



MANUAL PARA LA REALIZACIÓN DE ESTUDIOS HISTOPATOLÓGICOS, INMUNOHISTOQUÍMICOS Y DE PCR DIRECTA DE TEJIDOS PARA EL DIAGNÓSTICO RÁPIDO DE LA TUBERCULOSIS BOVINA POR EL COMPLEJO MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS (CMT)

Programa Nacional de Erradicación de la Tuberculosis Bovina (Infección por el Complejo *Mycobacterium Tuberculosis*) 2024.

Editado por:

Laboratorio Central de Sanidad Animal de Santa Fe.

Camino del Jau, s/n. 18320 Santa Fe (Granada)

Tel. 958 440 400

clvgr@mapa.es

Subdirección General de Sanidad, Higiene Animal y Trazabilidad.

sganimal@mapa.es

Dirección General de Sanidad de la Producción Agraria Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación.

Ministerio de Agricultura Pesca y Alimentación.

Con la colaboración de:

Centro de Vigilancia Sanitaria Veterinaria VISAVET

Universidad Complutense de Madrid

mycobacteria@visavet.ucm.es



ÍNDICE

ÍNDICE	2
ÁMBITO DE APLICACIÓN	3
CONSIDERACIONES DE LA TOMA DE MUESTRAS Y ENVÍO AL LABORATORIO	4
PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS EN EL LABORATORIO	5
ESTUDIO HISTOPATOLÓGICO DE TUBERCULOSIS	6
• Procesado de muestras	6
• Elaboración de cortes histológicos	6
• Desparafinado e hidratación	7
• Estudio Morfopatológico de Tuberculosis: Tinción Hematoxilina-Eosina (H&E)	7
• Estudio Etiológico: Tinción Ziehl-Neelsen (ZN)	10
• Estudio etiológico: Análisis Inmunohistoquímico (IHQ)	11
PCR DIRECTA DE TEJIDOS	13
• Homogenización de la muestra	13
• Extracción y Purificación de ADN	14
• PCR a tiempo real (PCR EURLAB)	14
ANEXO	16
A. Comparativa de resultados obtenidos sobre muestras clínicas mediante aislamiento microbiológico y métodos histopatológicos en el LNR de Santa Fe	16
B. Comparativa de resultados entre las muestras positivas o negativas en Microbiología y los resultados obtenidos en PCR Real Time (PE/013/MYC EURL).	18



ÁMBITO DE APLICACIÓN

El presente Manual tiene como objetivo principal ser una herramienta de trabajo para la coordinación y el correcto desarrollo y aplicación de la normativa en vigor en materia de la tuberculosis bovina, facilitando en la medida de lo posible, las actuaciones de las autoridades competentes implicadas en el seguimiento, control y erradicación de esta enfermedad, dentro del Programa Nacional de Erradicación de Tuberculosis Bovina. El presente documento es un documento “vivo” y está sujeto a modificaciones que, bien por modificación legislativa, avances en los conocimientos científicos o razones de índole práctica, sean consideradas como necesarias.

Las primeras actuaciones de lucha frente a la tuberculosis bovina se inician en España a principios de los años 50. En 1965 se establece, mediante la Orden de 24 de mayo, un Plan Nacional de Lucha contra la tuberculosis y la brucelosis bovinas, centrado principalmente en los principales núcleos de vacuno lechero del norte y centro de España. Tras la entrada de nuestro país en la CEE, en 1987 España presenta un Programa de Erradicación Acelerada, de acuerdo con las Directivas 77/391/CEE y 78/52/CEE y la Decisión 87/58/CEE. Los Programas de Erradicación de esta enfermedad se llevan aplicando desde los años 90, bajo el marco de la Directiva 64/432/CEE y sus modificaciones y el Real Decreto 2611/1996 por el que se regulan los Programas Nacionales de Erradicación de Enfermedades de los Animales y sus modificaciones.

Para la aplicación del Reglamento (UE) 2016/429 del Parlamento Europeo y del Consejo de 9 de marzo de 2016, relativo a las enfermedades transmisibles de los animales y por el que se modifican o derogan algunos actos en materia de sanidad animal, ha sido publicado el Reglamento Delegado (UE) 2020/689 de la Comisión de 17 de diciembre de 2019 que completa al anterior en lo referente a las normas de vigilancia, los programas de erradicación y el estatus de libre de enfermedad con respecto a determinadas enfermedades de la lista y enfermedades emergentes, entre ellas la infección por el complejo *Mycobacterium tuberculosis* (CMT). Es en este Reglamento Delegado (UE) 2020/689 donde se recoge la investigación de casos sospechosos mediante detección de material genético o de antígenos específicos del agente patógeno.

El objeto de este Manual es la investigación de animales negativos a las pruebas “in vivo” de tuberculosis, definidas en el programa como “reses de seguimiento”, y de los granulomas remitidos dentro del Protocolo de Vigilancia de animales sacrificados de rutina en mataderos, mediante PCR directa a CMT y/o histopatología. Quedan excluidos los animales positivos a las pruebas de diagnóstico “in vivo”.

Sólo de las muestras con PCR directa positiva a CMT (PCR EURLAB u otras PCR), o con lesiones histopatológicas compatibles con tuberculosis y otras PCR negativas, se procederá a realizar el cultivo microbiológico para intentar obtener el aislamiento para estudios de identificación y caracterización molecular del *Mycobacterium* perteneciente al CMT, que engloba entre otros a *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum*, *M. microti*, *M. pinnipedii* y *M. caprae*. **En el caso de muestras negativas a la PCR EURLAB no es necesario realizar el cultivo microbiológico**, salvo a efectos laborales para monitorizar la adecuada validación/correlación de ambas pruebas, pero sin efectos diagnósticos ni de comunicación de resultados al remitente de las muestras. Sí es necesario realizar el cultivo cuando la PCR directa EURLAB se considera como alternativa al cultivo microbiológico para la confirmación de



casos sospechosos y ante un resultado negativo se decide no suspender la calificación sanitaria del establecimiento de origen. En el supuesto de que con posterioridad se confirmase el caso por cultivo, en el establecimiento de origen se realizarán las actuaciones correspondientes a la retirada de la calificación sanitaria.

