



Determination of the presence of *M. bovis* in bovine tissue samples by RT-PCR

Determinación de la presencia de *M. bovis* en muestras de tejido bovino mediante RT-PCR

Víctor Andrés Vázquez-Nolasco*¹, Germinal Jorge Cantó-Alarcon¹, Feliciano Milián-Suazo¹,

¹Universidad Autónoma de Querétaro.

e-mail: vazqueznolasco@gmail.com*

<https://doi.org/10.29267/mxjb.2016.1.2.76>

ABSTRACT

Validation of the proof of RT-PCR to diagnose bovine tuberculosis caused by *M. bovis* was carried out. Doing the comparison against the results obtained previously by means of crop in half Stonebrink^R. The aim was to evaluate the sensitivity and specificity of the proof and verify if this awards a greater proportion of true negative and true positive when diagnosing said illness unlike the proof of gold. 100 bovine (*M. bovis*) positive fabrics and 10 negative samples (*M. bovis*) were used; direct extraction of DNA by the method of CTAB was done. The protocol of RT-PCR and the oligonucleótidos reported by the United States Department of Agriculture (USDA) were used. Data were analyzed using the program EPIDAT 3.1. The results obtained had a sensitivity of 92% and a specificity of 100%, in an approximately 48 hours, DNA concentration was lower than 50 ng/μL.

Keywords: direct extraction, *M. bovis*, RT-PCR, gold standard, sensitivity and specificity .

RESUMEN

Se realizó la validación de la prueba de RT-PCR para diagnosticar tuberculosis bovina causada por *M. bovis*. Haciendo la comparación contra los resultados obtenidos previamente mediante cultivo en medio Stonebrink^R. Con el fin de evaluar la sensibilidad y especificidad de la prueba y verificar si esta otorga una mayor proporción de verdaderos negativos y verdaderos positivos al diagnosticar dicha enfermedad a diferencia de la prueba de oro. Se usaron 100 tejidos bovinos positivos a *M. bovis* y 10 muestras negativas al mismo, se realizó extracción directa de ADN por el método de CTAB. Se realizó el protocolo de RT-PCR y los oligonucleótidos empleados y reportados por la United States Department of Agriculture (USDA). Los datos fueron procesados en el programa EPIDAT 3.1. Los resultados obtenidos fueron una sensibilidad del 92% y una especificidad del 100%, en un tiempo aproximado de 48 horas, detectando cantidades menores de 50 ng/μL de DNA.

Palabras clave: extracción directa, *M. bovis*, PCR-TR, prueba de oro, sensibilidad y especificidad.

1. INTRODUCCIÓN

El término tuberculosis se utiliza para las enfermedades que son causadas exclusivamente por agentes del complejo mycobacterium tuberculosis (*M. tuberculosis*; *M. bovis*; *M. africanum*; *M. microti*). Se conoce como “tuberculosis zoonótica” o “tuberculosis bovina” a la enfermedad causada por *M. bovis* en el ser humano y el ganado, respectivamente (Abaloss y Retamál, 2005).

En la actualidad la importancia de la tuberculosis bovina en México radica en que representa un riesgo para la salud pública y esta se ha convertido en una barrera no arancelaria para el comercio internacional (Biet et al., 2005; de Kantor y Ritacco, 2006). De igual manera provoca cuantiosas pérdidas económicas en el sector ganadero. (O'Reilly y Daborn, 1995). Además, la participación de *M. bovis* en casos de tuberculosis humana en algunas regiones de México se ha estimado hasta en un 7 % (Pérez, 2008), mientras que en la zona fronteriza sur de los Estados Unidos la proporción llega al 40% (Rodwell, 2008).

En México, la norma de control y erradicación de la tuberculosis bovina, indica que el diagnóstico se realiza mediante las pruebas de tuberculina, histopatología y aislamiento bacteriológico (cultivo) e identificación, pero éstas presentan algunas limitantes de sensibilidad y especificidad (Cegielskiet al., 1997). La norma indica que un animal positivo a la prueba de tuberculina se conoce como reactor (NOM-031-ZOO-96).

El diagnóstico etiológico de la tuberculosis depende de la demostración microscópica de los bacilos alcohol ácido resistentes (BAAR) y de su aislamiento e identificación en medio de cultivo. Aunque la baciloscopia o tinción BAAR es un método de diagnóstico simple y relativamente rápido, presenta problemas en cuanto a su sensibilidad (33.9%), ya que son necesarias cantidades mayores de 10 000 bacilos / mL para su detección; así, casi dos terceras de los casos de TB activa puede tener baciloscopia negativa (Barrón et al., 2006). Las pruebas de cultivo de esputo son más sensibles 80 a 96%, la sensibilidad se disminuye si se trata de muestras con menor carga bacilar, tales como líquido cefalorraquídeo, orina o biopsias. El principal inconveniente de este método es el tiempo de incubación para la recuperación de este microorganismo, que puede demorar hasta 8 semanas (Barrón et al., 2006). La prueba de tuberculina es relativamente rápida, en comparación al cultivo, pero tiene una sensibilidad del 72,0% y presenta reacciones antigénicas cruzadas con bacterias atípicas (Liébana et al., 1994). A pesar de los grandes avances en los métodos de diagnóstico, la tuberculosis es todavía identificada por estos procedimientos, que todavía son considerados como estándar de oro en el diagnóstico de TB (Katoch, 2004).

