

TRABAJO PRÁCTICO DIPLOMADO EN SALUD PÚBLICA 2018

***“Aportaciones al diagnóstico para la confirmación de
Tuberculosis bovina en Extremadura”***

María Cortés Gómez.

ÍNDICE:

I. RESUMEN	1
II. INTRODUCCIÓN	2
1. Recuerdo histórico de la tuberculosis	2
2. Género <i>Mycobacterium</i>	6
3. Aspecto zoonósico de la TBb	7
4. Diagnóstico de la TBb en el ganado doméstico	8
III. OBJETIVO	10
IV. MATERIAL Y MÉTODO	10
V. RESULTADOS	13
VI. DISCUSIÓN Y CONCLUSIÓN	16
REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	18
ANEXO I. Abreviaturas	24
ANEXO II. Imágenes	26

I. RESUMEN.

La tuberculosis es una enfermedad infectocontagiosa causada por bacterias del Género *Mycobacterium* que afecta a los animales y al hombre. En Extremadura, a pesar de los esfuerzos realizados para su control y erradicación en el ganado doméstico durante más de tres décadas y así evitar problemas en la Salud Pública a causa de los posibles contagios a la población en general y; al personal de riesgo en contacto con los animales en particular, sigue causando elevadas pérdidas económicas en los sectores ganadero y cinegético, ambos básicos en la economía de la región. Algunos de los principales problemas para llevar a cabo un exitoso control de esta enfermedad en determinadas zonas, radican en los escasos conocimientos que se tienen acerca de la epidemiología de la tuberculosis bovina y las limitaciones de sus métodos diagnósticos. En este sentido, nuestro estudio se ha centrado en la utilización de tres pruebas diagnósticas: Reacción en Cadena de la Polimerasa a Tiempo Real (RTPCR), Cultivo en Medio selectivo Líquido (Cultivo ML) y Cultivo en Medio selectivo Sólido (Cultivo MS) para la confirmación del agente en el menor tiempo posible en muestras de linfonodos de 176 bovinos que, previamente han dado resultado positivo en la Intradermotuberculinización (IDTB) cutánea o Gamma-Interferón en las campañas para el Control y Erradicación de la Tuberculosis Bovina y Caprina desarrolladas por el MAPAMA en todo el territorio nacional. De las tres pruebas diagnósticas la que menor tiempo tarda en diagnosticar los resultados positivos y es capaz de detectar un mayor número de muestras positivas es la RTPCR. Seguida de la RTPCR tendríamos el Cultivo ML y por último el Cultivo MS en orden decreciente de aislamientos y creciente en tiempo de diagnóstico.

Analizando la sensibilidad y especificidad de la RTPCR y el Cultivo ML con respecto al Cultivo MS (método de diagnóstico tradicional) observamos una muy buena sensibilidad, pero una baja especificidad en ambas técnicas, lo que sugiere que no serían unas técnicas

aplicables para el diagnóstico confirmatorio de la enfermedad. Sin embargo, la concordancia entre la RTPCR y el Cultivo ML calculada a través del Coeficiente Kappa es buena, por lo tanto, es posible que estas pruebas sean más sensibles que el Cultivo MS y sean más adecuadas, ya que presentan mayor sensibilidad y un tiempo de diagnóstico bastante menor. Sin embargo, para probar esta hipótesis habría que realizar más estudios en un futuro.

II. INTRODUCCIÓN.

1. Recuerdo histórico de la tuberculosis.

La tuberculosis es la enfermedad zoonótica causada por bacterias del Género *Mycobacterium*, que se ha cobrado más víctimas a lo largo de la historia de la humanidad, tanto en personas como en animales, además de producir grandes pérdidas económicas por improductividad y aplicación de medidas de control.

A. Tuberculosis humana (TB).

La tuberculosis es una enfermedad que ha acompañado a los humanos desde las primeras civilizaciones, encontrándose lesiones nodulares típicas de la enfermedad en momias del antiguo Egipto. También hay evidencias de TB en restos óseos procedentes del período Neolítico (datados en torno a 5000 años a.C.). A algunas especies de micobacterias (*M. ulcerans*), se les ha atribuido una antigüedad de 150 millones de años [1-3].

Los primeros documentos describiendo la enfermedad, fueron encontrados en India y en China hace 3300 y 2300 años respectivamente. En la antigua Grecia, la TB fue denominada por Hipócrates (460-377 a.C.) como *tisis* y la describió como una fatal enfermedad. Isócrates fue el primer autor en reflejar que la TB era una enfermedad de tipo infeccioso [4].

Desde los tiempos de Hipócrates hasta mediados del siglo XIX, ni siquiera se admitía la naturaleza infecciosa y contagiosa de la enfermedad, que se consideraba hereditaria y diatésica [5].

En la segunda mitad del siglo XIX se empezó a aceptar la naturaleza transmisible de la TB, a través de los trabajos de Jean Antoine Villemin, 1868. Confirmando que la TB era una enfermedad que se podía transmitir entre los animales y el hombre [4].

Unos años más tarde, Robert Koch publicó el resultado de sus investigaciones el 24 de marzo de 1882, en las cuales consiguió aislar el bacilo tuberculoso como agente causante de la TB. Este resultado le valió para obtener el premio Nobel en 1905 [4].

A partir de la publicación de los trabajos de Robert Koch, se desarrollaron una serie de estudios, como la tinción innovada por Ziehl [6] y Neelsen [7], basada en su característica de ácido-alcohol resistencia, el hallazgo de la reacción cutánea a la tuberculina [8] y la aplicación clínica de la técnica del Mantoux [9], o la invención de la vacuna de Calmette-Guerin [10].

Con el descubrimiento de la estreptomicina por Selman Waksman en 1943 y el resto de antibiótico en décadas posteriores, sentaron las bases de la llamada era moderna de la TB, la época de la quimioterapia.

Hasta mediado de los años ochenta, la enfermedad descendió progresivamente. Con la aparición del Virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH) y el aumento de la inmigración desde países en vías de desarrollo, de nuevo hicieron de la TB un problema creciente. Además, la situación se ha agravado en las últimas décadas con la aparición y diseminación de cepas multirresistentes [11, 12].

