

UNIVERSIDAD NACIONAL
SISTEMA DE ESTUDIOS DE POSGRADO
POSGRADO REGIONAL EN CIENCIAS VETERINARIAS TROPICALES



Tuberculosis bovina: implementación del diagnóstico molecular y concordancia con técnicas diagnósticas utilizadas en Costa Rica.

Rocío Jacqueline González Díaz

Universidad Nacional, Heredia, Junio de 2016

Tesis sometida a consideración del Tribunal Examinador del Posgrado Regional en Ciencias Veterinarias Tropicales, Maestría en Enfermedades Tropicales para optar al grado de *Magister Scientiae*

Tuberculosis bovina: implementación del diagnóstico molecular y concordancia con técnicas diagnósticas utilizadas en Costa Rica.

Rocío Jacqueline González Díaz

Tesis presentada para optar al grado de *Magister Scientiae* en Enfermedades Tropicales cumple con los requisitos establecidos por el Sistema de Estudios de Posgrado de la Universidad Nacional. Heredia. Costa Rica.

Miembros del Tribunal Examinador

Representante del Consejo Central del Posgrado

Sandra Estrada Ph.D.
Coordinador PCVET

Gaby Dolz Ph.D.
Tutor

Gabriela Hernández M.Sc.
Co-tutor

Juan José Romero Ph.D.
Lector

Carlos Trabado MQC, MBA.
Lector

Rocío Jacqueline González Díaz
Sustentante

RESUMEN GENERAL

La tuberculosis bovina es una enfermedad bacteriana crónica con potencial zoonótico causada por *Mycobacterium bovis*. Los programas de control y erradicación se basan en la detección de bovinos reactivos a la prueba de tuberculina y el sacrificio de estos animales. En Costa Rica, los animales reactivos sacrificados son sometidos a una inspección *post-mortem* en busca de lesiones compatibles con tuberculosis (LCT). Estos son sometidos a la observación directa de bacilos ácido-alcohol resistentes (BAAR) mediante tinción Ziehl-Neelsen (ZN) y al cultivo bacteriológico para aislar *M. bovis* que es considerada la prueba de oro, sin embargo, tiene como desventaja el largo periodo de incubación (dos meses). El objetivo del presente trabajo fue implementar una técnica de diagnóstico rápida y certera, como lo es la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR), para ser utilizada como complemento al cultivo bacteriológico, y estimar las características diagnósticas del PCR implementado, de la técnica de ZN e inspección *post-mortem* con respecto al cultivo bacteriológico.

En la primera parte del trabajo fueron analizados tres grupos de muestras, en el Grupo 1 se incluyeron 47 aislamientos de *M. bovis*, en el Grupo 2, se incluyeron 51 muestras de tejido de bovinos con LCT mientras que el Grupo 3 100 muestras de tejidos de bovinos negativos fueron analizados. Del total de 198 muestras analizadas, un 49.5% (98/198 Grupo 1 y Grupo 2) correspondieron a animales con LCT, solamente un 54.1% (53/98) resultaron cultivo positivo, un 47.9% (47/98) fueron identificadas como PCR positivas, y un 51.0% (50/98) se determinaron positivas en tinción ZN. El PCR mostró valores de sensibilidad entre 78.1%-100% (IC95%: 63.8-100.0) y de especificidad entre 96.2%-100% (IC95%: 88.8-103.5), mientras que la tinción ZN mostró valores de sensibilidad entre 62.5%-71.4% (IC95%: 45.7-98.8) y de especificidad entre 73.1%-94.1% (IC95%: 56.0-98.3) comparados al cultivo bacteriológico. La inspección *post-mortem* (Grupo 2 y 3) mostró una sensibilidad del 100% (IC95%: 100.0-100.0) y una especificidad del 84.0% (IC95%: 77.5-90.6). Se concluye, que la inspección

post-mortem constituye una excelente prueba tamiz en el diagnóstico de la tuberculosis bovina en Costa Rica, y el PCR, puede ser incluido en el diagnóstico de laboratorio como técnica complementaria al cultivo, para confirmar la presencia de *M. bovis*, con la gran ventaja de obtener resultados en un menor tiempo (dos días).

En la segunda parte del estudio se determinó el valor predictivo positivo (VPP) de la prueba de tuberculina y se identificó *Mycobacterium bovis* mediante la técnica de PCR en bovinos reactivos. Se analizaron dos grupos de muestras: en el primer grupo se incluyeron 35 aislamientos obtenidos a partir de muestras de tejidos (linfonodos y pulmón) de animales reactivos a la prueba de tuberculina simple, mientras que en el segundo grupo se incluyeron 10 muestras de tejidos (linfonodos) de animales reactivos a la prueba de tuberculina cervical comparativa. La prueba de tuberculina simple ano-caudal mostró un VPP de 31.4%; mientras que la prueba de tuberculina cervical comparativa mostró un VPP de 70%. Mediante PCR se identificaron como positivas el 34.3% y 30.0% de las muestras del Grupo 1 y 2, respectivamente. Estos resultados indican que existe una menor probabilidad de que un animal reactivo a la prueba de tuberculina ano-caudal resulte cultivo positivo, por lo tanto, se recomienda utilizar la prueba cervical comparativa que posee mayor especificidad. El PCR permite un diagnóstico rápido en tan solo 2 días, sin embargo, deben evaluarse otros procesos de extracción de ADN a partir de linfonodos para mejorar la sensibilidad del PCR implementado.

Palabras claves:

Tuberculosis, ganado bovino, zoonosis, diagnóstico, tejido, reactivos, prueba de tuberculina, PCR.

AGRADECIMIENTOS

A Dios Todopoderoso, por su amor, misericordia, por sus bendiciones, por llenarme de fuerza, paciencia y permitirme crecer en al ámbito personal y profesional.

A mi familia por su amor incondicional a pesar de la distancia y por todo su apoyo en esta etapa de mi vida.

Al Servicio Alemán de Intercambio Académico (DAAD) por su ayuda financiera durante 29 meses y por fomentar el intercambio académico y cultural.

A la Dra. Gaby Dolz por guiarme en este proceso, por su tiempo, apoyo y por permitirme trabajar en el Laboratorio de Entomología.

A la Dra. Gaby Hernández por su interés en la investigación, por siempre estar dispuesta a compartir sus conocimientos, por su amistad y por las oportunidades para colaborar en trabajo de campo de interés Veterinario.

A mis lectores Dr. Juan José Romero y Dr. Carlos Trabado Alpízar por brindarme su ayuda, orientación, por sus palabras de aliento y motivación a lo largo de todo el proyecto de investigación.

A la Dra. Estela Cordero por compartir sus conocimientos aun no estando relacionados con el tema de investigación, por siempre estar dispuesta a facilitar el trabajo en el laboratorio, por la oportunidad de compartir mi experiencia de trabajo y por su amistad.

A la Lic. Yinnel Soto por su incondicional y atenta ayuda durante el trabajo de laboratorio, por su paciencia y por su amistad.

Al Dr. Jiménez y Dr. Cartin de SENASA por su ayuda y cooperación en las giras de trabajo de campo.

A la Lic. Ruth Castro por brindarme asesorías para el diagnóstico molecular.

A los Médicos Veterinarios y técnicos encargados de inspección de los Mataderos GICO, ARREO, Montecillos y del Valle por su amabilidad y por facilitar la recolección de muestras.

A Mauricio Andino, Alicia Ramírez, Roderico Chea y Nineth Mendoza por su amistad, por compartir momentos excelentes, buenos y no tan buenos, por convertirse en mi familia durante todo el tiempo de estudio en Costa Rica.

Al Posgrado Regional en Ciencias Veterinarias Tropicales, PCVET por estar siempre dispuestos a colaborar y estar pendientes de nuestras necesidades.

DEDICATORIA

A mis Padres Abel González y Julia de González:

Por su amor, consejos, por inculcar valores y por hacerme saber en cada oportunidad que de la mano de Dios no hay imposibles.

A mis hermanos Wendy, Gricelda, Roberto y mi Angelito Valeria González:

Por su apoyo incondicional, oraciones y por ser fuente de inspiración para ser cada día mejor persona y mejor profesional.

A toda mi Familia y mis amigos Ámbar Rivas, Karol Aguilar y Carlos Valle:

Por sus buenos deseos y palabras de apoyo cuando las necesito.

INDICE

Resumen General	iv
Agradecimientos.....	vi
Dedicatoria	viii
Índice de cuadros	xi
Índice de figuras.....	xii
Introducción general.....	xiii
Referencias bibliográficas	xxiv

ARTICULO I

Resumen	1
Abstract	2
1. Introducción	4
2. Metodología.....	7
2.1 Diseño de estudio, toma, tamaño y clasificación de la muestra	7
2.2 Cultivo bacteriológico y tinción Ziehl-Neelsen	10
2.3 Reacción en Cadena de Polimerasa (PCR)	12
2.3.1 Extracción de ADN	12
2.3.2 PCR para la detección de bacterias del complejo <i>M. tuberculosis</i> y diferenciación de <i>M. bovis</i>	12
2.3.3 Electroforesis.....	14
2.4 Secuenciación	14
2.5 Análisis Estadístico	15
3. Resultados.....	16
4. Discusión.....	23
5. Conclusiones	29
6. Recomendaciones.....	30
7. Referencias bibliográficas.....	31

ARTICULO II

Resumen	37
Abstract	38
1. Introducción	39
2. Metodología.....	43
2.1 Diseño de estudio, tamaño y toma de muestra	43
2.2 Cultivo bacteriológico	44
2.3 Reacción en Cadena de Polimerasa (PCR)	45
2.3.1 Extracción de ADN	45
2.3.2 PCR para la detección de bacterias del complejo <i>M. tuberculosis</i> y diferenciación de <i>M. bovis</i>	46
2.3.3 Electroforesis.....	47
2.4 Secuenciación	48
2.5 Ensayo en tiras de ADN	48
2.6 Análisis Estadístico	48
3. Resultados.....	49
4. Discusión	51
5. Conclusiones	55
6. Recomendaciones.....	55
7. Referencias bibliográficas.....	57
Discusión general.....	64
Conclusiones generales	73
Recomendaciones generales.....	74

INDICE DE CUADROS

ARTICULO I

Cuadro 1

Tipo de tejido animal analizado en los diferentes grupos 9

Cuadro 2

Oligonucleótidos utilizados en las amplificaciones por PCR 14

Cuadro 3

Distribución de los resultados y características diagnósticas de tinción ZN y PCR con respecto al cultivo bacteriológico para el diagnóstico de tuberculosis en el Grupo 1 18

Cuadro 4

Concordancia mediante el coeficiente de Cohen´s Kappa, entre PCR y tinción ZN para el diagnóstico de tuberculosis en el Grupo 1..... 18

Cuadro 5

Distribución de los resultados y características diagnósticas de inspección *post-mortem*, tinción ZN y PCR con respecto al cultivo bacteriológico para el diagnóstico de tuberculosis en bovinos del Grupo 2 20

Cuadro 6

Concordancia mediante el coeficiente de Cohen´s Kappa, entre PCR y tinción ZN e inspección *post-mortem* para el diagnóstico de tuberculosis en el Grupo 2..... 21

Cuadro 7

Distribución de las muestras y frecuencia de cultivos bacteriológicos positivos de *M. bovis* según el tipo de tejido y lesión en animales del Grupo 2 22

Cuadro 8

Descripción de la población bovina que resultó positiva en el cultivo bacteriológico a *M. bovis* 23

ARTICULO II

Cuadro 1

Oligonucleótidos utilizados en las ampliaciones por PCR. 47

Cuadro 2

Comparación de resultados positivos obtenidos mediante cultivo y PCR en los 45 bovinos reactivos en la prueba de tuberculina..... 50

Cuadro 3

Resultados de 19 bovinos reactivos a la prueba de tuberculina que resultaron positivos a cultivo o a PCR. 50

INDICE DE FIGURAS

ARTICULO I

Figura 1

Frecuencia y distribución por grupos de los resultados positivos en cultivo, tinción ZN y PCR, según presencia o ausencia de lesiones compatibles con tuberculosis (LCT). 16

Figura 2

Electroforesis en gel de agarosa de los productos de amplificación del gen RV0577 para micobacterias del complejo *M. tuberculosis* y del gen RV1510 dentro de la región de diferenciación RD4 ausente en *M. bovis* y *M. bovis* BCG..... 17

INTRODUCCIÓN GENERAL

Definición y etiología

El término tuberculosis proviene de los nódulos, llamados “tubérculos” que se forman en linfonodos de animales afectados (OIE, 2012). Se refiere a las enfermedades que son ocasionadas por agentes que pertenecen al complejo *Mycobacterium tuberculosis*: *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium bovis* BCG (bacilo Calmette-Guérin), *Mycobacterium africanum*, *Mycobacterium microti*, *Mycobacterium caprae*, *Mycobacterium pinnipedii*, y *Mycobacterium canetti* (Romero, 2012).

La tuberculosis bovina es una enfermedad bacteriana crónica de los animales, con potencial zoonótico, causada por *Mycobacterium bovis*. Esta bacteria, se logró diferenciar de *Mycobacterium tuberculosis* agente de la tuberculosis humana, en 1896 por Theobal Smith (Mendez, 2008). *M. bovis* pertenece al orden *Actinomycetales*, familia *Mycobacteriaceae* y se clasifica como un bacilo Gram positivo débil, debido a la estructura de su pared celular, de composición fundamentalmente lipídica (Gyles *et al.*, 2010; Delogu *et al.*, 2013; Markey *et al.*, 2013), que le proporciona una barrera impermeable a compuestos nocivos y drogas, y le brinda la característica de ácido alcohol resistencia (Gyles *et al.*, 2010; Markey *et al.*, 2013). Es aerobio obligado, no móvil, y no formador de esporas; sensible al proceso de pasteurización, y resistente a la desecación. No se multiplica en el medio ambiente, pero si se protege de la luz, sobrevive varios meses en el suelo o estiércol bovino (Gyles *et al.*, 2010; Rodríguez, 2012; Romero, 2012).

En medios de cultivo sólido *M. bovis* se desarrolla formando colonias lisas o rugosas generalmente opacas. Es una bacteria microaerófila, de crecimiento lento, con morfología colonial disgónica y no cromógena. Crece poco o nada en medios que contienen glicerol, pero es estimulado en medios con piruvato de sodio. La temperatura óptima de incubación es de 37°C. (Grange *et al.*, 1996; Markey *et al.*, 2013).

Especies afectadas

A nivel internacional, según la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO), la tuberculosis bovina ocasiona pérdidas económicas al sector ganadero aun cuando se ejecutan programas para el control de la enfermedad (FAO, 2012). *M. bovis* es la especie de micobacteria que posee el rango más amplio de hospedadores, ya que afecta al ganado vacuno, otros animales domésticos como cabras, caballos, cerdos, perros, gatos, y algunas poblaciones de animales salvajes entre ellos: búfalo africano (*Syncerus caffer*), bisonte (*Bison bison*), venado cola blanca (*Odocoileus virginianus*), tejón europeo (*Meles meles*) y jabalí (*Sus scrofa*), que desempeñan un rol muy importante como reservorio y fuente de infección para el ganado vacuno, dificultando la erradicación (Thoen *et al.*, 2009; FAO, 2012). En países en desarrollo, debido a la limitada capacidad de diagnóstico y programas deficientes de control de la enfermedad, la tuberculosis bovina podría representar una zoonosis importante (Suazo *et al.*, 2010; Alwathnani *et al.*, 2012).

Transmisión

Las vías principales de transmisión en animales son la vía aerógena y digestiva, por contaminación de agua y alimentos; esta última vía es importante en terneros, y aunque menos frecuente, existe la posibilidad de transmisión por vía cutánea a través de heridas en piel, y por vía genital (CFSPH, 2009). La transmisión de tuberculosis bovina al hombre se produce principalmente por ingestión de productos lácteos no pasteurizados o carne mal cocida de animales infectados; sin embargo, también puede ocurrir por vía aerógena. Las poblaciones en mayor riesgo lo constituyen trabajadores de establos, de mataderos y veterinarios, al tener contacto con animales infectados no identificados (CFSPH, 2009; Suazo *et al.*, 2010; Alwathnani *et al.*, 2012; OIE, 2012).

Patogenia y manifestaciones clínicas

El bacilo tuberculoso una vez dentro del animal, puede diseminarse como tuberculosis primaria (periodo del complejo primario), pero también como tuberculosis secundaria (periodo de diseminación post-primaria) (Soto, 2007; Martínez, 2008).

Tuberculosis primaria: tras la inhalación de los bacilos contenidos en aerosoles, estos alcanzan los alveolos en donde son fagocitados por macrófagos que destruyen a la mayoría de bacilos gracias a respuesta inmune innata. Si el bacilo sobrevive la primera línea de defensa, inicia su multiplicación dentro de los macrófagos y células adyacentes (Thoen *et al.*, 2009; Delogu *et al.*, 2013). Se establece, lo que se conoce como foco primario, que consiste en una pequeña zona

necrótica que contiene bacilos vivos y muertos rodeados por una capa de macrófagos. Posteriormente, los bacilos se transportan de este foco necrótico por vía linfática o hemática a otros sitios donde se origina el mismo tipo de lesión. La combinación de lesiones en el órgano de entrada y en el ganglio linfático regional constituyen el complejo primario (Rodríguez, 2012).

La calcificación de las lesiones inicia aproximadamente 2 semanas después. Una vez que la respuesta inmune adaptativa entra en acción, la migración de neutrófilos, linfocitos y otras células inmunes al sitio de infección primaria dan lugar a un infiltrado celular que posteriormente forma la estructura típica de un granuloma, componentes fibróticos rodean el granuloma produciendo la calcificación de manera tal, que los bacilos contenidos en el interior se protegen de la respuesta inmune del hospedador (Martínez, 2008; Gyles *et al.*, 2010; Delogu *et al.*, 2013).

Tuberculosis secundaria: Al disminuir las defensas del animal, la diseminación post-primaria es aquella, en la cual los bacilos dan origen a granulomas tuberculosos en diferentes órganos; y se establece el tubérculo característico de la enfermedad (Soto, 2007).

La evolución lenta por vía linfo-hemática y afectación multisistémica que se conoce como tuberculosis miliar; afecta pulmones, hígado, bazo, glándula mamaria, músculos y toda la cadena ganglionar (Romero, 2012). El proceso es lento y puede ser clínicamente inaparente por largo tiempo; incluso cierto número de animales pueden pasar toda su vida útil sin sintomatología evidente, pero constituyendo una amenaza potencial para el resto del rebaño (Martínez, 2008).

Las manifestaciones clínicas dependen de factores como ruta de infección, estado inmune del hospedador, virulencia de la cepa, entre otros (Rodríguez, 2012),

y se caracterizan principalmente por la formación de granulomas nodulares conocidos como tubérculos, los cuales se detectan en el análisis *post-mortem*. Puesto que la enfermedad es de carácter crónico en muy pocos casos se observa presentaciones con curso agudo (CFSPH, 2009; Romero, 2012). Especialmente en países con un control estricto de tuberculosis bovina los animales tuberculosos rara vez llegan a presentar síntomas; la mayor parte del ganado bovino infectado se identifica tempranamente y son poco frecuentes las infecciones sintomáticas (CFSPH, 2009).

Cuando se presentan síntomas, generalmente en etapas avanzadas, estos no son específicos de la enfermedad. En general se observa emaciación progresiva, debilidad y disminución en la producción láctea o cárnica, inflamación de ganglios linfáticos cervicales y retrofaríngeos que pueden llegar a drenar, y síntomas clásicos de enfermedad pulmonar: tos, disnea, disfunción pulmonar en general (CFSPH, 2009; Romero, 2012). Como enfermedad crónica, la tuberculosis persiste por periodos prolongados en el ganado, donde las condiciones sanitarias y de hacinamiento contribuyen a su diseminación (Martínez, 2008).