Actualmente, las técnicas moleculares permiten la identificación de micobacterias a nivel de especie en aquellas muestras donde los métodos de cultivo y otras técnicas convencionales de detección son negativos (Barrón et al., 2006). Se está haciendo extensivo el uso de métodos de amplificación de genes, tanto para la identificación del bacilo tuberculoso a partir de cultivos y muestras clínicas para la detección molecular. Así,

tenemos la técnica de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), con gran sensibilidad, que en condiciones óptimas puede detectar de 1 a 10 microorganismos. Con los métodos de extracción de ADN disponibles, es posible ahora la identificación de micobacterias a partir de cualquier muestra biológica (Johansen et al., 2004).

El objetivo de este trabajo fue validar la prueba de RT-PCR comparando resultados previamente obtenidos en medio de cultivo Stonebrink^R, para obtener los parámetros de sensibilidad y especificidad de la prueba, para otorgar un diagnóstico rápido mediante la extracción directa de DNA de tejido bovino.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

Este experimento fue desarrollado en la Facultad de Ciencias Naturales de la Universidad Autónoma de Querétaro, en el Laboratorio de Salud Animal y Microbiología Animal, se evaluaron tejidos bovinos de linfonodos traqueobronquiales y mediastínicos en su mayoría colectados en 2009 de los estados de Jalisco (41%), Estado de México (47%), Querétaro (3%), Baja California (6%) y Coahuila (3%). Se analizaron 100 tejidos bovinos conservados a -20°C, el criterio de inclusión para proceder con la extracción de material genético fue: presentar lesiones adjudicarles a tuberculosis y tener un reporte de crecimiento positivo en medio de cultivo Stonebrink^R.

2.1. Muestreo de tejido

El tejido se manipulo usando pinzas sobre papel aluminio. Se examinó para determinar la presencia de lesiones, granulomas, o tubérculos. Se consideró la existencia de lesión y se cortaron 0.5 gr de la muestra lo más cerca posible del borde exterior (corteza), se cortó una lesión por muestra y se transfirió a tubos Eppendorf de 2 ml.

2.2. Extracción directa de ADN

Se tomaron 0.5 gr de tejido lesionado y se transfirió a un tubo Eppendorf de 2 ml. Posteriormente se adicionaron 400 µl de TE 1X y se homogenizó. Se agregaron 50 µl de lisozima (10mg/ml), finalmente se incubó a 37°C por 1 hora. A este resultado se le adicionaron 100 µl de SDS al 10% y 10 µl de Proteinasa K (10 mg/ml), se incubó a 65°C por 30 minutos. Después se agregaron 100 µl de NaCl 5M y se agito la mezcla. Posteriormente se agregaron 40 µl N acetil-N,N,N-bromuro de trimetilamonio al 10%, se homogenizó en vortex y se incubó a 65°C por 30 minutos. Se adicionaron 400 µl de fenol-cloroformo isoamílico 25:24:1 y se homogenizó en vortex por 10 segundos. Esta mezcla se centrifugó a 13000 rpm x 10 minutos y se tomaron 500 µl del sobrenadante para transferirlos a un nuevo tubo Eppendorf de 1.5 ml. A este tubo se le agregaron 500 µl de solución de cloroformo isoamílico y se agitó en vortex por 10 segundos, se centrifugó a 13000 rpm durante 10 minutos. Se tomaron 500 µl del sobrenadante y se transfirió a un tubo de 1.5 ml. Se agregaron 600 µl de solución de alcohol isopropílico, se almaceno a -20°C por 2 horas y se centrifugó a 13000 rpm durante 15 minutos. Para finalizar el proceso

se lavó la pastilla de ADN con 500 μ l de etanol y se centrifugó a 13000 rpm durante 10 segundos, se eliminó el líquido para acceder a la pastilla de ADN y este se empleó para el protocolo de PCR. El ADN obtenido se cuantificó con ayuda de un NanoDrop 2000™ a una absorbancia de 260/2680nm, para asegurar el protocolo y resultado de la prueba por PCR. Finalmente se hicieron alícuotas de DNA estandarizado a 50 ng/ μ l.