En la actualidad, la TB sigue siendo un importante problema de salud pública, por lo que es necesaria una estrategia combinada, basada en mejorar el tratamiento farmacológico,

los instrumentos de diagnóstico y la estrategia de prevención, para erradicar *M. tuberculosis* para el año 2050, tal como lo acordó la Organización Mundial de la Salud (OMS) [13].

B. Tuberculosis bovina (TBb).

La primera referencia sobre la tuberculosis animal data del año 40 d.C., cuando Columela describe la tuberculosis pulmonar de los vacunos. Hasta mediados del siglo XIX no se la relacionó con la tuberculosis humana, ni fue designada como tal. El primer intento de asociar ambos procesos sucedió en 1797, cuando Klenke, vinculó el consumo de leche de vaca y la aparición de las escrófulas (tuberculosis humana).

Posteriormente, se produjo un cambio en la concepción sobre la tuberculosis, gracias a Gurlt (1831), Hering (1849) y Fuchs (1859), quienes consideraron la tuberculosis pulmonar del ganado vacuno prácticamente igual a la tuberculosis pulmonar humana.

En 1868, Villemin confirmó la tuberculosis como una enfermedad transmisible del hombre al animal y viceversa. Se demostró que la tuberculosis de los hombres y el mal perlado de los vacunos eran idénticos y estaban producidos por un agente infeccioso.

Ya en 1889, tuvo lugar en Finlandia la primera campaña de erradicación de la tuberculosis bovina y; en 1890 Koch desarrolla el medio de diagnóstico de la tuberculina, tras la fallida pretensión de utilizarla como vacuna [14].

En 1896, Lehman y Neumann asignaron las especies al género *Mycobacterium*. Se distinguió entre *Mycobacterium tuberculosis hominis* y *Mycobacterium tuberculosis bovis*, que podía dar lugar a enfermedad extrapulmonar en el hombre, como consecuencia de la ingestión de leche de vacas infectadas [15].

Mycobacterium bovis, fue aislado por primera vez en el año 1898 por Theobald Smith, que diferenció el bacilo tuberculoso humano del bacilo bovino.

El primer intento para evitar el contagio de la tuberculosis bovina a humanos (1899) se realizó cuando la Royal Commission on Tuberculosis consideró las lecherías, carnicerías y establos como zonas de riesgo potencial para la Salud Pública; prohibiéndose la venta de leche y carne proveniente de vacas infectadas [14].

En EEUU, en 1917 se comenzó con un programa de erradicación de la enfermedad en el ganado bovino, que no se inició en Europa hasta 1935. A principios de los 90, algunos países como Dinamarca, Holanda y Luxemburgo consideraron la enfermedad erradicada.

En la actualidad la infección de la cabaña ganadera por *Mycobacterium bovis* sigue siendo un problema que origina pérdidas económicas importantes como consecuencia de pérdidas en la producción de leche y carne y las restricciones legales en la importación y exportación de los animales afectados [16].

C. Situación de la TBb en España y Extremadura.

Las primeras actuaciones de lucha frente a la tuberculosis bovina se iniciaron en España a principios de los años 50. El objetivo principal de estos programas fue incrementar paulatinamente la sensibilidad en el diagnóstico, tanto a nivel de rebaño como individual y, como resultado, las prevalencias de tuberculosis han manifestado un descenso sostenido pero moderado de la enfermedad durante los últimos 25 años, con rebrotes puntuales (**Gráfica1**). En los últimos años se han introducido en los programas de erradicación medidas adicionales de gestión de posibles reservorios silvestres o la integración del sistema de vigilancia en mataderos, todo ello, con el objetivo de reducir la TBb a niveles cercanos a la erradicación e incluso a la propia erradicación. En los años 2013- 2015 se produjo un ascenso significativo en la incidencia de rebaño, disminuyendo

en 2016 (**Gráfica2**). La incidencia de animales ha iniciado un descenso tras tres años de incremento significativo. Las principales causas de este ascenso son, el incremento de la sensibilidad diagnóstica (elevado número de pruebas de gamma-interferón realizadas en rebaños infectados, formación para el diagnóstico, validación para los veterinarios de campo en 2012-2015 y el aumento de los controles oficiales sobre estos veterinarios) que está haciendo aflorar la infección residual, junto con el creciente papel como reservorio de la fauna silvestre en determinadas zonas.

En el año 2016 las CCAA con mayor prevalencia de rebaño son Andalucía con un 17,10 %, seguida de Extremadura con un 12,96%. Prácticamente nos encontramos con el mismo panorama cuando nos referimos al porcentaje de animales positivos en las distintas CCAA. Canarias mantuvo en 2016 la prevalencia cero y ha sido declarada como OTF a principios de 2017. En el caso de Baleares la prevalencia se sitúa en cero (**Tabla1**).

El número de casos de tuberculosis humana debidos a *M. bovis/caprae* de acuerdo con el Informe Comunitario de Fuentes y Tendencias de Zoonosis (casos confirmados) fue de 30 en 2013, 39 en 2014 y 42 en 2015 [17].

2. Género *Mycobacterium*.

En el género *Mycobacterium* se encuentran descritas bacterias saprofitas, patógenos oportunistas y patógenos estrictos del hombre y de los animales. Las principales características que comparten todos los miembros de este género son su forma bacilar, la inmovilidad, su imposibilidad para formar esporas, su dependencia de oxígeno y la ácido-alcohol resistencia.

Se han elaborado numerosas clasificaciones a lo largo de los años basándose en sus características fenotípicas, en su patogenicidad y más recientemente en los genotipos. La clasificación más práctica e intuitiva, es aquella que divide a las micobacterias en no

cultivables o difícilmente cultivables y cultivables. Dentro de estas últimas se subdividen en micobacterias de crecimiento rápido (colonias visibles en cultivos sólidos en menos de 7 días) y las de crecimiento lento (tardan más de 7 días).