La sistemática para aplicar este Manual, como alternativa al cultivo, será la siguiente:

Reses de seguimiento procedentes de pruebas de IDTB comparada de rutina o del “Procedimiento de actuaciones y movimientos de ganado ante la aparición de animales reaccionantes en rebaños T3H sin sospecha de enfermedad en zonas de baja prevalencia de tuberculosis 2023”:

Las muestras de estos animales, procedentes de establecimientos T3H, serán sometidas bien al estudio histopatológico o bien a PCR directa, no siendo necesarias pruebas adicionales si no se detectan lesiones histológicas compatibles o el resultado de la PCR es negativo.

Reses de seguimiento epidemiológico (de establecimientos con antecedentes) y granulomas remitidos dentro del Protocolo de Vigilancia de animales sacrificados de rutina en mataderos:

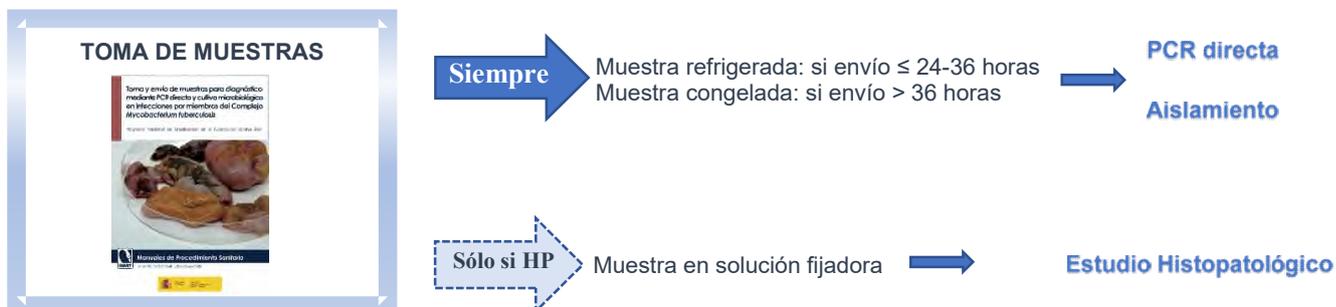
Las muestras de estos animales, procedentes de establecimientos T3 o T3H, serán sometidos al estudio histopatológico y a PCR directa, no siendo necesarias pruebas adicionales si no se detectan lesiones histológicas compatibles, o si se detectan el resultado a la PCR EURLAB es negativo y, en el caso de granulomas de animales sacrificados de rutina, se proporciona además por el laboratorio un posible diagnóstico diferencial. En el caso de que no se realicen pruebas de diagnóstico diferencial y se decida no suspender la calificación sanitaria del establecimiento de origen, será necesario realizar el cultivo microbiológico de las muestras y sólo en el caso de confirmación microbiológica se realizarán las actuaciones correspondientes en el establecimiento de origen.

Estas pruebas para la realización de un diagnóstico rápido se encuentran disponibles en el LNR de Santa Fe y en el Centro de Vigilancia Sanitaria Veterinaria (VISAVET) de la Universidad Complutense de Madrid (UCM), a través de la Resolución de 22 de junio de 2020, de la Dirección General de Sanidad de la Producción Agraria, por la que se publica el Convenio de encomienda de gestión a la UCM, para la realización de trabajos relacionados con el Programa Nacional de Erradicación de la Tuberculosis en especies domésticas y el plan de actuación frente a tuberculosis en especies silvestres (BOE Núm. 182 jueves 2 de julio de 2020 Sec. III. Pág. 46477). Se consideran como prioritarias para su análisis las muestras de granulomas remitidos dentro del Protocolo de Vigilancia de animales sacrificados de rutina en mataderos. **En ambos laboratorios, la PCR directa en muestra que se realiza es la PCR EURLAB.**

CONSIDERACIONES DE LA TOMA DE MUESTRAS Y ENVÍO AL LABORATORIO

Este procedimiento puede aplicarse sobre muestras clínicas de la especie bovina, principalmente linfonódulos, pulmón, hígado, etc.

La toma de muestras se hará siempre según el [Manual de procedimiento para la toma y envío de muestras para cultivo microbiológico y diagnóstico de tuberculosis](#). Además, si se va a realizar el estudio histopatológico (HP) de las muestras se recomienda la fijación de una porción de tejido en solución fijadora (formol salino al 10% o formol tamponado al 10% estabilizado con metanol comercial) cuanto antes, a ser posible en el propio matadero.



Las muestras se recogerán asépticamente en botes con cierre de rosca de seguridad que evite el derrame de fluidos al exterior e identificados de manera inequívoca con respecto a la documentación aportada.

Cuando se observen lesiones compatibles con tuberculosis, se tomarán fotografías que serán incorporadas al expediente digital enviado al laboratorio, junto con la documentación de la toma de muestras.

Los laboratorios designados por las autoridades competentes para efectuar estos análisis tendrán a su disposición los procedimientos del LNR, así como la posibilidad de formación en los diferentes métodos descritos en este manual.

PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS EN EL LABORATORIO

Las muestras deben prepararse retirando la grasa periférica que pudiera existir.

Para la observación de posibles lesiones a nivel macroscópico, se realizarán cortes seriados cada 3-5 mm en la muestra, anotando el resultado de la observación.

Se deben seleccionar fragmentos de la muestra de una zona de tránsito entre el tejido sano y el tejido afectado. En caso de no haber lesión, se tomará al menos una muestra, siendo aconsejable tomar dos muestras diferentes discontinuas del mismo tejido.

Para el estudio histopatológico se tomará un fragmento de tejido que no debe exceder de 1-1,5 cm de grosor, y ponerlo en contacto con la **solución fijadora** para que pueda acceder bien a todas las células. La fijación se puede hacer dentro o fuera de un casete de histopatología usando formol salino al 10% o formol tamponado al 10% estabilizado con metanol comercial. El tiempo de exposición será de 24-48 horas a temperatura ambiente (no refrigerado). Tiempos de fijación muy prolongados endurecen excesivamente los tejidos y favorecen la presentación de depósitos de pigmento formólico, a la vez que comprometen gravemente la antigenicidad de la muestra si es necesario un



estudio inmunohistoquímico posterior. Esto último puede evitarse utilizando formol tamponado al 10% en lugar del formol salino al 10%.