2.3 Preparación de la mezcla para la reacción de PCR-TR

El volumen de cada reacción fue de 20 μ l. Se tomaron 15 μ l de esta mezcla homogenizada para cada pozo, y se agregaron posteriormente 5 μ l del ADN extraído al pozo adecuado. Siempre se agregó un volumen a la esquina inferior derecha para el Control Positivo de *M. bovis*.

2.4 Volúmenes de reactivos para una preparación de PCR directo en tiempo real

Tabla 1. Volúmenes de reactivos para una preparación de PCR directo en tiempo real

Reactivos	Volumen (μ l)
2X Taqman PCR Master Mix (μ l)	10.00
20X L3NN Primer/Probe Mix (μ l)	1.00
FAM L3NN P Primer/Probe Mix (μ l)	1.00
Agua destilada (μ l)	3.00
Volumen Total de Master Mix (μ l):	15.00
Volumen de ADN a agregar (μ l):	5.00
Volumen Total de la Reacción (μ l):	20.00

2.5 Protocolo de PCR-TR

Se realizó la técnica de RT-PCR al ADN obtenido en muestras de tejido bovino utilizando un múltiplex de reactivos para PCR en tiempo real, como prueba que confirma la presencia de *Mycobacterium bovis*. Se utilizó el cebador y sonda diseñados por la USDA Locus 3 NN (L3NN) que genera una amplificación de 110 pares de bases (pb) sobre una proteína reguladora de la transcripción, reportado por fluorescencia en la reacción. Además se utilizaron controles negativos para validar la prueba: se utilizó ADN de *M. tuberculosis* (H37) obtenida del cepario interno del laboratorio de microbiología para así comprobar la capacidad que tienen los oligonucleótidos para diferenciar las muestras, se usaron tejidos con reportes negativos al crecimiento en cultivo para asegurar que el ADN extraído no

amplificara alguna otra región inespecífica; por último se analizó un blanco negativo que seguía el mismo proceso de la extracción, utilizando los mismos reactivos para la prueba de PCR de muestras positivas para asegurar que no existiera alguna contaminación cruzada.

El protocolo de termociclado se realizó de la siguiente manera; la etapa uno a 50°C durante 2 minutos por un ciclo; la etapa dos a 95°C durante 10 minutos por un ciclo; la etapa 3 primero se inició a 95°C por 15 minutos y termino a 60°C durante un minutos por 40 ciclos.

2.6. Validación de la prueba de PCR

Para medir la sensibilidad de la prueba se ordenaran los resultados de forma dicotómica, es decir positivos y negativos, relacionando los positivos con la existencia de la enfermedad, para realizar la comparación, se ordenaron los resultados en una tabla cursada de 2x2 en la que se enfrenta el resultado de la prueba diagnóstica (filas) con el estado real (columnas) a lo que se conoce como prueba de oro (lesiones en el tejido y cultivo), como prueba en paralelo. Para analizar su validez se calcularon los valores de sensibilidad y especificidad con ayuda del programa estadístico Epidat 3.1.

3. RESULTADOS

Los resultados del RT-PCR se obtuvieron usando el cebador L3 NN diferencial para *M. bovis* tomando como positivos los valores de Cq que van 20 a 40 y negativos los que no aplicaron dentro de la prueba, de lo cual se puede decir con una confianza del 95%, que se obtuvo una sensibilidad del 92% y una especificidad del 100%, en cuanto a valores predictivos se calculó 100% para valor predictivo positivo y 71% para el valor predictivo negativo. Además de contar con un índice de validez de 93% que es la proporción de individuos clasificados correctamente.

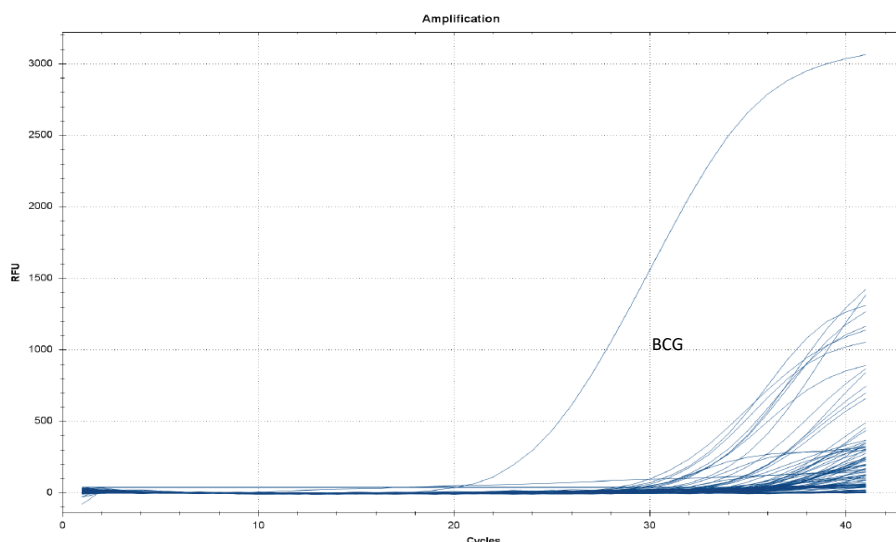


Fig 1. Resultados de la PCR-TR para diferenciar *M. bovis* en tejidos positivos a cultivo en medio Stonebrink^R, donde se usó como control positivo una cepa de BCG.