Dentro de las micobacterias de crecimiento rápido encontramos la mayoría de las especies saprofitas de vida libre, ampliamente distribuidas en el medio ambiente. En el grupo de micobacterias de crecimiento lento están encuadradas todas aquellas que tienen mayor importancia en Salud Pública y en Medicina Veterinaria. Dentro de este grupo se encuentran el Complejo *Mycobacterium tuberculosis* que incluyen las especies causantes de TB en mamíferos y el Complejo *Mycobacterium avium*, que también puede producir infecciones en hombres y animales.

El Complejo *Mycobacterium tuberculosis* (CMTB), se caracteriza por una similitud entre sus miembros del 99,9 % a nivel de nucleótidos, lo que les hace poseer secuencias de ARNr 16S prácticamente idénticas [18]. Este complejo está formado por los siguientes miembros: *M. tuberculosis* [19], *M. bovis* [20], *M. bovis* BCG (bacilo Calmette-Guérin [21]), *M. africanum* [22], *M. microti* [23], *M. canettii* [24], *M. caprae* [25] y *M. pinnipedii* [26]. Además, también se incluyen en el complejo, el *Dassie bacillus* [27] y el *Oryx bacillus* [28].

3. Aspecto zoonótico de la TBb.

El principal agente que provoca la TB en los seres humanos es *M. tuberculosis*, aunque esta enfermedad también se desarrolle por agentes como *M. bovis* y *M. caprae*, siendo *M. bovis*, la segunda causa más común de TB en personas. En los bovinos también podemos encontrar casos de TBb generados por *M. tuberculosis*, aunque el principal agente que provoca esta enfermedad en es *M. bovis*. Sin embargo, es más frecuente encontrar *M. bovis* en seres humanos que *M. tuberculosis* en bovinos [29].

Actualmente, los casos de infección por *M. bovis* en humanos son menos frecuentes debido a la instauración de procesos como la pasteurización de la leche y los productos lácteos [30]. También han contribuido a esta disminución de la enfermedad, las campañas y programas de control y erradicación de TBb en los animales objeto de estas campañas.

Esta zoonosis presenta un marcado riesgo ocupacional, ya que las personas que mantienen un estrecho contacto con el ganado o la fauna silvestre, como pueden ser los ganaderos, el personal de mataderos, los veterinarios, los cazadores y los gestores cinegéticos se encuentran especialmente expuestos a ella [31].

La caracterización molecular ha contribuido a avanzar en el conocimiento de las relaciones epidemiológicas entre las infecciones animales y humanas, sin embargo, el intercambio de información ha sido bastante precario durante un largo tiempo debido a la falta de estrategias comunes entre los servicios de Salud Pública y los Servicios Veterinarios. La situación ha mejorado en los últimos años y ahora es generalmente aceptado que el control de las zoonosis beneficia tanto a los seres humanos como a los animales [32].

4. Diagnóstico de la TBb en el ganado doméstico.

A. Diagnóstico “in vivo”.

En la actualidad el diagnóstico “*in vivo*” o “*ante mortem*” de la TBb se realiza principalmente a través de pruebas que se basan en la respuesta de base celular (CMI) mediada por linfocitos T. Este tipo de respuesta es la de mayor importancia en el diagnóstico de la TBb y la que se establece con mayor intensidad en las primeras fases de la enfermedad [33]. Además de la respuesta celular, existe una respuesta de tipo humoral en fases más avanzadas de la infección, en la que se basan pruebas como el diagnóstico serológico, donde se detectan anticuerpos frente a miembros del CMTB. Actualmente

este tipo de diagnóstico está menos desarrollado que los que se basan en la respuesta de tipo celular y no se emplean de forma rutinaria en el Diagnóstico Oficial de la TBb.

Las técnicas de diagnóstico de base celular que se utilizan actualmente en el diagnóstico de la TBb son la técnica de intradermotuberculinización (IDTB) y la detección de IFN-gamma específico.

La IDTB se aplica de manera rutinaria para el diagnóstico de campo de la TBb en los animales domésticos desde hace prácticamente un siglo [30]; siendo la prueba oficial en el Programa Nacional de Erradicación de la Tuberculosis Bovina.

El IFN-gamma específico es una técnica *in vitro*, que se emplea de forma paralela con la IDTB para incrementar la sensibilidad y así detectar el máximo número de animales infectados por TBb [34]. En la actualidad es considerada por la Unión Europea como la prueba oficial complementaria para el diagnóstico de la TBb [16].

B. Diagnóstico “post-mortem”.

Aunque se utilicen otros métodos alternativos para diagnosticar la enfermedad en el ganado doméstico, la prueba de referencia o “gold standard” para la confirmación de la infección por uno de los miembros del CMTB, sigue siendo la detección directa de la bacteria por examen bacteriológico. Que consiste en la demostración de la presencia de bacilos ácido-alcohol resistentes a través de tinción específica de Ziehl-Neelsen y examen microscópico, seguido del aislamiento de la micobacteria en medios de cultivos selectivos y su posterior identificación por pruebas bioquímicas o técnicas de ADN, tales como la PCR.

A pesar de ser la prueba de referencia la detección de micobacterias en medios selectivos, el tiempo de diagnóstico es bastante amplio para la confirmación de la presencia de micobacterias en la muestra analizada. Por tanto, cuando la situación epidemiológica lo

requiera, a efecto de investigación se utilizan otras técnicas de diagnóstico: PCR sobre tejidos infectados, estudios histológicos y anatomo-patológicos con el objetivo de efectuar el diagnóstico etiológico de la enfermedad de una forma temprana [35].

III. OBJETIVO.

El objetivo de este trabajo es comparar la eficacia de diferentes métodos laboratoriales utilizados para confirmar las infecciones por *M. bovis*, con la finalidad de diseñar un protocolo confirmatorio que en el menor tiempo posible ofrezca coeficientes de sensibilidad y especificidad óptimos.