Para la PCR directa de tejido se tomará un fragmento mínimo de 2 - 2,5 gr, que se troceará al máximo con ayuda de unas tijeras o un bisturí y unas pinzas.

Nota: Las **micobacterias**, según la especie de la que se trate, se clasifican como **agentes biológicos de los grupos 2 y 3** dentro del **Real Decreto 664/1997** de 12 de mayo, sobre protección de los trabajadores contra los **riesgos relacionados con la exposición a agentes biológicos** durante el trabajo. El trabajo con micobacterias requerirá por tanto cumplir las normas de trabajo de Seguridad Biológica según los procedimientos del laboratorio.

ESTUDIO HISTOPATOLÓGICO DE TUBERCULOSIS

El estudio histopatológico permite valorar las lesiones que pueden aparecer en un cuadro tuberculoso (estudio morfológico). Para ello, se realizará la tinción de Hematoxilina-Eosina (H&E) sobre cortes histológicos. Las técnicas complementarias que permiten visualizar en los tejidos al agente etiológico o sus antígenos son, respectivamente, la tinción de Ziehl-Neelsen y la técnica inmunohistoquímica (IHQ).

• Procesado de muestras

Una vez fijadas las muestras, se procederá a la inclusión de éstas en parafina. Para ello, tomaremos un trozo de la muestra en cuestión, de un grosor de aproximadamente 2-4 mm, a fin de favorecer la infiltración de los tejidos. Este trozo se colocará en un casete porta-muestras que se introducirá en un procesador automático de tejidos. El procesado de las muestras también puede hacerse manualmente, y al igual que en el sistema automatizado incluirá las siguientes etapas:

1. **Deshidratación:** pasar las muestras por una escala ascendente de alcoholes.
2. **Aclarado:** las muestras deshidratadas se introducen en xilol.
3. **Infiltración:** consiste en reemplazar el xilol de los tejidos por parafina líquida (60°C). Este paso exige la utilización de vacío para mejorar la infiltración; en caso de procesar manualmente y sin vacío, deberán utilizarse muestras de pequeño grosor.
4. Finalmente, las muestras infiltradas se colocarán en sus respectivos moldes con parafina para su enfriamiento en una crioconsola.

Una vez finalizado este paso los **bloques de parafina** estarán dispuestos para ser cortados.

• Elaboración de cortes histológicos

Para la obtención de cortes histológicos, los bloques de parafina en los que se encuentran incluidas las muestras se cortan en un microtomo de parafina. Previamente los bloques habrán de ser desbastados, es decir, eliminarles el exceso de parafina hasta que aparezca la muestra en su superficie.



Una vez desbastados los bloques, se realizarán cortes seriados de 3-4µm de grosor. Estos cortes histológicos se depositarán en un baño de agua a 45-50°C (baño de flotación), con la intención de eliminar los pliegues (**proceso de estiramiento de las secciones**).

Sobre un portaobjetos (si es posible cargado iónicamente, aunque no es imprescindible) se recogerán del baño los cortes histológicos que se adhieren a su superficie. Los portaobjetos con los cortes histológicos se colocarán sobre una platina o soporte de vidrio ranurado (cuna) que se introducirá en la estufa de secado a 55-60°C para su desparafinación hasta su utilización.

• Desparafinado e hidratación

Los portaobjetos con los cortes histológicos deben someterse a un proceso de desparafinado e hidratación y así conseguir que los colorantes penetren en los tejidos. Para ello, los portaobjetos deben introducirse en cubetas que contengan el reactivo correspondiente y en este orden: xilol (2 cubetas), alcoholes en escala descendente (por ejemplo, 100º, 96º, 70º) y agua.

Los cortes estarán listos para técnicas de tinción histológica (Hematoxilina-Eosina, Ziehl-Neelsen).

• Estudio Morfopatológico de Tuberculosis: Tinción Hematoxilina-Eosina (H&E)

La tinción Hematoxilina-Eosina es la más ampliamente usada. Supone la aplicación de hematoxilina que, por su naturaleza básica, tiñe estructuras ácidas en tonos azul y púrpura, y el uso de eosina que, por su carácter ácido, tiñe componentes básicos en tonos de color rosa.

En términos generales, el procedimiento de esta tinción consta de las siguientes fases:

- Tinción con Hematoxilina
- Lavado con agua corriente
- Decoloración con alcohol clorhídrico
- Lavado con agua corriente
- Tinción con Eosina
- Lavado con agua corriente
- Escala ascendente de alcoholes (por ejemplo, 70º, 96º, 100º)
- Xilol (2 cubetas)
- Montado de cubreobjetos con medio de montaje.

Los cortes histológicos teñidos con H&E nos permitirán visualizar y evaluar las posibles lesiones y, por tanto, constituyen el elemento sobre el que se fundamenta el estudio histopatológico.

Se observarán en campo claro, primero a pocos aumentos, para evaluar la estructura general de los tejidos y, en su caso, localizar alteraciones morfológicas. A estos aumentos, en el estudio



