000), de tal modo que ante la detección positiva es necesario confirmar con PCR-rt. No obstante, la interpretación y el uso de estos datos deben de considerarse con precaución dado el posible sesgo inherente, señalado con anterioridad, del presente estudio.

## 8. CONCLUSIONES

En comparación con los procesos de diagnóstico empleado la prueba de PCR tiempo real realizada a partir de macerados mostró la mayor sensibilidad para detectar animales infectados con *Mycobacterium bovis*.

No existe diferencia estadística significativa entre la condición clínica de los animales y la proporción animales detectados con las pruebas de diagnóstico empleados.

La PCR-rt a partir de macerados procedente de tejido linfadenopático bovino reveló mayor fiabilidad para detectar animales positivos a *Mycobacterium bovis*.

La PCR-rt mostró la mayor concordancia con el aislamiento positivo a *M. bovis* que las otras pruebas empleadas. No obstante, la selección de colonias a partir del medio sólido con características fenotípicas de *M. bovis* aparentemente influyó en este resultado.

Si bien el uso del sistema BACTEC™ aparentemente contribuye a agilizar los resultados se observó una relativa baja proporción de muestras que resultan no compatibles con *M. bovis* por lo que afectó a la fiabilidad, y a los VPP y VPN de este método.

En las muestras bovinas con linfadenopatía procesadas en rastros ocurre la presencia de otras micobacterias que no corresponden con *M. bovis*, lo cual puede afectar la precisión diagnóstica y su uso y aplicación en estudios epidemiológicos y de control de la tuberculosis bovina.

En determinadas circunstancias es necesario aplicar todos los procesos diagnósticos aquí analizados para reconocer a animales portadores de *M. bovis*.

## 9. LITERATURA CITADA

- Alderwick, Luke J, James Harrison, Georgina S Lloyd, y Helen L Birch. 2015. “The Mycobacterial CellWall—Peptidoglycan and Arabinogalactan Luke”. *Cold Spring Harb Parspect Med* 5(8): 1–15.
- Anne, N. S., Ronald, B. S. M., Kumar, T. S., Kannan, P., & Thangavelu, A. (2017). Molecular identification of Mycobacterium tuberculosis in cattle. *Veterinary microbiology*, 198, 81-87.
- Blas I, Ruiz-Zarzuela I, Vallejo A. **WinEpi : Working in epidemiology. An online epidemiological tool.** *ISVEE 11: Proceedings of the 11th Symposium of the International Society for Veterinary Epidemiology and Economics*, Cairns (Australia), August 6-11 2006. Theme 4 - Tools & training for epidemiologists: Poster session session, 2006; 800
- Cardona, P. J. (2018). Patogénesis de la tuberculosis y otras micobacteriosis. *Enfermedades infecciosas y microbiología clinica*, 36(1), 38-46.
- Chiaradia, L., Lefebvre, C., Parra, J., Marcoux, J., Burlet-Schiltz, O., Etienne, G., ... & Daffé, M. (2017). Dissecting the mycobacterial cell envelope and defining the composition of the native mycomembrane. *Scientific reports*, 7(1), 12807.
- Clifford, J. & Delgadillo Álvarez, J. B. “Plan estratégico conjunto entre Estados Unidos - México para la colaboración en tuberculosis bovina 2013-2018”. : 1–26.
- Corner, L. A., O’meara, D., Costello, E., Lesellier, S., & Gormley, E. (2012). The distribution of Mycobacterium bovis infection in naturally infected badgers. *The Veterinary Journal*, 194(2), 166-172.
- Cousins, D. V. (2012). “Tuberculosis Bovina”. En línea. [http://www.oie.int/fileadmin/Home/esp/Health\\_standards/tahm/2.04.06\\_BOVINE\\_TB.pdf](http://www.oie.int/fileadmin/Home/esp/Health_standards/tahm/2.04.06_BOVINE_TB.pdf) (el 8 de noviembre de 2017).
- Cruciani M, Scarparo C, Malena M, Bosco O, Serpelloni G, Mengoli C. (2004) Meta-analysis of BACTEC MGIT 960 and BACTEC 460 TB, with or without solid media, for detection of mycobacteria. *J Clin Microbiol*. 42:2321-5.
- Delgadillo Medrano, Joel. (2017). “Evaluación de técnicas bacteriológicas para el aislamiento de Mycobacterium bovis en tejidos bovinos”. Universidad Autónoma de Nuevo León. <http://eprints.uanl.mx/14461/>.

- DOF. NOM-031-ZOO-1995. Campaña nacional contra la Tuberculosis Bovina (*Mycobacterium bovis*). En línea: <https://www.gob.mx/senasica/documentos/nom-031-zoo-1995>
- DOF. NOM-056-1995. Especificaciones técnicas para las pruebas diagnósticas que realicen los laboratorios de pruebas aprobados en materia zoosanitaria. En línea: <https://www.gob.mx/senasica/documentos/nom-056-zoo-1995>
- Downs, S. H., Parry, J. E., Upton, P. A., Broughan, J. M., Goodchild, A. V., Nunez-Garcia, J., ... & de la Rua-Domenech, R. (2018). Methodology and preliminary results of a systematic literature review of ante-mortem and post-mortem diagnostic tests for bovine tuberculosis. *Preventive veterinary medicine*, 153, 117-126.
- Duque, A., Lin, S. Y. G., Desmond, E., Rienthong, S., Rienthong, D., & Boonin, C. (2013). Evaluation of the BD Bactec MGIT 320 system for detection of mycobacteria and drug susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of clinical microbiology*, 51(10), 3403-3405.
- García, Patricia et al. 2017. “Evaluación de la técnica Xpert® MTB/RIF para la detección de *Mycobacterium tuberculosis* complex en muestras extra-pulmonares”. *Revista chilena de infectología* 34(4): 333–39.
- Gormley E, Corner LA (2013) Control strategies for wildlife tuberculosis in Ireland. *Transbound Emerg Dis* 60(Suppl 1):128–135
- Heifets H. et al., 2000. Two liquid Medium Systems, Mycobacteria Growth Indicator tube and MB redox tube, for *mycobacterium tuberculosis* isolation from sputum specimens. *Journal of clinical microbiology*: 1227-1230
- Issa, M. D. A., Soares Filho, P. M., Fonseca Júnior, A. A., Hodon, M. A., Santos, L. C. D., Reis, J. K. P. D., & Cerqueira Leite, R. (2017). Comparative study of *Mycobacterium bovis* primary isolation methods. *brazilian journal of microbiology*, 48(1), 139-144.
- Kanchana, M. V., Cheke, D., Natyshak, I., Connor, B., Warner, A., & Martin, T. (2000). Evaluation of the BACTEC™ MGIT™ 960 system for the recovery of mycobacteria. *Diagnostic microbiology and infectious disease*, 37(1), 31-36.
- Koneman, E, O Giovanniello, D Klajn, y M Preciado. 2008. “Diagnostico Microbiológico: texto y atlas en color.”, *Madrid España*. 197p: 1691.

- Lozano, José Antonio. (2002). “Tuberculosis . Patogenia , diagnóstico y tratamiento”. *Elsevier* 21(8): 11–194.
- Marcano-Vásquez, M. E., Ramírez, I. A., Mata-Jardín, D., Josefina, O., & Fernández-Figueiras, S. (2016). “Comparación del sistema BacT/ALERT® 3D con los métodos de cultivo Lowenstein-Jensen y Ogawa-Kudoh para el aislamiento de micobacterias.” *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología* 36(1): 4–9.
- Mekonnen, G. A., Ameni, G., Wood, J. L., Berg, S., & Conlan, A. J. (2019). Network analysis of dairy cattle movement and associations with bovine tuberculosis spread and control in emerging dairy belts of Ethiopia. *BMC veterinary research*, 15(1), 262.
- Milián Suazo, Feliciano et al. (2018). “Diversidad genética y distribución regional de cepas de *Mycobacterium bovis* del ganado en México”. *Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias* 3(4): 459–71.
- Murray, Patrick, Ken Rosenthal, y Michael Pfaller. (2016). Elsevier España *Microbiología medica*. 8th ed. Elsevier España, S.L.U.
- Organización Panamericana de la Salud. (2008). “Manual Para El Diagnóstico Bacteriológico De La Tuberculosis”. : 50–54. [http://www.sld.cu/galerias/pdf/sitios/tuberculosis/tb-labs-cultivo\[2\].pdf](http://www.sld.cu/galerias/pdf/sitios/tuberculosis/tb-labs-cultivo[2].pdf).
- Pfyffer, G. E., Welscher, H. M., Kissling, P., Cieslak, C., Casal, M. J., Gutierrez, J., & Rüsch-Gerdes, S. (1997). Comparison of the *Mycobacteria* Growth Indicator Tube (MGIT) with radiometric and solid culture for recovery of acid-fast bacilli. *Journal of clinical microbiology*, 35(2), 364–368.
- Robbe-Austerman, S., Bravo, D. M., & Harris, B. (2013). Comparison of the MGIT 960, BACTEC 460 TB and solid media for isolation of *Mycobacterium bovis* in United States veterinary specimens. *BMC veterinary research*, 9(1), 74.
- Rovid, S. A., Roth, J. A., & Galyon, J. (2010). Enfermedades emergentes y exóticas de los animales. Iowa (Estados Unidos: The Center for Food Security & Public Health.)
- Samper, Sofía, y Julià González-Martin. (2018). “Diagnóstico microbiológico de las infecciones causadas por el género *Mycobacterium*”. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica* 36(2): 104–11. <http://dx.doi.org/10.1016/j.eimc.2017.11.009>.

- SENASICA, 2019. Reconocimientos internacionales en Tuberculosis Bovina. En línea: <https://www.gob.mx/senasica/documentos/reconocimientos-internacionales-en-tuberculosis-bovina?idiom=es>
- SENASICA, 2019. Situación actual de la Tuberculosis Bovina. En línea: <https://www.gob.mx/senasica/documentos/situacion-actual-de-tuberculosis-bovina?state=published>
- Soares Filho, P. M., Ramalho, A. K., de Moura Silva, A., Hodon, M. A., de Azevedo Issa, M., Júnior, A. A. F., ... & Leite, R. C. (2019). Evaluation of post-mortem diagnostic tests' sensitivity and specificity for bovine tuberculosis using Bayesian latent class analysis. *Research in veterinary science*, 125, 14-23.
- Surat, Güzin, William A Wallace, Ian F Laurenson, y Amie-Louise Seagar. (2014). "Rapid real-time PCR for detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex DNA in formalin-fixed paraffin embedded tissues: 16% of histological 'sarcoid' may contain such DNA". *Journal of Clinical Pathology* 67(12): 1084–87. <http://jcp.bmj.com/lookup/doi/10.1136/jclinpath-2014-202307>.
- Teran, Rommy, y Jacobus H. De Waard. (2015). "Recientes avances en el diagnóstico de tuberculosis en el laboratorio clínico." *eJIFCC* 26(4): 310–25. <http://www.ifcc.org/media/334117/eJIFCC2015Vol26No4pp310-325.pdf>.
- Thakur, Mukesh Kumar, Dharmender Kumar Sinha, y Bhoj Raj Singh. (2016). "Evaluation of complementary diagnostic tools for bovine tuberculosis detection in dairy herds from India". *Veterinary World* 9(8): 862–68.
- Smeeton, N.C. (1985). «Early History of the Kappa Statistic». *Biometrics* 41: 795.
- Soares Filho, P. M., Ramalho, A. K., de Moura Silva, A., Hodon, M. A., de Azevedo Issa, M., Júnior, A. A. F., ... & Leite, R. C. (2019). Evaluation of post-mortem diagnostic tests' sensitivity and specificity for bovine tuberculosis using Bayesian latent class analysis. *Research in veterinary science*, 125, 14-23
- World Health Organization. Use of liquid TB culture and drug susceptibility testing (DST) in low and medium income settings. Summary report of the expert group meeting on the use of liquid culture media. Geneva, Switzerland: WHO; 2007.
- Youden W.J. (1950). Index for rating diagnostic tests. *Cancer*. 3:32–35.

Yu Jung Jung et al. 2016. "Evaluation of three real-time PCR assays for differential identification of *Mycobacterium tuberculosis* Complex and nontuberculous mycobacteria species in liquid culture media.

## 10. ANEXOS

### **SOP-MB-0080. Detección de las especies del Complejo *Mycobacterium tuberculosis* mediante PCR Tiempo real.**

#### Propósito

El propósito de este Procedimiento Operativo Estándar (Por sus siglas en inglés, SOP) es el de proveer las instrucciones para desempeñar correctamente la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) sobre las muestras deseadas, utilizando los reactivos para la PCR Tiempo real. En este SOP se anexan instrucciones para la realización de un segundo ensayo de PCR Tiempo real para confirmar cualquier resultado falso negativo obtenido en el primer ensayo. El diagnóstico de las especies del Complejo Mtb, es utilizado en los Laboratorios Veterinarios del Servicio Nacional (NVSL) de los Estados Unidos de América (USA) como un complemento para la realización de exámenes de laboratorio para la detección de *M. bovis* en conjunto con los exámenes estándar de patología enviados del rastro.

El análisis ubica la presencia de dos objetivos: la presencia de un control interno, (es decir, el ADN diana) el cual debería estar presente en todas las muestras (Quasar 670® fluorescente tipo Cy5) y debe estar coordinado para la detección del ADN de *M. bovis*. En ambos casos, el sistema detecta los productos del PCR utilizando la actividad de la nucleasa 5' del ADN Polimerasa en pruebas con ADN fluorogénico. Cuando la sonda está intacta, el colorante se une a la cadena 3' y reduce la emisión de fluorescencia del colorante unido a la cadena terminal 5'. Si la secuencia diana está presente, la sonda se une al objetivo y es cortado por la ADN polimerasa, separando al marcador del objetivo, permitiendo que sea detectado.

#### Precauciones de seguridad.

- Solo aquellas personas que han sido debidamente capacitadas para trabajar con microorganismos en laboratorios de bioseguridad nivel 2 (BSL-2) o 3 (BSL-3) podrán manejar los cultivos. Se deberá mantener continuamente la capacitación.
- Es obligatorio utilizar el equipo de protección personal adecuado para abordar las instalaciones. De preferencia, se debe mantener bajo seguimiento las recomendaciones del Centro de Control de Enfermedades (CDC).



## Procedimiento

Preparación y almacenamiento de conjuntos de oligonucleótidos y sondas.

Los conjuntos de sondas de los oligonucleótidos se pueden mandar a desarrollar a Integrated DNA Technologies; se ordenan como "PrimerTime® XL qPCR Assay" y "HPLC Purification".

- Resuspender los conjuntos de sondas de los primers en 1,25 mL 0,1x TE buffer; remueva la suspensión a un tubo de polipropileno más grande y agregue 1.25 mL adicionales de 0.1x TE buffer para hacer una solución madre de 20X de sonda (Primers = 0.01 nmoles de solución madre; sonda = 0.005 nmoles de solución madre).
- Hacer alícuotas de 500 L en tubos de microcentrífuga de 1,5 mL; almacenar a > -15 °C en un recipiente envuelto en papel de aluminio.
- Según sea necesario, retire una alícuota de 500 L y descongele en hielo; hacer partes de alícuotas de 50 L en tubos de PCR de 0,5 mL; guarde los tubos en el plato envuelto en papel de aluminio a > -15 °C.
- El conjunto de sondas de primers de extracción de ADN Control 670 está en un vial marrón impermeable a la luz, este debe ser almacenado a > -15°C.

Selección del conjunto de sondas de primer para la reacción de PCR.

- Si detecta el Complejo MTb, de preferencia, utilice la sonda IS1081\_3 ya que este conjunto de primers parece tener una sensibilidad ligeramente superior en la fase de validación temprana y se usó en la validación de campo del ensayo (Tabla 3).
- Si detecta *M. bovis*, use de preferencia la sonda L3 (Tabla 2).
- Otros conjuntos de sondas de imprimación enumerados (Tabla 2 y 3) están disponibles para esclarecer muestras problemáticas, evaluar posibles problemas de contaminación, problemas de reactivos, etc., siempre que se mantenga la documentación adecuada. Las series IS1081, IS 6110 y extRD9 detectan ADN en todo el complejo de *M. tuberculosis* (MTBC), mientras que LpqT, L2 y L3 solo detectan *M. bovis*.

**Tabla 6. Set de primers para *M. bovis***

| Nombre               | F: Forward<br>R: Reverse<br>P: Probe | Secuencia  | Temperatura          | Tamaño<br>del<br>amplicon |
|----------------------|--------------------------------------|--|----------------------|---------------------------|
| LpqT                 | IpqT_F<br>IpqT_R<br>IpqT_P           | ACGAATCCGGCGATGATC<br>CGACTGCACACCTGGAA<br>TTGGCCGGCGCCGGTT          | 65.2<br>65<br>73.2   | 140 bp                    |
| Locus 2<br>(L2)      | Locus2_F<br>Locus2_R<br>Locus2_P     | CGCCTTCCTAACCAGAATTG<br>CCCCGTAGCGTTACTGAGAA<br>AACACTCTTGGAGTGGCCTA | 64.1<br>66.3<br>66.4 | 161 bp                    |
| Locus<br>3NN<br>(L3) | Locus3_F<br>Locus3_R<br>Locus3_Pnew  | ATCAGCAGCGATGTGAGCAT<br>GACGGCTACCGGCAAGAC<br>CGGATGATTGCCAGCGGTTTGC | 67.9<br>71<br>64.6   | 110 bp                    |

**Tabla 7. Set de primers para MTBC**

| Nombre   | F: Forward<br>R: Reverse<br>P: Probe | Secuencia   | Temperatura<br>(°C) | Tamaño<br>del<br>amplicon |
|----------|--------------------------------------|---|---------------------|---------------------------|
| IS1081_1 | IS1081_F1                            | GGCTGCTCTCGACGTTTCATC   | 67.4                | 100 bp                    |
|          | IS1081_R1                            | CGCTGATTGGACCGCTCAT   | 67.7                |                           |
|          | IS1081_P1                            | CTGAAGCCGACGCCCTGTGC  | 71.7                |                           |
| IS1081_2 | IS1081_F2                            | CTATTTCCCGGACTGGCTGC  | 67.5                | 94 bp                     |
|          | IS1081_R2                            | AGTGGATACTCCCAGCAGGT  | 67.7                |                           |
|          | IS1081_P2                            | CGAGCTGAACGCGCACTGACC   | 71.6                |                           |
| IS1081_3 | IS1081_F3                            | GAGGGCTACCGAGAGATCCT  | 66.9                | 84 bp                     |
|          | IS1081_R3                            | GACCAGGTCGCGGAAGAA  | 66.8                |                           |
|          | IS1081_P3                            | TCCAGGTCACCTCCGCCGAG  | 71.7                |                           |
| IS6110_1 | IS6110_F1                            | CAGGACCACGATCGCTGATC  | 67                  | 122 bp                    |
|          | IS6110_R1                            | CTGCCCAGGTCGACACATAG  | 66.8                |                           |
|          | IS6110_P1                            | CGTCCCGCCGATCTCGTCCA  | 72                  |                           |
| IS6110_2 | IS6110_F2                            | CACATCGATCCGGTTCAGC   | 67.5                | 99 bp                     |
|          | IS6110_R2                            | TCGTCTCGGCTAGTGCATTG  | 67.2                |                           |
|          | IS6110_P2                            | TCGGTCGGAGCGGTTCGGAAG   | 71.9                |                           |
| IS6110_3 | IS6110_F3                            | CGGCCTATACAAGACCGAGC  | 66.8                | 72 bp                     |
|          | IS6110_R3                            | GTGGCCAACTCGACATCCTC  | 67.3                |                           |
|          | IS6110_P3                            | TCAAACCCGGCAAGCCCTGG  | 71.9                |                           |
| Ext-RD9  | Ext-RD9_F                            | GCCACCACCGACTCATAC<br><br>CGAGGAGGTCATCCTGCTCTA<br><br>G+TT+CTTCAG+CTGGT+CC | 64.9                | 68 bp                     |
|          | Ext-RD9_R                            |   | 67.2                |                           |
|          | Ext-RD9_P                            |   | 59.9/73.5           |                           |

Preparación de la mezcla de reacción de PCR y la placa de reacción.

Mezcla de reacción del Complejo MTb y configuración de la placa.

Utilice los siguientes datos para introducir a la placa.

- Agregue su nombre a la entrada de Nombre de Técnico de qPCR.
- Ingrese el número de volúmenes adicionales para el error de pipeteo
- Ingrese el nombre del archivo donde la máquina ViiA7 almacenará los datos con el siguiente formato: YYMMDD\_ <Run #> \_ MTBC.
- Verifique que los números de lote sean correctos y firme la entrada para dar fe de esto

Puntos críticos de control:

Para evitar la contaminación cruzada de los reactivos, la punta de la pipeta debe ser reemplazada por una nueva cada vez que se extraiga una alícuota de un vial de reactivo. Todos los reactivos y tubos de microcentrífuga deben mantenerse en hielo en todo momento. Los pasos deben ser realizados en una estación de trabajo de flujo de aire laminar vertical de PCR.

- Usando la pipeta apropiada con una punta de pipeta con punta de filtro, pipetee los reactivos de PCR necesarios en un tubo de microcentrífuga estéril de 1,5 mL. El volumen de cada reacción es de 20 L. Una placa completa (96 reacciones) con un volumen adicional generará 1445 L de volumen total.
- La mezcla anterior debe ser agitada en el vórtex para posteriormente pipetear 15 µL en cada pocillo, llenando primero la fila A, luego la B, etc. Nota: siempre agregue un volumen a la esquina inferior derecha para el control positivo de *M. bovis*.
- Pipetee 5 µL de ADN extraído en el pozo apropiado.

Puntos críticos de control:

La cubierta adhesiva debe sellar completamente todos los pozos. Asegúrese de que todos los pozos en los bordes exteriores estén completamente sellados antes de colocarlos en la máquina ViiA7. Las reacciones deben realizarse después de configurar la placa; No almacene la placa para su uso posterior.

- Cubra la placa con una cubierta adhesiva óptica.

- Mantenga la placa en hielo hasta que esté lista para cargar en la máquina. Nota: puede configurar la placa de PCR unas horas antes y cargar el ADN una vez finalizada la extracción.

Mezcla de reacción específica y configuración de placa de *M. bovis* (L3)

Puntos críticos de control:

- Todos los reactivos y tubos de microcentrífuga deben mantenerse en hielo en todo momento.
- Realice los pasos en una estación de trabajo de flujo de aire laminar vertical de PCR.
- Usando la pipeta apropiada equipada con una punta de pipeta con punta de filtro, pipetee los reactivos de PCR necesarios en un tubo de microcentrífuga estéril de 1,5 mL. El volumen de cada reacción es de 20 L.
- Agite en vórtex la mezcla de reacción y pipetee 15 µL en cada pocillo, llenando primero la fila A.
- Encuentra la placa de ADN extraída de la ejecución anterior; pipetee 5 µL de ADN extraído del pocillo apropiado en la placa L3 adecuada.

Puntos críticos de control:

La cubierta adhesiva debe sellar completamente todos los pozos. Asegúrese de que todos los pozos en los bordes exteriores estén completamente sellados antes de colocarlos en la máquina ViiA7. Las reacciones deben realizarse después de configurar la placa; No almacene la placa para su uso posterior.

- Cubra la placa con una cubierta adhesiva óptica.
- Cargue la placa L3 en la máquina.

Operación de la máquina ViiA7.

La plantilla MTBC Direct se configura con los siguientes parámetros:

- Bloque rápido de 96 pocillos (0,1 ml)
  - Curva estándar
  - Reactivos Taqman®
  - Propiedades estándar
- b) Dye Reporteros

El MTBC Direct es el reportero de FAM

ii. El IC es el reportero de Cy5.

iii. Referencia pasiva = ROX.

c) El perfil del ciclo térmico es el siguiente:

Etapas 1 = 50.0 / 2: 00, 1 ciclo

ii. Etapas 2 = 95.0 / 10: 00, 1 ciclo

iii. Etapas 3 = 95.0 / 0: 15, 60.0 / 1: 00, 40 ciclos

iv. Volumen de muestra = 20 µl

Introduzca un nombre de placa.

Nota: el uso de la máquina ABI 7500 es válido; la configuración del programa es ligeramente diferente a la máquina ViiA7; Solicite asistencia a un microbiólogo experto o a un técnico competente.

Preparación del informe y análisis de datos.

Reacción MTBC.

- Prepare los archivos de datos para el informe.
- Compruebe los valores Ct para el IC; estos deben estar entre 25 y 38.2; la página de resultados determinará automáticamente las muestras como "Inhibidas" si el valor IC Ct está fuera de estos valores.
- Alterne el botón "U = Indeterminado" cerca de la parte superior del formulario.
- Si una muestra que no sea de Controles Positivos es Positiva, haga clic en la celda junto a la muestra en la columna "L3 (X)"; El ADN de estas muestras debe analizarse con el conjunto de primer / sonda L3; Notificar a un líder del equipo el resultado.
- Si una muestra es "U" para Bovis e IC, la reacción se inhibe; verifique la columna "Rehacer (X)"; estas muestras se deben volver a extraer y probar con el conjunto de sondas de cebador.
- Para que la ejecución sea válida, la media de los controles positivos debe tener un valor Ct para MTBC dentro del rango especificado por la hoja de datos de reactivos específicos del lote.
- Para que la ejecución sea válida, todos los controles negativos deben tener una "U" para MTBC.

#### Procedimientos de Control de Calidad.

- No utilice reactivos caducados.
- Criterios para determinar una ejecución válida:
- El control positivo MBD-POS (*M. bovis*) y la media de los controles MTD-POS (MTBC) están dentro del rango especificado por la hoja de datos de reactivos específicos del lote.
- Todos los controles negativos deben ser reportados como indeterminados. Criterios para una revisión detallada de una carrera (una revisión incluye un microbiólogo molecular y un técnico):
- Si alguno de los controles (MBD-POS, MTD-POS, MBD-NEG) no tiene Valores Ct válidos para el IC.
- Si uno o más de los controles positivos (MBD-POS, MTD-POS) no tienen valores de Ct válidos dentro del rango especificado por la hoja de datos de reactivos específicos del lote.
- Si se inhibe una extracción de muestra (sin valor de IC), elija una o más de las siguientes opciones:
- Si la muestra es una de varias para la accesión, y existen valores de IC Ct válidos para la (s) otra (s) muestra (s), no es necesario repetir el análisis.
- Vuelva a extraer la muestra utilizando menos de 50 mg de tejido por tubo de muestra; notifique al técnico.
- Si una muestra proporciona un valor de Ct para la sonda MTBC:
  - A. Reportar lo "no negativo" a la patología.
  - B. Vuelva a probar el ADN utilizando un conjunto de sondas de primer específico para *M. bovis*; Póngase en contacto con un técnico autorizado para realizar la prueba de PCR.
- Si cualquier conjunto de sondas de primer se contamina o deja de funcionar correctamente, suspenda el uso del conjunto, documente el evento y notifique a un líder de equipo de MB.

Para reacciones específicas de *M. bovis*:

- A. Los valores de IC Ct deben estar entre 25 y 38.2; el pozo está "Inhibido" si los valores de Ct están fuera de estos límites.

- B. Si el control MBD-NEG o MTD-POS muestra un valor de Ct, la ejecución no es válida; Repetir las pruebas y documentar el evento.
- C. Si el control positivo *M. bovis* es "U", la ejecución no es válida; Repetir las pruebas y documentar el evento.
- D. Informe los resultados de ejecución válidos a la patología de forma inmediata.



SOP-MB-0079. Preparación de muestras y método de extracción de ADN micobacteriano para PCR directa.

Propósito.

Este SOP describe un método que utiliza la ruptura de perlas para extraer ADN de muestras de tejido fresco presentadas para la detección de *M. bovis*. Usando este método, solo se requiere un pequeño número de células de *M. bovis* para lograr una plantilla de ADN adecuada para una PCR exitosa.

Precauciones de seguridad

- Solo el personal debidamente capacitado para trabajar con organismos BSL-2 y BSL-3 pueden manipular las muestras de tejido.
- Se debe utilizar el equipo de protección personal adecuado. Siga las recomendaciones aprobadas de los CDC.

Procedimiento

Controles

- Prepare controles negativos y positivos.
- Varios tipos diferentes de controles están incorporados en esta prueba de diagnóstico. Tenga cuidado con cada control para asegurar una prueba adecuada.
- Pique cada muestra, ya sea de control o diagnóstico, con el Control interno (Control de extracción de ADN 670). Este control funciona como una medida de inhibición de la reacción de PCR para ese pozo / muestra.
- Los controles negativos y positivos deben pasar las pruebas de validación.
- Incluya un control negativo (MDB-NEG) cada quinta muestra para las primeras 20 muestras de diagnóstico; después de lo cual, incluya un control de tejido negativo cada diez muestras.
- Incluya un control positivo de Tb (TBD-POS) cada quinta muestra para las primeras 20 muestras de diagnóstico; después de lo cual se incluirá un control positivo que se incluirá cada décima muestra.
- Para cada placa de extracción, incluya un solo control positivo *M. bovis* (MBD-POS) como tubo # 96 y colóquelo en la esquina inferior derecha de las placas de extracción y PCR.

## Preparación

Correlacione los frascos de borato físico con la lista de muestras registradas; Si encuentra discrepancias, documéntelas y notifique a un Líder de Equipo MB inmediatamente.

Discrepancias potenciales:

- no hay muestra en el bote de borato,
- no hay papeleo que acompañe a la muestra,
- ninguna muestra que acompañe el papeleo,
- diferencias entre los números de identificación de la muestra en el frasco y el papeleo.

Prepare los tubos del batidor de talón.

Recoja los tubos de microcentrífuga tapados en un bastidor y transfíralos a una campana BSL-2 previamente desinfectada. Coloque las pinzas / fórceps, tijeras, escalpelos, toallas de papel, platos de papel, bolsa de autoclave, desinfectante, contenedor de residuos y el recipiente para utensilios de riesgo biológico lleno de desinfectante en la campana.

## Muestreo de tejidos

Nota: este es el paso crucial del procedimiento; se requiere un excelente muestreo para proporcionar la mayor probabilidad de detectar *M. bovis* si está presente en el tejido lesionado.

Prepare controles de Tb negativos y positivos en orden secuencial, intercalados entre muestras.

- No prepare los controles antes o después de tomar muestras.
- Preparar siempre los controles con las muestras.
- Prepare la muestra # 96, el control positivo *M. bovis*, por último, después de que se hayan realizado todas las muestras y controles.

Brevemente, el protocolo incluye:

- A. Examinar el (los) tejido (s) para detectar lesiones aparentes
- B. Use escalpelos y pinzas para cortar los tejidos y buscar lesiones adicionales
- C. Obtenga una muestra representativa de los tejidos / lesiones y colóquela en los viales de rotura de perlas preparados.

D. Caliente las muestras / viales a aproximadamente 95 - 100 °C durante aproximadamente 30 minutos.

E. Descontamine los viales.

F. Entregar las muestras al técnico que realiza los procedimientos de extracción y PCR.

- Corte aproximadamente una muestra del tamaño de un chicharo (tamaño total) por vial. Se puede preparar más de un vial por accesión para obtener muestras que representen adecuadamente el (los) tejido (s) enviado (s).

- Devuelva el (los) tejido (s) no utilizado (s) al recipiente de borato.

Extracción y Purificación - Método de placa de 96 pocillos.

En resumen, el protocolo incluye:

- Agitar las muestras durante aproximadamente 2 minutos.
- Centrifugar los tejidos rotos para sedimentar los desechos.
- Transferir aproximadamente 400 µL de muestra a un tubo que contenga 400 µL de fenol / cloroformo; mezcla de vórtice; Centrifugar para separar los líquidos hidrofóbicos (fase inferior) de los hidrofílicos (fase superior).

- Transferir aproximadamente 400 µL del extracto crudo a una placa de 96 pocillos que contiene la cantidad apropiada de tampón de unión de ADN en el pocillo apropiado.

- Transferir el tampón de extracto / unión a la placa de la columna de Spin; centrífugo; repita hasta que toda la muestra se cargue en la placa de la columna de centrífugo.

- Lavar la muestra unida con aproximadamente 200 L de tampón de prelavado; centrífugo.

- Lave la muestra unida con aproximadamente 500 L de tampón de lavado; centrífugo. h. Eluir la muestra unida con aproximadamente 100 µL de tampón de elución; centrífugo.

Nota: la cubierta Aeraseal es un paso crítico de calidad. Otras cubiertas causarán el mal funcionamiento de la resina de unión al ADN ubicada en el fondo del pozo.

- El técnico de extracción tiene la opción de ejecutar las centrifugadoras a los rpm correspondientes.

- Si el extracto crudo parece tener un volumen mínimo después del Paso 7.3.1, entonces el técnico tiene la opción de volver a extraer las fases de interfaz / orgánica con 200 L adicionales de TE y combinar extractos hidrofílicos.
- Siga SOP-MB-0080, PCR en tiempo real para la detección de *M. bovis* en muestras enviadas para completar la prueba.

#### Extracción y Purificación - Método de columna.

El técnico de extracción tiene la opción de extraer y purificar los ácidos nucleicos de las muestras mediante columnas giratorias.

Nota: el técnico de extracción tiene la opción de ejecutar las centrifugadoras a las rpm correspondientes.

En resumen, el protocolo incluye:

- Perturbación de las perlas de las muestras durante aproximadamente 2 minutos
- Centrifugar los tejidos rotos para sedimentar los desechos.
- Transfiera aproximadamente 400 µL de muestra a un tubo de microcentrífuga que contenga 400 µL de fenol / cloroformo; mezcla de vórtice; Centrifugar para separar los líquidos hidrofóbicos (fase inferior) de los hidrofílicos (fase superior).

#### Control de calidad

- No utilice reactivos caducados.
- Use controles de Tb negativos y positivos para asegurarse de que no haya ocurrido contaminación cruzada durante el procesamiento o durante la extracción. Es crucial que los controles se realicen en orden secuencial, intercalados entre muestras.

## **SOP-MB-0059. Aislamiento de micobacterias utilizando el sistema MGIT 960.**

### **Propósito**

El propósito de este Procedimiento de Operación Estándar (SOP) es proporcionar una guía general para el aislamiento de especies de *Mycobacterium* utilizando el líquido MGIT™ 960.

### **Procedimiento**

#### **Estándares y controles de prueba**

La prueba MGIT™ se basa en la cantidad de fluorescencia generada a partir de un compuesto fluorescente incrustado en una resina, ubicada en la parte inferior de cada tubo MGIT. El oxígeno disuelto en el medio por encima de la resina suprime la fluorescencia.

Los microorganismos consumen el oxígeno durante la respiración y permiten que el compuesto tenga fluorescencia. Los tubos de calibración están ubicados en cada cajón; El instrumento MGIT™ compara la cantidad de fluorescencia entre el calibrador y el tubo de ensayo para determinar si se está generando una señal "positiva".

#### **Manipulación, conservación y mantenimiento de muestras.**

Las muestras se inocularán el mismo día en que se complete el procesamiento. La falta de inoculación el mismo día en que se complete el procesamiento requerirá que la muestra se procese nuevamente.

#### **Preparación de la muestra.**

Precaución: Se recomienda que la suplementación de medios MGIT™ se realice en una campana BSC Clase II limpia para reducir las posibilidades de contaminación.

Suplementación para cada tubo MGIT™ (consulte WI-MB-0024, Suplementación de medios MGIT™ 960):

- Agregue 1.5 mL de eritromicina de 800 µg/mL al MGIT™ PANTA™ en seco Mezcla suministrada en el kit de suplementación MGIT™ 960.
- Agregue 15 mL del líquido reconstituyente a la mezcla de PANTA™/eritromicina.
- Si el MGIT™ PANTA™ se va a utilizar con tubos MGIT™ tratados, agregue 85 µL de verde malaquita a cada vial de PANTA™ resuspendido.

- Agregue 0.8 mL de la mezcla de PANTA™ reconstituida en cada tubo MGIT™ 960.
- Asegúrese de que el inóculo se resuspenda agitando el tubo a mano, agitando la suspensión con un hisopo estéril o con una pipeta de transferencia estéril, o agitando con vórtex. Todo el material en el pellet debe ser resuspendido; La resuspensión debe ser lo más homogénea posible.

#### Método de prueba

Para muestras que potencialmente contengan bacterias del complejo MTb u otros organismos BSL3, las inoculaciones deben realizarse en un Gabinete de Seguridad Biológica de Clase III. Las inoculaciones se pueden realizar en un Gabinete de Seguridad Biológica de Clase II si se cumplen los siguientes criterios.

- Equipo de protección personal, que incluye un respirador, bata de laboratorio desechable, guantes y se utilizan gafas de seguridad.
- El técnico sigue todos los procedimientos adecuados para las inoculaciones con los medios utilizando el Gabinete de Seguridad Biológica Clase II.
- El técnico está capacitado.
- Se debe colocar un letrero en la puerta que ingresa al conjunto de procesamiento que indica que se debe usar equipo de protección personal (PPE) si se ingresa.

Con una pipeta estéril, una pipeta de transferencia estéril o una jeringa y aguja estériles, agregue 0,4 mL + 0,1 mL de inóculo a un tubo MGIT™ 960 suplementado y etiquetado. Invertir el tubo para mezclar los contenidos. Si se utilizó el método de descontaminación HPC, agregue solo 0.1 - 0.2 mL de inóculo.

Asegúrese de que las tapas estén ajustadas antes de ingresar al instrumento MGIT™ 960.

Rocíe los tubos inoculados con desinfectante y espere un mínimo de 10 minutos antes de retirarlos de la campana.

introducir tubos en MGIT™ 960 para escanear el tubo inoculado en el instrumento MGIT 960.

#### Procedimientos de Control de Calidad

- Consulte los manuales de usuario del BACTEC™ MGIT 920 para su cuidado y mantenimiento.

- Diariamente, compruebe la temperatura de cada cajón; Compare la lectura del termómetro en el cajón con la lectura digital indicado por el icono de temperatura; registre los resultados en el "Registro de mantenimiento 960 de BACTEC™ MGIT™.

Cada semana, asegúrese de que:

- las luces indicadoras en la parte frontal de cada cajón y en el interior cada cajón funciona correctamente,
- la impresora tiene suficiente papel para generar los informes semanales.
- Registre los datos en el formulario "Registro de mantenimiento BACTEC™ MGIT™ 960" proporcionado por Becton Dickinson.

Cada mes, revise los filtros de aire en la parte inferior delantera de la máquina; Si los filtros están sucios, límpielos siguiendo la instrucciones del Manual del Usuario; Reemplace los filtros según sea necesario. Los calibradores deben pedirse antes de la sustitución; almacenar los tubos a temperatura ambiente hasta que la fecha de caducidad del fabricante sea excedido; Verifique la fecha de vencimiento del fabricante en la casilla, y Deseche cualquier tubo que haya superado la fecha de caducidad. Reemplace los calibradores en cada cajón antes de la fecha de vencimiento; registre los datos en el formulario "Calibración BACTEC™ MGIT™ 960 Log" proporcionado por Becton Dickinson.

Análisis de datos, cálculos y resolución de problemas

- Revise semanalmente las luces indicadoras en la parte frontal del cajón para ver si los tubos de máquina son positivos (luz roja) y negativos (luz verde).
- Los tubos de máquina positiva deben retirarse el primer día laborable de cada semana.

Nota: Los tubos de máquina positiva se pueden quitar el viernes anterior al primer día de trabajo y se pueden almacenar a 37 °C + 2 °C durante el fin de semana; asegúrese de que todos los tubos positivos para máquinas que señalen durante el fin de semana estén incluidos en la colección de "Tubos positivos" de esa semana.

- Los tubos negativos se pueden extraer en cualquier momento durante la semana laboral.

- Se deben realizar tinciones BAAR semanales.
- Si el resultado de la mancha de un tubo de máquina positiva no es positivo para el BAAR, entonces sostenga el tubo a 37 °C + 2 °C hasta la sexta semana después de la fecha de inoculación; seis semanas después de la inoculación, solicite una tinción BAAR.

#### Resultado

- Los tubos de máquina negativa deben mantenerse durante 30 días después de que se hayan publicado los resultados finales de las pruebas.
- Los tubos MGIT™ con AF positivo deben entregarse al técnico que realiza las pruebas de identificación para la semana actual.
- Los tubos con AF positivo se mantienen durante al menos 30 días después de la publicación del informe final y el ingreso a la colección de cultivo.
- Los tubos positivos para la máquina que no sean AF MGIT™ deben mantenerse durante 30 días después de que se hayan publicado los resultados finales de las pruebas.



#### **WI-MB-0024. Suplemento para los medios MGIT 960.**

Nota: los suplementos deben hacerse antes de la inoculación. Para limitar la posible contaminación, realice la suplementación en una campana BSC II que se haya limpiado a fondo.

Diagrama esquemático del suplemento regular de MGIT™ (pruebas UNT):

- 1.5 mL 800 µg/mL de eritromicina → MGIT™ PANTA™ (seco).
- 15 mL de líquido reconstituyente (botella marrón) → PANTA™ / mezcla de eritromicina.
- 0,8 ml → cada tubo MGIT™.

Diagrama esquemático del suplemento regular de MGIT-Malachite Green (TRT Testing):

- 1.5 mL 800 µg/mL de eritromicina → MGIT™ PANTA™ (seco).
- 15 mL de líquido reconstituyente (botella marrón) → PANTA™/mezcla de eritromicina.
- Agregue 85 µL de verde malaquita al suplemento resuspendido. 0.8 mL → cada tubo MGIT™.

## **WI-MB-0077. Preparación de muestras para PCR directa**

### **Preparación de tubos de ruptura de perlas**

1. Se pueden preparar muchos tubos de ruptura de cuentas por adelantado y almacenar a aproximadamente 4 °C.
2. Utilice los tubos de ruptura de cuentas comprados. Si no están disponibles, prepare los tubos vertiendo cuidadosamente aproximadamente 0,25 mL de una mezcla de perlas de vidrio en el tubo de microcentrífuga con tapón de rosca de 2,0 mL. Utilice aproximadamente 125 µL de bolas de 1,0 mm y 125 µL de 0,1 mm.
3. Prepare la solución tampón que contenga aproximadamente 400 µL de 1x buffer TE y aproximadamente 2.5 µL de Control de extracción de ADN 670 (el control interno) por muestra. Antes de agregar el control interno a la solución, DEBE agitarlo.
4. Transfiera 400 µL de esta solución tampón (1XTE más control de extracción de ADN) al tubo de ruptura de perlas

### **8.5.2 Preparación de muestras, controles y tubos.**

1. Etiquete los tubos y los frascos de borato con los números de los tubos de muestra asignados.
2. Obtenga controles de tejido Negativo (MBD-NEG), TB Positivo (TBD-POS) y *M. bovis* Positivo (MBD-POS) de las cajas de almacenamiento en el congelador a -20 °C. Deje que los controles alcancen la temperatura ambiente.
3. Recoja los tubos de interrupción con tapa y los tubos de control de tejido en un bastidor y transfíralos a una campana BSL 2 previamente desinfectada. Coloque también las pinzas / pinzas, tijeras, toallas de papel, platos de papel, bolsa de autoclave, desinfectante, contenedor de desechos y el recipiente de utensilios de riesgo biológico lleno de desinfectante en la campana.

### **Muestreo de tejidos.**

Nota: Este es el paso crucial del procedimiento. Se requiere un excelente muestreo para proporcionar la mayor probabilidad de detectar *M. bovis* si está presente en el tejido lesionado.

1. Los controles de Tb negativo y positivo se harán en orden secuencial, intercalados entre muestras. No realice los controles antes o después de tomar muestras. Siempre haga los controles en orden dentro del procedimiento de muestreo.

La muestra 96, MBD-POS (el control positivo de bovis), debe hacerse en último lugar, una vez que se hayan realizado todas las muestras y controles.

2. Transfiera el (los) tejido (s) del recipiente de borato con unas pinzas/pinzas a un plato de papel.
3. Examine el tejido para detectar la presencia de lesiones, granulomas o tubérculos. Decida si es necesario más de un tubo para representar la muestra; Asegúrese de introducir el tubo extra/muestras en la parte inferior de la lista de accesiones.
4. Si hay una lesión presente, tome la muestra lo más cerca posible del borde exterior (corteza), pero trate de evitar la matriz externa fibrosa y resistente, si es posible. Corte la muestra de tejido o lesión y transfírala al tubo de microcentrífuga etiquetado. Cortar aproximadamente una muestra del tamaño de un guisante (tamaño total). Devuelva el (los) tejido (s) no utilizado (s) al recipiente de borato.
5. Con una pipeta Pasteur desechable y estéril, asigne aproximadamente 100  $\mu$ L de los controles negativos y positivos en los tubos de control individuales apropiados.
6. Tome muestras de todos los 6-35 boratos y de los tubos de control individuales, coloque los tubos en un bloque caliente precalentado a  $100\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 5\text{ }^{\circ}\text{C}$  e incube durante aproximadamente 30 minutos.
7. Descontamine los viales, los materiales y la campana rociándolos con desinfectante (LPH o Vesphene), durante al menos 10 minutos.
8. Retire las muestras de tejido y los materiales de la campana, y transpórtelos al técnico que realiza las extracciones.

WI-MB-0081. Purificación por extracción en columna giratoria para PCR directa

1. Montar los reactivos y plásticos de la siguiente tabla:
2. Recoja el número total de tubos de rotura de perlas que contienen muestras preparadas.
3. Prepare un número igual de tubos de recolección, cada uno con la adición de 1,2 mL de tampón de unión de ADN en cada pocillo; numere cada tubo de recolección con el número de muestra que se está procesando.
4. Prepare un número igual de columnas giratorias cargadas en los tubos de recolección; etiqueta cada columna de giro con el número de muestra.

**Tabla 8. Buffers**

| Cat #                      | Buffer Components        | Cat #                     | Plastics Components          |
|----------------------------|--------------------------|---------------------------|------------------------------|
| D6010-1-150, or equivalent | Fecal DNA Binding Buffer | C1011, or equivalent      | Zymo-Spin™ IIC Columns       |
| D3004-5-50, or equivalent  | DNA Pre-Wash Buffer      | C1001, or equivalent      | Collection Tubes             |
| D6010-2-100, or equivalent | Fecal DNA Wash Buffer    | 05-408-129, or equivalent | 1.5 ml microcentrifuge tubes |
| D3004-4-10, or equivalent  | DNA Elution Buffer       | 02-681-292, or equivalent | 2.0 ml microcentrifuge tubes |

5. Prepare tantos tubos de microcentrífuga como muestras para el día; agregue 400 L de fenol/cloroformo a cada tubo y etiquételo con el/los número (s) de muestra;

Nota: FM-MB-0080, la pestaña Extracción proporciona una tabla que describe la cantidad total de fenol/cloroformo necesario para la extracción del día.

Nota: el técnico de extracción tiene la opción de ejecutar las centrifugadoras a los rpm correspondientes, que se enumerarán entre paréntesis detrás del rcf requerido.

6. Recoja los tubos de rotura de talón que contienen las muestras de tejido y transfíralos a la bandeja de batido del talón. Coloque las muestras y la bandeja en una máquina para batir perlas durante un mínimo de 2 minutos.
7. Retirar las muestras y transferirlas a una centrífuga. Centrifugar las muestras a aproximadamente 18,000 rcf (13,000 rpm) durante aproximadamente 10 minutos.

8. Transfiera con cuidado aproximadamente 400 litros de líquido acuoso al tubo correspondiente que contiene fenol/cloroformo.
  9. Agite en vórtex el tubo acuoso fenol/cloroformo durante aproximadamente 15 segundos.
  10. Centrifugar durante aproximadamente 5 minutos a aproximadamente 18,000 rcf (13,000 rpm).
  11. Retire hasta 400 L de la capa superior (acuosa) y colóquelo en el tubo de recolección correspondiente que contiene el tampón de unión.
- Nota: si el extracto crudo tiene un volumen mínimo (por ejemplo, menos de 200 l), entonces el técnico tiene la opción de volver a extraer las fases de interfaz/orgánica con 200 L adicionales de TE; repita los pasos 8 y 9, agregando la fase acuosa adicional al tampón de unión más la muestra.
12. Mezclar el tampón de unión de ADN de 1,2 mL con los 400 µL de extracto crudo utilizando la pipeta.
  13. Transfiera una cantidad de 800 µL de esta solución al pozo apropiado de la columna de centrifugado.
  14. Centrifugar durante aproximadamente 1 minuto a aproximadamente 18,000 rcf (13,000 rpm). Deseche el flujo continuo.
  15. Repita el paso 12 hasta que toda la solución esté cargada en la columna.
  16. Agregue 200 µL de tampón de prelavado a cada columna; centrifugue durante aproximadamente 1 minuto a aproximadamente 18,000 rcf (13,000 rpm). Nota: el descarte no necesita ser descartado; El técnico puede proceder con el paso 16.
  17. Agregue 500 µL de tampón de lavado a cada columna; Centrifugar durante aproximadamente 1 minuto a aproximadamente 18,000 rcf (13,000 rpm).
  18. Transfiera la columna de centrifugación a un nuevo tubo de microcentrífuga de 1,5 ml; Agregue 100 µL de tampón de elución por columna; centrifugue durante aproximadamente 1 minuto a aproximadamente 18,000 rcf (13,000 rpm); Deseche la columna de centrifugado. Almacenar a 4° + 2°C listo para agregar a la placa de PCR.
  19. Siga SOP-MB-0080, PCR en tiempo real para la detección de *M. bovis*.

**NOM-056-ZOO-1995 Especificaciones técnicas para las pruebas diagnósticas que realicen los laboratorios de pruebas aprobados en materia zoosanitaria**

Capítulo 13 de la NOM-056-ZOO-1995. Tuberculosis Bovina, estipula lo siguiente.

a) Para el análisis histopatológico.

El objetivo del diagnóstico histopatológico de la tuberculosis bovina es detectar en las lesiones granulomatosas presentes en nódulos linfáticos y otros órganos en los bovinos para diferenciar otras enfermedades de la TBb. Esto aplica a la identificación de las lesiones histológicas compatibles con Tb, organismos alcohol-ácido resistentes, auramina o positivos reactores durante el estudio postmortem. El estudio histológico de las lesiones compatibles con Tb y las pruebas confirmatorias se realizan mediante coloraciones de hematoxilina-eosina concentrada, Ziehl Neelsen y/o nueva fucsina.

Las muestras provienen de animales asegurados en la línea de inspección de carnes sospechosos y/o reactores a la prueba de la tuberculina. Dichas muestras pueden presentarse como nódulos linfáticos: traqueobronquiales, mediastínicos, medial retrofaríngeo, mandibulares, parotídeos, hepáticos y mesentéricos, en algunos casos pulmón, hígado, bazo y riñón con presencia de lesiones sugestivas.

El corte de tejidos para el procesamiento se realiza, en la campana de humos, protegiéndose las manos con guantes de látex y ojos con los lentes de bioseguridad, accionando la campana de extracción durante la preparación de los tejidos recibidos para procesamiento. Durante el procesamiento de tejidos se preferiría mantener el equipo de las campanas de extracción de vapores o alternativamente en un área amplia y ventilada.

Para las condiciones de recepción de las muestras se recomienda el envío de los tejidos en un tamaño no mayor de 2 cm en una solución de formalina amortiguada al 10% pH 7.2, en una relación de tejido-formalina 1:10. con la identificación clara de las muestras con sus datos generales; órgano(s), nombre del propietario, ubicación de la explotación de origen, donde se obtuvo la muestra, la descripción del animal (especie, raza, sexo, edad, etc.), identificación precisa del animal (arete, marcas u otros). así como el nombre, registro y domicilio del Médico Veterinario oficial o aprobado que remita la muestra. Para el estudio histológico de rutina se contará con laminillas control positivo de tejidos con bacterias alcohol-ácido resistentes. Para las pruebas de Ziehl Neelsen y auramina o rodamina.

Las muestras se ordenan para su registro en los formatos de procesamiento de tejidos, posteriormente se extraen tejidos de los frascos y se colocan sobre toallas desechables para absorber la solución de formalina en la cual están embebidas. Cada tejido se examinará y cortará separadamente con un grosor de 2-5 mm seleccionándose áreas de tejido normal y anormal, reincorporándose nuevamente a los frascos originales de envío de tejidos. Posteriormente se colocan estos en las cápsulas de procesamiento de tejidos identificadas previamente, cuando éstas hubieran estado calcificados se colocarán después de la formalina en las soluciones descalcificadoras antes del procesamiento de los tejidos.

b) Para el análisis Bacteriológico.

El estudio bacteriológico de la tuberculosis sirve para corroborar el diagnóstico realizado en el campo por medio de las pruebas tuberculínicas y para detectar animales con lesiones sospechosas de tuberculosis en los rastros o mataderos dentro de un programa de vigilancia epizootiológica.

La campana de seguridad biológica, la centrífuga y la incubadora deben estar en una sola área aislada delimitada del resto del laboratorio y que tenga señalamientos de riesgo biológico.

c) Medidas de bioseguridad

Las infecciones por el bacilo de la tuberculosis bovina son un riesgo comprobado para el personal de laboratorio especialmente para los individuos expuestos a los aerosoles infecciosos. Existen requisitos mínimos de bioseguridad para el personal que trabaja con micobacterias tuberculosas o bovinas.

d) Personal

- El personal de laboratorio debe ser tuberculino (PPD) positivo. De resultar negativo, debe vacunarse con BCG y ser admitido en el área hasta que se verifique su positividad.
- Debe realizarse un control radiográfico de tórax del personal cada año y conservar las placas para estudios comparativos posteriores.

e) Área de trabajo

- Debe haber un área delimitada y aislada de las otras secciones del laboratorio donde se encuentre el equipo, se trabajen las muestras y se realicen cultivos y resiembras.

- La entrada al área debe ser restringida al momento de trabajar con muestras en la campana, centrifugar, revisar o realizar cultivos.
- El equipo de seguridad y prevención de accidentes debe estar disponible, ser suficiente para el personal del área y estar en un lugar visible junto con las instrucciones para su uso.
- Siempre debe contarse con propipetas o bombas para pipetear, evitando pipetear con la boca.

#### f) Limpieza y desinfección

- Todas las zonas de trabajo deben descontaminarse al menos una vez al día y siempre después de trabajar.

#### g) Desecho de material contaminado

- Antes de desecharlo, todo el material biológico contaminado debe ser esterilizado en autoclave.
- La cristalería y material utilizados en el procesamiento de muestras presumiblemente contaminados o material biológico como cultivos deben ser esterilizados antes de ser lavados.

#### h) Material biológico

Material sospechoso con lesiones granulomatosas: nódulos linfáticos o tejidos diversos, o nódulos linfáticos o tejidos de animales reactivos a la prueba de tuberculina en solución saturada de borato de sodio en una relación de tejido-volumen 1:1 ó 1:2. Cuando no se cuente con medios disponibles para siembra inmediata, los órganos deberán ser retirados de la solución de borato y ser conservados en congelación a -20°C.

#### i) Condiciones ambientales

El procesamiento de las muestras se debe realizar bajo condiciones estrictas de seguridad biológica, en el interior de cabinas de seguridad microbiológica.

#### J) Preparación y acondicionamiento de la muestra

Seleccionar previamente la muestra: retirar toda la grasa y tejido conectivo de la muestra a procesar. Si la lesión es muy grande o tiene mucho exudado, elegir una parte externa de la lesión (cápsula) y parte del interior de la lesión. Cuando la muestra es muy pequeña, incluir toda. En caso de no haber lesiones visibles, seleccionar una porción de tejido representativo de la muestra.



#### k) Procedimiento

1.- Descontaminación. La descontaminación de la muestra puede hacerse por el método de Petroff o por su variante ácido-álcali.

2.- Método de Petroff. - colocar la muestra en un mortero con arena y agua destilada, todo estéril y macerar. Trasvasar a un tubo con solución estéril de hidróxido de sodio al 4% en una proporción 1:2. Agitar vigorosamente e incubar a 37 °C por 20 minutos, agitando cada 5 minutos. Centrifugar por 20 minutos a 3,000 rpm y desechar el sobrenadante. Agregar al sedimento 1 a 2 gotas de solución de rojo de fenol y unas gotas de una solución de ácido clorhídrico al 10% hasta que vire el indicador del rojo violáceo al amarillo anaranjado. Agregar 2 ml de agua destilada estéril y sembrar o bien agregar 3 ml de agua destilada estéril, agitar y centrifugar a 3,000 rpm por 15 minutos. Desechar el sobrenadante y sembrar el sedimento.

3.- Variante ácido-álcali del método de Petroff. - Macerar en un mortero de porcelana agregando un poco de arena y agua destilada estériles. Trasvasar a dos tubos de ensaye estériles con tapón y guardar uno identificado en congelación. Añadir al segundo tubo 5 partes de ácido clorhídrico al 10% y añadir 2 a 3 gotas de rojo de fenol al 1% hasta que vire a un color naranja. Agitar y dejar en reposo 20 minutos. Añadir gota a gota una solución de hidróxido de sodio 2 N agitando el tubo hasta que vire a un color violáceo (morado a lila). Centrifugar a 3,000 rpm por 20 minutos y desechar el sobrenadante. Sembrar el sedimento. Siembra. Sembrar el sedimento descontaminado con hisopo, pipeta Pasteur o asa bacteriológica, sobre la superficie de 1 tubo de medio Lowenstein Jensen y 2 tubos de medio de Stonebrink. Incubar a 37°C los tubos sembrados con los tapones flojos en posición horizontal el primer día y en posición vertical después del segundo día, para que el sedimento seque sobre toda la superficie del medio. Revisar semanalmente durante 9 semanas. En caso de contaminación de todos los tubos, éstos se deben desechar y se debe procesar la muestra congelada (de réplica). Esta se divide en dos tubos. Se guarda uno en congelación y el otro se procesa para descontaminación y se debe efectuar nueva siembra como ya fue descrito.

#### l) Interpretación de resultados

Las colonias de *Mycobacterium bovis* se aprecian a simple vista a partir de la 3a. semana generalmente, pero pueden tardar hasta 9 semanas. Crecen mejor en el medio de

Stonebrink (crecimiento eugónico o abundante) que en el medio de Lowenstein Jensen (crecimiento disgónico o pobre).

a) Morfología colonial

Medio de Lowenstein Jensen: colonias muy pequeñas (8.0 a 1.5 mm), translúcidas; con el tiempo toman una forma piramidal.

Medio de Stonebrink: colonias generalmente pequeñas, blancas, como pezones, que suelen estar dispersas.

b) Morfología celular

Bacilos largos; en el examen microscópico con tinción de Ziehl Neelsen se observan bacilos largos ácido alcohol resistentes (rojos) de 2 a 6 x 0.3  $\mu\text{m}$ , que pueden observarse como "cordones".

Todas las cepas aisladas sospechosas de ser *M. bovis* deben ser remitidas al Laboratorio de Referencia para realizar la identificación por pruebas enzimáticas.

Índices de reproducibilidad y repetibilidad son del 96% aproximadamente.