IV. MATERIAL Y MÉTODO.

Las 176 muestras que hemos utilizado para el experimento han sido obtenidas durante los meses de febrero y marzo de 2015 a partir de bovinos sacrificados en mataderos que resultan positivos en pruebas oficiales en las Campañas de Saneamiento Ganadero en Extremadura. Éstas proceden del Laboratorio Regional de Sanidad Animal de Badajoz y del Laboratorio Provincial de Sanidad Animal de Cáceres, que han sido transportadas a temperatura de refrigeración al Laboratorio de Patología Infecciosa de la Facultad de Veterinaria de Cáceres, para la confirmación de la infección por uno de los miembros del CMTB por tres técnicas en paralelo.

1. Aislamiento mediante descontaminación y cultivo (medio sólido y medio líquido). Identificación molecular por PCR convencional.

Las muestras para el cultivo bacteriológico proceden de linfonodos con lesiones visibles compatibles con tuberculosis (LVTB) y lesiones no visibles compatibles con tuberculosis (LNVTB), estos linfonodos son fundamentalmente los linfonodos submandibulares, retrofaríngeos, traqueobronquiales, mediastínicos y mesentéricos (**Imagen1**). También son muestras de elección los órganos parenquimatosos como el pulmón, el hígado o el

bazo, así como cualquier tejido que presentan lesiones macroscópicas. Pero en nuestra prueba, sólo hemos seleccionado muestras de linfonodos de bovinos.

El protocolo para el procesado de este tipo de muestras está establecido en España en el “Manual de procedimientos para toma y envío de muestras para el cultivo microbiológico de tuberculosis” [36], que se basa en la Directiva 64/432/ECC y sus modificaciones.

Las muestras seleccionadas para el cultivo son diseccionadas eliminando el tejido conectivo y la grasa en el interior de una cabina de seguridad microbiológica (Faster BH-EN 2004). A continuación, son troceados 2 gr de muestra y suspendidos en una solución de 5 ml de albúmina sérica bovina al 0,2% en una bolsa de “stomacher” para su homogeneización mecánica durante 4 minutos. En (Smasher, AES Laboratories, Montreal, QC, Canadá)

El siguiente paso es la descontaminación de las muestras, ya que los linfonodos actúan como órganos “filtro”, en los que puede haber concentrado una gran variedad de otros agentes microbianos, y debido al lento crecimiento de las micobacterias, esta medida es indispensable para evitar que otros contaminantes de crecimiento más rápido dificulten el aislamiento de aquellas. El descontaminante utilizado es N-acetil-L-cisteína-hidróxido sódico (BBL MycoPrep, BD).

A continuación, la mezcla se agita durante 15 minutos a temperatura ambiente, se lava con una solución de Tampón fosfato (BBL MycoPrep, BD) y se centrifuga a 5300 r.p.m.. Finalmente se descarta parte del sobrenadante hasta quedarnos con unos 2 ml de muestra para proceder a su cultivo en Middlebrook 7H9 modificado (BD BBL MGIT, Becton and Dickinson, USA) incubándose de forma automatizada en BACTEC MGIT 960 (Becton Dickinson Inc.) [37] en un período que puede ir entre 42 y 56 días (**Imagen2**) y

Löwenstein-Jensen (Conda-Pronidasa, Madrid, España) incubándose en una estufa a 37°C de ocho a 12 semanas (**Imagen3**).

El aislamiento microbiológico obtenido tras el cultivo de las muestras se sometió a una extracción de ADN. En el caso del cultivo sólido se seleccionan una o dos colonias sospechosas de ser micobacterias pertenecientes al CMTB y se suspenden en 200 microlitros de agua ultrapura estéril. Esta suspensión se inactiva durante 15 minutos a 100°C.

Para el cultivo líquido se recogen 1,5 ml de medio líquido con crecimiento de micobacterias pertenecientes al CMTB y se centrifuga a 12000 g durante 10 minutos. Se descarta el sobrenadante y se resuspende el sedimento en un mililitro de agua ultrapura estéril. Se vuelve a centrifugar y retirar el sobrenadante, a continuación, se resuspende en 100 microlitros de agua ultrapura estéril y se inactiva durante 15 minutos a 100°C.

Finalmente se ha realizado una identificación molecular de los aislados mediante PCR específica [38, 39], cuyo objetivo es detectar y diferenciar entre nivel de género y los miembros del CMTB. Este tipo de PCR consta de un conjunto de cebadores dentro de una única mezcla (MYCGEN-F (AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG), MYCGEN-R (TGC ACA CAG GCC ACA AGG GA), TB-F (GAA CAA TCC GGA GTT GAC AA) y TB-R (AGC ACG CTG TCA ATC ATG TA)) para producir amplificadores. Los dos primeros (MYCGEN-F y MYCGEN-R) que codifican la subunidad 16S (ARNr), amplifican un fragmento de 1030 pb específico para el género *Mycobacterium* y los dos segundos (TB-F y TB-R) que codifican el gen mpb70 amplifican un fragmento de 372 pb específico para los distintos miembros del CMTB.

La visualización del ADN amplificado se realiza a través de una electroforesis. Para ello es necesario la formación de un gel de agarosa al 1,5% (1,5 g de agarosa (Agarosa MS-8,

Conda) por cada 100 ml de TBE (0,89 M pH 8.3 Tris Borate + 20MM Na₂ EDTA) (TBE 10x Ultrapure Buffer Concentrate, Conda)), el cual, es teñido con 5 microlitros de Midori Green Advance (Genetics) por cada 100 mililitros de este. El gel se carga con las muestras, un control positivo (H37Rv), un control negativo y un marcador de pesos moleculares (Smart Ladder 1000 lanes, Eurogentec); se somete a una intensidad de 130 v durante 45 minutos. Finalizada la electroforesis, se observa el gel con la ayuda de una lámpara de luz ultravioleta y se comprueba la presencia o ausencia de bandeo.

2. Extracción de ADN de tejidos. Identificación molecular por RTPCR.

Para llevar a cabo la determinación de *Mycobacterium* spp. hemos utilizado muestras procedentes de linfonodos con (LVTB y LNVTB) de los mismos animales muestreados para las técnicas anteriores.