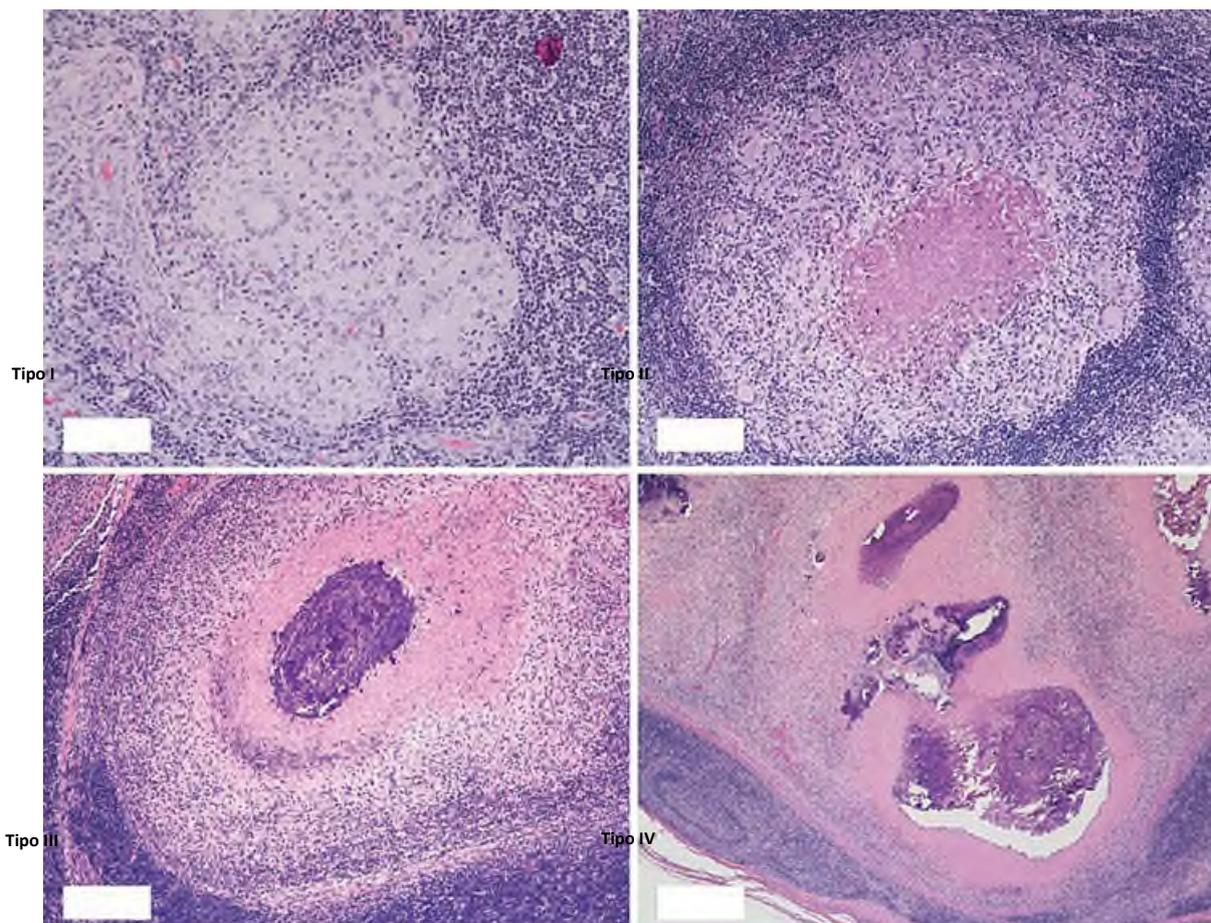
histopatológico de la tuberculosis, deberán buscarse desde pequeños granulomas hasta amplias zonas de caseificación y/o calcificación.

Después de la valoración inicial, con el objetivo de menor aumento, procederemos al estudio pormenorizado de la muestra con el **objetivo x40**. A este nivel, en el estudio histopatológico de la tuberculosis, discriminaremos el tipo celular presente en los infiltrados/granulomas que hayamos detectado a menor aumento, pudiendo diferenciar entre elementos polimorfonucleares (neutrófilos, eosinófilos) y aquellos otros mononucleares (linfocitos, monocito-macrófago).

De este modo, el diagnóstico histopatológico de esta enfermedad se realizará en función de la aparición de las siguientes alteraciones: necrosis por caseificación y/o calcificación distrófica, acúmulo de células epitelioides en empalizada con presencia de células gigantes tipo Langhans, infiltración de linfocitos y células plasmáticas y reacción fibrosa (cápsula conjuntiva).

Cabe señalar que Wangoo y cols., realizaron un estudio en el cual llegaron a clasificar los granulomas en 4 tipos en función del grado de necrosis y encapsulamiento (Wangoo, 2005).

TIPO I	GRANULOMA INICIAL	Acúmulo irregular de fagocitos. No encapsulado
TIPO II	GRANULOMA SÓLIDO	Fina cápsula incompleta. Inicio de necrosis
TIPO III	MÍNIMA NECROSIS CENTRAL	Cápsula conjuntiva completa
TIPO IV	NECROSIS Y MINERALIZACIÓN	Granulomas multicéntricos



Esta enfermedad es sumamente compleja y su patogenia está condicionada por la especie animal, agente patógeno y reacción individual del organismo, pudiendo dar lugar a inflamaciones más exudativas (exudado rico en proteínas, ausencia de linfocitos y granulocitos y poca tendencia a la demarcación) o más proliferativas (infiltración linfocitaria, delimitación por tejido de granulación y calcificación distrófica).

Se tendrá en cuenta que, al ser la tuberculosis una enfermedad que cursa con lesiones de tipo granulomatoso, debe tenerse presente el diagnóstico diferencial con lesiones piogranulomatosas (Actinomicosis, Actinobacilosis, Nocardiosis, Pasterelosis, Corinebacteriosis, Rodococosis, etc.), granulomas micóticos, granulomas parasitarios y granulomas no piógenos (Brucelosis, Paratuberculosis). **Los laboratorios que realicen diagnósticos diferenciales señalarán en informes complementarios el proceso diagnosticado y las técnicas complementarias utilizadas.**

De este modo, para completar el diagnóstico, deberá evidenciarse la presencia de micobacterias o de sus antígenos, en el interior de las células histiocitarias (fundamentalmente células epitelioideas y gigantes) y/o en zonas de caseificación (calcificadas o no). Para ello se realizará, sobre cortes histológicos seriados, la tinción Ziehl-Neelsen o la técnica de Inmunohistoquímica. Esta última, es una técnica más sensible, ya que amplifica la señal obtenida mediante el empleo de anticuerpos específicos. En ambos casos es **absolutamente imprescindible la utilización de muestras control**, que establezcan que la tinción se ha realizado correctamente.