4. DISCUSIONES

La reacción en cadena de la polimerasa es una de las técnicas de diagnóstico más importantes en tuberculosis bovina, esta técnica es especialmente útil por la rápida detección de la infección en el animal sospechoso. La PCR ha mejorado a través del tiempo, pero su sensibilidad sigue siendo deficiente comparada con el cultivo y en ocasiones proporciona resultados falso, sin embargo con la incursión de RT-PCR se puede aumentar la sensibilidad de la prueba usando cebadores dirigidos a regiones específicas y que además se complementan con sondas que aumentan la afinidad que se tiene sobre estas cadenas de oligonucleótidos, como lo es el cebador L3NN.

El uso de la reacción en cadena de la polimerasa se ha incrementado como prueba de diagnóstico primario y juega un papel importante en la caracterización de cepas. Esta es una técnica rápida que proporciona resultados en uno o dos días comparado con las dos semanas del cultivo y aumentado los parámetros de sensibilidad y especificidad.

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos a la USDA por facilitarnos sus protocolos y los oligonucleótidos de interés para realizar los experimentos, así como a la Facultad de Ciencias Naturales de la Universidad Autónoma de Querétaro por las instalaciones y al Fondo de Proyectos Especiales de Rectoría (FOPER) por financiar el proyecto.

CONFLICTO DE INTERESES

Los autores declaran que no existe conflicto de intereses en la publicación de los datos.

REFERENCIAS

Abaloss, P., & Retamál, P. 2005. Tuberculosis: ¿Una Zoonosis Re Emergente?. Laboratorio Veterinario Avedila, (33), 583-591.

Barrón, H., Monteghirfo, M., & Rivera, N. 2006. Diagnóstico Molecular De Mycobacterium Tuberculosis En Biopsias Pleurales Embebidas En Parafina. In Anales De La Facultad De Medicina (Vol. 67, No. 1, Pp. 11-18). UNMSM. Facultad De Medicina.

Biet, F., Boschioli M.L., Thorel M.F. & Guilloteau L.A. 2005. Zoonotic aspects of *Mycobacterium bovis* and *Mycobacterium avium* intracellular complex MAC. Vet Res;363:411-436.

de Kantor, I.N. & Ritacco, V. 2006. An update on bovine tuberculosis programs in Latin American and Caribbean countries. Vet Microbiol;1122-4:111-118.

Johansen, I. S., Thomsen, V. O., Forsgren, A., Hansen, B. F. & Lundgren, B. 2004. Detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex in formalin-fixed, paraffin-embedded tissue specimens with necrotizing granulomatous inflammation by strand displacement amplification. *J Mol Diagn.*;6:231- 5.

Katoch, V. M. 2004. Newer Diagnostic Techniques For Tuberculosis. Review Article. *Indian J Med Res.*;120:418-28.

Liébana, E., Aranaz, A., Mateos, A., Villafrancia, M., Gomez-Mampaso, E., Tercero, J., Alemany, J., Suarez, G., Domingo & M., Dominguez. L. 1994. Simple and rapid detection of *Mycobacterium tuberculosis* Complex Organisms in Bovine Tissue Samples by PCR. *J ClinMicrobiol.* 33: 33-36.

NORMA OFICIAL MEXICANA - NOM-031-ZOO-96. Campaña Nacional Contra La Tuberculosis Bovina [*Mycobacterium bovis*]. Diario Oficial De La Federación. DX 6: 35. 1996.

O'Reilly, L. & Daborn, C. 1995. The Epidemiology of *Mycobacterium bovis* Infections In: *Animals And Man: A Review.* *TuberLungDis.* 76: 1-46.

Pérez-Guerrero, L., Milián-Suazo, F., Arriaga-Díaz, C., Romero-Torres, C., & Escartín-Chávez, M. 2008. Epidemiología Molecular De Las Tuberculosis Bovina Y Humana En Una Zona Endémica De Querétaro, México. *Salud Pública De México*, 50(4), 286-291.

Rodwell T.C., Moore, M., Moser, K.S., Brodine, S.K., & Strathdee,. SA. 2008. Tuberculosis from *Mycobacterium bovis* in binational communities, United States. *Emerg Infect Dis*;146:909-916.