Para la detección de *M. bovis* en linfonodos utilizamos un ensayo PCR a tiempo real específico frente a este patógeno, [40] que nos permitió a su vez cuantificar la cantidad de microorganismo existente en la muestra. Para este ensayo hemos utilizado como “muestras problema” el ADN previamente extraído de 30 mg de los linfonodos de cada animal con el Kit comercial (E.Z.N.A. Tissue DNA Kit – OMEGA bio-tek) siguiendo las instrucciones del fabricante. La cuantificación de *M. bovis* se realizó mediante un ensayo de cuantificación absoluta en base a una curva patrón, que fue calibrada utilizando diferentes diluciones de la secuencia a amplificar con la PCR, siguiendo los procedimientos habituales.

V. RESULTADOS.

1. Porcentajes de positivos y negativos en cada una de las técnicas utilizadas.

Tabla 1

	Cultivo MS	Cultivo ML	RTPCR
% positivos	30,7 %	44,9 %	52,3 %
% negativos	69,3 %	55,1 %	47,7 %

En la tabla número 1 se observa que, de las técnicas empleadas, la RTPCR es la que presenta mayor porcentaje de muestras donde se detectan micobacterias que pertenecen al CMTB. Sin embargo, en el Cultivo MS nos encontramos con el caso contrario, es donde hay menor porcentaje de aislados.

2. Sensibilidad y Especificidad para el Cultivo ML y RTPCR con respecto al Cultivo MS.

Tabla MS Vs ML

Tabla 2

	MS (+)	MS (-)
ML (+)	54	25
ML (-)	0	97

Sensibilidad Cultivo ML: 100%

Especificidad Cultivo ML: 79,50%

La tabla número 2 presenta unos valores obtenidos a partir del análisis de resultado de las muestras por Cultivo ML y Cultivo MS, observando que la sensibilidad del Cultivo ML con respecto al Cultivo MS es de un 100%. Sin embargo, la especificidad es de un 79,50%.

Tabla MS Vs qPCR:

Tabla 3

	MS (+)	MS (-)
qPCR (+)	53	39
qPCR (-)	1	83

Sensibilidad qPCR: 98%

Especificidad qPCR: 68,03%

La tabla número 3 presenta unos valores obtenidos a partir del análisis de resultado de las muestras por RTPCR y Cultivo MS, observando que la sensibilidad de la RTPCR con respecto al Cultivo MS es de un 98%. Sin embargo, la especificidad es de un 68,03%.

3. Fuerza de la concordancia entre las distintas técnicas empleadas para el aislamiento de micobacterias pertenecientes al CMTB descrita a través del Índice Kappa.

$$\kappa = \frac{\sum \pi_{ii} - \sum \pi_{i.} \sum \pi_{.i}}{1 - \sum \pi_{i.} \pi_{.i}}$$

Tabla 4

	Índice Kappa	Fuerza de la concordancia
MS Vs ML	0,704221564936811	Buena
MS Vs qPCR	0,553299492385787	Moderada
qPCR Vs ML	0,762467866323908	Buena

En la tabla número 4 se aprecia que, según el Índice Kappa, la Fuerza de la concordancia entre Cultivo MS y Cultivo ML y; RTPCR y Cultivo ML es buena. Sin embargo, la Fuerza de la concordancia entre Cultivo MS y RTPCR es moderada.

4. Número promedio de días que se necesitan para la confirmación de micobacterias pertenecientes al CMTB en la muestra con las distintas técnicas empleadas.

$$\bar{X} = \frac{\sum fiXi}{n}$$

Tabla 5

	PROMEDIO DÍAS
RTPCR	1
Cultivo ML	17
Cultivo MS	40

La tabla 5 nos muestra como la técnica que menor tiempo necesita para la confirmación de la presencia de micobacterias es la RTPCR. Sin embargo, el Cultivo MS es la técnica que más tiempo necesita para la confirmación.

VI. DISCUSIÓN Y CONCLUSIÓN.

En nuestro estudio hemos utilizado 3 técnicas para confirmar la presencia de micobacterias que pertenecen al CMTB. Para la confirmación de cualquier agente capaz de producir una enfermedad, lo más adecuado es utilizar técnicas con una alta especificidad, ya que nos interesa discernir si el animal sujeto a una prueba anterior de

cribado que ha dado resultado positivo a la enfermedad realmente padece esa enfermedad [41].

Partiendo que el “gold estándar” hasta hace relativamente poco tiempo para la confirmación de la Tuberculosis Bovina y Caprina en España y concretamente en Extremadura ha sido el Cultivo MS, nos planteamos si fuera útil introducir otro tipo de pruebas diagnósticas como el Cultivo ML y RTPCR.

Al calcular la sensibilidad y especificidad de estas dos pruebas alternativas con respecto al Cultivo MS, parece que tanto el Cultivo ML como la RTPCR carecen de la especificidad suficiente para ser utilizadas como pruebas confirmatorias y que, por lo tanto, no deberían usarse para confirmar infecciones por bacterias del CMTB (no se garantiza que el animal cuando se le diagnostique positivo a la enfermedad realmente lo sea).

Sin embargo, teniendo en cuenta que los positivos en Cultivo ML han sido confirmados por técnicas moleculares y que existe una buena concordancia (de hecho, el mejor coeficiente Kappa) entre la RTPCR y el Cultivo ML; es posible que lo que esté ocurriendo realmente es que estas pruebas sean más sensibles que el Cultivo MS y por consiguiente sean más adecuadas, ya que presentan mayor sensibilidad y un tiempo de diagnóstico bastante menor (Tabla 5). Sin embargo, para comprobar esta hipótesis será necesario, realizar más estudios en un futuro.

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.