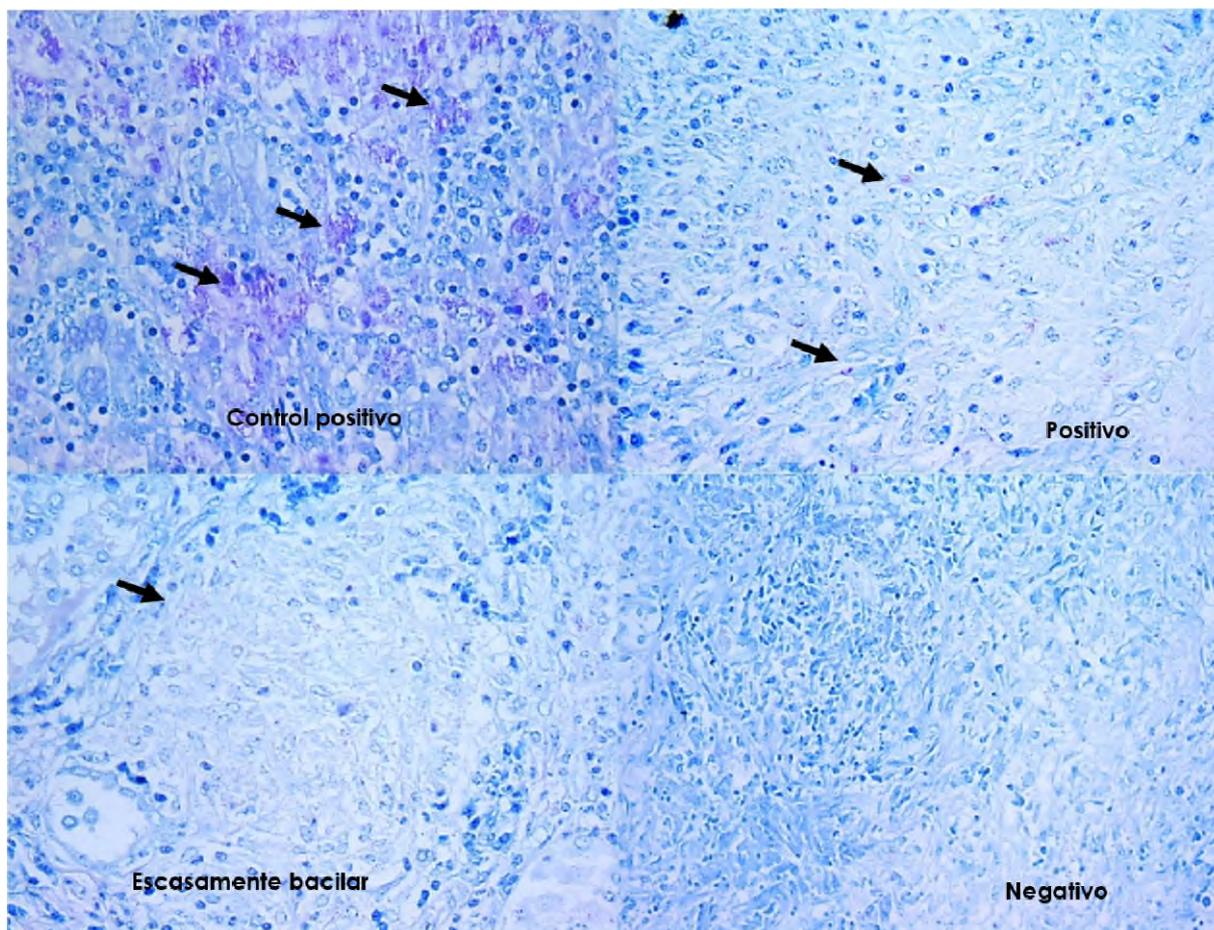
• Estudio Etiológico: Tinción Ziehl-Neelsen (ZN)

La tinción Ziehl-Neelsen permite la visualización de bacilos ácido-alcohol resistentes (BAAR), que se tiñen con fucsina básica, reteniendo el colorante tras la fase de decoloración con alcohol clorhídrico. El colorante de contraste es el azul de metileno. **Habrá que incluir una muestra positiva como control del proceso de tinción.**

En términos generales, el procedimiento de esta tinción consta de las siguientes fases:

- Tinción con fucsina básica
- Lavado con agua corriente
- Decoloración con alcohol clorhídrico
- Lavado con agua desionizada
- Tinción con azul de metileno
- Escala ascendente de alcoholes (por ejemplo, 70º, 96º, 100º)
- Xilol
- Montado con medio de montaje.

Debido al pequeño tamaño de los bacilos tuberculosos, comenzaremos la observación con el **objetivo x20 o x40**. En el estudio de la tuberculosis, a estos aumentos se pueden localizar pequeños grumos rojizos en el interior de células epitelioides y/o dispersos por el *caseum*, que se corresponden con pequeños acúmulos de micobacterias. En el caso de cuadros paucibacilares, muy frecuentes en tuberculosis bovina, pueden observarse formas bacilares simples en el interior de un escaso número de células gigantes. Para realizar el estudio de rigor se recurrirá a la observación con el **objetivo de inmersión x100**. El diagnóstico etiológico será efectivo cuando se demuestre la presencia de bacilos ZN+ en zonas caseificadas o en el interior de células epitelioides y/o gigantes. Se puede establecer la carga bacilar según Wangoo y col. (2005).



• Estudio etiológico: Análisis Inmunohistoquímico (IHQ)

Esta técnica se basa en el fenómeno natural del reconocimiento específico del antígeno por parte del anticuerpo. Para la detección de antígenos micobacterianos se utilizará un anticuerpo primario policlonal (fabricado en conejo) frente a una micobacteria del complejo *Mycobacterium tuberculosis*. A tal fin podrán utilizarse anticuerpos policlonales producidos utilizando *M. bovis* (BCG) o *M. tuberculosis* como inmunógeno. Sin embargo, debido a la elevada reactividad cruzada entre las distintas especies del Género *Mycobacterium*, podría detectarse inmunorreactividad por la presencia de otras micobacterias atípicas o del complejo *Mycobacterium avium*, de ahí la importancia de una correcta valoración en el estudio histopatológico previo. Para el análisis IHQ **habrá que incluir un control positivo y un control negativo como control del proceso.**

Una de las técnicas inmunohistoquímicas es la técnica ABC (Avidina-Biotina-Peroxidasa). Ésta es una técnica indirecta basada en la unión antígeno-anticuerpo, con capacidad de amplificar la señal obtenida. Esta técnica consta de cuatro etapas:

- Unión del anticuerpo primario a los antígenos presentes en el tejido.
- Unión del anticuerpo secundario, marcado con biotina, al anticuerpo primario.



- Unión del complejo ABC a la biotina presente en el Anticuerpo secundario.
- Utilización de un cromógeno para detectar la presencia de peroxidasa.