Epidemiología

La tuberculosis bovina está incluida en la lista única de enfermedades de declaración obligatoria de la Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE, 2016). Luego de la introducción del proceso de pasteurización, y de establecer programas de erradicación basados en detección y sacrificio de animales reactivos, muchos

países desarrollados eliminaron la tuberculosis del ganado, sin embargo reservorios de animales silvestres han comprometido programas de erradicación de tuberculosis en ganado en países como Reino Unido, Nueva Zelanda, Canadá y Estados Unidos (Thoen *et al.*, 2009).

La información acerca de la enfermedad en animales es mínima en países en vías de desarrollo, se reporta la situación epidemiológica de ciertas zonas de estos países, pero no a nivel nacional (FAO, 2012). A pesar de tratarse de una enfermedad de declaración obligatoria, en países con sistemas de vigilancia y de notificación de enfermedades deficientes, ésta generalmente no se notifica (FAO, 2012). En países que reportan una prevalencia nacional baja, pueden existir problemas serios en rebaños específicos. Según el Organismo Internacional Regional de Sanidad Agropecuaria (OIRSA) la prevalencia de tuberculosis bovina reportada para el 2011 fue 0.65% en Guatemala, 0.30% en Honduras, 1% en El Salvador, 0.24% en Nicaragua, 0.8% en Costa Rica, 0.016% en Panamá, y 0.26% en República Dominicana (OIRSA, 2012).

En el año 2011 se reportaron 268.400 casos nuevos de tuberculosis humana (TB) en el continente americano, el 67% de estos casos se reportó en América del Sur, 17% en México y Centroamérica; 11% en el Caribe y 5,1% en América del Norte (WHO, 2013). Estudios en diferentes países revelan que, *M. bovis* causa menos del 2% de todos los casos de tuberculosis humana en los Estados Unidos de América (de Kantor, 2010; CDC, 2011), menos de 0,5% en España (FAO, 2012) y menos del 1% en Latinoamérica (Thoen *et al.*, 2009). En el año 2013, el 13% de 9 millones de personas que desarrollaron tuberculosis a nivel mundial, fueron personas positivas al virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) (WHO, 2014). Se

crea, que la tuberculosis bovina puede representar un riesgo para la población VIH positiva (FAO, 2012), y se considera por eso una enfermedad importante para la salud pública.

Diagnóstico

La enfermedad se diagnostica en el bovino vivo mediante pruebas de hipersensibilidad retardada, que consiste en la inyección intradérmica de derivado proteico purificado (PPD) bovino, en la prueba intradérmica simple o prueba de tuberculina simple, o inyectando PPD bovino y PPD aviar, en la prueba de tuberculina comparativa con lectura luego de 72 horas, observando o no un incremento en el grosor de la piel (OIE, 2012). Esta prueba de tuberculina representa una preocupación constante, por las características diagnósticas de sensibilidad y especificidad muy variables (sensibilidad 40-90% y especificidad 78-96%) y reacciones falsas positivas y falsas negativas, lo que reduce la eficacia de los programas de control (Suazo *et al.*, 2010).

Recientemente ha sido aprobado y evaluado, como técnica complementaria para el diagnóstico *ante-mortem* de tuberculosis en bovino, el ensayo de gamma interferón el cual mide la liberación de gamma interferón a partir de linfocitos sensibilizados con PPD bovina en comparación con PPD aviar. Países de la Unión Europea, Estados Unidos, Nueva Zelanda y Australia han aprobado su uso en programas nacionales (OIE, 2012; Romero, 2012).

Luego de la muerte, la enfermedad se diagnostica a través del examen *post-mortem* en mataderos. En bovinos reactivos a la prueba de tuberculina se confirma

el diagnóstico por la presencia de lesiones compatibles con tuberculosis, estas lesiones características llamadas tubérculos son de color amarillento, con material caseoso o calcificado. Se encuentran generalmente durante la inspección de nódulos linfáticos asociados al tracto respiratorio (linfonodos bronquiales y mediastínicos) pero pueden encontrarse también en otros órganos como pulmones, hígado y bazo (Thoen *et al.*, 2009). Las técnicas histopatológicas y bacteriológicas que se utilizan para confirmar lesiones macroscópicas de tuberculosis, identifican la presencia de bacilos ácido-alcohol resistentes (B.A.A.R) en muestras clínicas o tejidos o aíslan el agente en medio de cultivo, lo que se considera la prueba de oro (Suazo *et al.*, 2010; OIE, 2012). Los medios usualmente utilizados para el aislamiento de *M. bovis*, son medios a base de huevo, enriquecidos con piruvato de sodio; mientras que los medios a base de glicerol tradicionalmente son utilizados para el cultivo de *M. tuberculosis* ya que inhiben el crecimiento de *M. bovis* (Medeiros *et al.*, 2010; Gormley *et al.*, 2014).

El desarrollo de técnicas moleculares basadas en la identificación y análisis de ácidos nucleicos ha dado un gran impulso a la investigación epidemiológica de la tuberculosis humana y animal, al proporcionar herramientas que permiten identificar y comparar los patrones genómicos de cepas obtenidas en distintos escenarios epidemiológicos (Retamal *et al.*, 2003). Estas técnicas se pueden clasificar principalmente en dos grupo de acuerdo al análisis del genoma total o parcial; las primeras aunque tienen mayor valor epidemiológico son técnicas más difíciles de automatizar, mientras que las segundas son las más ampliamente utilizadas (Gormley *et al.*, 2014), sin embargo, deben ser evaluadas para ser utilizadas como complemento al diagnóstico tradicional de la infección. La Reacción

en Cadena de la Polimerasa (PCR), con el uso de iniciadores específicos para la detección de *M. bovis* ha sido empleada en múltiples estudios. Diversas investigaciones demuestran que la PCR directamente de muestras biológicas presenta características diagnósticas que le permiten ser utilizada como prueba diagnóstica complementaria de esta enfermedad, reportando sensibilidades entre 70-90% y especificidades del 90-95%, además de permitir un diagnóstico confirmativo en menor tiempo que el cultivo y se pueden amplificar regiones que determinan la especie de micobacteria involucrada en la infección (Cedeño *et al.*, 2005; Martínez, 2008; Suazo *et al.*, 2010; Thacker *et al.*, 2011; Courcoul *et al.*, 2014; Neeraja *et al.*, 2014). Se han evaluado diferentes dianas para la identificación de micobacterias como la amplificación del gen que codifica la subunidad 16S del ARN ribosómico que permite identificar a bacterias del género *Mycobacterium* (OIE, 2012; Romero, 2012). Para la identificación a nivel de especie dentro del complejo *M. tuberculosis* las secuencias de inserción IS6110 o IS1081, son las dos más utilizadas para la caracterización molecular, pero su presencia y número de copias en cepas de *M. bovis* limita su uso (Arraíz *et al.*, 2006; Romero, 2012; Gormley *et al.*, 2014). Otra de las técnicas empleadas para la identificación es a través de polimorfismos restringidos a un solo nucleótido (SNPs por sus siglas en inglés) en los genes *gyrA*, *katG*, *pncA*, *oxyR'*, *hsp65*, y *gyrB* (OIE, 2012), sin embargo, se les utiliza generalmente para identificación a partir de aislamientos y por si solos no son capaces de diferenciar todas las especies del complejo (Huard *et al.*, 2003). Recientemente se propuso un esquema de diferenciación del complejo *M. tuberculosis* en base a 16 regiones de diferencia (RD) presentes en el genoma de *M. tuberculosis*, pero ausentes en *M. bovis*, *M. bovis* variedad BCG y otros

miembros del complejo; por lo tanto determinar la presencia o ausencia de RD permite identificar de una forma muy fiable las especies pertenecientes a complejo (OIE, 2012; Huard *et al.*, 2003; Romero, 2012; Gormley *et al.*, 2014).

Tratamiento y control

En contraste con los avances obtenidos en el tratamiento de tuberculosis en humanos, el estudio de medicamentos para el tratamiento de la tuberculosis bovina no ha arrojado resultados satisfactorios sino más bien contribuido a la resistencia de cepas a ciertos antibióticos (FAO, 2012). Es por eso, que aún no se recomienda un plan terapéutico para el tratamiento de la tuberculosis bovina, sino que se ejecutan medidas para el control y erradicación, basadas principalmente en el diagnóstico correcto y oportuno de los animales infectados, y eliminación de los mismos. Dándole un seguimiento a los animales de las fincas que estuvieron en contacto con estos animales tuberculosos (Abalos y Retamal, 2004; Thoen *et al.*, 2009; FAO, 2012;).

Tuberculosis bovina en Costa Rica

En Costa Rica, la tuberculosis fue declarada en el 2008 una enfermedad de combate particular obligatorio, bajo normativa y fiscalización del Servicio Nacional de Sanidad Animal (SENASA), el diagnóstico de campo de la tuberculosis se hace por medio de la prueba de tuberculina según el Reglamento para la Prevención, el Control y Erradicación de la Tuberculosis en los Bovinos, con la eliminación de los animales reactivos, en finca o matadero oficialmente reconocido (Ley N°34852-

MAG, 2008). A pesar de que se realiza el combate particular de la enfermedad desde hace siete años, no existe información sobre la situación actual de la tuberculosis bovina en el país. La enfermedad ha sido totalmente descuidada, y se cree, que la prevalencia a nivel nacional puede estar subestimada a menos de un 1% (Dr. Bonilla, comunicación personal).

En Costa Rica, el diagnóstico *post-mortem* de tuberculosis bovina se realiza mediante identificación del agente por tinción Ziehl-Neelsen (ZN), y posterior confirmación mediante cultivo en medio Stonebrink por un periodo igual o mayor a 60 días, para determinar el crecimiento de las bacterias, lo que resulta un proceso largo y tedioso para confirmar el diagnóstico. Aun cuando el cultivo bacteriológico es considerado el estándar de oro para confirmar el agente, es necesario implementar técnicas que permitan obtener un diagnóstico confiable en menor tiempo. Por estas razones es necesario evaluar si el PCR es una técnica diagnóstica con buena sensibilidad y especificidad para *M. bovis* y cuál es el grado de concordancia entre el PCR, inspección *post-mortem* en matadero y tinción Ziehl-Neelsen que son técnicas actualmente utilizadas en Costa Rica para el diagnóstico de tuberculosis bovina.

Referencias Bibliográficas

- Abalos, P., & Retamal, P. (2004). Tuberculosis: ¿una zoonosis re-emergente? *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.*, 23(2), 583–594.
- Alwathani, H., Ashgan, M., & Ihab, M. (2012). Nested polymerase chain reaction as a molecular tool for detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex recovered from milk samples. *Afr. J. Microbiol. Res (African Journal of Microbiology Research)*, 6(6), 1338–1344.
- Arráiz, N., Romay, Z., Faría, N., & Mujica, D. (2006). Identificación diferencial de aislados clínicos de *Mycobacterium tuberculosis* y *Mycobacterium bovis* por un ensayo de RCP múltiple. *Revista Científica FCV-LUZ*, 16(6), 622–628.
- Cedeño, I., Obaldía, R. de, Sanjur, O., Bayard, V., Ortega-Barría, E., & Escobar, C. (2005). Use of the Polymerase Chain Reaction for diagnosing bovine tuberculosis in Panama. *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.*, 24(3), 1067–1076.
- Center for Disease Control and Prevention. (Agosto, 2011). *Mycobacterium bovis (Bovine Tuberculosis) in Humans*.
- Courcoul, A., Moyen, J. L., Brugère, L., Sandy.F., Hénault, S., & Gares, H. e. a. (2014). Estimation of Sensitivity and Specificity of Bacteriology, Histopathology and PCR for the Confirmatory Diagnosis of Bovine Tuberculosis Using Latent Class Analysis. *PLoS ONE*, 9(3), e90334.
- de Kantor, I. N. de, LoBue, P. A., & Thoen, C. O. (2010). Human tuberculosis caused by *Mycobacterium bovis* in the United States, Latin America and the Caribbean. *INT J TUBERC LUNG DIS (The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease)*, 14(11), 1369–1373.
- Delogu, G., Sali, M., & Fadda, G. (2013). The Biology of *Mycobacterium tuberculosis* Infection. *Mediterranean Journal of Hematology and Infectious Diseases*, 5(1).
- Farga, V. (2004). La conquista de la tuberculosis. *Rev. chil Enf Respir (Revista Chilena de enfermedades respiratorias)*, 20(2), 101–108.

- Gormley, E., Corner, L., Costello, E., & Rodriguez-Campos, S. (2014). Bacteriological diagnosis and molecular strain typing of *Mycobacterium bovis* and *Mycobacterium caprae*. *Research in Veterinary Science*, 97, S30-S43.
- Grange, M., Yates, M., & de Kantor I.N. (1996). *Guidelines for speciation within the Mycobacterium tuberculosis complex*. Retrieved from World Health Organization website: <http://www.who.int/emc>
- Gyles, C. L., Prescott, J. F., Songer, G., & Thoen, C. O. (2010). *Pathogenesis of Bacterial Infections in Animals, Fourth Edition* (4th ed.). Iowa. USA: Blackwell.
- Huard, R. C., Lazzarini, L., Butler, W. R., van Soolingen, D., & Ho, J. (2003). PCR-Based method to differentiate the subspecies of the *Mycobacterium tuberculosis* Complex on the basis of genomic deletions. *J. Clin. Microbiol. (Journal of Clinical Microbiology)*, 41(4), 1637–1650.
- La Gaceta N°230. San José, Costa Rica, 27 de Noviembre de 2008.
- Markey, B., Leonard, F., Archambault, M., Cullinane, A., & Maguire, D. (2013). *Clinical Veterinay Microbiology* (2da): MOSBY-ELSEVIER.
- Martínez, C. A. (Mayo, 2008). *Diagnóstico Molecular de Mycobacterium bovis en ganado bovino de la zona centro del Estado de Veracruz* (Tesis). Universidad Veracruzana, Veracruz, Ver.
- Medeiros, L. d. S., Marassi, C. D., Figueiredo, E. E., & Lilenbaum, W. (2010). Potential application of new diagnostic methods for controlling bovine Tuberculosis in Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology*, 41(3), 531–541.
- Mendez, J. M. (2008). *Tuberculosis Bovina* (Tesis Licenciatura). Universidad Michuacana de San Nicolás de Hidalgo, Morelia, Michoacán.
- Neeraja, D., Veeregowda, B. M., Rani, M., Rathnamma, D., Narayanaswamy, H. D., Venkatesha, M. D., & et al. (2014). Identification of *Mycobacterium tuberculosis* complex by culture and duplex Polymerase Chain Reaction in bovines. *Ajava (Asian Journal of Animal and Veterinary Advances)*, 9(8), 506–512.
- Organismo Internacional Regional de Sanidad Agropecuaria. (Mayo, 2012). *Sanidad e Inocuidad Pecuaria en Centroamérica y República Dominicana: Una agenda prioritaria de políticas e inversiones*.

- Organización Mundial de Sanidad Animal. (2012). *Manual de la OIE sobre animales terrestres: Tuberculosis Bovina*.
- Organización Mundial de Sanidad Animal. (2016). Enfermedades de la Lista de la OIE 2016. Recuperado de <http://www.oie.int/es/sanidad-animal-en-el-mundo/oie-listed-diseases-2016/>
- Organización Mundial para la Alimentación y Agricultura. (2012). *Boletín de enfermedades transfronterizas de los animales: La tuberculosis bovina en la interfaz entre animales, seres humanos y ecosistema* (No. 40), pp. 1–11.
- Retamal M, Martínez, M. A., & Abalos, P. (2003). Secuencias de inserción IS6110 e IS1081 en cepas de *Mycobacterium bovis* provenientes de bovinos beneficiados en la Región Metropolitana. *Revista chilena de infectología*, 20(3).
- Rodríguez, S. (2012). *Epidemiología Molecular de Mycobacterium bovis y Mycobacterium caprae en España* (Tesis Doctoral). Universidad Complutense de Madrid, Madrid.
- Romero, B. M. (2012). *Tuberculosis bovina. Epidemiología molecular y su importancia en sanidad animal y salud pública* (Tesis doctoral). Universidad Complutense de Madrid, Madrid.
- Soto, L. R. (2007). *Test de gamma interferón como prueba confirmatoria para el diagnóstico de la tuberculosis bovina* (Tesis de maestría). Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima-Perú.
- Suazo, F., Harris, B., Díaz, C., Thomsen, B., Stuber, T., & Suárez, D. e. a. (2010). Sensibilidad y especificidad de PCR anidada y Spoligotyping como pruebas rápidas de diagnóstico de tuberculosis bovina en tejido fresco. *Rev Mex Cienc Pecu*, 1(4), 403–415.
- Thacker, T. C., Harris, B., Palmer, M. V., & Waters, W. R. (2011). Improved specificity for detection of *Mycobacterium bovis* in fresh tissues using IS6110 real-time PCR. *BMC Veterinary Research*, 7(1), 50.
- The Center for Food Security and Public Health, Intitute for International Cooperation in Animal Biologics. (2009). *Bovine Tuberculosis*.

- Tohen, C., LoBue, P. A., Enarson, D., Kaneene, J., & de Kantor I.N. (2009). Tuberculosis: a re-emerging disease in animals and humans. *Veterinaria Italiana*, 45(1), 135–181.
- Thomas M. D. (2006). The history of tuberculosis. *Respiratory Medicine*, 100(11), 1862–1870.
- World Health Organization. (2013). *Tuberculosis in the Americas: Regional Report 2012*. Epidemiology, Control and Financing. Washington DC.
- World Health Organization. (2014). *Global tuberculosis Report*. France.

ARTICULO I

Capacidad diagnóstica de la inspección *post-mortem*, tinción Ziehl-Neelsen y PCR para la tuberculosis en ganado bovino de Costa Rica.

Resumen

La tuberculosis bovina es una enfermedad bacteriana crónica con potencial zoonótico causada por *Mycobacterium bovis*. En Costa Rica, el cultivo bacteriológico es considerado la prueba de oro para emitir el diagnóstico confirmativo de tuberculosis; el cual, requiere un periodo de incubación igual o mayor a 60 días, para determinar la presencia o ausencia de la bacteria, lo que resulta un proceso largo y tedioso para confirmar el diagnóstico. El objetivo del presente trabajo fue implementar una técnica de diagnóstico rápida y certera, como lo es la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR), para ser utilizada como complemento al cultivo bacteriológico, y determinar las características diagnósticas del PCR implementado, de la técnica de ZN e inspección *post-mortem* con respecto al cultivo bacteriológico. Fueron analizados tres grupos de muestras, en el Grupo 1 se incluyeron 47 aislamientos de *M. bovis*; en el Grupo 2, se incluyeron 51 muestras de tejido de bovinos con lesiones compatibles con tuberculosis (LCT); mientras que, en el Grupo 3 fueron analizadas 100 muestras de tejido de bovinos sin sospecha de tuberculosis. Del total de 198 muestras analizadas, un 49.5% (98/198 Grupo 1 y Grupo 2) correspondieron a animales con LCT, solamente un 54.1% (53/98) resultaron cultivo positivo, un 47.9% (47/98) fueron identificadas como PCR positivas, y un 51.0% (50/98) se determinaron positivas en tinción ZN. El PCR mostró valores de sensibilidad entre 78.1%-100% (IC95%: 63.8-100.0) y de especificidad entre 96.2%-100% (IC95%: 88.8-103.5), mientras que la tinción ZN mostró valores de sensibilidad entre 62.5%-71.4% (IC95%: 45.7-98.8) y de especificidad entre 73.1%-94.1% (IC95%: 56.0-98.3) comparados al cultivo bacteriológico. La inspección *post-mortem* (Grupo 2 y 3) mostró una sensibilidad del 100% (IC95%: 100.0-100.0) y una especificidad del 84.0% (IC95%: 77.5-90.6). Se concluye,

que la inspección *post-mortem* constituye una excelente prueba tamiz en el diagnóstico de la tuberculosis bovina en Costa Rica, y el PCR, puede ser incluido al diagnóstico de laboratorio como técnica complementaria al cultivo, para confirmar la presencia de *M. bovis*, con la gran ventaja de obtener resultados en un menor tiempo (dos días).