- [1] **Hayman J.** Mycobacterium ulcerans: an infection from Jurassic time? Lancet. 1984;2(8410): 1015-1016.
- [2] **Sauret Valet J.** La tuberculosis a través de la historia. Madrid: Rayma S.L.; 1990.
- [3] **Báguena M J.** La tuberculosis y su historia. Barcelona: Fundación Uriach 1838, D.L.; 1992.
- [4] **Barberis I,** Bragazzi N L., Galluzzo L., Martini M. The history of tuberculosis: from the first historical records to the isolation of Koch's bacillus. J Prev Med Hyg. 2017; 58: E9-E12.
- [5] **Caminero Luna JA.** Breves reseñas históricas sobre la tuberculosis. En: Guía de la Tuberculosis para Médicos Especialistas. París: Unión Internacional Contra la Tuberculosis y Enfermedades Respiratorias (UICTER); 2003.p.17-24.
- [6] **Ziehl F.** Zur Färbung des Tuberkelbacillum. Deutsche Medizinische Wochenschrift. 1882; 8: 451-453.
- [7] **Neelsen F.** Ein casuistischer Beitrag zur Lehre von der Tuberkulose. Centrabl Med Wissenschaften. 1883; 28: 497-501.
- [8] **Pirquet von Cesenatico.** Der diagnostischer Wert der Kutaneu Tuberkulin reaction bei der Tuberkulose des kinds salters auf Grund von 100 Sektion. Wien Klin. 1907; 20: 1123-1128.
- [9] **Mantoux C.** L'intradermo-réaction à la tuberculina et son interprétation clinique. Presse Medicale. 1910; 18: 10-13.

- [10] **Daniel TM.** The origins and precolonial epidemiology of tuberculosis in the Americas: can we figure them out?. *Int J Tuberc Lung Dis.* 2000; 4(5): 395-400.
- [11] **Comas I.,** Gagneux S. The Past and Future of Tuberculosis Research. *PLoS Pathog.* 2009; 5(10): e1000600.
- [12] **Keshavjee S.,** Farmer PE. Tuberculosis, drug resistance, and the history of modern medicine. *N Engl J Med.* 2012; 367(10):931-6.
- [13] **Dye C.,** Williams BG. Eliminating human tuberculosis in the twenty-first century. *J R Soc Interface.* 2008;5(23):653-62.
- [14] **Martín-Atance P.,** León-Vizcaíno L. La tuberculosis: introducción a la enfermedad. *Galemys.* 1998; 10(2):36-37.
- [15] **Aranaz A.,** Llebana E., Mateos A. Spoligotyping of *Mycobacterium bovis* strains from cattle and other animals: a tool for epidemiology of tuberculosis. *Clin Microbiol.* 1996; 34:2734-2740.
- [16] **Unión Europea.** Eur-Lex (Derecho de la Unión Europea, D.O.U.E.) [internet]. <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/ES/TXT/?uri=celex:31964L0432>.
- [17] **MAPAMA** Ministerio de Agricultura y Pesca, Alimentación y Medio Ambiente. Informe final técnico Programa Nacional de Tuberculosis Bovina año 2016. [Consultado el 20 de julio de 2018] Disponible en: https://www.mapama.gob.es/es/ganaderia/temas/sanidad-animal-higiene-ganadera/informe_final_tecnico_tb_2016_2_tcm30-421636.pdf
- [18] **Huard RC.,** Fabre M., de Haas P., Lazzarini LCO., Van Soolingen D., Cousins D., Ho JL. Novel Genetic Polymorphisms That Further Delineate the Phylogeny of the *Mycobacterium tuberculosis* Complex. *J. Bacteriol.* 2006; 188:4271-4287.

- [19] **Koch R.** Die Aetiologie der Tuberculose. Berliner Klinische Wochenschrift.1882; 19:221-230.
- [20] **Karlson AG.,** Lessel EF. *Mycobacterium bovis* nom. Nov. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology.1970; 20: 273-282.
- [21] **Grange JM.,** Gibson J., Osborn TW., Collins CH., Yates MD. What is BCG?. Tubercle. 1983; 64:129-139.
- [22] **Castets M.,** Rist N., Boisvert H. Le variété africaine du bacille tuberculeux. Medicine de l'Afrique Noire. 1969; 16:321.
- [23] **Reed GB.** Genus *Mycobacterium* (species affecting warm-blooded animals except those causing leprosy). En: Murray EGD., Breed S., Smith NR. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology.1957.
- [24] **Van Soolingen D.,** Hoogenboezem T., de Haas PE., Hermans PW., Koedam MA., Teppema KS., Brennan PJ., Besra GS., Portaels F., Top J., Schouls LM., Van Embden JDA. A novel pathogenic taxon of the Mycobacterium tuberculosis complex, Canetti: characterization of an exceptional isolate from Africa. Int. J. Syst. Bacteriol.1997; 47: 1236–1245.
- [25] **Aranaz A.,** Cousins D., Mateos A., Domínguez L. Elevation of Mycobacterium tuberculosis subsp. caprae Aranaz et al. 1999 to species rank as Mycobacterium caprae comb. nov., sp. nov. Int J Syst Evol Microbiol. 2003; 53(Pt 6):1785-9.
- [26] **Cousins DV.,** Bastida R., Cataldi A., Quse V., Redrobe S., Dow S., Duignan P., Murray A., Dupont C., Ahmed N., Collins DM., Butler WR., Dawson D., Rodríguez D., Loureiro J., Romano MI., Alito A., Zumarraga M., Bernardelli A. Tuberculosis in

seals caused by a novel member of the *Mycobacterium tuberculosis* complex: *Mycobacterium pinnipedii* sp. nov. Int J Syst Evol Microbiol. 2003; 53(Pt 5):1305-14.

[27] **Wagner JC.**, Buchanan G., Bokkenheuser V., Levisseur S. An acid-fast bacillus isolated from the lungs of the Cape hyrax, *Procavia capensis* (Pallas). Nature, 1958;181:284–285.

[28] **Lomme JR.**, Thoen CO., Himes EM., Vinson JW., King RE. *Mycobacterium tuberculosis* infection in two East African oryxes. J. Am. Vet. Med. Assoc. 1976; 169:912-914.