Las fases de la técnica IHQ ABC se resume en los siguientes pasos:

- Desparafinado de la muestra con xilol
- Aclarado de la muestra con alcohol 100º
- Inhibición de la peroxidasa endógena con solución de peróxido de hidrógeno
- Hidratación mediante escasa descendente de alcoholes (por ejemplo, 96º y 70º) y agua.
- Incubación de cortes en tampón fosfato (PBS)
- Supresión de la tinción de fondo con suero normal de la especie del anticuerpo secundario
- Incubación con el anticuerpo primario (anti-MTB fabricado en conejo) a la dilución estandarizada
- Lavado con PBS
- Incubación con el anticuerpo secundario anti-conejo, marcado con biotina
- Lavado con PBS
- Incubación con el complejo terciario ABC (avidina y peroxidasa) a la dilución estandarizada
- Lavado con una solución de TRIS
- Revelado de la reacción con una solución de diaminobencidina (DAB) y peróxido de hidrógeno: La forma oxidada de la DAB genera precipitado insoluble de color pardo o marrón oscuro de forma permanente en los lugares de unión del anticuerpo primario. Lavado con agua corriente
- Contratinción con hematoxilina.
- Lavado con agua corriente
- Deshidratación en escala ascendente de alcoholes (70º, 96º, 100º)
- Transparentado en xilol
- Montado con medio de montaje

La inmunotinción nos permitirá realizar el estudio etiológico al poder visualizar a los agentes patógenos asociados a los cuadros patológicos previamente observados (estudio histopatológico); es importante recordar, que se trabajará siempre sobre **cortes seriados**, lo que nos permitirá correlacionar de forma inequívoca la observación del agente con la zona patológica en la que se circunscribe.

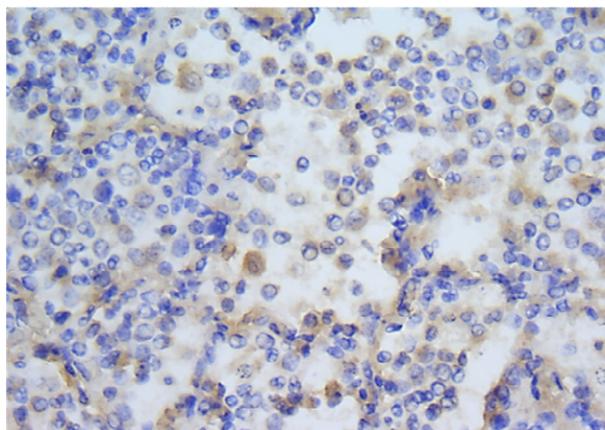
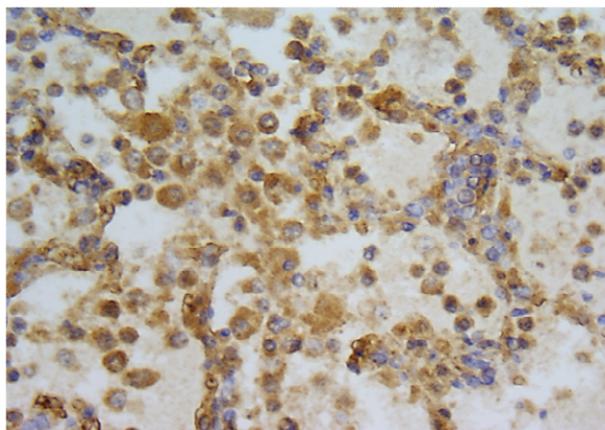
Comenzaremos la observación con el **objetivo x40**, obteniendo de esta forma una valoración general de la inmunorreactividad presente en el tejido y prestando especial atención a las zonas en las que

hay lesión. También podrá recurrirse a la observación con el **objetivo de inmersión x100**, con lo que se alcanzará mayor detalle y diferenciación de la señal presente.

La inmunorreacción positiva se caracteriza por la presencia de un precipitado insoluble de tipo granular de color pardo-marrón, que puede tener localización intracelular (células histiocitarias como macrófagos, células epitelioides y células gigantes) y/o extracelular (presencia de precipitado en las zonas de necrosis).

Puesto que la interpretación de la inmunoreactividad positiva se basa en la detección de un precipitado insoluble de color pardo-marrón, habrá de prestar especial atención en diferenciar éste de aquellas otras sustancias presentes en el tejido que puedan tener características similares y que no estén relacionadas con la presencia de antígenos micobacterianos.

Existen otras técnicas Inmunohistoquímicas alternativas a la técnica ABC que pueden resultar igual de válidas y que tienen la ventaja de no utilizar reactivos tóxicos como la diaminobencidina. En el Centro de Vigilancia Sanitaria Veterinaria VISAVET se utiliza la técnica inmunohistoquímica con la utilización de un kit comercial.



PCR DIRECTA DE TEJIDOS

La detección del material genético (ADN) de las bacterias del complejo *M. tuberculosis* directamente sobre los tejidos diana es una herramienta muy rápida, sencilla y robusta, que ofrece una especificidad y sensibilidad diagnóstica similar a la del cultivo bacteriológico.

Esta metodología incluye tres pasos: homogenización de la muestra, extracción y purificación del ADN y amplificación de la diana de elección mediante PCR a tiempo real:

- **Homogenización de la muestra**

Preparar un homogeneizado de la muestra troceada previamente, añadiendo solución salina estéril. Para conseguir una correcta homogenización, se utilizarán medios mecánicos (homogeneizador de palas) durante 3-5 minutos.



• Extracción y Purificación de ADN

La extracción de ADN genómico de las micobacterias debería incluir:

1. Lisis mecánica: Centrifugar el lisado a 9.000 g durante 5 minutos y retirar el sobrenadante del tubo con pipeta. Resuspender el sedimento con el volumen requerido según el kit de extracción de ADN comercial empleado y realizar la lisis empleando un equipo de rotura mecánica (ej. Precellys o Fast-Prep).
2. Lisis enzimática: se lleva a cabo con proteinasa K, normalmente durante toda la noche, siguiendo las especificaciones del fabricante. Hasta que no haya finalizado este paso las muestras se manipulan en cabina de bioseguridad tipo IIA. Hay que evitar incluir la enzima durante el primer paso de lisis mecánica.
3. Purificación con kits comerciales, manuales o automatizados. Se deben seguir las especificaciones del fabricante y todos comparten el siguiente fundamento:
 - Unión del ADN a una membrana de fibras de vidrio contenida en una columna de elución o a perlas magnéticas en solución. El proceso de unión es reversible y específico para ácidos nucleicos.
 - Lavados para eliminar posibles restos celulares e impurezas del extracto.
 - Elución de ADN genómico purificado con buffer alcalino o agua MilliQ.

Cabe señalar que con estos kits se purifica ADN total, incluyendo genómico y plasmídico entre otros. Se pueden utilizar kits de diferentes marcas indistintamente para la purificación de ADN a partir de muestras clínicas de todo tipo, por ejemplo DNeasy Blood & Tissue o QiaAmp DNA Mini kit (Qiagen), High Pure PCR Template Preparation Kit (Roche), MagMAX™ CORE Nucleic Acid Purification Kit (ThermoFisher), etc.

• PCR a tiempo real (PCR EURLAB)

Una vez que se dispone del material genético ya extraído y purificado, es necesario emplear una PCR a tiempo real para detectar la presencia de ADN de las micobacterias del complejo *M. tuberculosis*. En este documento se facilita el protocolo de la PCR EURLAB, validado por el EU-RL de Tuberculosis Bovina. Esta PCR detecta la secuencia de inserción IS6110 (elemento móvil presente en todas las especies del complejo y que varía únicamente en el número de copias dependiendo de la especie y la cepa). El Procedimiento Normalizado de Trabajo (PNT) **está a disposición** de los laboratorios oficiales que lo requieran:

- PNT-BM-A-29: Detección de microorganismos pertenecientes al Complejo *Mycobacterium tuberculosis* mediante PCR a tiempo real. Basado en PCR EURLAB: PE/013/MYC PROCEDURE FOR DETECTION OF *Mycobacterium tuberculosis* COMPLEX MICROORGANISMS THROUGH REAL TIME PCR



- Secuencia de los cebadores y sonda

Nombre	Cebadores 5' - 3'
F6110	GGT AGC AGA CCT CAC CTA TGT GT
R6110	AGG CGT CGG TGA CAA AGG
S6110	FAM - CAC GTA GGC GAA CCC - MGB NFQ

- Preparación de la mezcla de PCR

Reactivo*	Concentración	Volumen por muestra (µl)
H ₂ O		7,5
Quantifast Probe PCR	5X	5
ICA assay	10X	2,5
ICA DNA	10X	2,5
F6110	10 µM	1
R6110	10 µM	1
S6110	10 µM	0,5
Volumen de reacción		20
DNA		5

* Kit empleado: Quantifast Pathogen Master Mix (Qiagen)

- Programa de amplificación

Temperatura	Tiempo	Nº de ciclos
95°C	5 min	1
95°C	15 sec	45
60°C	60 sec*	

* Lectura de fluorescencia después de los 60 sec.

- Análisis e interpretación de resultados

La validez del ensayo se determina cuando se obtenga el resultado esperado en los controles:

Canal FAM	Ct FAM	Canal VIC
-----------	--------	-----------



Controles positivos	+	<38	+/-
Controles negativos	-		+ (Ct ~ 30 ±3)

En caso de no obtener los resultados esperados en los controles se considera el ensayo **NO VÁLIDO** y se ha de **repetir la PCR** con todas las muestras.

La interpretación de resultados se hará de la siguiente manera:

Canal FAM	Ct FAM	Canal VIC	RESULTADO
+	<38	+/-	Positivo
+	38-40	+/-	Dudoso*
+	>40	+/-	Negativo
-		+	Negativo
-		-	Nulo*

*En el caso de que el resultado sea “**dudoso**” o “**nulo**”, se repetirá la muestra y/o una dilución 1/10. Si persisten los resultados “nulos” o “dudosos” se repetirá la extracción de ADN si es posible, si tampoco se resuelve se informarán como “Resultado no concluyente” en el correspondiente boletín de análisis.

ANEXO

A. Comparativa de resultados obtenidos sobre muestras clínicas mediante aislamiento microbiológico y métodos histopatológicos en el LNR de Santa Fe

Las muestras incluidas en esta comparativa corresponden a muestras de BOVINO recibidas en este laboratorio y que han obtenido resultados por ambos métodos entre los años 2013 y 2020.

Respecto a los datos de aislamiento microbiológico, se han considerado muestras positivas a CMT cuando se ha obtenido un aislamiento confirmado como perteneciente al *Complejo Mycobacterium tuberculosis* mediante métodos basados en PCR. Las muestras negativas a CMT son aquellas en las que no se ha conseguido ningún aislamiento o los resultados de PCR han determinado su identificación como *Mycobacterium* spp. o dentro del *Complejo Mycobacterium avium*.

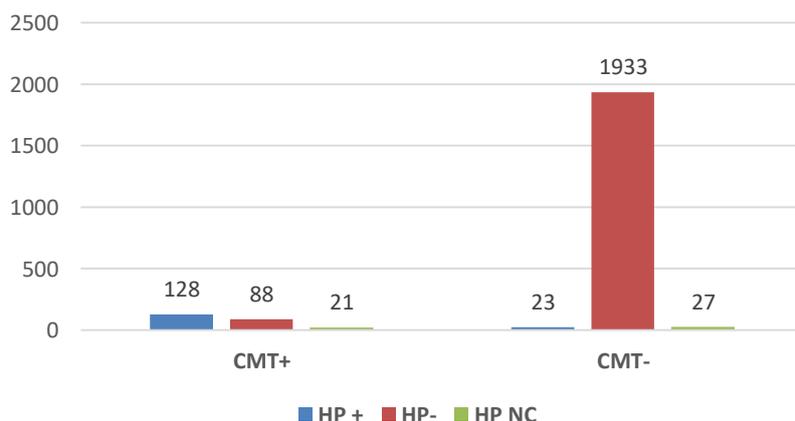
Respecto a los datos de Histopatología, se han considerado muestras positivas cuando el estudio histopatológico muestra lesiones compatibles con tuberculosis a nivel microscópico, confirmando la presencia de antígenos micobacterianos con la técnica inmunohistoquímica ABC. Las muestras negativas son aquellas en las que no se han observado a nivel microscópico lesiones compatibles con la enfermedad.



La siguiente tabla muestra los resultados obtenidos por ambos métodos sobre un total de 2172 muestras bovinas.

	CMT+	CMT-	TOTAL
HP +	128	23	151
HP-	88	1933	2021
TOTAL	216	1956	2172

Resultados de Histopatología frente a Aislamiento microbiológico de CMT



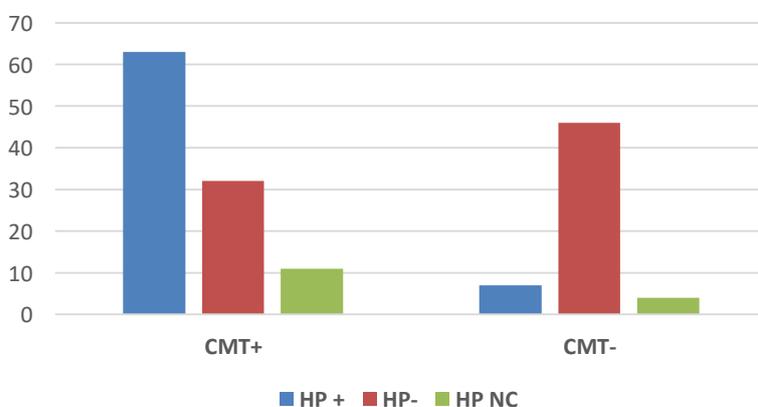
Sensibilidad	59,26 %
Especificidad	98,82 %
VPP	84,77 %
VPN	95,65 %

Estos resultados muestran la utilidad de la técnica histopatológica para descartar de una manera rápida aquellos animales potencialmente negativos a la tuberculosis bovina, obteniendo un número de falsos positivos muy bajo.

Por otro lado, el análisis de datos en muestras remitidas con lesiones a nivel macroscópico da los siguientes resultados:

	CMT+	CMT-	TOTAL
HP +	63	7	70
HP-	32	46	78
TOTAL	95	53	148

Resultados de Histopatología frente a Aislamiento microbiológico de CMT en muestras con lesiones macroscópicas



Sensibilidad	66,32 %
Especificidad	86,79 %
VPP	90,00 %
VPN	58,97 %



Esto demuestra un aumento de la sensibilidad en muestras con lesiones macroscópicas, pasando del 59,26% al 66,32%. La bajada en el dato de la especificidad (del 98,82% al 86,79%) podría atribuirse a cuadros tuberculosos con lesiones paucibacilares, más típicas de *M.bovis*, o a lesiones aparentemente tuberculosas provocadas por micobacterias atípicas u otros microorganismos tales como *Nocardia* o *Rhodococcus* que presentan comunidad antigénica con el bacilo tuberculoso. En este último caso puede aportar mayor información la tinción de Ziehl-Neelsen.

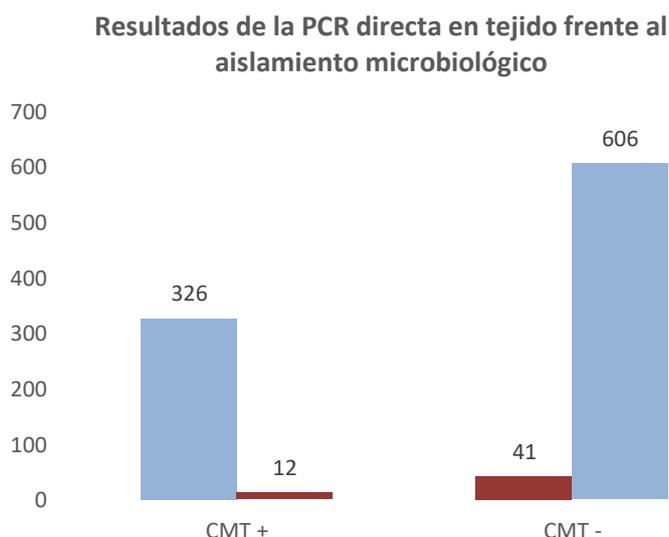
B. Comparativa de resultados entre las muestras positivas o negativas en Microbiología y los resultados obtenidos en PCR Real Time (PE/013/MYC EURL).

En este segundo apartado se comparan los resultados obtenidos en Microbiología con los obtenidos mediante PCR Real Time desarrollada por el EU-RL sobre un total de 985 muestras, recogidas dentro del programa nacional de erradicación entre 2013 y 2018. Estos resultados han sido publicados por el EU-RL de Tuberculosis Bovina en colaboración con varios Laboratorios Nacionales de Referencia y son de acceso público.

Se han considerado muestras positivas a CMT cuando ha habido aislamiento e identificación de especie del CMT con su correspondiente espigotipo.

Se han considerado muestras negativas cuando no se ha conseguido el aislamiento de CMT.

	CMT+	CMT-	TOTAL
PCR+	326	41	367
PCR-	12	606	618
TOTAL	338	647	985



Sensibilidad	96,45 %
Especificidad	93,66 %
VPP	88,83 %
VPN	98,06 %



Con estos datos, se estima una sensibilidad del 96,5% y una especificidad del 93,7%, observando una concordancia muy buena entre el cultivo bacteriológico y esta PCR directa sobre tejido ($\kappa = 0,88$). Cabe destacar que 35 de las 41 muestras con resultados discordantes (PCR positiva, CMT negativo) se confirmaron mediante la PCR a tiempo real-mpb70 específica del CMT, observando una mayor sensibilidad y especificidad corregida (96,78% y 99,02%, respectivamente), y una concordancia de 0,96.

Bibliografía.

A Wangoo, L Johnson, J Gough, R Ackbar, S Inglut, D Hicks, Y Spencer, G Hewinson, M Vordermeier. 2005. Advanced granulomatous lesions in *Mycobacterium bovis*-infected cattle are associated with increased expression of type I procollagen, gammadelta (WC1+) T cells and CD 68+ cells. Journal of Comparative Pathology, 133:223-234. DOI: [10.1016/j.jcpa.2005.05.001](https://doi.org/10.1016/j.jcpa.2005.05.001)

V Lorente-Leal, E Liandris, M Pacciarini, A Botelho, K Kenny, B Loyo, R Fernández, J Bezos, L Domínguez, L de Juan, B Romero. 2021. Direct PCR on tissue samples to detect *Mycobacterium tuberculosis* complex: an alternative to the bacteriological culture. Journal of Clinical Microbiology, 59: e01404-20. DOI: [10.1128/JCM.01404-20](https://doi.org/10.1128/JCM.01404-20).