Palabras claves:

Tuberculosis, ganado bovino, zoonosis, diagnóstico, PCR, tejido.

Abstract

Bovine tuberculosis is a bacterial chronic disease with zoonotic potential, caused by *Mycobacterium bovis*. In Costa Rica, the bacterial culture is considered the gold standard for issuing the confirmatory diagnosis of tuberculosis, which requires an incubation period equal to or greater than 60 days, to determine the presence or absence of the bacterium, which is a long process and tedious to confirm the diagnosis. The objective of the present investigation was to implement a rapid and accurate diagnostic technique, such as Polymerase Chain Reaction (PCR), to be used complementary to the bacterial isolation, and to determine the diagnostic characteristics of the PCR, the ZN staining and the *post-mortem* inspection, with regard to bacteriological culture. Three groups of samples were analyzed, Group 1 consisted of 47 *M. bovis* isolates; in Group 2, 51 tissue samples belonging to bovines with lesions compatible with tuberculosis (LCT) were included, whereas in Group 3, they were analyzed tissues belonging to 100 bovines without suspicion of tuberculosis. Of the total of 198 samples analyzed, 49.5% (98/198, Group 1 and Group 2) belonged to animals with LCT, yielding only 54.1% (53/98) positive results in bacterial culture, 47.9% (47/98) in PCR, and 51.0% (50/98) with ZN staining. Sensitivity and specificity determined for the PCR were 78.1%-100% (95%CI: 63.8-100.0) and 96.2%-100% (95%CI: 88.8-103.5), respectively, whereas ZN

staining showed sensitivity of 62.5%-71.4% (95%CI: 45.7-98.8) and specificity of 73.1%-94.1% (95%CI: 56.0-98.3) compared to the bacterial culture. For the *post-mortem* inspection (Group 2 and 3) a sensitivity of 100% (95%CI: 100.0-100.0) and a specificity of 84.0% (95%CI: 77.5-90.6) was determined. It is concluded that the *post-mortem* inspection is an excellent screening test for the diagnosis of bovine tuberculosis in Costa Rica, and PCR can be included in laboratory diagnosis, as a complementary technique to bacterial culture, to confirm the presence of *M. bovis*, with the advantage of obtaining results in less time (two days).

Keywords

Tuberculosis, Cattle, zoonosis, diagnosis, PCR, tissue.

1. Introducción

La tuberculosis bovina es una enfermedad bacteriana crónica con potencial zoonótico causada por *Mycobacterium bovis*, una micobacteria del complejo *Mycobacterium tuberculosis* que posee el rango más amplio de hospedadores (Gyles *et al.*, 2010; Markey *et al.*, 2013; Sa'idu *et al.*, 2015). Afecta al ganado vacuno, otros animales domésticos como cabras, caballos, cerdos, perros, gatos, y algunas poblaciones de animales silvestres que desempeñan un rol muy importante como reservorio y fuente de infección para el ganado, dificultando los programas de erradicación (Thoen *et al.*, 2009; FAO, 2012; Domingo *et al.*, 2014). Esta enfermedad está incluida en la lista de enfermedades de declaración obligatoria de la Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE, 2016). Ocasiona importantes pérdidas económicas a la industria ganadera, por limitar el libre comercio de animales y sus productos, además por los altos costos de los programas de control y erradicación (Suazo *et al.*, 2010).

El diagnóstico de campo y *ante-mortem* de la tuberculosis bovina se realiza por medio de la prueba de tuberculina, cuyas características diagnósticas varían entre 40-90% de sensibilidad y 78-96% de especificidad (Suazo *et al.*, 2010). Animales reactores positivos a la prueba son sacrificados en matadero, donde generalmente se detectan lesiones compatibles con la enfermedad. Estas lesiones se presentan especialmente en órganos parenquimatosos (pulmones, hígado, bazo) y nódulos linfáticos adyacentes (Gormley *et al.*, 2014). La identificación del agente en el diagnóstico *post-mortem* se realiza con la observación directa de bacilos ácido-alcohol resistentes (BAAR) por tinción

Ziehl-Neelsen (ZN) en granulomas sospechosos y el aislamiento mediante cultivo bacteriológico (Alwathnani *et al.*, 2012; FAO, 2012). Si bien la técnica de tinción ZN es rápida y económica, no diferencia entre micobacterias y otros microorganismos que comparten la característica de ácido alcohol resistencia, como bacterias de los géneros *Corynebacterium*, *Nocardia* y *Rhodococcus* (Medeiros *et al.*, 2010). Además se detecta la presencia de BAAR, cuando las concentraciones son superiores a 10^4 bacterias por mililitro; por lo que este método se considera de baja sensibilidad y especificidad (85% y 83%, respectivamente) (Medeiros *et al.*, 2010; Chukwu *et al.*, 2013; Gormley *et al.*, 2014; Neejara *et al.*, 2014).

La prueba de oro para emitir un diagnóstico confirmativo de tuberculosis lo constituye el cultivo bacteriológico, el cual requiere un periodo de incubación igual o mayor a 60 días, para determinar la presencia o ausencia de la bacteria, lo que resulta un proceso largo y tedioso para confirmar el diagnóstico (Medeiros *et al.*, 2010; Madigan, 2012; Araújo *et al.*, 2014; Courcoul *et al.*, 2014). Debido a la dificultad del aislamiento primario de *M. bovis* se utilizan diversos procedimientos pre-tratamientos en la muestra (homogenización y descontaminación) y el uso de medios de cultivos que inhiban el crecimiento de microorganismos contaminantes para recuperar las micobacterias. Estos factores, influyen en la detección del agente en el cultivo bacteriológico (Gormley *et al.*, 2014; Corner *et al.*, 2012). La baja sensibilidad (alrededor de 85%) y la necesidad de confirmar cada aislado mediante pruebas bioquímicas o técnicas

moleculares, son desventajas adicionales de esta técnica (Medeiros *et al.*, 2010; Madigan, 2012; Araújo *et al.*, 2014; Courcoul *et al.*, 2014).

El uso de técnicas moleculares, como herramienta alternativa para la identificación de micobacterias, se ha incrementado en los últimos años, por ser técnicas rápidas y confiables en la identificación de *M. bovis* (Martínez, 2008; Medeiros *et al.*, 2010; Alwathnani *et al.*, 2012); sin embargo, deben ser evaluadas previamente, para determinar su utilidad como complemento al diagnóstico tradicional de la infección. La técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) se puede realizar a partir de ADN de tejido sin cultivo previo, y se pueden amplificar regiones que determinan la especie de micobacteria involucrada en la infección, obteniendo resultados en tan solo horas, en comparación con el cultivo bacteriológico (Martínez, 2008, Neejara *et al.*, 2014). Se han evaluado diferentes protocolos, que estudian diferentes dianas para la detección de micobacterias mediante PCR, especialmente para identificar y diferenciar las dos especies de mayor importancia clínica *M. tuberculosis* y *M. bovis* los cuales poseen un 99.95% de identidad en la secuencia de sus genomas (Garnier *et al.*, 2003). Diversos autores describen el siguiente protocolo como simple, sencillo rápido y específico: la amplificación del gen RV0577, el cual permite diferenciar micobacterias del complejo *M. tuberculosis* de micobacterias ambientales, los cuales no poseen ese gen (Huard *et al.*, 2003; Arráiz *et al.*, 2005, 2006,2007; Taylor *et al.*, 2007). Muestras que resultan positivas, se someten a un segundo PCR que amplifica la región de diferencia RD4, la cual se encuentra ausente en *M. bovis* y *M. bovis* variedad BCG (Bacilo

Calmette-Guérin), pero presente en otras especies del complejo *M. tuberculosis*, permitiendo así la diferenciación de *M. bovis* y *M. bovis* variedad BCG de otras especies del complejo *M. tuberculosis* (OIE, 2009; Huard *et al.*, 2003; Romero, 2012; Gormley *et al.*, 2014).

Existe concordancia, de que ninguna de las técnicas utilizadas para el diagnóstico de tuberculosis bovina es capaz de detectar a todos los bovinos infectados con *M. bovis*, especialmente si la prevalencia de la enfermedad se encuentra en niveles mínimos. Por lo tanto, es necesario implementar un protocolo de diagnóstico, combinando técnicas tradicionales y alternativas, que permitan un diagnóstico rápido, sensible y específico (Medeiros *et al.*, 2010). El presente trabajo tiene como objetivo implementar la técnica de PCR para el diagnóstico de *M. bovis* y estimar las características diagnósticas del PCR, de la tinción Ziehl-Neelsen y de la inspección *post-mortem* respecto al estándar de oro para la tuberculosis bovina en Costa Rica.

2. Metodología

2.1 Diseño de estudio, toma, tamaño y clasificación de la muestra

Se realizó un estudio de tipo observacional transversal. Las muestras fueron recolectadas en cuatro mataderos oficiales (Arreo, Gico, Montecillos y del Valle) autorizados por el Servicio Nacional de Salud Animal (SENASA) de Costa Rica, los cuales se encuentran ubicados en el Valle Central del país. Las muestras se obtuvieron durante la inspección *post-mortem* y fueron remitidas

por médicos veterinarios oficiales de los mataderos al SENASA. Se procesaron en el Laboratorio de Bioseguridad Nivel III del Centro Nacional de Referencia de Micobacteriología del Instituto Costarricense de Investigación y Enseñanza en Nutrición y Salud (CNRM-INCIENSA), en el Laboratorio de Bacteriología del SENASA y en el Laboratorio de Zoonosis de la Escuela de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional (EMV-UNA). Se obtuvieron 198 muestras, las cuales se dividieron en tres grupos.

El primer grupo lo conformaron 47 muestras de cultivos en medio Stonebrink, donados por el Laboratorio de Bacteriología del SENASA, los cuales habían sido procesados entre 2012-2014 a partir de muestras de linfonodos y pulmones de bovinos con lesiones sospechosas de tuberculosis. Del SENASA se obtuvo los resultados de las 47 muestras en tinción Ziehl-Neelsen y cultivo bacteriológico.

En el segundo grupo se incluyeron 51 muestras de tejido de bovinos que se consideraron sospechosos, por ser reactores positivos a la prueba de tuberculina o porque presentaron lesiones compatibles con tuberculosis (LCT) durante la inspección *post-mortem*. Las muestras fueron remitidas por médicos veterinarios oficiales de los mataderos a SENASA para su análisis entre 2014-2016. Los tejidos recolectados en este grupo de animales se clasificaron además macroscópicamente en lesiones tipo I (lesiones supurativas, sin necrosis o fibrosis evidente), tipo II (lesiones fibrosas, con necrosis caseosa moderada), o lesiones tipo III (lesiones circunscritas a una cápsula fibrosa gruesa, con necrosis caseosa central extensa) (Menin *et al.*, 2013; Estrada-Chávez *et al.*, 2004).

En el tercer grupo se incluyó 100 muestras de tejido (linfonodos retrofaríngeos, traqueobronquiales y mediastínicos) de bovinos sin sospecha de tuberculosis (reactores negativos a la prueba de tuberculina o sin LCT). Los cuales fueron recolectados durante el 2015 en los cuatro mataderos. En el Cuadro 1 se detalla el tipo de tejido animal recolectado en los diferentes grupos.

Cuadro 1: Tipo de tejido animal analizado en los diferentes grupos.

Tipo de tejido/ Grupo	Linfonodos	Pulmón	Linfonodos y pulmón	Total
Grupo 1	44	1	2	47
Grupo 2	29	11	11	51
Grupo 3	100	0	0	100

Los tejidos de los grupos 2 y 3, se limpiaron durante la recolección, del exceso de grasa, y se colocaron en bolsas plásticas herméticas debidamente cerradas. Se rotularon con el número de protocolo asignado por SENASA (Grupo 2) o con la identificación del animal (Grupo 3). En cada bolsa se colocó únicamente muestras correspondientes a un solo animal y se obtuvo además para cada una de las muestras información sobre edad, raza, sexo y propósito zootécnico del bovino. Las muestras se mantuvieron a temperatura de refrigeración (4°C) durante el envío al laboratorio donde se congelaron a -20°C hasta su procesamiento mediante tinción Ziehl-Neelsen, cultivo y PCR.

2.2 Cultivo bacteriológico y tinción Ziehl-Neelsen.

Independientemente de la presencia o no de lesiones en los tejidos del grupo 2 y 3, se seleccionó una pequeña parte del tejido, y se cortó en secciones pequeñas. En el caso de muestras sospechosas se optó por la zona que presentaba material caseoso. Antes de macerar, se tomó una porción de esta muestra y se realizó frotis por aposición del tejido, dejándose secar dentro de la cámara de flujo laminar para posteriormente realizar la tinción Ziehl-Neelsen. Se cortaron porciones pequeñas de la muestra seleccionada en una placa de Petri, luego se colocaron dentro de un mortero y se trituraron agregando 2 ml de agua destilada estéril. Se continuó macerando hasta obtener una suspensión homogénea. De la suspensión homogénea se separó 0.5 ml en tubos Eppendorf para realizar posteriormente la extracción de ADN. El resto de macerado se depositó en un tubo cónico de 15 ml para realizar la descontaminación utilizando el método de Petroff como se describe en el Manual para el Diagnóstico Bacteriológico de la Tuberculosis (OPS, 2008). Al macerado se agregó igual cantidad de hidróxido de sodio (NaOH) al 4% para descontaminar, se incubó a 37°C durante 15 minutos agitando cada 5 minutos, luego se agregó 1 gota de fenolftaleína al 0.5%, y se observó el cambio de color a fucsia. El exceso de álcali se neutralizó con ácido sulfúrico (H₂SO₄) al 15%, hasta que la muestra se tornó incolora. El exceso de ácido se neutralizó con NaOH al 2% hasta que se observó cambio de color a rosado y nuevamente se neutralizó con H₂SO₄ al 1%. Seguidamente la muestra descontaminada se centrifugó a 2,000 g durante 12-20 minutos, finalmente se eliminó el sobrenadante y se resuspendió el sedimento

con 2 ml de agua destilada estéril, se colocó en el vortex y se dejó sedimentar nuevamente. Este sedimento se utilizó también para realizar tinción ZN (WHO, 1996; OPS, 2008; OIE, 2012).

Se inocularon 0.2 ml de la muestra descontaminada (6-8 gotas) en dos tubos de medio Stonebrink según descrito en el manual (OPS, 2008) y según directrices para la diferenciación del complejo *M. tuberculosis* (Grange *et al.*, 1996). Para ello se homogenizó el inóculo y se colocó en la superficie del medio inclinado, finalmente se incubaron a 37°C en ángulo de 45° con las tapas de los tubos aflojadas por 48 horas. Transcurridas las 48 horas se colocaron los tubos en forma vertical y se cerraron las tapas, para proceder a una incubación de 60 días. Los cultivos en los que se observó el crecimiento de colonias amarillas-cremosas, lisas y de forma redondeada a lo largo del medio inclinado se consideraron positivos.

Del sedimento y del frotis por aposición de tejido, se realizó tinción Ziehl-Neelsen, según el Manual para el Diagnóstico Bacteriológico de la Tuberculosis (OPS, 2008b). Las láminas se identificaron con el número de protocolo o identificación del animal, se secaron en la cámara de flujo laminar, se colocaron sobre un soporte para cubrir la superficie del extendido con fucsina fenicada por cinco minutos, se calentó por debajo del extendido con un mechero hasta emisión de vapores (evitando producir ebullición por exceso de calor), y se eliminó el colorante de manera suave, con agua corriente. Para decolorar se cubrió el portaobjeto con alcohol ácido al 3% efectuando movimientos de vaivén por menos de dos minutos y se lavó nuevamente con agua. Por último se cubrió

con azul de metileno por un minuto, se lavó y dejó secar a temperatura ambiente en posición vertical. Los frotis en los que se observó bacilos ácido-alcohol resistentes (BAAR) de color fucsia se consideraron positivos.

2.3 Reacción en Cadena de Polimerasa (PCR)

2.3.1 Extracción de ADN

Del primer grupo se tomó de 3-5 colonias, o un raspado de la superficie del cultivo sin crecimiento visible, y se colocaron en 200 µl de solución de extracción de ADN del ensayo Anyplex™ MTB/NTM (Seegene Inc.). Las colonias se inactivaron con calor a 100°C durante 20 minutos en un bloque calentador, luego se centrifugó a 2,000 g por 5 minutos.

La extracción de ADN de muestras de tejido (linfonodos y pulmones) de los grupos 2 y 3, se realizó mediante el ensayo DNeasy® Blood & Tissue Kit (QIAGEN) siguiendo las instrucciones del fabricante. La extracción se llevó a cabo el mismo día en que se realizaron las pruebas de tinción ZN y cultivo bacteriológico, para evitar descongelaciones continuas de las muestras que podrían afectar la calidad del ADN. El ADN extraído se almacenó a -20°C hasta su uso en la amplificación.

2.3.2 PCR para detección de bacterias del complejo *Mycobacterium tuberculosis* y diferenciación de *M. bovis*

Todas las muestras de ADN se sometieron a un primer PCR utilizando los iniciadores Rv0577F y Rv0577R (Cuadro 2), los cuales amplifican la secuencia

de la región codificante del gen Rv0577 de un tamaño de 786 pb, el cual se encuentra presente en todas las micobacterias del complejo *M. tuberculosis*.

Las muestras detectadas como positivas en el primer PCR se sometieron a un segundo PCR, utilizando los iniciadores Rv1510F y Rv1510R (Cuadro 2), los cuales amplifican un segmento del gen RV1510 de 1,033 pb del locus RD4, ausente en *M. bovis* y *M. bovis* variedad BCG. Por lo tanto, la ausencia de este fragmento en el segundo PCR, en muestras que resultaron positivas en el primer PCR, revela la presencia de *M. bovis* y *M. bovis* BCG (Huard *et al.*, 2003).

La amplificación para ambos PCR, se llevó a cabo según lo descrito por Huard *et al.* (2003), realizando modificaciones en la reacción y número de ciclos, como se describe a continuación: la mezcla de la reacción para un volumen final de 25 µl comprendió 13 µl de Dream Taq™ PCR Master Mix 2X (Fermentas®), 1 µl de cada iniciador (20µM), 1 µl de seroalbúmina bovina (BSA) (Thermo Scientific®), 2 µl de Dimetilsulfoxido (DMSO), 5 µl de ADN (250-500ng) y 2 µl de agua libre de nucleasas (Fermentas®) para completar la reacción. El programa de amplificación utilizado fue de 5 minutos de desnaturalización inicial a 94°C, 35 ciclos de desnaturalización (94°C por 1 minuto), hibridación (60°C para el primer PCR y 57°C para el segundo PCR por 1 minuto) y extensión (72°C por 1 minuto), y una extensión final de 72°C por 10 minutos (Huard *et al.*, 2003).

Como controles positivos se utilizaron ADN obtenido de la cepa de referencia ATCC H37Ra de *M. tuberculosis* y ADN de *M. bovis* BCG proporcionados por el CNRM-INCIENSA, mientras que el ADN de *M. bovis* fue proporcionado por el SENASA. Como control negativo se utilizó agua libre de

nucleasas (Fermentas®). Muestras que mostraron amplificaciones con tamaños de 786 pb en el primer PCR, se consideraron positivas a micobacterias del complejo *M. tuberculosis*, y se sometieron al segundo PCR, donde se consideraron positivas, las muestras que no mostraron amplificaciones.

2.3.3 Electroforesis

Los productos amplificados en el PCR fueron analizados mediante electroforesis en geles de agarosa al 1.5% en amortiguador TBE (Tris base, ácido bórico, EDTA 0.5M, pH 8), teñidos con fluorocromo GelRed® DNA Nucleic Acid Gel Strain y utilizando como marcador molecular GeneRuler 100pb Plus DNA ladder (Fermentas®). Los geles se corrieron en cámara de electroforesis a 85 voltios durante 1 hora y fueron observados mediante un transiluminador de luz ultravioleta.

Cuadro 2. Oligonucleótidos utilizados en las amplificaciones por PCR.

Nombre	Secuencia de nucleótidos	PCR	Tamaño (pb)	Referencia
Rv0577F	5'_ATGCCCAAGAGAAGCGAATACAGGCAA_3'	Específico del complejo <i>M. tuberculosis</i>	786 pb	Huard <i>et al.</i> , 2003
Rv0577R	5'_CTATTGCTGCGGTGCGGGCTTCAA_3'			
Rv1510F	5'_GTGCGCTCCACCCAAATAGTTGC_3'	Región de diferencia RD4, ausente en <i>M. bovis</i> y <i>M. bovis BCG</i>	1,033 pb	Huard <i>et al.</i> , 2003
Rv1510R	5'_TGTCGACCTGGGGCACAAATCAGTC-3'			

2.4 Secuenciación

Se seleccionaron productos amplificados en el primer PCR y se enviaron a secuenciar a MacroGen® (Seoul, Corea) con el fin de confirmar los resultados. Las secuencias obtenidas fueron editadas manualmente con el programa

BioEdit™ 7.2 Sequence Alignment Editor® y comparadas con otras secuencias en algoritmo BLAST en la base de datos del National Center for Biotechnology Information (NCBI).

2.5 Análisis estadístico.

Se determinó las características diagnósticas (sensibilidad, especificidad, tasa de falsos positivos, tasa de falsos negativos, valor predictivo positivo y valor predictivo negativo) de las diferentes técnicas de diagnóstico (inspección *post-mortem*, tinción ZN por aposición de tejido, ZN de sedimento y PCR) con respecto a la técnica de oro (cultivo bacteriológico); además, se estableció la concordancia entre las diferentes técnicas, a excepción del cultivo, mediante el coeficiente de Cohen's Kappa (k) utilizando el programa Winespiscope 2.0. Valores de $K > 0.75$ indicaron una concordancia excelente, entre 0.75 y 0.40 concordancia buena a regular y menores a 0.40 una concordancia pobre (González y Pérez, 2007; Tarabla y Signorini, 2013).

Se realizó, además, un análisis descriptivo de los resultados y de los bovinos que resultaron cultivo positivo, según las variables contenidas en el formulario de recepción de muestras (SENASA).

3. Resultados

De las 198 muestras analizadas, 98 (49.50%) correspondieron a animales sospechosos de sufrir tuberculosis. De estos, un total de 53 (54.1%) resultaron cultivo positivo, 50 (51.0%) se determinaron positivas en tinción ZN, y 47 (47.9%) fueron identificadas como PCR positivas (Figura 1). Las muestras positivas en el primer PCR amplificaron un segmento de 786pb correspondiente al gen RV0577 del complejo *M. tuberculosis* (Figura 2), y no amplificaron el gen RV1510 localizado en la región de diferenciación RD4 (segundo PCR), por lo que fueron identificadas como *M. bovis* (Figura 2). Las secuencias de seis muestras positivas en el primer PCR mostraron un porcentaje de homología del 99% con la secuencia *M. bovis* (CP010332.1) y *M. tuberculosis* (CP010340.1) depositadas en GenBank.

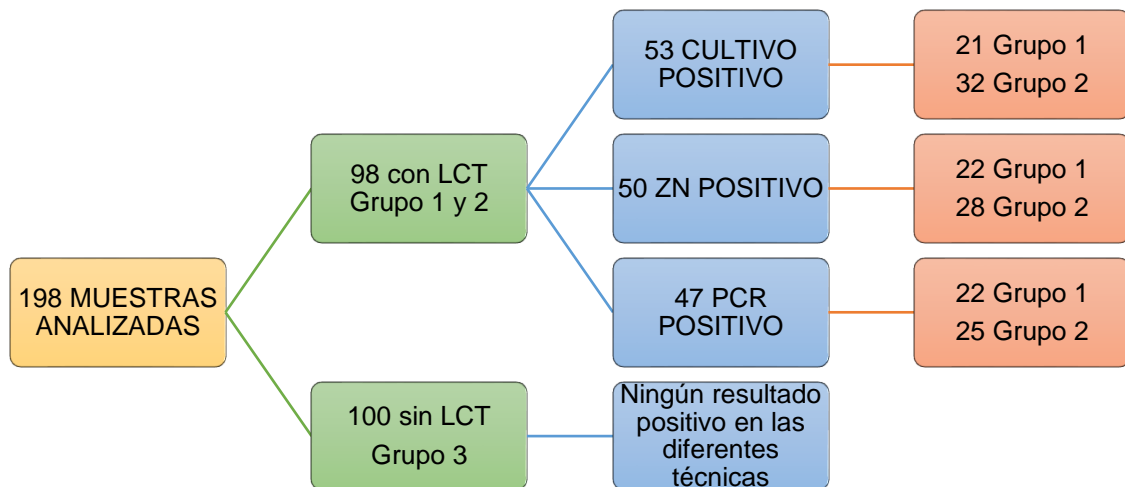


Figura 1: Frecuencia y distribución por grupos de los resultados positivos en cultivo, tinción ZN y PCR, según presencia o ausencia de lesiones compatibles con tuberculosis (LCT).

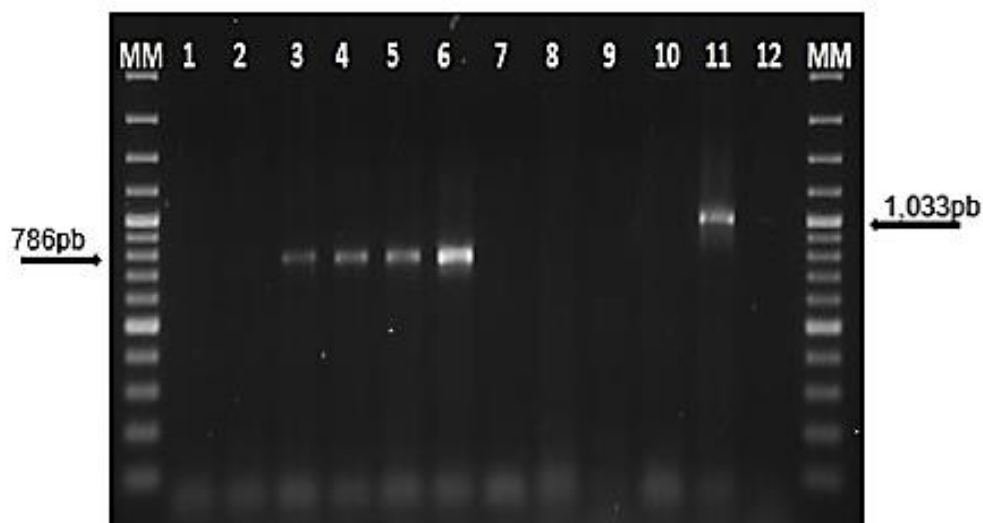


Figura 2: Electroforesis en gel de agarosa de los productos de amplificación del gen RV0577 para micobacterias del complejo *M. tuberculosis* (1-7) y del gen RV1510 dentro de la región de diferenciación RD4 ausente en *M. bovis* y *M. bovis* BCG (8-12) MM: marcador de peso molecular 100pb; 1 y 2 muestras negativas bovinas; 3: muestra positiva bovina; 4, 5 y 6: controles positivos de *M. bovis*, *M. bovis* BCG y *M. tuberculosis* H37Ra, respectivamente, 7: control negativo. 8: muestra positiva bovina; 9 y 10: controles positivos de *M. bovis* y *M. bovis* BCG, respectivamente; 11: control de *M. tuberculosis* H37Ra; 12: control negativo.

En el primer grupo de 47 cultivos (21 positivos y 26 negativos), se determinaron BAAR en un total de 22 (48.8%) muestras, de las cuales solamente 15 fueron cultivo positivas, mientras que el PCR identificó 22 (46.8%) como positivas, de las cuales 21 fueron cultivo positivas (Cuadro 3). Las características diagnósticas de tinción ZN y PCR con respecto al cultivo bacteriológico se muestran en el Cuadro 3. Para la tinción ZN se determinó una sensibilidad de 71.4% y una especificidad de 73.1%, mientras que para el PCR una sensibilidad de 100%, una especificidad de 96.2% y con un valor predictivo negativo del 100%. La concordancia entre PCR y tinción ZN resultó regular ($K = 0.49$) (Cuadro 4).

Cuadro 3: Distribución de los resultados y características diagnósticas de tinción ZN y PCR con respecto al cultivo bacteriológico para el diagnóstico de tuberculosis en el Grupo 1.

Técnica evaluada		Cultivo			Sn (%)	Esp (%)	VPP	VPN
		ENFERMOS	SANOS	TOTAL	(IC=95%)	(IC=95%)	(IC=95%)	(IC=95%)
Tinción ZN	POSITIVO	15	7	22	71.4	73.1	68.2	76.0
	NEGATIVO	6	19	25	(52.1-90.8)	(56.0-90.1)	(48.7-87.6)	(91.5-98.9)
		21	26	47				
PCR	POSITIVO	21	1	22	100.0	96.2	95.5	100.0
	NEGATIVO	0	25	25	(100.0-100.0)	(88.8-103.5)	(86.8-104.2)	(100.0-100.0)
		21	26	47				

Sn: sensibilidad, Esp: especificidad, VPP: valor predictivo positivo, VPN: valor predictivo negativo, TFP: tasa de falsos positivos, TFN: tasa de falsos negativos.

Cuadro 4: Concordancia mediante el coeficiente de Cohen's Kappa, entre PCR y tinción ZN para el diagnóstico de tuberculosis en el Grupo 1.

		PCR			Kappa
		POSITIVOS	NEGATIVOS	TOTAL	
Tinción ZN	POSITIVO	16	6	22	
	NEGATIVO	6	19	25	(IC=95%) 0.49 (0.20-0.77)
		22	25	47	

En el segundo grupo, *M. bovis* fue aislado en 32 (62.7%) de 51 muestras. Mediante tinción ZN, tanto del frotis por aposición de tejido como del sedimento, se observaron BAAR en 28 (54.9%) muestras. La detección de *M. bovis* mediante PCR se logró en 25 (49.0%) muestras, todas resultaron también cultivo positivas (Cuadro 5). Las características diagnósticas determinadas se muestran en el Cuadro 5. La sensibilidad y especificidad para tinción ZN por aposición de tejido, tinción ZN del sedimento y PCR fueron 62.5% y 93.3%, 65.6% y 94.1%, 78.1 y 100.0%, respectivamente. El PCR demostró una tasa de falsos negativos del 22.0% y un valor predictivo positivo del 100.0%.

La concordancia entre PCR y tinción ZN por aposición de tejido y ZN de sedimento fue moderada ($K= 0.57$ y 0.65 , respectivamente) (Cuadro 6).

Al comparar los resultados de la inspección *post-mortem* con los resultados del cultivo en las muestras del Grupo 2, se determinó un total de 32 (62.7%) muestras con LCT como cultivo positivo, mientras que en 19 muestras con LCT no se pudo aislar *M. bovis* (Cuadro 5). La sensibilidad fue del 100.0% y la especificidad del 84.0%. La concordancia entre la inspección *post-mortem* y la tinción ZN por aposición de tejido y ZN del sedimento fue moderada ($K=0.62$), igual grado de concordancia se determinó entre la inspección *post-mortem* y PCR ($K=0.56$) (Cuadro 6).

Cuadro 5: Distribución de los resultados y características diagnósticas de inspección *post-mortem*, tinción ZN y PCR con respecto a cultivo bacteriológico para el diagnóstico de tuberculosis en el Grupo 2.

Técnica evaluada		Cultivo			Sn (%)	Esp (%)	VPP (%)	VPN (%)	TFP (%)	TFN (%)
		ENFERMOS	SANOS	TOTAL	(IC=95%)	(IC=95%)	(IC=95%)	(IC=95%)		
Post-mortem	CON LCT	32	19	51	100.00	84.0	62.7	100	16.0	0.0
	SIN LCT	0	100	100	(100.0-100.0)	(77.5-90.6)	(49.5-76.0)	(100.0-100.0)		
		32	119	151						
Tinción ZN aposición de tejido	POSITIVO	20	8	28	62.5	93.3	71.4	90.2	7.0	38.0
	NEGATIVO	12	111	123	(45.7-79.3)	(88.8-97.8)	(54.7-88.2)	(85.0-95.5)		
		32	119	151						
Tinción ZN sedimento	POSITIVO	21	7	28	65.6	94.1	75.0	91.1	6.0	34.4
	NEGATIVO	11	112	123	(49.2-82.1)	(89.9-98.3)	(59.0-91.0)	(86.0-96.1)		
		32	119	151						
PCR	POSITIVO	25	0	25	78.1	100.0	100.0	94.4	0.0	22.0
	NEGATIVO	7	119	126	(63.8-92.4)	(100.0-100.0)	(100.0-100.0)	(90.4-98.4)		
		32	119	151						

Sn: sensibilidad, Esp: especificidad, VPP: valor predictivo positivo, VPN: valor predictivo negativo, TFP: tasa de falsos positivos, TFN: tasa de falsos negativos.

Cuadro 6: Concordancia mediante el coeficiente de Cohen´s Kappa, entre PCR y tinción ZN e inspección *post-mortem* para el diagnóstico de tuberculosis en el Grupo 2.

		PCR			Kappa	<i>Post-mortem</i>			Kappa	PCR			Kappa	
		POSITIVO	NEGATIVO	IC=95%			POSITIVO	NEGATIVO	IC=95%			POSITIVO	NEGATIVO	IC=95%
ZN aposición de tejido	POSITIVO	17	11	0.57 (0.41-0.72)	ZN aposición de tejido	28	0	0.62 (0.47-0.76)	Post- mortem	25	26	0.56 (0.42-0.70)		
	NEGATIVO	8	115			23	100			0	100			
		POSITIVO	NEGATIVO			POSITIVO	NEGATIVO							
ZN sedimento	POSITIVO	19	9	0.65 (0.50-0.82)	ZN sedimento	28	0	0.62 (0.47-0.76)						
	NEGATIVO	6	117			23	100							

La frecuencia de resultados positivos en cultivo bacteriológico en el segundo grupo de muestras, de acuerdo al tipo de tejido y la clasificación de la lesión, se detallan en el Cuadro 7. La mayor frecuencia de resultados positivos en cultivo bacteriológico se obtuvo en muestras con lesiones tipo III (20/23,86.9%).

Cuadro 7: Distribución de las muestras y frecuencia de cultivos bacteriológicos positivos de *M. bovis* según el tipo de tejido y lesión en animales del Grupo 2.

Tipo de tejido	Clasificación de lesión			Positivos/Total
	Positivos/Total			
	I	II	III	
Linfonodo	3/6 (50.0%)	6/14 (42.8%)	8/9 (88.9%)	17/29 (58.6%)
Linfonodo y pulmón	0/0	1/3 (33.3%)	6/8 (75.0%)	7/11 (63.6%)
Pulmón	0/0	2/5 (40.0%)	6/6 (100.0%)	8/11 (72.7%)
Total	3/6 (50.0%)	9/22 (49.9%)	20/23 (86.9%)	32/51 (62.7%)

Ninguna de las muestras del tercer grupo (muestras de animales reactivos negativos a la prueba de tuberculina o sin LCT durante inspección *post-mortem*) resultó positiva tanto en tinción ZN, cultivo y PCR.

La población bovina que resultó cultivo positivo fueron animales criollos 29/53 (54.72%), hembras 48/53 (90.57%), adultas 31/53 (58.49%) y destinados a carne 20/53 (37.74%) (Cuadro 8).

Cuadro 8: Descripción de la población bovina que resultó positiva en el cultivo bacteriológico a *M. bovis*.

Variable	Datos	Positivos	Porcentaje
Raza	Criolla	29	54.72%
	SRD	13	24.53%
	Jersey	5	9.43%
	Holstein	4	7.55%
	Brahman	1	1.89%
	Guernsey	1	1.89%
Sexo	Hembra	48	90.57%
	Macho	3	5.66%
	N/I	2	3.77%
Edad	Adulto	31	58.49%
	N/I	20	37.74%
	Ternero	2	3.77%
	Joven	0	0.0%
Propósito Zootécnico	Carne	20	37.74%
	N/I	18	33.96%
	Otro	14	26.42%
	Cría	1	1.89%
	Doble propósito	0	0.00%

4. Discusión

Este trabajo representa el primer estudio de comparación de técnicas y detección molecular de *M. bovis* en bovinos de Costa Rica.

Solamente 53 (54.1%) de un total de 98 muestras sospechosas de tuberculosis resultaron cultivo positivo, 21 (60.0%) en el primer grupo y 32 (62.7%) en el segundo grupo. El porcentaje de aislamientos positivos fue similar al 60.0% reportado por Nassar *et al.* (2007) y mayor al 36.4% reportado por Proaño-Pérez *et al.* (2011). Estos dos grupos de investigadores utilizaron el cultivo bacteriológico en las mismas condiciones descritas en la presente

investigación. Según Corner *et al.* (2012), el cultivo bacteriológico está influenciado por el procedimiento de descontaminación, el tipo de medio y el número de inóculos utilizados. Proaño-Pérez *et al.* (2011) además encontraron, que varios ciclos de congelación y descongelación de las muestras puede reducir la viabilidad de los bacilos, disminuyendo así la sensibilidad de la técnica de cultivo bacteriológico. También puede haberse debido a una baja cantidad de *M. bovis* viables en las muestras iniciales, las cuales luego arrojaron resultados negativos en cultivo. El uso de hidróxido de sodio y de ácido sulfúrico como descontaminantes resulta ser muy eficiente para eliminar microorganismos contaminantes (bacterias y hongos) en las muestras, sin embargo, son tóxicos para micobacterias, reduciendo su viabilidad, característica importante para el aislamiento bacteriológico (Courcoul *et al.*, 2014; Mishra *et al.*, 2005). Es por eso que Corner *et al.* (2012) recomiendan no realizar descontaminación de las muestras. En un estudio realizado por estos investigadores, se determinó una mayor cantidad de muestras positivas en cultivo bacteriológico, cuando no se realizó la descontaminación de la muestra, seguido del uso de cloruro de benzalconio (BC) como descontaminante en combinación con el medio Stonebrink para el cultivo, mientras que la combinación de hidróxido de sodio como descontaminante en combinación los medios de cultivo Middlebrook 7H11 o Stonebrink arrojaron los peores resultados.

La baja frecuencia de aislamientos positivos (54.1%) encontrados en la presente investigación también puede haberse debido a la presencia de granulomas ocasionados por otros microorganismos como *Nocardia*,

Rhodococcus, *Actinobacillus*, *Arcanobacterium*, los cuales pueden haberse confundido con LCT (Liébana *et al.*, 2008; Araújo *et al.*, 2014).

El PCR identificó como positivas un total de 47 (88.7%) de 53 muestras, que habían resultado cultivo positivo, además detectó una muestra como positiva, la cual había sido reportada cultivo negativa. Esta muestra se confirmó como positiva mediante secuenciación, por lo que el PCR permitió la identificación de *M. bovis* similar al cultivo bacteriológico.

En el primer grupo de muestras (aislamientos de *M. bovis*), el PCR confirmó todos los cultivos positivos, resultados que concuerdan con lo reportado por Arraíz *et al.* (2005, 2006, 2007), los cuales reportaron correlaciones del 100% entre las dos técnicas, recomendando el PCR como técnica de confirmación de *M. bovis* a partir de aislamientos. El PCR realizado con muestras de tejido (Grupo 2, ADN obtenido de tejido homogenizado, sin someterse a proceso de descontaminación), no logró detectar 7 (21.8%) muestras que resultaron cultivo positivo, lo cual coincide con reportes de Araújo *et al.* (2014), Proaño-Pérez *et al.* (2011) y Cardoso *et al.* (2007).