[29] **Pérez-Guerrero L**, Milián-Suazo F, Arriaga-Díaz C, Romero-Torres C, Escartín-Chávez M. Epidemiología molecular de las tuberculosis bovina y humana en una zona endémica de Querétaro, México. Salud pública Méx [Internet]. 2008 [citado 26 de agosto de 2018]; 50(4):286-291.en:http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S003636342008000400006

[30] **De la Rua-Domenech R.** Human *Mycobacterium bovis* infection in the United Kingdom: incidence, risks, control measures and review of the zoonotic aspects of bovine tuberculosis. Tuberc Edinb Scotl. 2006; 86:77–109.

[31] **Gutierrez M**, Samper S, Jimenez MS., van Embden JD, Marin JF, Martin C. Identification by spoligotyping of a caprine genotype in *Mycobacterium bovis* strains causing human tuberculosis. J Clin Microbiol. 1997; 35:3328–30.

[32] **Zinsstag J**, Schelling E, Roth F, Bonfoh B, De Savigny D, Tanner M. Human benefits of animal interventions for zoonosis control. Emerg Infect Dis. 2007;13(4):527-531.

- [33] **Pollock JM**, Rodgers JD, Welsh MD, McNair J. Pathogenesis of bovine tuberculosis: the role of experimental models of infection. *Vet Microbiol.* 2006; 112:141–150.
- [34] **Álvarez J**, de Juan L, Bezos J, Romero B, Sáez JL, Gordejo FJR, Reviriego Gordejo FJ, Briones V, Moreno MA, Mateos A, Dominguez L, Aranaz A. Interference of paratuberculosis with the diagnosis of tuberculosis in a goat flock with a natural mixed infection. *Vet Microbiol* 2008;128(1-2):72–80.
- [35] **MAPAMA** Ministerio de Agricultura y Pesca, Alimentación y Medio Ambiente. Programa Nacional de Erradicación de Tuberculosis Bovina presentado por España para el año 2018.[Consultado el 20 de julio de 2018] Disponible en: https://www.mapama.gob.es/es/ganaderia/temas/sanidad-animal-higiene-ganadera/pnetb_2018_tcm30-436761.pdf
- [36] **Centro de Vigilancia Sanitaria Veterinaria (VISAVET)**. UCM. y Subdirección General de Sanidad e Higiene Animal y Trazabilidad. MAPAMA. Manual de procedimientos para toma y envío de muestras para el cultivo microbiológico de tuberculosis. [s.L.]: VISAVET, MAPAMA; 2017.
- [37] **Hines N**, Payeur JB, Hoffman LJ. Comparison of the recovery of *Mycobacterium bovis* isolates using the BACTEC MGIT 960 system, BACTEC 460 system, and Middlebrook 7H10 and 7H11 solid media. *J. Vet. Diagn. Invest.* 2006.18, 243–250.
- [38] **Wilton S**, Cousins D. Detection and identification of multiple mycobacterial pathogens by DNA amplification in a single tube. *Genome Res.* 1992;1: 269–273.
- [39] **Liébana E**, Aranaz A, Francis B, Cousins D. Assessment of genetic markers for species differentiation within the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *J Clin Microbiol* 1996;34: 933–938.

[40] **Sweeney FP**, Courtenay O, Hibberd V, Hewinson RG, Reilly LA, Gaze WH, Wellington EMH. Environmental monitoring of *Mycobacterium bovis* in badger feces and badger sett soil by real-time PCR, as confirmed by immunofluorescence, immunocapture, and cultivation. *Appl Environ Microbiol.* 2007; 73: 7471-7473.

[41] **Escrig Sos J**, Martínez Ramos D y Miralles Tena JM. Pruebas diagnósticas: nociones básicas para su correcta interpretación y uso. *Cir Esp.* 2006;79(5):267-73.

ANEXO I

Abreviaturas:

A: adenina

a.C.: antes de Cristo

ADN: ácido desoxirribonucleico

ARN: ácido ribonucleico ribosómico

BCG: bacilo *Calmette-Guérin*

C: citosina

CCAA: Comunidades Autónomas

CMI: inmunidad mediada por células (*Cell Mediated Immunity*)

CMTB: complejo *Mycobacterium tuberculosis*

Cultivo ML: cultivo en medio líquido

Cultivo MS: cultivo en medio sólido

EDTA: ácido etilendiaminotetraacético

G: guanina

IDTB: Intradermotuberculinización

IFN-gamma: interferón-gamma

LNVTB: lesiones no visibles compatibles con tuberculosis

LVTB: lesiones visibles compatibles con tuberculosis

MAPAMA: Ministerio de Agricultura y Pesca, Alimentación y Medio Ambiente

ML: medio líquido

MS: medio sólido

OMS: Organización Mundial de la Salud

OTF: oficialmente libre de tuberculosis

pb: pares de bases

PCR: reacción en cadena de la polimerasa (*Polymerase Chain Reaction*)

r.p.m.: revoluciones por minuto

RTPCR: reacción en cadena de la polimerasa a tiempo real (*Real Time Polymerase Chain Reaction*)