Se ha propuesto que la conformación compleja de la pared celular de las micobacterias y la presencia de fibrosis y calcificación en los granulomas, dificultan la extracción de ADN, lo que puede influir en los resultados obtenidos en el PCR de las muestras clínicas en el presente trabajo (Taylor *et al.*, 2007; Araújo *et al.*, 2014), por lo que se recomienda utilizar procedimientos adicionales como la homogeneización del tejido con nitrógeno líquido, sonicación o agitación con cuentas (perlas) seguida por la extracción de ADN utilizando un kit comercial

o realizarla a partir del pellet obtenido luego del proceso de descontaminación de la muestra para aumentar la sensibilidad del PCR (Cardoso *et al.*, 2007; Taylor *et al.*, 2007). La sensibilidad moderada obtenida (78.1%), resultó ser inferior a lo reportada por Taylor *et al.* (2007), quienes reportaron un aumento de la sensibilidad de 70.0% al 91.0%, luego de la implementación de homogeneización del tejido con nitrógeno líquido, pero superior a la reportada por Estrada-Chávez *et al.* (2004) y Proaño-Pérez *et al.* (2011) quienes obtuvieron 53.0% y 56.5%, respectivamente, evaluando PCR simples.

La técnica de tinción ZN determinó un total de 50 muestras como positivas, sin embargo, solamente 35 se confirmaron como cultivo positivas. Resultados similares reportó Morales *et al.* (2005) y Estrada-Chávez *et al.* (2004). Según Liébana *et al.* (2008), a menudo es difícil identificar BAAR en las lesiones, debido entre otras causas, a la poca cantidad de micobacterias presentes en lesiones tuberculosas, por lo que la presencia de los bacilos pasa desapercibida (falsos negativos), y que cuando se detectan, puede tratarse de otros microorganismos con la capacidad de ácido alcohol resistencia (falsos positivos), lo cual podría explicar la alta cantidad de resultados falsos negativos (17) y falsos positivos (15) obtenidos en el presente estudio. Los valores de sensibilidad oscilaron entre 62.5% y 71.4%, siendo mayores (43.5%), mientras que los valores de especificidad entre 73.1%-94.1% este último valor similar al reportado por Proaño-Pérez *et al.* (2011). Se obtuvo una concordancia moderada entre el PCR y la tinción ZN, contrario a lo reportado Estrada-Chávez *et al.* (2004) y Proaño-Pérez *et al.* (2011). Como la técnica de tinción ZN resultó

ser menos sensible y específica que el PCR no se recomienda utilizarla como prueba confirmativa (Medeiros *et al.*, 2010).

Con respecto a la inspección *post-mortem* se obtuvo una sensibilidad del 100%, y una especificidad de 84.0% comparado con la técnica de cultivo, valores superiores a los reportados por Norby *et al.* (2004), Biffa *et al.* (2010) y Aylate *et al.* (2013) (25.0%-86.0% y 76.5%-84.1%, respectivamente), lo que es de suma importancia en países como el nuestro, con prevalencia baja y en donde la inspección *post-mortem* como parte de la vigilancia epidemiológica y se torna más difícil la identificación de hatos infectados (Calvalho *et al.*, 2015; Araújo *et al.*, 2014). La alta sensibilidad y concordancia moderada entre la *inspección post-mortem* en comparación a la tinción ZN y el PCR obtenida en el presente estudio, hacen de la inspección *post-mortem* una excelente prueba tamiz.

Según Carvalho *et al.* (2015), hasta un 86% de las lesiones de tuberculosis aparecen en linfonodos de cabeza y cavidad torácica. Aunque en el presente estudio, no se registró la ubicación anatómica de los linfonodos recolectados, el 87.75% de las muestras en que se detectaron LCT fueron linfonodos, coincidiendo con lo reportado por Aylate *et al.* (2013) y Menin *et al.* (2013). Además un 90.6% de las muestras con resultados cultivo positivos en el presente estudio, pertenecían a muestras cuyas lesiones eran de tipo fibroso o con necrosis caseosa, lo que concuerda con los reportado por Estrada-Chávez *et al.* (2005).

En cuanto a las características de los bovinos positivos al aislamiento de *M. bovis* el 90.6% fueron hembras y un 58.49% eran animales adultos, similar a lo reportado por Asseged *et al* (2004).

La técnica de PCR implementada en el presente estudio demostró que puede ser utilizada como técnica complementaria al cultivo para confirmar la presencia de *M. bovis*, con la gran ventaja de obtener resultados en un menor tiempo que el requerido cuando se realizan pruebas bioquímicas (Medeiros *et al.*, 2010; Arráiz *et al.*, 2007; Huard *et al.*, 2003), por lo que se recomienda implementar esta técnica en el SENASA. El diagnóstico confirmativo directamente de muestras clínicas se obtuvo en tan solo dos días (Martínez, 2008; Taylor *et al.*, 2007), sin embargo se debe implementar mejoras en el procedimiento de descontaminación de las muestras y extracción de ADN para aumentar la sensibilidad del PCR (Araújo *et al.*, 2014; Cardoso *et al.*, 2007). La inspección *post-mortem* resultó ser una prueba de tamizaje de alta sensibilidad para la detección de LCT, mientras que la técnica de ZN mostró una cantidad variable de resultados falsos positivos y negativos.

5. Conclusiones

Se logró la implementación de una técnica de PCR para el diagnóstico de *M. bovis*.

El PCR mostró una alta sensibilidad para confirmar molecularmente aislamientos de *M. bovis*, y una sensibilidad moderada para la identificación de *M. bovis* directamente de muestras de tejido.

Existe concordancia moderada entre el PCR implementado y las técnicas tradicionalmente utilizadas para el diagnóstico de tuberculosis bovina en Costa Rica.

Las técnicas de Inspección *post-mortem* y PCR mostraron mejores características diagnósticas que la técnica de tinción Ziehl-Nelseen.

6. Recomendaciones

Incluir la técnica de PCR al diagnóstico de laboratorio de la tuberculosis bovina en Costa Rica, como técnica complementaria al cultivo, para confirmar la presencia de *M. bovis*

Evaluar diferentes procedimientos en la descontaminación para realizar el cultivo de muestras sospechosas de tuberculosis, para lograr una mayor detección de muestras positivas.

Evaluar procedimientos alternativos de extracción de ADN en muestras con LCT para mejorar la sensibilidad de la técnica de PCR con ese tipo de muestras.

7. Referencias bibliográficas.

- Alwathani, H., Ashgan, M., & Ihab, M. (2012). Nested polymerase chain reaction as a molecular tool for detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex recovered from milk samples. *Afr. J. Microbiol. Res (African Journal of Microbiology Research)*, 6(6), 1338–1344.
- Araújo, C. P., Osório, A. L., Jorge, K., Ramos, C. A., Filho, A. A., & Vidal, Carlos, C.E et al. (2014). Detection of *Mycobacterium bovis* in Bovine and Bubaline Tissues Using Nested-PCR for TbD1. *PLoS ONE*, 9(3), e91023.
- Araújo, C. P., Osório, A. L. A., Jorge, K. S., Ramos, C. A., Souza Filho, A. F., Vidal, C. E., . . . Araújo, F. R. (2014). Direct detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex in bovine and bubaline tissues through nested-PCR. *Brazilian Journal of Microbiology*, 45(2), 633–640.
- Arráiz, N., Bermúdez, V., Romay, Z., Faría, N., & Mujica, D. (2005). Evaluación de un ensayo de PCR duplex para la identificación de micobacterias del complejo *mycobacterium tuberculosis* y no tuberculosis. *Revista Científica FCV-LUZ*, 15(6), 568–575.
- Arráiz, N., Romay, Z., Faría, N., & Mujica, D. (2006). Identificación diferencial de aislados clínicos de *Mycobacterium tuberculosis* y *Mycobacterium bovis* por un ensayo de RCP múltiple. *Revista Científica FCV-LUZ*, 16(6), 622–628.
- Arráiz, N. R., Romay, Z., & Faría, N. M. (2007). Evaluación de un ensayo de RPC múltiple para diferenciar micobacterias del complejo *Mycobacterium tuberculosis* en un laboratorio de referencia. *Revista chilena de infectología*, 24(2), 99–105.
- Asseged, B., Woldesenbet, Z., Yimer, E., & Lemma, E. (2004). Evaluation of Abattoir Inspection for the Diagnosis of *Mycobacterium bovis* Infection in Cattle at

- Addis Ababa Abattoir. *Tropical Animal Health and Production*, 36(6), 537–546.
- Aylate, A., Shah, S., Aleme, H., & Gizaw, T. T. (2013). Bovine tuberculosis: Prevalence and diagnostic efficacy of routine meat inspection procedure in Woldiya municipality abattoir north Wollo zone, Ethiopia. *Tropical Animal Health and Production*, 45(3), 855–864.
- Biffa, D., Bogale, A., & Skjerve, E. (2010). Diagnostic efficiency of abattoir meat inspection service in Ethiopia to detect carcasses infected with *Mycobacterium bovis*: Implications for public health. *BMC Public Health*, 10(462).
- Cardoso, M. A., Cardoso, R. F., Hirata, R. D. C., Hirata, M. H., Leite, C. Q. F., Santos, A. C. B., . . . Lonardon, M. V. C. (2007). Direct Detection of *Mycobacterium bovis* in Bovine Lymph Nodes by PCR. *Zoonoses and Public Health*, 56(8), 465–470.
- Carvalho, R. C., Furlanetto, L. V., Muruyama, F. H., Araújo, C. P., Barros, S. L., do Nascimento, & C.A. et al. (2015). Evaluation of the efficiency of nested q-PCR in the detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex directly from tuberculosis-suspected lesions in *post-mortem* macroscopic inspections of bovine carcasses slaughtered in the state of Mato Grosso, Brazil. *Meat Science*, 106, 11–15.
- Chukwu, I., Okoh, C., Kandakai-Olukemi, Y., Owolodun, O., Nwosuh, C., & Agada, G. O. (2013). Detection of *Mycobacterium tuberculosis* Complex in Lung Specimen of Slaughtered Cattle and Goats by a DNA Based multiplex Polymerase Chain Reaction and Ziehl-Neelsen Methods In Jos, Nigeria. *British Microbiology Research Journal*, 3(4), 550–556. doi:10.9734/BMRJ/2013/3708

- Corner, L. A., Gormley, E., & Pfeiffer, D. U. (2012). Primary isolation of *Mycobacterium bovis* from bovine tissues: Conditions for maximising the number of positive cultures. *Veterinary Microbiology*, 156(1-2), 162–171.
- Courcoul, A., Moyen, J. L., Brugère, L., Sandy, F., Hénault, S., & Gares, H. e. a. (2014). Estimation of Sensitivity and Specificity of Bacteriology, Histopathology and PCR for the Confirmatory Diagnosis of Bovine Tuberculosis Using Latent Class Analysis. *PLoS ONE*, 9(3), e90334.
- Domingo, M., Vidal, E., & Marco, A. (2014). Pathology of bovine tuberculosis. *Research in Veterinary Science*, 97, S20-S29.
- Estrada-Chávez, C., Fernando, O. D., Arriaga, C.D., Villegas-Sepúlveda C., González, R. P., & González, D. S. (2004). Concordancia de la PCR y métodos rutinarios para el diagnóstico de tuberculosis bovina. *Veterinaria México*, 35(3), 225–236.
- Garnier, T., Eiglmeier, K., Camus, J.-C., Medina, N., Mansoor, H., & Pryor, M. e. a. (2003). The complete genome sequence of *Mycobacterium bovis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(13), 7877–7882.
- González, C., & Pérez, J. F. (2007). Curso de introducción a la investigación clínica: Capítulo 8: Pruebas diagnósticas. Concordancia. *SEMERGEN*, 33(10), 509–519.
- Gormley, E., Corner, L., Costello, E., & Rodriguez-Campos, S. (2014). Bacteriological diagnosis and molecular strain typing of *Mycobacterium bovis* and *Mycobacterium caprae*. *Research in Veterinary Science*, 97, S30-S43.
- Grange, M., Yates, M., & de Kantor I.N. (1996). *Guidelines for speciation within the Mycobacterium tuberculosis complex*. Retrieved from World Health Organization website: <http://www.who.int/emc>
- Gyles, C. L., Prescott, J. F., Songer, G., & Thoen, C. O. (2010). *Pathogenesis of Bacterial Infections in Animals, Fourth Edition* (4th ed.). Iowa. USA: Blackwell.

- Huard, R. C., Lazzarini, L., Butler, W. R., van Soolingen, D., & Ho, J. (2003). PCR-Based method to differentiate the subspecies of the *Mycobacterium tuberculosis* Complex on the basis of genomic deletions. *J. Clin. Microbiol. (Journal of Clinical Microbiology)*, 41(4), 1637–1650.
- Liébana, E., Johnson, L., Gough, J., Durr, P., Jahans, K., Clifton-Hadley, R., . . . Downs, S. H. (2008). Pathology of naturally occurring bovine tuberculosis in England and Wales. *The Veterinary Journal*, 176(3), 354–360.
- Madigan, G. (Abril, 2012). *Evaluation of different methods for the detection of Mycobacterium bovis in lymph node tissue*. NUI MAYNOOTH, Maynooth.
- Markey, B., Leonard, F., Archambault, M., Cullinane, A., & Maguire, D. (2013). *Clinical Veterinay Microbiology (2da)*: MOSBY-ELSEVIER.
- Martinez, C. A. (Mayo, 2008). *Diagnóstico Molecular de Mycobacterium bovis en ganado bovino de la zona centro del Estado de Veracruz* (Tesis). Universidad Veracruzana, Veracruz, Ver.
- Medeiros, L. d. S., Marassi, C. D., Figueiredo, E. E., & Lilenbaum, W. (2010). Potential application of new diagnostic methods for controlling bovine Tuberculosis in Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology*, 41(3), 531–541.
- Menin, Á., Fleith, R., Reck, C., Marlow, M., Fernandes, P., & Pilati, C. e. a. (2013). Asymptomatic cattle naturally infected with *Mycobacterium bovis* present exacerbated tissue pathology and bacterial dissemination. *PLoS ONE*, 8(1), e53884.
- Mishra, A., Singhal, A., Chauhan, D., Katoch, V., Srivastava, K., & Thakral, S. e. a. (2005). Direct detection and identification of *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium bovis* in bovine samples by a Novel Nested PCR assay: correlation with conventional techniques. *J. Clin. Microbiol. (Journal of Clinical Microbiology)*, 43(11), 5670.

- Morales, A., Martínez, I., Carlos, A., Álvarez, G., Álvarez, M., & Maldonado, J. (2005). Redalyc.Comparación de histopatología, cultivo y PCR en el diagnóstico de tuberculosis bovina. *Revista Científica*, 15(2), 103–108.
- Nassar, A. F., Miyashiro, S., Oliveira, C. G., Pacheco, W. A., & Ogata, R. A. (2007). Isolation and identification of bovine tuberculosis in a Brazilian herd (São Paulo). *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 102(5), 639–642.
- Neeraja, D., Veeregowda, B. M., Rani, M., Rathnamma, D., Narayanaswamy, H. D., Venkatesha, M. D., & et al. (2014). Identification of *Mycobacterium tuberculosis* complex by culture and duplex Polymerase Chain Reaction in bovines. *Ajava (Asian Journal of Animal and Veterinary Advances*, 9(8), 506–512.
- Norby, B., Bartlett, P. C., Fitzgerald, S. D., Granger, L. M., Bruning-Fann, C. S., Whipple, D. L., & Payeur, J. B. (2004). The sensitivity of gross necropsy, caudal fold and comparative cervical tests for the diagnosis of bovine tuberculosis. *J Vet Diagn Invest (Journal of Veterinary Diagnostic Investigation)*, 16(2), 126:131.
- Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y Agricultura. Emergency Prevention System (2012). *Boletín de enfermedades transfronterizas de los animales* (No. 40), pp. 1–11.
- Organización Mundial de Sanidad Animal. (2009). *Terrestrial Manual OIE: Bovine tuberculosis*.
- Organizacion Mundial de Sanidad Animal. (2016). Enfermedades de la Lista de la OIE 2016. Retrieved from <http://www.oie.int/es/sanidad-animal-en-el-mundo/oie-listed-diseases-2016/>
- Organización Panamericana de la Salud. (2008a). *Manual para el diagnóstico bacteriológico de tuberculosis: Parte 2 Cultivo* (No. 2).

- Organización Panamericana de la Salud. PS. (2008b). *Manual para el Diagnóstico Bacteriológico de la Tuberculosis: Parte 1 Baciloscopia* (No. 1).
- Portilla, M. (2007). *Uso de la secuencia de inserción RvD1 para la identificación de M. Bovis*. Universidad Veracruzana.
- Proaño-Perez, F., Benitez-Ortiz, W., Desmecht, D., Coral, M., Ortiz, J., Ron, L., . . . Linden, A. (2011). Post-mortem examination and laboratory-based analysis for the diagnosis of bovine tuberculosis among dairy cattle in Ecuador. *Preventive veterinary medicine*, 101(1-2), 65–72.
- Sa'idu, A. S., Okolocha, E. C., Dzikwi, A. A., Kwaga, J. K. P., Gamawa, A. A., Usman, A., & Maigari, S. A. Et al. (2015). Detection of *Mycobacterium bovis* in organs of slaughtered cattle by DNA-based Polymerase Chain Reaction and Ziehl-Neelsen techniques in Bauchi State, Nigeria. *Journal of Veterinary Medicine*, (1), 1–7.
- Suazo, F., Harris, B., Díaz, C., Thomsen, B., Stuber, T., & Suárez, D. e. a. (2010). Sensibilidad y especificidad de PCR anidada y Spoligotyping como pruebas rápidas de diagnóstico de tuberculosis bovina en tejido fresco. *Rev Mex Cienc Pecu*, 1(4), 403–415.
- Tarabla, H., & Signorini, M. (2013). *Epidemiología diagnóstica* (1a ed.). Santa Fe, Argentina: UNL.
- Taylor, G. M., Worth, D. R., Palmer, S., Jahans, K., & Hewinson, R. G. (2007). Rapid detection of *Mycobacterium bovis* DNA in cattle lymph nodes with visible lesions using PCR. *BMC Veterinary Research*, 3(1), 12.
- Thoen, C., LoBue, P. A., Enarson, D., Kaneene, J., & de Kantor I.N. (2009). Tuberculosis: a re-emerging disease in animals and humans. *Veterinaria Italiana*, 45(1), 135–181.

ARTICULO II

Valor predictivo positivo de la prueba de tuberculina e identificación de *Mycobacterium bovis* mediante PCR, en bovinos reactivos de Costa Rica.

Resumen

El método de referencia *ante-mortem* para la detección de la tuberculosis bovina lo constituye la prueba de tuberculina, ampliamente utilizada en los programas de control y erradicación de la enfermedad, los valores de sensibilidad y especificidad reportados para esta prueba son muy variables, por lo que se considera importante conocer la probabilidad que un animal con resultado positivo o negativo a la prueba sea verdaderamente positivo o libre de la enfermedad. En la presente investigación se determinó el valor predictivo positivo (VPP) de la prueba de tuberculina y se identificó *Mycobacterium bovis* mediante la técnica de PCR en bovinos reactivos. Se analizaron dos grupos de muestras. En el primero se incluyeron 35 aislamientos obtenidos a partir de muestras de (pulmones y linfonodos) de animales reactivos a la prueba de tuberculina simple caudal, mientras que en el segundo grupo se incluyeron 10 muestras de linfonodos de 10 animales reactivos a la prueba de tuberculina cervical comparativa. La prueba de tuberculina simple ano-caudal mostró un VPP de 31.4%; mientras que la prueba de tuberculina cervical comparativa mostró un VPP de 70%. Mediante PCR se identificaron como positivas el 34.3% y 30.0% de las muestras del Grupo 1 y 2, respectivamente. Estos resultados indican que existe una menor probabilidad de que un animal reactor a la prueba de tuberculina ano-caudal resulte cultivo positivo, por lo tanto, se recomienda utilizar la prueba cervical comparativa que posee mayor especificidad. El PCR permite un diagnóstico rápido en tan solo 2 días, sin embargo, deben evaluarse otros procesos de extracción de ADN a partir de linfonodos para mejorar la sensibilidad del PCR implementado.

Palabras claves:

Tuberculosis, ganado bovino, diagnóstico, reactores, prueba de tuberculina, PCR.

Abstract

The *ante-mortem* reference method for the detection of tuberculosis in bovines is the tuberculin test, which is widely used in control and eradication programs, the sensitivity and specificity reported for this test are highly variable, so it is considered important to know the probability that an animal with positive or negative test result is really positive or free of the disease. In this research the positive predictive value (PPV) of the tuberculin test is determined and *Mycobacterium bovis* was identified by PCR in bovine reactors. Two groups of samples were analyzed, one group of 35 isolates from samples tissues (lymph nodes and lung) belonging to animals that have tested previously positive in the single caudal tuberculin test, while the second group of 10 lymph node samples belonged to bovines that tested positive in the comparative cervical tuberculin test. The single caudal tuberculin test showed a PPV of 31.4%; while the comparative cervical tuberculin test showed a PPV of 70%. The PCR identified the 34.3% and 30.0% of the samples of Group 1 and 2 respectively as positive. These results indicate that, there is less likelihood that an animal reactor to the single caudal tuberculin test be positive culture, therefore it is recommended to use the comparative cervical test has greater specificity. The PCR allowed a diagnosis in just 2 days, however, DNA extraction from lymph nodes must be improved to increase the sensitivity of the PCR.

Keywords:

Tuberculosis, cattle, diagnosis, reactors, tuberculin test, PCR.

1. Introducción

La tuberculosis bovina es una enfermedad bacteriana crónica causada por *Mycobacterium bovis*, bacteria con potencial zoonótico, que pertenece al complejo *Micobacterium tuberculosis* (Gyles *et al.*, 2010; Markey *et al.*, 2013; Sa'idu *et al.*, 2015). Se encuentra distribuida a nivel mundial y está incluida en la lista de enfermedades de declaración obligatoria de la Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE) (Thoen *et al.*, 2009; Álvarez *et al.*, 2012; OIE, 2016). Esta enfermedad ocasiona importantes pérdidas económicas a nivel mundial en la industria ganadera, que se estiman mayores en \$3 billones, sobre todo por los altos costos de los programas de control y erradicación, además de limitar el comercio de animales y sus productos (Schiller *et al.*, 2010; Suazo *et al.*, 2010).

El método de referencia *ante-mortem* para la detección de la tuberculosis bovina lo constituye la prueba de tuberculina, la cual se utiliza en los programas de control y erradicación de la enfermedad (Schiller *et al.*, 2011; Álvarez *et al.*, 2012; Farham *et al.*, 2012; Bezos *et al.*, 2014). Esta prueba consiste en inocular por vía intradérmica el derivado proteico purificado (PPD), preparado después de un tratamiento térmico y lítico de la cepa de *M. bovis* AN5 (PPD bovino) y de la cepa *Mycobacterium avium* D4ER o TB56 (PPD aviar). Luego de 72 horas de la aplicación, se mide la inflamación del pliegue cutáneo (respuesta inmune mediada por células o hipersensibilidad retardada) (Aagaard *et al.*, 2006; OIE, 2012; Álvarez *et al.*, 2012, Farham *et al.*, 2012; Bezos *et al.*, 2014).

Existen dos modalidades de la prueba de tuberculina, la prueba simple y la prueba comparativa. En la prueba simple se mide la hipersensibilidad

retardada ante PPD bovino aplicado en la región media del cuello (prueba cervical) o en el tercio medio del pliegue ano-caudal interno (prueba caudal). Por su localización anatómica, la prueba cervical posee mayor sensibilidad que la prueba caudal, por lo que se recomienda utilizar mayores dosis de PPD si se realiza la última prueba (Good y Duignan, 2011; Álvarez *et al.*, 2012; Karolemeas *et al.*, 2012; Bezos *et al.*, 2014). La prueba comparativa, mide la hipersensibilidad retardada contra PPD bovino y aviar, aplicados al mismo tiempo en puntos distintos sobre la región media cervical, para determinar y diferenciar entre animales infectados con *M. bovis* y animales sensibilizados a la prueba de tuberculina debido a una exposición a micobacterias no tuberculosas o géneros relacionados, por lo que posee mayor especificidad (Karolemeas *et al.*, 2012; OIE, 2012). La dosis de inyección recomendada es de 0.1 ml conteniendo al menos 2,000 Unidades Internacionales (UI) de PPD bovino y aviar según sea la prueba (simple o comparativa). El volumen máximo por dosis no debe superar los 0.2 ml (OIE, 2012; Bezos *et al.*, 2014).

En Costa Rica, según el Manual de Procedimientos de la Tuberculosis Bovina para el Control y Erradicación, se utiliza la prueba simple ano-caudal como prueba de rutina. La prueba cervical comparativa se utiliza en aquellos animales que resultaron con reacciones inconclusas a la prueba simple ano-caudal y para aclarar la situación de un hato en el que se obtuvieron animales reactivos a la prueba ano-caudal pero no se comprobó la presencia de lesiones visibles en la inspección *post-mortem* ni por pruebas de laboratorio.

Los valores de sensibilidad y especificidad reportados para la prueba de tuberculina son muy variables, 68-96% y 78-96%, para la prueba simple caudal; 80-91% y 55-96.8% para la prueba simple cervical, y 55.1-93.5% y 88.8-100% para la prueba cervical comparativa, respectivamente (Estrada-Chávez *et al.*, 2004; La Rúa-Domenech *et al.*, 2006; Schiller *et al.*, 2011). Como *M. bovis* comparte componentes antigénicos con micobacterias ambientales, la prueba de tuberculina puede arrojar resultados falsos positivos (carencia de especificidad), los cuales pueden tener un impacto económico por el sacrificio innecesario de animales sanos y consecuente pérdida de confianza por parte de los productores en los programas de control de la enfermedad (Álvarez *et al.*, 2014; Bezos *et al.*, 2014). En cambio, factores relacionados al animal (animales en etapas tempranas de la infección, anérgicos o inmunosupresos), factores relacionados al PPD (calidad del producto, condiciones inapropiadas de almacenamiento como exposición a la luz por largos periodos) o relacionados con el proceso de aplicación o interpretación (volumen inoculado, forma y sitio de inyección, inexperiencia en la lectura de resultados) pueden resultar en falsos negativos (carencia de sensibilidad), cuya detección es importante, especialmente si la prevalencia en el rebaño es baja y continua disminuyendo por las técnicas de diagnóstico adoptadas, ya que estos animales mantendrían la infección en el hato (Humblet *et al.*, 2011; Álvarez *et al.*, 2014; Bezos *et al.*, 2014).

Los animales que resultan reactores positivos a la prueba de tuberculina deben de ser sacrificados en finca (el médico veterinario oficial debe emitir un

certificado) o en un matadero oficialmente reconocido. En los mataderos, los inspectores deben tomar muestras de tejido de los animales reactivos, también de los animales que presentan lesiones sospechosas de tuberculosis, a fin de confirmar el resultado mediante aislamiento de *M. bovis* en medio de cultivo (Ley N°34852-MAG, 2008). La detección de bovinos infectados mediante la prueba de tuberculina y el sacrificio de estos, combinado con la vigilancia en mataderos ha permitido en muchos países controlar y erradicar la infección (Kantor *et al.*, 2010; FAO, 2012).

A pesar que la literatura brinda información sobre los valores de sensibilidad y especificidad de la prueba de tuberculina, es importante conocer la probabilidad que un animal con resultado positivo o negativo a la prueba sea verdaderamente positivo o libre de la enfermedad (cultivo positivo o negativo). A esta probabilidad se le conoce como valor predictivo positivo (VPP) o negativo (VPN), respectivamente. Ambos están influenciados tanto por las características de sensibilidad y especificidad así como por la prevalencia de la enfermedad en la población muestreada.

Dado de la confirmación mediante el cultivo requiere más de dos meses, representando una barrera de tiempo (Estrada-Chávez *et al.*, 2004), se han desarrollado técnicas alternativas para la identificación rápida y específica de *M. bovis* en muestras clínicas o aislamientos, como lo es la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) (Carvalho *et al.*, 2015). Esta prueba posee características diagnósticas buenas (70-90% de sensibilidad y 90-95% de especificidad), además, los resultados se obtienen en tan solo dos días

(Martínez, 2008; Medeiros *et al.*, 2010; Alwathnani *et al.*, 2012), lo que permite una confirmación rápida de los resultados obtenidos con la prueba de tuberculina, para una correcta toma de decisión sobre el decomiso de la canal, y para establecer el programa de control y seguimiento sobre el hato en el que se detectó el animal reactor.

El objetivo del presente trabajo fue determinar el valor predictivo positivo de la prueba de tuberculina e identificar *M. bovis* mediante la técnica de PCR en bovinos reactores de Costa Rica.

2. Metodología

2.1 Diseño de estudio, tamaño y toma de muestra

Se realizó un estudio de tipo observacional transversal. Se incorporaron en el estudio dos grupos de muestras. En el primer grupo se incluyeron 35 aislamientos obtenidos a partir de muestras de tejido de animales reactores a la prueba de tuberculina simple, los cuales habían sido sacrificados y sometidos a inspección *post-mortem* por los médicos veterinarios del matadero Montecillos durante 2012-2013.

En el segundo grupo se incluyeron 10 muestras de linfonodos provenientes de 10 animales reactores a la prueba de tuberculina cervical comparativa, sacrificados y sometidos a inspección *post-mortem* por los médicos veterinarios del matadero Montecillos en los años 2014-2016. Durante la recolección los linfonodos se limpiaron del exceso de grasa y se colocaron en

bolsas plásticas herméticas debidamente cerradas y rotuladas con el número de protocolo asignado por SENASA. En cada bolsa se colocó únicamente muestras correspondientes a un solo animal y se mantuvieron a temperatura de refrigeración (4°C) durante el envío al SENASA donde se congelaron a -20°C hasta su procesamiento en el Laboratorio de Bioseguridad Nivel III del Centro Nacional de Referencia de Micobacteriología del Instituto Costarricense de Investigación y Enseñanza en Nutrición y Salud (CNRM-INCIENSA), donde se descongelaron. Las lesiones en los linfonodos se clasificaron macroscópicamente en lesiones tipo I (lesiones supurativas, sin necrosis o fibrosis evidente), tipo II (lesiones fibrosas, con necrosis caseosa moderada) o lesiones tipo III (lesiones circunscritas a una cápsula fibrosa gruesa, con necrosis caseosa central extensa) (Menin *et al.*, 2013; Estrada-Chávez *et al.*, 2004), para posteriormente continuar con su procesamiento (cultivo bacteriológico y PCR).

2.2 Cultivo bacteriológico.

En las muestras del segundo grupo se seleccionó una pequeña parte del linfonodo y se cortó en secciones pequeñas; optando por la zona que presentaba material caseoso, en aquellas muestras que lo presentaban. Se cortaron porciones pequeñas de la muestra seleccionada en una placa de Petri, luego se colocaron dentro de un mortero y se trituraron, agregando 2 ml de agua destilada estéril, se continuó macerando, hasta obtener una suspensión homogénea. De la suspensión homogénea se separó 0.5 ml en tubos Eppendorf para realizar posteriormente la extracción de ADN. El resto de macerado se depositó en un

tubo cónico de 15 ml para realizar la descontaminación por el método de Petroff como se describe en el Manual para el Diagnóstico Bacteriológico de la Tuberculosis (OPS, 2008). La muestra descontaminada se centrifugó a 2,000 g durante 12-20 minutos, se eliminó el sobrenadante y se resuspendió el sedimento con 2 ml de agua destilada estéril, se colocó en el vortex y se dejó sedimentar nuevamente (Grange *et al.*, 1996; OPS, 2008; OIE, 2012). La inoculación en medio Stonebrink se realizó según se describe en el manual (OPS, 2008) y siguiendo las directrices para la diferenciación del complejo *M. tuberculosis* (Grange *et al.*, 1996).

2.3 Reacción en Cadena de Polimerasa (PCR)

2.3.1 Extracción de ADN

Del primer grupo se tomaron 3-5 colonias, o un raspado de la superficie del cultivo sin crecimiento visible y se colocaron en 200 µl de solución de extracción de ADN del ensayo Anyplex™ MTB/NTM (Seegene Inc.). Las colonias se inactivaron con calor a 100°C durante 20 minutos en un bloque calentador, luego se centrifugó a 2,000 g por 5 minutos.

La extracción de ADN de linfonodos del segundo grupo se realizó mediante el ensayo DNeasy® Blood & Tissue Kit (QIAGEN) siguiendo las instrucciones del fabricante. La extracción se llevó a cabo el mismo día en que se realizó el cultivo, para evitar descongelaciones continuas de las muestras que podrían afectar la calidad del ADN. El ADN extraído se almacenó a -20°C hasta su uso en la amplificación.

2.3.2 PCR para detección de bacterias del complejo *Mycobacterium tuberculosis* y diferenciación de *M. bovis*.

Todas las muestras de ADN se sometieron a un primer PCR utilizando los iniciadores Rv0577F y Rv0577R (Cuadro 1), los cuales amplifican la secuencia de la región codificante del gen Rv0577 de un tamaño de 786 pb, el cual se encuentra presente en todas las micobacterias del complejo *M. tuberculosis*.

Las muestras detectadas como positivas en el primer PCR se sometieron a un segundo PCR, utilizando los iniciadores Rv1510F y Rv1510R (Cuadro 1), los cuales amplifican un segmento del gen RV1510 de 1,033 pb del locus RD4, ausente en *M. bovis* y *M. bovis* variedad BCG. Por lo tanto, la ausencia de este fragmento en el segundo PCR, en muestras que resultaron positivas en el primer PCR, revela la presencia de *M. bovis* y *M bovis* BCG (Huard *et al.*, 2003).

La amplificación para ambos PCR, se llevó a cabo según lo descrito por Huard *et al.* (2003), realizando modificaciones en la reacción y número de ciclos, como se describe a continuación: la mezcla de la reacción para un volumen final de 25 µl comprendió 13 µl de Dream Taq™ PCR Master Mix 2X (Fermentas®), 1 µl de cada iniciador (20µ7M), 1 µl de seroalbúmina bovina (BSA) (Thermo Scientific®), 2 µl de Dimetilsulfoxido (DMSO), 5 µl de ADN (250-500ng) y 2 µl de agua libre de nucleasas (Fermentas®) para completar la reacción. El programa de amplificación utilizado fue de 5 minutos de desnaturalización inicial a 94°C, 35 ciclos de desnaturalización (94°C por 1 minuto), hibridación (60°C para el primer PCR y 57°C para el segundo PCR por 1 minuto) y extensión (72°C por 1 minuto), y una extensión final de 72°C por 10 minutos (Huard *et al.*, 2003).

Como controles positivos se utilizaron ADN obtenido de la cepa de referencia ATCC H37Ra de *M. tuberculosis* y ADN de *M. bovis* BCG proporcionados por el CNRM-INCIENSA, mientras que el ADN de *M. bovis* fue proporcionado por el SENASA. Como control negativo se utilizó agua libre de nucleasas (Fermentas®). Muestras que mostraron amplificaciones con tamaños de 786 pb en el primer PCR, se consideraron positivas a micobacterias del complejo *M. tuberculosis*, y se sometieron al segundo PCR, donde se consideraron positivas, las muestras que no mostraron amplificaciones.

2.3.3 Electroforesis

Los productos amplificados en ambos PCR fueron analizados mediante electroforesis en geles de agarosa al 1.5% en amortiguador TBE (Tris base, ácido bórico, EDTA 0.5M, pH 8), teñidos con fluorocromo GelRed® DNA Nucleic Acid Gel Strain y utilizando como marcador molecular GeneRuler 100pb Plus DNA ladder (Fermentas®). Los geles se corrieron en cámara de electroforesis a 85 voltios durante 1 hora y fueron observados mediante un transiluminador de luz ultravioleta.

Cuadro 1. Oligonucleótidos utilizados en las amplificaciones por PCR

Nombre	Secuencia de nucleótidos	PCR	Tamaño (pb)	Referencia
Rv0577F	5'_ATGCCCAAGAGAAGCGAATACAGGCAA_3'	Específico del complejo <i>M. tuberculosis</i>	786 pb	Huard <i>et al.</i> , 2003
Rv0577R	5'_CTATTGCTGCGGTGCGGGCTTCAA_3'			
Rv1510F	5'_GTGCGCTCCACCCAAATAGTTGC_3'	Región de diferencia RD4, ausente en <i>M. bovis</i> y <i>M. bovis</i> BCG	1,033 pb	Huard <i>et al.</i> , 2003
Rv1510R	5'_TGTGCACCTGGGGCACAAATCAGTC-3'			

2.4 Secuenciación

Muestras amplificadas en el primer PCR y que resultaron negativas en cultivo bacteriológico se enviaron a secuenciar a MacroGen® (Seoul, Corea) con el fin de confirmar los resultados. La secuencia obtenida fue editada manualmente con el programa BioEdit™ 7.2 Sequence Alignment Editor® y comparada con otras secuencias en algoritmo BLAST en la base de datos del National Center for Biotechnology Information (NCBI).

2.5 Ensayo en tiras de ADN.

Se utilizó el kit comercial GenoType® MTBC (Hain Lifescience) para confirmar los resultados y determinar la especie de micobacteria presente en las muestras que resultaron positivas por cultivo bacteriológico. Se siguió el protocolo propuesto por la casa comercial.

2.6 Análisis Estadístico.

Se realizó un análisis descriptivo de los resultados obtenidos en el cultivo bacteriológico y PCR. Además se determinó el valor predictivo positivo de la prueba de tuberculina con respecto al resultado del cultivo bacteriológico; es decir los animales positivos verdaderos entre los positivos verdaderos más los falsos positivos (Tarabla y Signorini, 2013).

3. Resultados.

Del total de 45 muestras provenientes de animales positivos a la prueba de tuberculina, solamente 18 se confirmaron como positivos en cultivo bacteriológico, el VPP de la prueba de tuberculina en la totalidad de las muestras fue de 40% (Cuadro 2). Mediante PCR se identificaron como positivos 15 (33.3%) muestras (Cuadro 3).

En el primer grupo de muestras, 11 resultaron cultivo positivos, el VPP para la prueba de tuberculina ano-caudal fue de 31.4% (Cuadro 2). Mediante PCR 12 (34.3%) muestras resultaron positivas, detectándose en el PCR una muestra adicional como positiva, la cual había sido reportada previamente como cultivo negativo (Cuadro 3). Esta muestra fue secuenciada y alineada con la secuencia de *M. bovis* (CP010332.1) y *M. tuberculosis* (CP010340.1) depositadas en GenBank, obteniéndose un porcentaje de homología del 99% con ambas especies e identificándose como *M. bovis* por ausencia de la región de diferencia RD4.

En el segundo grupo de 10 muestras, 7 resultaron cultivo positivo, el VPP de la prueba de tuberculina cervical comparativa fue de 70% (Cuadro 2). Solamente 3 (30.0%) muestras se determinaron como PCR positivos.

Un total de 14 de 18 aislamientos positivos se sometieron a la prueba de ensayo en tiras de ADN y fueron identificados como *M. bovis* subsp. *bovis*, cuatro muestras no se analizaron (Cuadro 3).

Cuadro 2: Valor predictivo positivo de la prueba de tuberculina con respecto al cultivo bacteriológico.

Reactores	Cultivo		VPP (%)
	ENFERMOS	SANOS	IC= 95%
Total (n=45)	18	27	40 (25.7-54.3)
Grupo 1 (n=35)	11	24	31.4 (16.0-46.8)
Grupo 2 (n=10)	7	3	70 (41.6-98.4)

Cuadro 3: Resultados de 19 bovinos reactores a la prueba de tuberculina que resultaron positivos a cultivo o a PCR.

Animal	Prueba Tuberculina	Cultivo bacteriológico	PCR <i>M. bovis</i>	Ensayo en tiras de ADN
1	+	+	+	<i>M. bovis</i> subsp. <i>bovis</i>
2	+	+	+	<i>M. bovis</i> subsp. <i>bovis</i>
3	+	+	+	<i>M. bovis</i> subsp. <i>bovis</i>
4	+	+	+	<i>M. bovis</i> subsp. <i>bovis</i>
5	+	+	+	<i>M. bovis</i> subsp. <i>bovis</i>
6	+	+	+	<i>M. bovis</i> subsp. <i>bovis</i>
7	+	+	+	<i>M. bovis</i> subsp. <i>bovis</i>
8	+	+	+	<i>M. bovis</i> subsp. <i>bovis</i>
9	+	+	+	<i>M. bovis</i> subsp. <i>bovis</i>
10	+	+	+	<i>M. bovis</i> subsp. <i>bovis</i>
11	+	+	+	<i>M. bovis</i> subsp. <i>bovis</i>
12	+	+	+	<i>M. bovis</i> subsp. <i>bovis</i>
13	+	+	+	<i>M. bovis</i> subsp. <i>bovis</i>
14	+	+	+	<i>M. bovis</i> subsp. <i>bovis</i>
15	+	+	-	NSR
16	+	+	-	NSR
17	+	+	-	NSR
18	+	+	-	NSR
19	+	-	+	NA
Total	19	18	15	14

Positivo (+), Negativo (-), NSR: no se realizó, NA: no aplica.

4. **Discusión**

En el presente estudio se determinó en el grupo de animales reactivos a la prueba de tuberculina simple (Grupo 1) un 68.6% de resultados falsos positivos, un porcentaje mucho mayor al reportado por Estrada-Chávez et al. (2004). En el grupo de animales sometidos a la prueba de tuberculina cervical comparativa (Grupo 2) se determinó un 30% de resultados falsos positivos, similar a lo reportado por Araújo *et al.* (2014).

El alto porcentaje de resultados falsos positivos determinados en el Grupo 1 se debe probablemente a reacciones cruzadas, ya que la prueba de tuberculina simple no establece, si la reacción de hipersensibilidad mostrada por el animal se debe a la infección con *M. bovis*, infección con micobacterias del ambiente o con bacterias de géneros relacionados. Es por eso, que se recomienda utilizar la prueba de tuberculina comparativa, la cual permite diferenciar entre reacciones debidas a infección con *M. bovis* u otras micobacterias no tuberculosas (Schiller *et al.*, 2011; OIE, 2012; La Rúa-Domenech *et al.*, 2006).

El bajo valor predictivo de la prueba de tuberculina simple ano-caudal (40%) fue similar al 38.9 % reportado por Álvarez *et al.* (2009); mientras el VPP de la prueba cervical comparativa (70%) coincide con (73.5% y 77.2%), reportado por Schiller *et al.* (2011) y Goodchild *et al.* (2015), respectivamente, obtenidos en base a resultados de estudios en diferentes escenarios epidemiológicos sin compararlos contra el cultivo.

Los valores de sensibilidad y especificidad de una prueba diagnóstica y la prevalencia de la enfermedad en la población, tienen influencia sobre los valores predictivos (Good y Duignan, 2011; Tarabla y Signorini, 2013; van Dick, 2013). El VPP se ve más afectado por cambios en la especificidad, lo que explica claramente el mayor VPP en el segundo grupo, los cuales fueron sometidos a la prueba de tuberculina cervical comparativa que posee mayor especificidad.

Por otro lado, a medida disminuye la prevalencia de una enfermedad, disminuye el VPP y aumentan los diagnósticos falsos positivos; situación que también puede explicar los resultados del primer grupo y apoyar la recomendación, de que los animales sean sometidos a la prueba cervical comparativa para evitar el sacrificio innecesario de animales reactivos en la prueba simple ano-caudal.

Los resultados del presente trabajo concuerdan con reportes de La Rúa-Domenech *et al.* (2006), Estrada-Chávez *et al.* (2004) y Araujo *et al.* (2014) en los que entre un 50-80% de bovinos reactivos a la prueba de tuberculina no se logran confirmar positivos en cultivo bacteriológico, sugiriendo una baja especificidad de la prueba de tuberculina, principalmente en la prueba ano-caudal. Sin embargo, señalaron también considerar, que a pesar de que el cultivo bacteriológico es considerado el estándar de oro, esta técnica es menos sensible que las pruebas inmunológicas, las cuales detectan una infección subclínica, concluyendo, que no todos los animales reactivos a la prueba de

tuberculina y con resultados negativos en cultivo, deben de ser considerados como falsos positivos o reactores no específicos.

En cuanto al PCR, se obtuvo una mayor cantidad de resultados positivos en el primer grupo de muestras, esto se debe, a que el PCR se realizó a partir de ADN de colonias en el medio Stonebink utilizado, contándose con ADN puro y concentrado, resultados similares a los reportados por Nassar *et al.* (2012). Además, la prueba de PCR detectó una de las muestras como positivas, la cual había sido reportada inicialmente como cultivo negativo. Esto probablemente se deba, a que en el momento de la lectura del resultado de cultivo no se observó crecimiento de colonias, y el periodo de incubación adicional (los cultivos no se desecharon después de la lectura a los 60 días, sino que se continuaron incubando a 37°C) permitió el crecimiento de *M. bovis*. Aunque no se encontró un estudio que soportara esta situación, en la presente investigación se observó en dos muestras, el crecimiento de colonias en un periodo mayor a 60 días de incubación que coincide con lo reportado por Corner *et al.* (2012), donde indica que el cultivo en medio Stonebrink requiere un mayor periodo de tiempo para la observación de las colonias en comparación con otros tipos de medio.

En contraste, en el segundo grupo de muestras, los cuatro resultados falsos negativos por PCR en comparación a los detectados por cultivo, pudieron ser resultado del proceso de extracción realizado directamente del tejido (linfonodos) aumentando la probabilidad de presencia de inhibidores en la muestra; por lo que se hace necesario, evaluar en un número mayor de muestras, otros procedimientos para mejorar la extracción de ADN de

micobacterias directamente de linfonodos, Cardoso *et al.* (2007) recomiendan, realizar la extracción de ADN del pellet obtenido luego del proceso de homogeneización del tejido con nitrógeno líquido, sonicación o agitación con cuentas (perlas), seguida por la extracción de ADN utilizando un kit comercial.

Es importante recalcar además, que las cuatro muestras de linfonodos no detectadas como positivas por el PCR mostraron a nivel macroscópico únicamente lesiones supurativas, y no necrosis o fibrosis que son detectadas en lesiones que sugieren tuberculosis avanzada. Es posible que el PCR no lograra detectar el ADN de *M. bovis* en estas muestras, por encontrarse los animales en una etapa temprana de la enfermedad, por consiguiente las muestras contenían una baja carga bacteriana (Araújo *et al.* 2014; de Souza *et al.* 2012; Estrada-Chávez *et al.* 2004). Como estas cuatro muestras habían mostrado macroscópicamente únicamente lesiones supurativas, se desconoce si las canales se aprobaron para el consumo humano, según el procedimiento de inspección *post-mortem* emitido por la Dirección de Inocuidad de Productos de Origen Animal (DIPO-PG-013) del año 2012. Se recomienda revisar este procedimiento, para asegurar que sean confiscadas todas las canales de animales reactivos, independientemente del grado de lesión que presenten y aún más se recomienda que aquellos reactivos que no presenten lesiones sean sometidas a confirmación mediante cultivo tal y como lo recomienda Araújo *et al.* 2014 que logró el aislamiento de *M. bovis* en un 37% de animales reactivos a la prueba de tuberculina comparativa y que no presentaban lesiones en la inspección *post-mortem*.

Los resultados obtenidos en cultivo, PCR y mediante el ensayo de tiras de ADN determinaron a *M. bovis* como el agente presente en todos los casos estudiados en el presente estudio.

5. Conclusiones.

La comparación de resultados de la prueba de tuberculina con el cultivo, mostró un VPP bajo de 31.4%, para la prueba de tuberculina simple ano-caudal y un VPP de 70%, para la prueba de tuberculina cervical comparativa.

El PCR mostró excelentes resultados con respecto al cultivo en el primer grupo de muestras (colonias de *M. bovis*), no así, en el segundo grupo de muestras (linfonodos), específicamente en muestras que indicaron una infección temprana con *M. bovis*.

6. Recomendaciones

Realizar la prueba de tuberculina comparativa para evitar resultados falsos positivos o no específicos arrojados por la prueba simple ano-caudal.

Mejorar el PCR como herramienta de diagnóstico confirmativo rápido de tuberculosis bovina, evaluando diferentes métodos de extracción de ADN a fin de mejorar la sensibilidad de la técnica.

Las canales de animales reactivos a las pruebas de tuberculina, con lesiones supurativas, deben de ser consideradas no aptas para el consumo humano hasta obtener el diagnóstico negativo del cultivo bacteriológico.

7. Referencias bibliográficas

- Aagaard, C., Govaerts, M., Meikle, V., Vallecillo, A. J., Gutierrez-Pabello, J. A., Suarez-Guemes, F., Pollock, J. M. (2006). Optimizing Antigen Cocktails for Detection of *Mycobacterium bovis* in Herds with Different Prevalences of Bovine Tuberculosis: ESAT6-CFP10 Mixture Shows Optimal Sensitivity and Specificity. *Journal of Clinical Microbiology*, 44(12), 4326–4335.
- Albernaz, T. T., Oliveira, C., da Silva, D. H., da Silva, N., Cardoso, D. P., Lopes, T. A., Barbosa, J. D. (2015). Comparison of the tuberculin test, histopathological examination, and bacterial culture for the diagnosis of tuberculosis (*Mycobacterium bovis*) in buffaloes (*Bubalus bubalis*) in Brazil. *Tropical Animal Health and Production*, 47(6), 1153–1159.
- Álvarez, J., Marqués, S., Saez, J. L., Juan, L. d., Romero, B., Grau, A., . . . Minguéz, O. (2009). *Evaluación de las medidas incorporadas en el programa de erradicación de la tuberculosis bovina de Castilla y León* (Colección Vigilancia Sanitaria). Madrid.
- Álvarez, J., Perez, A., Bezos, J., Marqués, S., Grau, A., Saez, J. L., Domínguez, L. (2012). Evaluation of the sensitivity and specificity of bovine tuberculosis diagnostic tests in naturally infected cattle herds using a Bayesian approach. *Veterinary Microbiology*, 155(1), 38–43.
- Álvarez, J., Perez, A., Marqués, S., Bezos, J., Grau, A., La Cruz, M. d., Domínguez, L. (2014). Risk factors associated with negative in-vivo diagnostic results in bovine tuberculosis-infected cattle in Spain. *BMC Veterinary Research*, 10(1), 14.
- Alwathani, H., Ashgan, M., & Ihab, M. (2012). Nested polymerase chain reaction as a molecular tool for detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex recovered from milk samples. *Afr. J. Microbiol. Res (African Journal of Microbiology Research)*, 6(6), 1338–1344.

- Araújo, C. P., Osório, A. L., Jorge, K., Ramos, C. A., Filho, A. A., & Vidal, Carlos, C.E et al. (2014). Detection of *Mycobacterium bovis* in Bovine and Bubaline Tissues Using Nested-PCR for TbD1. *PLoS ONE*, 9(3), e91023.
- Arráiz R, N., Romay B, Z., & Faría M, N. (2007). Evaluación de un ensayo de RCP múltiple para diferenciar micobacterias del complejo *Mycobacterium tuberculosis* en un laboratorio de referencia. *Revista chilena de infectología*, 24(2).
- Bezoz, J., Casal, C., Romero, B., Schroeder, B., Hardegger, R., Raeber, A. J., Domínguez, L. (2014). Current ante-mortem techniques for diagnosis of bovine tuberculosis. *Research in Veterinary Science*, 97, S44-S52.
- Cardoso, M. A., Cardoso, R. F., Hirata, R. D. C., Hirata, M. H., Leite, C. Q. F., Santos, A. C. B., Lonardon, M. V. C. (2007). Direct Detection of *Mycobacterium bovis* in Bovine Lymph Nodes by PCR. *Zoonoses and Public Health*, 56(8), 465–470.
- Carvalho, R. C., Furlanetto, L. V., Maruyama, F. H., Araújo, C. P., Barros, S. L., Ramos, C. A., Figueiredo, E. E. (2015). Evaluation of the efficiency of nested q-PCR in the detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex directly from tuberculosis-suspected lesions in post-mortem macroscopic inspections of bovine carcasses slaughtered in the state of Mato Grosso, Brazil. *Meat Science*, 106, 11–15.
- Clegg, T. A., Duignan, A., Whelan, C., Gormley, E., Good, M., Clarke, J., More, S. J. (2011). Using latent class analysis to estimate the test characteristics of the γ -interferon test, the single intradermal comparative tuberculin test and a multiplex immunoassay under Irish conditions. *Veterinary Microbiology*, 151(1-2), 68–76.
- Corner, L. A., Gormley, E., & Pfeiffer, D. U. (2012). Primary isolation of *Mycobacterium bovis* from bovine tissues: Conditions for maximising the number of positive cultures. *Veterinary Microbiology*, 156(1-2), 162–171.

- De Souza, E. E., Conte, A. J., Furlanetto, L. V., Silvestre, F. G., Silva, D., Trajano, J., . . . Flosi, M. M. (2012). Molecular Techniques for Identification of Species of the *Mycobacterium tuberculosis* Complex: The use of Multiplex PCR and an Adapted HPLC Method for Identification of *Mycobacterium bovis* and Diagnosis of Bovine Tuberculosis: Understanding Tuberculosis - Global Experiences and Innovative Approaches to the Diagnosis, Dr. Pere-Joan Cardona (Ed.), ISBN: 978-953-307-938-7,. *In Tech*, 411–432.
- Estrada-Chávez, C., Fernando, O. D., Arriaga. C.D., Villegas-Sepúlveda C., González, R. P., & González, D. S. (2004). Concordancia de la PCR y métodos rutinarios para el diagnóstico de tuberculosis bovina. *Veterinaria México*, 35(3), 225–236.
- Farnham, M. W., Norby, B., Goldsmith, T. J., & Wells, S. J. (2012). Meta-analysis of field studies on bovine tuberculosis skin tests in United States cattle herds. *Preventive Veterinary Medicine*, 103(2-3), 234–242.
- García, J. L. (2014). *Análisis comparativo de la relación entre la clasificación, animales reactivos a tuberculina, y el diagnóstico de tuberculosis bovina, realizado en laboratorios autorizados por el Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria (SENASICA), sagarpa en México, durante el período 2009-2012* (tesis). Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico D.F.
- González, C., & Pérez, J. F. (2007). Curso de introducción a la investigación clínica: Capítulo 8: Pruebas diagnósticas. Concordancia. *SEMERGEN*, 33(10), 509–519.
- Good, M., & Duignan, A. (2011). An evaluation of the Irish Single Reactor Breakdown Protocol for 2005–2008 inclusive and its potential application as a monitor of tuberculin test performance. *Veterinary Microbiology*, 151(1-2), 85–90.

- Goodchild, A. V., Downs, S. H., Upton, P., Wood, J. L. N., & La Rua-Domenech, R. d. (2015). Specificity of the comparative skin test for bovine tuberculosis in Great Britain. *The Veterinary record*, 177(10), 258.
- Gormley, E., Corner, L., Costello, E., & Rodriguez-Campos, S. (2014). Bacteriological diagnosis and molecular strain typing of *Mycobacterium bovis* and *Mycobacterium caprae*. *Research in Veterinary Science*, 97, S30-S43.
- Grange, M., Yates, M., & de Kantor I.N. (1996). Guidelines for speciation within the *Mycobacterium tuberculosis* complex. Retrieved from World Health Organization website: <http://www.who.int/emc>
- Gyles, C. L., Prescott, J. F., Songer, G., & Thoen, C. O. (2010). *Pathogenesis of Bacterial Infections in Animals*, Fourth Edition (4th ed.). Iowa, USA: Blackwell.
- Huard, R. C., Lazzarini, L., Butler, W. R., van Soolingen, D., & Ho, J. (2003). PCR-Based Method To Differentiate the Subspecies of the *Mycobacterium tuberculosis* Complex on the Basis of Genomic Deletions. *J. Clin. Microbiol. (Journal of Clinical Microbiology)*, 41(4), 1637–1650.
- Humblet, M.-F., Walravens, K., Salandre, O., Boschiroli, M. L., Gilbert, M., Berkvens, D., Saegerman, C. (2011). Monitoring of the intra-dermal tuberculosis skin test performed by Belgian field practitioners. *Research in Veterinary Science*, 91(2), 199–207.
- Kantor, I. N. de., Lobue, P. A., & Thoen, C. O. (2010). Human tuberculosis caused by *Mycobacterium bovis* in the United States, Latin America and the Caribbean. *INT J TUBERC LUNG DIS (The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease)*, 14(11), 1369–1373.
- Karolemeas, K., La Rua-Domenech, R. d., Cooper, R., Goodchild, A. V., Clifton-Hadley, R. S., Conlan, J. K., McKinley, T. J. (2012). Estimation of the Relative Sensitivity of the Comparative Tuberculin Skin Test in Tuberculous Cattle Herds Subjected to Depopulation. *PLoS ONE*, 7(8), e43217.

- La Rua-Domenech, R. d., Goodchild, A. T., Vordermeier, H. M., Hewinson, R. G., Christiansen, K. H., & Clifton-Hadley, R. S. (2006). *Ante mortem* diagnosis of tuberculosis in cattle: a review of the tuberculin tests, gamma-interferon assay and other ancillary diagnostic techniques. *Research in Veterinary Science*, 81(2), 190–210.
- Ley N° 34852-MAG. Reglamento para la Prevención, el Control y Erradicación de la Tuberculosis en los Bovinos. La Gaceta N°230. San José, Costa Rica, 27 de Noviembre de 2008.
- Markey, B., Leonard, F., Archambault, M., Cullinane, A., & Maguire, D. *Clinical Veterinary Microbiology* (2013) (2da): MOSBY-ELSEVIER.
- Martinez, C. A. (Mayo,2008). *Diagnóstico Molecular de Mycobacterium bovis en ganado bovino de la zona centro del Estado de Veracruz* (Tesis). Universidad Veracruzana, Veracruz, Ver.
- Medeiros, L. d. S., Marassi, C. D., Figueiredo, E. E., & Lilenbaum, W. (2010). Potential application of new diagnostic methods for controlling bovine Tuberculosis in Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology*, 41(3), 531–541.
- Menin, Á., Fleith, R., Reck, C., Marlow, M., Fernandes, P., Pilati, C., & Báfica, A. (2013). Asymptomatic Cattle Naturally Infected with *Mycobacterium bovis* Present Exacerbated Tissue Pathology and Bacterial Dissemination. *PLoS ONE*, 8(1), e53884.
- Nassar, A., Miyashiro, S., Piatti, R. M., Dib, C. C., Roxo, E., & Mendonca, R. Z. (2012). Comparative study on PCR and microbiological culture performance for identifying *Mycobacterium tuberculosis* complex and *Mycobacterium bovis* specie in bovine samples. *Rev Inst Adolfo Lutz*, 71(2), 244–249.
- Norby, B., Bartlett, P. C., Fitzgerald, S. D., Granger, L. M., Bruning-Fann, C., Whipple, D., & Payeur, J. B. (2004). The sensitivity of gross necropsy, caudal fold and comparative cervical tests for the diagnosis of bovine tuberculosis. *J Vet Diagn Invest*, 16, 126–131.

- Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. Emergency Prevention System. (2012). *EMPRES Boletín de enfermedades transfronterizas de los animales* (No. 40), pp. 1–11.
- Organizacion Mundial de Sanidad Animal. (2012). *Manual de la OIE sobre animales terrestres: Tuberculosis Bovina*.
- Organizacion Mundial de Sanidad Animal. (2016). Enfermedades de la Lista de la OIE 2016. Retrieved from <http://www.oie.int/es/sanidad-animal-en-el-mundo/oie-listed-diseases-2016/>
- Organización Panamericana para la Salud. (2008a). *Manual para el diagnóstico bacteriológico de tuberculosis: Parte 2 Cultivo* (No. 2).
- Organización Panamericana para la Salud. (2008b). *Manual para el Diagnóstico Bacteriológico de la Tuberculosis: Parte 1 Baciloscopia* (No. 1).
- Sa'idu, A. S., Okolocha, E. C., Dzikwi, A. A., Kwaga, J. K. P., Gamawa, A. A., Usman, A., & Maigari, S. A. Et al. (2015). Detection of *Mycobacterium bovis* in Organs of Slaughtered Cattle by DNA-Based Polymerase Chain Reaction and Ziehl-Neelsen Techniques in Bauchi State, Nigeria. *Journal of Veterinary Medicine*, 2015(1), 1–7.
- Schiller, I., Oesch, B., Vordermeier, H. M., Palmer, M. V., Harris, B. N., Orloski, K. A., Waters, W. R. (2010). Bovine Tuberculosis: A Review of Current and Emerging Diagnostic Techniques in View of their Relevance for Disease Control and Eradication. *Transboundary and Emerging Diseases*, 57, 205–220.
- Schiller, I., RayWaters, W., Vordermeier, H. M., Jemmi, T., Welsh, M., Keck, N., Oesch, B. (2011). Bovine tuberculosis in Europe from the perspective of an officially tuberculosis free country: Trade, *surveillance and diagnostics*. *Veterinary Microbiology*, 151(1-2), 153–159.

- Servicio Nacional de Sanidad Animal, Dirección de Inocuidad de Productos de Origen Animal. (2012). *Inspección Post mortem en Bovinos* (No. DIPOA-PG-013). Costa Rica.
- Tarabla, H., & Signorini, M. (2013). *Epidemiología diagnóstica* (1a ed.). Santa Fe, Argentina: UNL.
- Taylor, G. M., Worth, D. R., Palmer, S., Jahans, K., & Hewinson, R. G. (2007). Rapid detection of *Mycobacterium bovis* DNA in cattle lymph nodes with visible lesions using PCR. *BMC Veterinary Research*, 3(1), 12.
- Toen, O. C., Lobue, P. A., Enarson, D. A., Kaneene, J. B., & Kantor, I. N. de. (2009). Tuberculosis: a re-emerging disease in animals and humans. *Vet Ital (Veterinaria Italiana)*, 45(1), 135–181.
- Van Dijk, J. (2013). Towards risk-based test protocols: estimating the contribution of intensive testing to the UK bovine tuberculosis problem. *PLoS ONE*, 8(5), e63961.

DISCUSION GENERAL

Este trabajo representa el primer estudio de comparación de técnicas y detección molecular de *M. bovis* en bovinos de Costa Rica.

En la primer parte de la investigación, solamente 53 (54.1%) de un total de 98 muestras sospechosas de tuberculosis resultaron cultivo positivo, 21 (60.0%) en el primer grupo y 32 (62.7%) en el segundo grupo. El porcentaje de aislamientos positivos fue similar al 60.0% reportado por Nassar *et al.* (2007) y mayor al 36.4% reportado por Proaño-Pérez *et al.* (2011). Estos dos grupos de investigadores utilizaron el cultivo bacteriológico en las mismas condiciones descritas en la presente investigación. Según Corner *et al.* (2012), el cultivo bacteriológico está influenciado por el procedimiento de descontaminación, el tipo de medio y el número de inóculos utilizados. Proaño-Pérez *et al.* (2011) además encontraron, que varios ciclos de congelación y descongelación de las muestras puede reducir la viabilidad de los bacilos, disminuyendo así la sensibilidad de la técnica de cultivo bacteriológico. También puede haberse debido a una baja cantidad de *M. bovis* viables en las muestras iniciales, las cuales luego arrojaron resultados negativos en cultivo. El uso de hidróxido de sodio y de ácido sulfúrico como descontaminantes resulta ser muy eficiente para eliminar microorganismos contaminantes (bacterias y hongos) en las muestras, sin embargo, son tóxicos para micobacterias, reduciendo su viabilidad, característica importante para el aislamiento bacteriológico (Courcoul *et al.*, 2014; Mishra *et al.*, 2005). Es por eso que Corner *et al.* (2012) recomiendan no realizar descontaminación de las muestras. En un estudio realizado por estos

investigadores, se determinó una mayor cantidad de muestras positivas en cultivo bacteriológico, cuando no se realizó la descontaminación de la muestra, seguido del uso de cloruro de benzalconio (BC) como descontaminante en combinación con el medio Stonebrink para el cultivo, mientras que la combinación de hidróxido de sodio como descontaminante en combinación los medios de cultivo Middlebrook 7H11 o Stonebrink arrojaron los peores resultados.

La baja frecuencia de aislamientos positivos (54.1%) encontrados en la presente investigación también puede haberse debido a la presencia de granulomas ocasionados por otros microorganismos como *Nocardia*, *Rhodococcus*, *Actinobacillus*, *Arcanobacterium*, los cuales pueden haberse confundido con LCT (Liébana *et al.*, 2008; Araújo *et al.*, 2014).

El PCR identificó como positivas un total de 47 (88.7%) de 53 muestras, que habían resultado cultivo positivo, además detectó una muestra como positiva, la cual había sido reportada cultivo negativa. Esta muestra se confirmó como positiva mediante secuenciación, por lo que el PCR permitió la identificación de *M. bovis* similar al cultivo bacteriológico.

En el primer grupo de muestras (aislamientos de *M. bovis*), el PCR confirmó todos los cultivos positivos, resultados que concuerdan con lo reportado por Arraíz *et al.* (2005, 2006, 2007), los cuales reportaron correlaciones del 100% entre las dos técnicas, recomendando el PCR como técnica de confirmación de *M. bovis* a partir de aislamientos. El PCR realizado con muestras de tejido (Grupo 2, ADN obtenido de tejido homogenizado, sin

someterse a proceso de descontaminación), no logró detectar 7 (21.8%) muestras que resultaron cultivo positivo, lo cual coincide con reportes de Araújo *et al* (2014), Proaño-Pérez *et al.* (2011) y Cardoso *et al* (2007).

Se ha propuesto que la conformación compleja de la pared celular de las micobacterias y la presencia de fibrosis y calcificación en los granulomas, dificultan la extracción de ADN, lo que puede influir en los resultados obtenidos en el PCR de las muestras clínicas en el presente trabajo (Taylor *et al.*, 2007; Araújo *et al.*, 2014), por lo que se recomienda utilizar procedimientos adicionales como la homogeneización del tejido con nitrógeno líquido, sonicación o agitación con cuentas (perlas) seguida por la extracción de ADN utilizando un kit comercial o realizarla a partir del pellet obtenido luego del proceso de descontaminación de la muestra para aumentar la sensibilidad del PCR (Cardoso *et al.*, 2007; Taylor *et al.*, 2007). La sensibilidad moderada obtenida (78.1%), resultó ser inferior a lo reportada por Taylor *et al.* (2007), quienes reportaron un aumento de la sensibilidad de 70.0% al 91.0%, luego de la implementación de homogeneización del tejido con nitrógeno líquido, pero superior a la reportada por Estrada-Chávez *et al.* (2004) y Proaño-Pérez *et al.* (2011) quienes obtuvieron 53.0% y 56.5%, respectivamente, evaluando PCR simples.

La técnica de tinción ZN determinó un total de 50 muestras como positivas, sin embargo, solamente 35 se confirmaron como cultivo positivas. Resultados similares reportó Morales *et al.* (2005) y Estrada-Chávez *et al.* (2004). Según Liébana *et al.* (2008), a menudo es difícil identificar BAAR en las lesiones, debido entre otras causas, a la poca cantidad de micobacterias

presentes en lesiones tuberculosas, por lo que la presencia de los bacilos pasa desapercibida (falsos negativos), y que cuando se detectan, puede tratarse de otros microorganismos con la capacidad de ácido alcohol resistencia (falsos positivos), lo cual podría explicar la alta cantidad de resultados falsos negativos (17) y falsos positivos (15) obtenidos en el presente estudio. Los valores de sensibilidad oscilaron entre 62.5% y 71.4%, siendo mayores (43.5%), mientras que los valores de especificidad entre 73.1%-94.4% este último valor igual al reportado por Proaño-Pérez *et al.* (2011). Se obtuvo una concordancia moderada entre el PCR y la tinción ZN, contrario a lo reportado Estrada-Chávez *et al.* (2004) y Proaño-Pérez *et al.* (2011). Como la técnica de tinción ZN resultó ser menos sensible y específica que el PCR no se recomienda utilizarla como prueba confirmativa (Medeiros *et al.*, 2010).

Con respecto a la inspección *post-mortem* se obtuvo una sensibilidad del 100%, y una especificidad de 81.3% comparado con la técnica de cultivo, valores superiores a los reportados por Norby *et al.* (2004), Biffa *et al.* (2010) y Aylate *et al.* (2013) (25.0%-86.0% y 76.5%-84.1%, respectivamente), lo que es de suma importancia en países como el nuestro, con prevalencia baja y en donde la inspección *post-mortem* como parte de la vigilancia epidemiológica y se torna más difícil la identificación de hatos infectados (Calvalho *et al.*, 2015; Araújo *et al.*, 2014). La alta sensibilidad y concordancia moderada entre la *inspección post-mortem* en comparación a la tinción ZN y el PCR obtenida en el presente estudio, hacen de la inspección *post-mortem* una excelente prueba tamiz.

Según Carvalho *et al.* (2015), hasta un 86% de las lesiones de tuberculosis aparecen en linfonodos de cabeza y cavidad torácica. Aunque en el presente estudio, no se registró la ubicación anatómica de los linfonodos recolectados, el 87.75% de las muestras en que se detectaron LCT fueron linfonodos, coincidiendo con lo reportado por Aylate *et al.* (2013) y Menin *et al.* (2013). Además un 90.6% de las muestras con resultados cultivo positivos en el presente estudio, pertenecían a muestras cuyas lesiones eran de tipo fibroso o con necrosis caseosa, lo que concuerda con lo reportado por Estrada-Chávez *et al.* (2005).

En cuanto a las características de los bovinos positivos al aislamiento de *M. bovis* el 90.6% fueron hembras y un 58.49% eran animales adultos, similar a lo reportado por Asseged *et al.* (2004).

La técnica de PCR implementada en el presente estudio demostró que puede ser utilizada como técnica complementaria al cultivo para confirmar la presencia de *M. bovis*, con la gran ventaja de obtener resultados en un menor tiempo que el requerido cuando se realizan pruebas bioquímicas (Medeiros *et al.*, 2010; Arráiz *et al.*, 2007; Huard *et al.*, 2003), por lo que se recomienda implementar esta técnica en el SENASA. El diagnóstico confirmativo directamente de muestras clínicas se obtuvo en tan solo dos días (Martínez, 2008; Taylor *et al.*, 2007), sin embargo se debe implementar mejoras en el procedimiento de descontaminación de las muestras y extracción de ADN para aumentar la sensibilidad del PCR (Araújo *et al.*, 2014; Cardoso *et al.*, 2007). La inspección *post-mortem* resultó ser una prueba de tamizaje de alta sensibilidad

para la detección de LCT, mientras que la técnica de ZN mostró una cantidad variable de resultados falsos positivos y negativos.

En la segunda parte del presente estudio, se determinó en el grupo de animales reactivos a la prueba de tuberculina simple (Grupo 1) un 68.6% de resultados falsos positivos, un porcentaje mucho mayor al reportado por Estrada-Chávez et al. (2004). En el grupo de animales sometidos a la prueba de tuberculina cervical comparativa (Grupo 2) se determinó un 30% de resultados falsos positivos, similar a lo reportado por Araújo *et al.* (2014).

El alto porcentaje de resultados falsos positivos determinados en el Grupo 1 se debe probablemente a reacciones cruzadas, ya que la prueba de tuberculina simple no establece, si la reacción de hipersensibilidad mostrada por el animal se debe a la infección con *M. bovis*, infección con micobacterias del ambiente o con bacterias de géneros relacionados. Es por eso, que se recomienda utilizar la prueba de tuberculina comparativa, la cual permite diferenciar entre reacciones debidas a infección con *M. bovis* u otras micobacterias no tuberculosas (Schiller *et al.*, 2011; OIE, 2012; La Rúa-Domenech *et al.*, 2006).

El bajo valor predictivo de la prueba de tuberculina simple ano-caudal (40%) fue similar al 38.9 % reportado por Álvarez *et al.* (2009); mientras el VPP de la prueba cervical comparativa (70%) coincide con (73.5% y 77.2%), lo reportado por Schiller *et al.* (2011) y Goodchild *et al.* (2015), respectivamente, obtenidos en base a resultados de estudios en diferentes escenarios epidemiológicos sin compararlos contra el cultivo.

Los valores de sensibilidad y especificidad de una prueba diagnóstica y la prevalencia de la enfermedad en la población, tienen influencia sobre los valores predictivos (Good y Duignan, 2011; Tarabla y Signorini, 2013; van Dick, 2013). El VPP se ve más afectado por cambios en la especificidad, lo que explica claramente el mayor VPP en el segundo grupo, los cuales fueron sometidos a la prueba de tuberculina cervical comparativa que posee mayor especificidad. Por otro lado a medida disminuye la prevalencia de una enfermedad, disminuye el VPP y aumentan los diagnósticos falsos positivos; situación que también puede explicar los resultados del primer grupo y apoyar la recomendación, de que los animales sean sometidos a la prueba cervical comparativa para evitar el sacrificio innecesario de animales reactivos en la prueba simple ano-caudal.

Los resultados del presente trabajo concuerdan con reportes de La Rúa-Domenech *et al.* (2006), Estrada-Chávez *et al.* (2004) y Araujo *et al.* (2014) en los que entre un 50-80% de bovinos reactivos a la prueba de tuberculina no se logran confirmar positivos en cultivo bacteriológico, sugiriendo una baja especificidad de la prueba de tuberculina, principalmente en la prueba ano-caudal. Sin embargo, señalaron también considerar, que a pesar de que el cultivo bacteriológico es considerado el estándar de oro, esta técnica es menos sensible que pruebas inmunológicas, las cuales detectan una infección subclínica, concluyendo, que no todos los animales reactivos a la prueba de tuberculina y con resultados negativos en cultivo, deben de ser considerados como falsos positivos o reactivos no específicos.

En cuanto al PCR, se obtuvo una mayor cantidad de resultados positivos en el primer grupo de muestras, esto se debe, a que el PCR se realizó a partir de ADN de colonias en el medio Stonebink utilizado, contándose con ADN puro y concentrado, resultados similares a los reportados por Nassar *et al.* (2012). Además, la prueba de PCR detectó una de las muestras como positivas, la cual había sido reportada inicialmente como cultivo negativo. Esto probablemente se deba, a que en el momento de la lectura del resultado de cultivo no se observó crecimiento de colonias, y el periodo de incubación adicional (los cultivos no se desecharon después de la lectura a los 60 días, sino que se continuaron incubando a 37°C) permitió el crecimiento de *M. bovis*. Aunque no se encontró un estudio que soportara esta situación, en la presente investigación se observó en dos muestras, el crecimiento de colonias en un periodo mayor a 60 días de incubación que coincide con lo reportado por Corner *et al.* (2012), donde indica que el cultivo en medio Stonebrink requiere un mayor periodo de tiempo para la observación de las colonias en comparación con otros tipos de medio.

En contraste, en el segundo grupo de muestras, los cuatro resultados falsos negativos por PCR en comparación a los detectados por cultivo, pudieron ser resultado del proceso de extracción realizado directamente del tejido (linfonodos) aumentando la probabilidad de presencia de inhibidores en la muestra; por lo que se hace necesario, evaluar en un número mayor de muestras, otros procedimientos para mejorar la extracción de ADN de micobacterias directamente de linfonodos, Cardoso *et al.* (2007) recomiendan, realizar la extracción de ADN del pellet obtenido luego del proceso de

homogeneización del tejido con nitrógeno líquido, sonicación o agitación con cuentas (perlas), seguida por la extracción de ADN utilizando un kit comercial.

Es importante recalcar además, que las cuatro muestras de linfonodos no detectadas como positivas por el PCR mostraron a nivel macroscópico únicamente lesiones supurativas, y no necrosis o fibrosis que son detectadas en lesiones que sugieren tuberculosis avanzada. Es posible que el PCR no lograra detectar el ADN de *M. bovis* en estas muestras, por encontrarse los animales en una etapa temprana de la enfermedad, por consiguiente las muestras contenían una baja carga bacteriana (Araújo *et al.* 2014; de Souza *et al.* 2012; Estrada-Chávez *et al.* 2004). Como estas cuatro muestras habían mostrado macroscópicamente únicamente lesiones supurativas, se desconoce si las canales se aprobaron para el consumo humano, según el procedimiento de inspección *post-mortem* emitido por la Dirección de Inocuidad de Productos de Origen Animal (DIPO-PG-013) del año 2012. Se recomienda revisar este procedimiento, para asegurar que sean confiscadas todas las canales de animales reactivos, independientemente del grado de lesión que presenten y aún más se recomienda que aquellos reactivos que no presenten lesiones sean sometidas a confirmación mediante cultivo tal y como lo recomienda Araújo *et al.* 2014 que logró el aislamiento de *M. bovis* en un 37% de animales reactivos a la prueba de tuberculina comparativa y que no presentaban lesiones en la inspección *post-mortem*.

Los resultados obtenidos en cultivo, PCR y mediante el ensayo de tiras de ADN determinaron a *M. bovis* como el agente presente en todos los casos estudiados en el presente estudio.

CONCLUSIONES GENERALES

Se logró la implementación de una técnica de PCR para el diagnóstico de *M. bovis*.

El PCR mostró una alta sensibilidad para confirmar molecularmente aislamientos de *M. bovis*, y una sensibilidad moderada para la identificación de *M. bovis* directamente de muestras de tejido.

Existe concordancia moderada entre el PCR implementado y las técnicas tradicionalmente utilizadas para el diagnóstico de tuberculosis bovina en Costa Rica.

Las técnicas de Inspección *post-mortem* y PCR mostraron mejores características diagnósticas que la técnica de tinción Ziehl-Nelsen.

La comparación de resultados de la prueba de tuberculina con el cultivo, mostró un VPP bajo de 31.4%, para la prueba de tuberculina simple ano-caudal y un VPP de 70%, para la prueba de tuberculina cervical comparativa.

El PCR mostró excelentes resultados con respecto al cultivo en el primer grupo de muestras (colonias de *M. bovis*), no así, en el segundo grupo de muestras (linfonodos), específicamente en muestras que indicaron una infección temprana con *M. bovis*.

RECOMENDACIONES GENERALES

Incluir la técnica de PCR al diagnóstico de laboratorio de la tuberculosis bovina en Costa Rica, como técnica complementaria al cultivo, para confirmar la presencia de *M. bovis*

Evaluar diferentes procedimientos en la descontaminación para realizar el cultivo de muestras sospechosas de tuberculosis, para lograr una mayor detección de muestras positivas.

Evaluar procedimientos alternativos de extracción de ADN en muestras con LCT para mejorar la sensibilidad de la técnica de PCR con ese tipo de muestras.

Realizar la prueba de tuberculina comparativa para evitar resultados falsos positivos o no específicos arrojados por la prueba simple ano-caudal.

Mejorar el PCR como herramienta de diagnóstico confirmativo rápido de tuberculosis bovina, evaluando diferentes métodos de extracción de ADN a fin de mejorar la sensibilidad de la técnica.

Las canales de animales reactivos a las pruebas de tuberculina, con lesiones supurativas, deben de ser consideradas no aptas para el consumo humano hasta obtener el diagnóstico negativo del cultivo bacteriológico.