T: timina

TB: tuberculosis

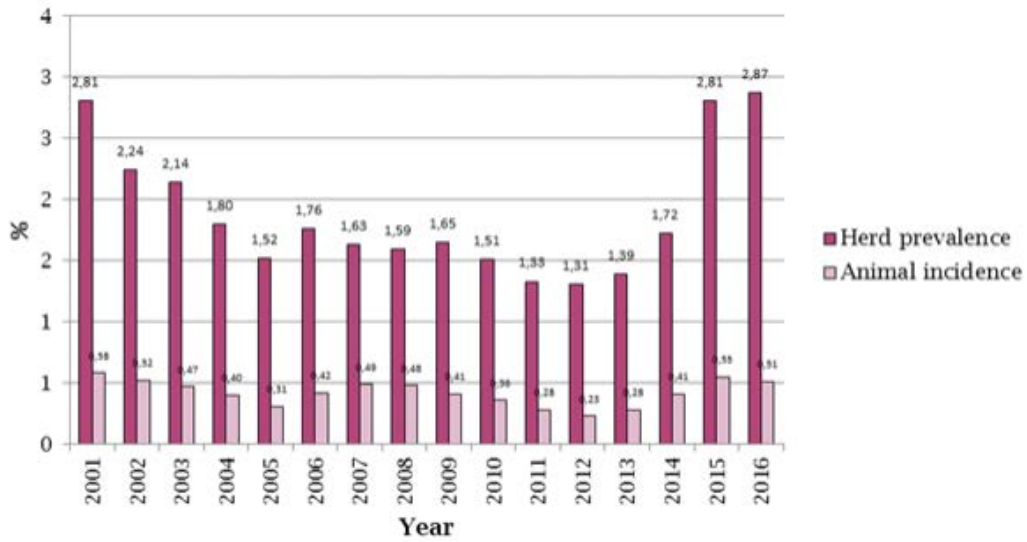
TBb: tuberculosis bovina

TBE: Tris-borato-EDTA

VIH: virus de la inmunodeficiencia humana

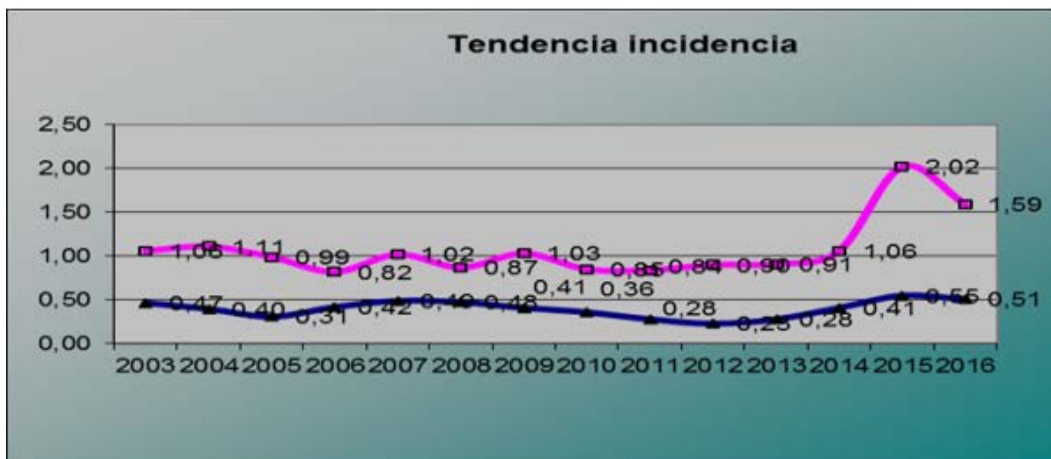
ANEXO II

Gráfica 1:



Fuente: MAPAMA

Gráfica 2:



Fuente: MAPAMA

Tabla 1:

CCAA	PREVALENCIA DE REBAÑO														
	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014	2015	2016
ANDALUCÍA	9,65	8,47	6,73	5,32	5,76	4,15	5,80	8,94	8,54	6,16	5,69	5,94	11,51	17,24	17,10
ARAGÓN	3,14	2,75	2,03	1,56	1,96	3,65	0,75	0,70	1,22	1,62	1,38	0,71	0,58	0,81	0,60
ASTURIAS	0,32	0,22	0,24	0,18	0,17	0,24	0,22	0,21	0,18	0,14	0,19	0,20	0,21	0,28	0,17
BALEARES	0,92	1,02	0,65	0,65	0,22	0,21	0,00	0,00	0,17	0,00	0,40	0,60	0,41	0,60	0,00
CANARIAS	0,34	1,05	2,40	1,00	0,36	0,37	0,24	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
CANTABRIA	1,00	1,34	1,41	1,16	1,05	2,25	1,57	0,91	0,79	0,74	0,89	0,88	0,70	1,38	0,83
CASTILLA LA MANCHA	7,69	3,36	7,19	7,02	7,71	9,51	11,62	10,27	7,11	5,35	3,54	3,33	7,21	7,63	7,84
CASTILLA Y LEÓN	5,10	5,66	3,78	3,37	5,11	4,16	3,71	2,75	2,62	2,57	2,66	2,88	2,22	1,93	1,87
CATALUNYA	1,93	1,74	1,78	1,70	1,65	1,08	0,85	0,83	0,59	0,81	0,25	0,04	0,16	0,32	0,30
EXTREMADURA	7,45	5,95	5,57	4,05	4,84	3,74	3,37	3,78	3,04	3,11	3,29	4,53	4,62	12,23	12,96
GALICIA	0,52	0,43	0,46	0,31	0,20	0,19	0,11	0,22	0,28	0,19	0,21	0,12	0,11	0,08	0,05
LA RIOJA	2,05	2,70	2,76	1,31	0,72	0,70	1,45	0,75	1,14	0,38	0,36	0,37	0,72	2,81	3,86
MADRID	3,69	3,92	1,99	2,58	2,59	3,41	5,72	5,54	5,45	7,22	6,13	4,51	3,55	3,86	3,04
MURCIA	5,79	1,48	7,59	4,46	4,95	8,05	3,29	3,51	1,59	0,33	1,40	1,84	0,94	1,66	2,90
NAVARRA	0,52	0,82	0,36	0,38	0,27	0,33	0,40	0,30	0,67	0,65	0,30	0,66	0,67	0,50	0,64
PAÍS VASCO	0,06	0,17	0,22	0,64	0,19	0,14	0,20	0,57	0,37	0,33	0,25	0,17	0,25	0,16	0,17
VALENCIA	12,47	5,56	2,63	2,16	1,61	1,14	1,41	1,38	3,84	1,94	1,55	2,88	3,06	2,73	1,99
TOTAL	2,24	2,14	1,80	1,52	1,76	1,63	1,59	1,65	1,51	1,33	1,31	1,39	1,72	2,81	2,87

Fuente: MAPAMA

Imagen 1:



Fuente: Red de Recursos Faunísticos

Imagen 2:



Imagen 3:

