

# UNIVERSIDAD DE CHILE



**FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS**  
**ESCUELA DE POSTGRADO Y POSTÍTULO**

## **Comparación de cuatro métodos para el diagnóstico de** ***Mycobacterium bovis* en Chile**

**ANA EUGENIA PATIÑO SUAZA**

Tesis para optar al  
Grado de Magíster en  
Ciencias Animales y Veterinarias  
Mención Patología Animal

**Santiago- Chile**  
**2015**

# UNIVERSIDAD DE CHILE



**FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS**  
**ESCUELA DE POSTGRADO Y POSTÍTULO**

## **Comparación de cuatro métodos para el diagnóstico de** ***Mycobacterium bovis* en Chile**

**ANA EUGENIA PATIÑO SUAZA**

**Dirigido por: Dr. Patricio Retamal Merino**

Tesis para optar al  
Grado de Magíster en  
Ciencias Animales y Veterinarias  
Mención Patología Animal

**Santiago- Chile**

**2014**

## INFORME APROBACIÓN TESIS DE MAGISTER

Se informa a la Dirección de Posgrado y Postítulo de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias que la Tesis de Magíster presentada por la candidata

**Ana Eugenia Patiño Suaza**

### **Comparación de cuatro métodos para el diagnóstico de *Mycobacterium bovis* en Chile**

Ha sido aprobada por la Comisión Evaluadora como requisito para optar al grado de Magíster en Ciencias Animales y Veterinarias, con Mención en Patología animal, en Examen de Defensa de tesis rendido el día 16 de enero de 2015.

Director

\_\_\_\_\_  
Dr. Patricio Retamal Merino

Evaluador

\_\_\_\_\_  
Dr. Pedro Abalos Pineda

Evaluador

\_\_\_\_\_  
Dr. Claudio Lecocq Parra

Informante de tesis

\_\_\_\_\_  
Dr. Rigoberto Solís

## **DEPARTAMENTO Y FUENTES DE FINANCIAMIENTO**

Esta investigación fue dirigida por el Dr. Patricio Retamal Merino, Departamento de Medicina Preventiva Animal de la Universidad de Chile y realizada en el Laboratorio de Micobacterias Del Subdepartamento Laboratorios Y Estación Cuarentenaria Pecuaria Lo Aguirre Del Servicio Agrícola Y Ganadero.

Las muestras y los procedimientos de laboratorio fueron financiados por el Plan Nacional de Control y Erradicación de Tuberculosis Bovina del SAG.

## BIOGRAFÍA

<b>Nombre</b>	Ana Eugenia Patiño Suaza
<b>Nombre en citaciones</b>	Patiño Suaza, AE
<b>Nacionalidad</b>	Colombiana

### Formación Académica

- Estadía Postdoctoral Universidad de Chile, Enero de 2014 – Enero de 2015
- Doctorado Salud Publica, Universidad Andina Simón Bolívar. Bolivia, Agosto de 2013
- Posgrado en Salud Pública con énfasis en Salud Indígena, Universidad del Estado Federal del Amazonas. Brasil, Marzo de 2010
- Especialización Laboratorio Clínico Veterinario, Universidad de Ciencias Aplicadas y Ambientales – UDCA. Colombia. Agosto de 2005
- Medicina Veterinaria, Universidad de Antioquia. Colombia, Diciembre de 1995

### Cargos Recientes

- Instituto Colombiano Agropecuario, Análisis y Diagnóstico Veterinario, cargo actual
- Universidad Cooperativa de Colombia, docente hora catedra. 2011-2012
- Universidad Nacional Abierta y a Distancia, docente 2001-2010

### Áreas de actuación

- Análisis y diagnóstico Veterinario
- Salud Publica

### Categoría Colciencias:

Investigador Junior (IJ)

## DEDICATORIA

A Dios que bendice todos mis días,  
y a mi hija que acompaña mis travesías.

### AGRADECIMIENTOS

- Dr. Patricio Retamal Merino, por dirigir y apoyar este trabajo.
- Plan Nacional de Control y Erradicación de Tuberculosis Bovina por financiar totalmente esta investigación.
- Dra. Paulina Zurita; por acompañar y apoyar cada paso de éste trabajo y garantizar su calidad.
- Funcionarios del Departamento Laboratorios Estaciones Cuarentenarias Agrícola y Pecuaria SAG, por facilitar todos los procesos para la exitosa ejecución.
- Dres. Paula Núñez y Federico Cifuentes por su apoyo en el área de Histopatología y Claudia Ávila en el área de Biotecnología.
- Departamento de Medicina Preventiva Animal de la Universidad de Chile, por fortalecer mi idoneidad técnica y académica para desarrollar este trabajo.
- Doctores Pedro Abalos Pineda, Claudio Lecocq Parra y Rigoberto Solís, por contribuir con su evaluación al mejoramiento de este trabajo.
- Escuela POSTFAVE de la Universidad de Chile, por su excelencia administrativa y académica, que hicieron que este magíster superara todas las expectativas.
- Instituto Colombiano Agropecuario “ICA”, por apoyar y financiar este magister y mi estadía en Chile.
- Ing. Alfonso Fenick Muñoz, por su aporte para el análisis matemático de los resultados.
- Mi familia especialmente mi hermana Ángela María, por su apoyo eterno y permanente.

## ÍNDICE DE CONTENIDOS

1	Introducción.	15
2	Revisión bibliográfica	16
2.1	Antecedentes	16
2.2	Las micobacterias	17
2.3	Diagnóstico de la TBB	18
	Medios de Cultivo	19
	Sistema BACTEC 460	20
	Sistema MGIT	21
	BACTEC MGIT 960	22
	PCR en tiempo real, RT-PCR, PCR cuantitativa, (qPCR)	22
3	Hipótesis	24
4	Objetivos	25
4.1	Objetivo general	25
4.2	Objetivos específicos	25
5	Materiales y Métodos	26
5.1	Muestras	26
5.2	Método	26
	Cultivo en medio sólido.	27
	Cultivo en medio líquido.	27
	Extracción de DNA genómico	28
	Programa de PCR	29
	Límite de detección	29
5.3	Análisis estadístico de resultados	30
6	Resultados	34
6.1	Resultados obtenidos por cada muestra	34
6.2	Velocidad de crecimiento de <i>M. bovis</i> , en ST y BACTEC MGIT 960	35
6.3	Concordancia entre los métodos de laboratorio evaluados.	36



6.4	Coloración de Kinyoun a partir de los tubos BACTEC MGIT positivos.	36
6.5	Subcultivo en medio ST a partir de los tubos BACTEC MGIT positivos.	36
6.6	Parámetros de eficiencia	37
7	Discusión	38
7.1	RT-PCR	38
7.2	Histopatología	39
7.3	Cultivo en medio solido Stonebrink (ST)	40
7.4	Cultivo en sistema BACTEC MGIT 960	42
8	Conclusiones	46
9	Recomendaciones	47
10	Bibliografía	48

**LISTA DE TABLAS**

Tabla 1. Interpretación de Índice de Kappa	31
Tabla 2. Resultados obtenidos de las muestras sospechosas a TBB, con cada uno de los métodos evaluados	34
Tabla 3. Resultados de las muestras sospechosas a TBB, por la técnica de Histopatológica	35
Tabla 4. Tiempo promedio de crecimiento de <i>M. bovis</i> , en ST y BACTEC MGIT 960	35
Tabla 5. Resultados del test de kappa entre pruebas.	36
Tabla 6. Calificaciones (C) obtenidas por cada uno de los parámetros de eficiencia en los métodos de laboratorio evaluado	37
Tabla 7. Resultado de cada muestra por cada uno de los métodos evaluados.	52
Tabla 8. Lesiones observadas por Histopatología	55

**LISTA DE FIGURAS**

Figura 1. Recta de Asignación de puntaje para los parámetros de eficiencia.....33

## RESUMEN

Con el objetivo de implementar métodos que disminuyan los tiempos de respuesta diagnóstica y por ende proporcionen rapidez en la emisión del resultado de tuberculosis bovina, se evaluaron y compararon los resultados obtenidos por los métodos BACTEC MGIT 960, cultivo bacteriológico en medio Stonebrink (ST), reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (RT-PCR), e Histopatología.

Todo el trabajo se realizó en el Laboratorio de Micobacterias del Subdepartamento Laboratorios y Estación Cuarentenaria Pecuaria del Servicio Agrícola y Ganadero (SAG), siguiendo los protocolos establecidos por el laboratorio. Se utilizaron 100 muestras de tejido obtenidas de nódulos linfáticos y/u órganos con lesiones del tipo granulomatosas (LTG), provenientes de bovinos de plantas faenadoras o por inspección de seguimiento.

Los resultados mostraron que el cultivo en el sistema BACTEC MGIT 960 puede disminuir el tiempo de detección de *Mycobacterium bovis* y favorecer la rapidez en la emisión del resultado en el diagnóstico de la Tuberculosis Bovina (TBB).

En combinación las cuatro pruebas detectaron 89 muestras positivas y todas tuvieron concordancia positiva entre sí, que varió entre débil a moderada, según los índices de Kappa, con significancia estadística ( $p < 0,05$ ).

En cuanto a la eficiencia, cada método sobresalió por un parámetro diferente, siendo RT-PCR menos compleja y más rápida, los cultivos los más económicos comercialmente y de mayor certidumbre, aunque la Histopatología resultó con el mejor nivel de eficiencia combinado.

Se propone implementar un esquema que incluya los cuatro métodos (histopatológico, molecular, un cultivo en medio sólido y un cultivo en medio líquido), que permita detectar el número máximo de resultados positivos, en el menor tiempo posible y con alta certidumbre.

**Palabras Clave:** *Mycobacterium bovis*, RT-PCR, Histopatología, Stonebrink, BACTEC  
MGIT

## SUMMARY

In order to implement methods to shorten the time of growth and thus provide speed in issuing the results in the diagnosis of bovine tuberculosis were evaluated and compared the results obtained by the methods BACTEC MGIT 960, bacteriological culture amid Stonebrink (ST), polymerase chain reaction in real time (RT-PCR), and histopathology.

All work was performed in the Laboratory of mycobacteria at Subdepartment of Laboratories and Quarantine Station of the Agricultural and Livestock Service (SAG), following the protocols established by the Laboratory.

100 tissue samples obtained from bovine lymph nodes and / or organs with granulomatous lesions (LTG) were used.

The results showed that cultivation in the MGIT 960 system can shorten the growth of *Mycobacterium bovis* and the time required for diagnosis of bovine tuberculosis.

In combination, the four tests detected 89 positive samples and all had positive agreement among themselves, with significant ( $p < 0,05$ ) Kappa indexes which ranged from weak to middle values.

Regarding efficiency, each method excelled some parameter, with RT-PCR being less complex and faster, bacteriological culture were the cheapest, although histopathology had the highest combined efficiency.

These results support a diagnostic scheme that includes the four methods (histopathological, molecular, solid medium and a liquid medium) for achievement the maximum number of isolates, in the shortest time and with highest certainty.

Keywords: *Mycobacterium bovis*, RT-PCR, Histopathology, Stonebrink, BACTEC MGIT

## **1 Introducción.**

La tuberculosis bovina (TBB) es una zoonosis relevante que se puede diseminar a los seres humanos principalmente a través de la inhalación de aerosoles contaminados y por el consumo de productos lácteos sin pasteurizar. *Mycobacterium bovis* (*M. bovis*) es clasificado como un patógeno de riesgo 3 para la salud pública, es decir pertenece al grupo de agentes patógenos que provocan enfermedades humanas o animales graves, pero que existen medidas preventivas y terapéuticas eficaces para tratarlas. El control de la tuberculosis en los seres humanos por *M. bovis* depende de la erradicación de la enfermedad en el ganado y la fauna silvestre, y precisa de diagnóstico temprano.

En el año 2011 Chile reactivó el Plan Nacional de Control y Erradicación de la TBB con implementación de actividades de rastreo en predios y vigilancia en los mataderos más importantes del país. Las muestras de tejido se examinan en laboratorios del Servicio Agrícola y Ganadero (SAG) usando como pruebas de diagnóstico la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (RT-PCR), Histopatología y cultivo en medio sólido Stonebrink.

Con el objetivo de implementar métodos que disminuyan los tiempos de detección y por ende proporcionen rapidez en la obtención del resultado en el diagnóstico de TBB, se evaluaron y compararon los resultados registrados en el sistema BACTEC MGIT 960, con los obtenidos en cultivo bacteriológico, RT-PCR e Histopatología.

## 2 Revisión bibliográfica

### 2.1 Antecedentes

Aunque en el continente americano la tuberculosis zoonótica por *M. bovis* produce consecuencias secundarias de la enfermedad, datos disponibles confirman el hallazgo de que puede ser una causa importante de las muertes por tuberculosis entre los seres humanos en determinados grupos de población y contextos (Müller, 2013; De Kantor, 2008; Thoen, 2006). Según reporte del año 2011 emitido por la Organización Mundial de la Salud (OMS) sobre el control mundial de tuberculosis humana, se estima que durante el año 2010 se presentaron 1,45 millones de muertes por dicha infección y un total de 8,8 millones de casos nuevos (128 casos por cada 100.000 habitantes), de los cuales 264.000 tuvieron lugar en la región de las Américas (Castañeda *et al.*, 2012; Gyllen, 2014).

Estudios realizados en Chile, en bovinos lecheros, revelan una gran variabilidad de la frecuencia de la enfermedad a lo largo del país, con prevalencias animales que van desde el 23,6% en la zona central, hasta un 2,6% en zonas del sur del país (Mancilla, *et al.*, 2006; Hernández, 2012).

En informe del SAG, según la última clasificación predial, durante el periodo 2008-2013, se observó que de 12.217 predios clasificados, 560 predios están actualmente considerados como infectados (con y sin cuarentena), representado el 4,58 % a nivel país (SAG, 2013).

En los últimos años se ha tomado conciencia que para lograr la erradicación de la TBB, es importante mejorar la eficiencia de los métodos diagnósticos. Es así como se han desarrollado nuevos sistemas de diagnóstico e identificación que permiten reducir de una manera importante el tiempo para el reporte de los resultados, lo mismo que su sensibilidad y especificidad. La sensibilidad y especificidad de los distintos métodos de detección es variable y depende mucho de la experiencia de cada laboratorio en particular y de cómo los adapte a su rutina de trabajo. Los cultivos son las alternativas más sensibles aunque más lentas, mientras que las técnicas moleculares basadas en



amplificaciones genómicas tienen una sensibilidad menor que los cultivos pero son más rápidas (Dorronsoro y Torroba, 2007).

## 2.2 Las micobacterias

El orden de los Actinomycetales incluye la familia Mycobacteriaceae, Actinomycetaceae, Streptomycetaceae y Nocardiaceae. La familia Mycobacteriaceae contiene un solo género, el género *Mycobacterium*, en el que se han descrito más de 120 especies de micobacterias diferentes. Se caracterizan por ser bacilos ácido-alcohol resistente (BAAR) debido al alto contenido en lípidos que tienen en su pared celular. Las micobacterias son capaces de sobrevivir durante semanas o meses sobre objetos inanimados, siempre que estén protegidas de la luz solar, y son más resistentes a los ácidos, álcalis y desinfectantes que el resto de las bacterias no formadoras de esporas. Resisten la desecación y la congelación, pero la luz ultravioleta y el calor (>65° C durante 30 minutos) las inactivan (Dorronsoro y Torroba, 2007).

Las micobacterias se consideran de distribución mundial, causan enfermedad en mamíferos, aves, reptiles, anfibios y peces (Soler *et al.*, 2009).

El complejo *M. tuberculosis* incluye especies de micobacterias que son agentes causantes de la tuberculosis humana y animal. Incluye *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum*, *M. microti*, *M. canettii*, *M. caprae* y *M. pinnipedii* (Collins, 2001). La tuberculosis bovina (TBB, causada por *M. bovis*), y la tuberculosis humana (TB, causada por *M. tuberculosis*) son enfermedades caracterizadas por el desarrollo progresivo de lesiones granulomatosas específicas o tubérculos en el tejido pulmonar, los nódulos linfáticos u otros órganos. La tuberculosis provocada por *M. bovis* es una enfermedad de casi todos los animales de sangre caliente, incluyendo el ser humano. La TBB es, pues, una zoonosis y puede transmitirse a los humanos a través de la inhalación de aerosoles, y el consumo de leche sin pasteurizar. (Collins, 2011; Collins, 2001; Jenkins *et al.*, 2011).

La importancia económica asociada a la enfermedad bovina se basa en las pérdidas directas derivadas de la muerte de los animales, la reducción de la ganancia de peso,

disminución de la producción de leche y la eliminación temprana de la cría de animales de alto valor (Menzies y Neill, 2000).

## **2.3 Diagnóstico de la TBB**

### **2.3.1 Diagnóstico *ante-mortem***

Se basa en los signos clínicos, prueba de hipersensibilidad retardada (o prueba de tuberculina), cultivo y tinciones ácido alcohol resistentes en muestras de fluidos o biopsias de órganos animales (Soler *et al.*, 2009).

#### **2.3.1.1 Prueba de la tuberculina**

Esta es la prueba prescrita para el comercio internacional que implica la inyección intradérmica de un derivado proteico purificado (PPD) de tuberculina bovina y la posterior detección de inflamación (hipersensibilidad retardada) en el punto de inyección 72 horas después (OIE, 2012). Esto puede realizarse utilizando solo tuberculina bovina o como prueba comparativa utilizando tuberculinas aviar y bovina. La prueba de la tuberculina se suele realizar en la parte media del cuello, pero también puede llevarse a cabo en el pliegue caudal de la cola (OIE, 2012).

La prueba intradérmica comparativa de la tuberculina se utiliza para diferenciar entre animales infectados con *M. bovis* y los que responden a la tuberculina bovina como consecuencia de una exposición a otras micobacterias. (OIE, 2012).

#### **2.3.1.2 Frotis directos y técnicas de tinción**

Tienen por objeto, poder visualizar en el microscopio la presencia o no de bacilos ácidos alcohol resistentes (BAAR) en las muestras clínicas y en las obtenidas *post-mortem*. Actualmente siguen constituyendo la forma más rápida y económica para diagnosticar la TB, aunque se consideran técnicas complementarias en vista de sus deficiencias en sensibilidad y especificidad. (Madigan, 2012)

## **2.3.2 Diagnóstico *post-mortem***

### **2.3.2.1 Histopatología**

La infección por micobacterias se puede diagnosticar con un examen histopatológico de muestras de tejido. *M. bovis* en el ganado causa cambios celulares característicos en los tejidos que se pueden identificar con tinción de hematoxilina y eosina (H y E). Se ha encontrado correlación del 94 % entre el uso de la Histopatología y el cultivo para el diagnóstico de la infección por *M. bovis* en el ganado (Johnson *et al.*, 2007; Madigan, 2012). Una debilidad de este método es que otras bacterias o micobacterias pueden inducir lesiones similares a las provocadas por la TBB, y una infección por *M. bovis* en otros animales, puede no causar los mismos cambios celulares como los observados en el ganado que hacen más difícil el diagnóstico (Johnson *et al.*, 2007; Madigan, 2012).

### **2.3.2.2 Cultivo**

El cultivo de micobacterias puede dar más información sobre la infección por micobacterias que un frotis directo o la Histopatología.

#### **Medios de Cultivo**

Tradicionalmente se han utilizado tres tipos distintos de medios de cultivo: los basados en huevo: Lowenstein-Jensen (LJ), ST y Ogawa; los basados en agar: Middlebrook 7H10 y 7H11; y los líquidos: Middlebrook 7H9 y 7H12. El crecimiento de micobacterias tuberculosas (MTBC) en los medios basados en agar es más rápido que en los basados en huevo, pero estos últimos tienden a ser más sensibles. El crecimiento en los medios líquidos es más rápido que en los sólidos, normalmente se utiliza una combinación de medios de cultivo líquido y sólido (López, *et al.*, 2011; Robledo *et al.*, 2011).

El cultivo en medio sólido tiene la ventaja que puede proporcionar información preliminar sobre las especies de micobacterias de crecimiento, antes de llevar a cabo las pruebas bioquímicas o moleculares. Las micobacterias tuberculosas (MTB) crecen sólo

cuando se incuban a  $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ , mientras que otras micobacterias pueden crecer a diferentes temperaturas. La adición de piruvato al medio LJ ( LJP ) soportará el crecimiento de *M. bovis* , mientras que la adición de glicerol al medio LJ ( LJG ) permite el crecimiento de *M. tuberculosis* pero inhiben el crecimiento de *M. bovis* (Keating *et al.*, 2005).

Algunos estudios han demostrado que los sistemas de cultivo líquidos tienen algunas ventajas, por tener un tiempo más corto para la detección y mayor tasa de recuperación de micobacterias en comparación con los de cultivos sólidos (Hines *et al.*, 2006). Esta diferencia puede ser debido al enriquecimiento adicional de los medios de cultivo líquidos o la capacidad de las bacterias dentro de un medio líquido para difundir y acceder a todos los nutrientes, mientras que en medios sólidos las bacterias están limitadas a los nutrientes vecinos a las colonias. Las desventajas de los sistemas de cultivo líquidos son el alto costo y la necesidad de equipo especializado para supervisar los cultivos (Hines *et al.*, 2006).

Debido a la baja tasa de crecimiento de *M. bovis*, el medio de cultivo puede llegar a ser cubierto de bacterias y hongos que contaminan si están presentes en el inóculo; para evitarlo, las muestras para cultivo deben ser descontaminadas antes de la inoculación (Madigan, 2012). El método de descontaminación se basa en que la pared celular de las micobacterias les confiere relativa resistencia a los biocidas. El descontaminante de elección debe tener capacidad de controlar los microorganismos contaminantes (se acepta una tasa de contaminación de 2-10 %) y asegurar que sobrevivan suficientes micobacterias que se propaguen en el cultivo. Diferentes estudios de protocolos de descontaminación han demostrado que ácido oxálico al 5 % es un método adecuado para el cultivo de *M. bovis* (Madigan, 2012).

### **Sistema BACTEC 460**

Es un sistema de cultivo líquido semi - automatizado para la detección del crecimiento de micobacterias. Permite inocular las micobacterias en un medio líquido que contiene un intermediario metabólico como el ácido palmítico marcado con C14 (ácido palmítico

1-C14). Las micobacterias al utilizar dicho metabolito para su crecimiento, producen  $C^{14}O_2$  libre, por encima de la fase líquida del cultivo en un sistema de cámara iónica (Rishi, *et al.*, 2007).

Con este sistema pueden detectarse muestras positivas en un período de 7 a 18 días, en comparación con 25 días de los métodos estándar. También recupera el 91% de los aislamientos totales frente a un 73% de recuperación del medio (LJ). Al igual recupera micobacterias no tuberculosas (MNT) en muestras positivas y negativas (100% vs. 83%). Es un método rápido, sensible, eficiente para el aislamiento y diferenciación de las micobacterias, encontrándose altas tasas de aislamiento. Presenta limitaciones, como la posibilidad de transmisión de las micobacterias por escape de aerosoles debido al aumento de la presión de gas en los frascos de cultivo, las necesidades de mano de obra relacionados con la carga y descarga de botellas de muestra de la incubadora a un instrumento semi - automatizado, almacenamiento y eliminación de material radiactivo y para el seguimiento del crecimiento. (Cruciani *et al.*, 2004, Scarparo *et al.*, 2004).

### **Sistema MGIT**

El sistema denominado Mycobacterial Growth Indicator Tube (MGIT), es un tubo con medio líquido (Middlebrook 7H9), el cual tiene como característica tener adherida una resina en el fondo del tubo, que tiene la capacidad de fluorescer bajo la luz ultravioleta (365 nm), cuando disminuye la tensión de oxígeno en el medio, al ser éste consumido por la micobacteria cuando está en proceso de crecimiento (Fadzilah *et al.*, 2009). En este sistema, el tiempo promedio para la detección es de aproximadamente 13 días, no utiliza elementos radioactivos y podría utilizarse en un formato manual o un formato automatizado, dependiendo del volumen de muestras de los laboratorios. Su sensibilidad y especificidad es del 84,0%, y 94,1% respectivamente. Su desventaja es que por ser un medio de cultivo líquido requiere de un subcultivo en un medio sólido, para poder realizar las pruebas de identificación y de sensibilidad posteriormente (Fadzilah *et al.*, 2009).

### **BACTEC MGIT 960**

Es un sistema de cultivo líquido que utiliza un equipo totalmente automatizado, con capacidad para 960 muestras. Existen otros equipos con capacidad para menor número de muestras (Ejemplo: BACTEC MGIT 320).

El equipo supervisa continuamente el crecimiento en los tubos, tiene alta capacidad y utiliza una fluorescencia no radioactiva. Los tubos de cultivo contienen un sensor fluorescente que responde a la concentración de oxígeno en el medio a través de un fotodetector que mide la fluorescencia cada 60 minutos. Los niveles de fluorescencia corresponden al aumento de oxígeno consumido por el organismo en el inóculo y es proporcional al número de bacterias presentes (Hines, 2006; Pfyffer et al., 1997).

La tasa de recuperación de MTB es del 96,4%. El tiempo promedio para la detección de *M. tuberculosis* en frotis positivos fue 12,6 días, para extendidos negativos fue de 15,8 días. Es un sistema mucho más rápido para la recuperación de muestras negativas y es una buena alternativa para no utilizar medios radioactivos. Un estudio en Iowa ha demostrado que el sistema MGIT 960 es capaz de detectar *M. bovis* a partir de tejidos de nódulos linfáticos bovinos (Hines et al., 2006; Garrigó et al., 2007).

#### **2.3.2.3 Métodos Moleculares**

Estas técnicas están basadas en la amplificación del genoma de las micobacterias para desarrollar un diagnóstico rápido de la infección. Su sensibilidad varía entre el 9 y el 100% y su especificidad entre el 25% y 100%, dependiendo de diversos factores, como los oligonucleótidos iniciadores usados, el tipo de muestra, los métodos utilizados para la extracción de DNA, los métodos y protocolos para la amplificación y detección de los productos y la experiencia del laboratorio (Collins, 2011).

#### **PCR en tiempo real, RT-PCR, PCR cuantitativa, (qPCR)**

Una versión cuantitativa del IS *1081* PCR ha sido desarrollada para la comparación de las copias de genomas CMTB recuperados de diferentes muestras. RT-PCR requiere un

termociclador especializado que incluye una fuente de luz de excitación y un registrador de la salida de la señal fluorescente generada en cada ciclo de PCR. Los reactivos de una RT-PCR son similares a una PCR estándar, pero también requieren la inclusión de un emisor de fluorescencia ([Angela et al., 2006](#)).

### **3 Hipótesis**

El sistema de cultivo líquido BACTEC MGIT 960 presenta ventajas en la detección de *M. bovis*, cuando se compara con los métodos RT-PCR, Histopatología y cultivo en medio Stonebrink, realizados a partir de muestras de tejidos bovinos con lesiones granulomatosas.



## **4 Objetivos**

### **4.1 Objetivo general**

Implementar un método que acorte tiempo de detección y favorezca la rapidez en la emisión del resultado en el diagnóstico de TBB.

### **4.2 Objetivos específicos**

- Determinar la velocidad del crecimiento de *M. bovis* en el sistema BACTEC MGIT 960, a partir de muestras con lesiones granulomatosas.
- Establecer la concordancia estadística de los resultados obtenidos en el sistema BACTEC MGIT 960, con el cultivo en medio Stonebrink Histopatología y RT-PCR.
- Comparar la eficiencia de los métodos BACTEC MGIT 960, cultivo en medio Stonebrink, Histopatología y RT-PCR utilizados para el diagnóstico de *M bovis*.

## 5 Materiales y Métodos

El trabajo se realizó en el Laboratorio de Micobacterias del Subdepartamento Laboratorios y Estación Cuarentenaria Pecuaria Lo Aguirre del Servicio Agrícola y Ganadero, siguiendo los protocolos establecidos por el laboratorio.

### 5.1 Muestras

Se utilizaron nódulos linfáticos y/u órganos con lesiones del tipo granulomatosas (LTG) de bovinos con lesiones visibles en la inspección *post-mortem* en plantas faenadoras. Estas muestras fueron obtenidas dentro de las actividades de seguimiento y vigilancia incluidas dentro del Plan Nacional De Control y Erradicación De la TBB.

Considerando la disponibilidad de recursos técnicos del laboratorio SAG, se procesaron 100 muestras por los cuatro métodos diagnósticos: RT-PCR, Histopatología, cultivo convencional en medio solido de ST y sistema líquido BACTEC MGIT 960.

### 5.2 Método

#### 5.2.1 Procesamiento y descontaminación de los tejidos

Para el procesamiento se siguió el procedimiento estandarizado por el laboratorio del SAG, para la descontaminación se aplicó la metodología Australiana con ácido oxálico 5% (Madigan, 2012; Flynn, 2001).

- En gabinete de bioseguridad se depositó la muestra en una placa de Petri estéril.
- Mediante el uso de un bisturí se seleccionaron entre 5 y 10 g. de tejido con lesiones granulomatosas aparentes (caseo-necrosis, consistencia calcificada u otro) y tejido sano adyacente, que luego se cortó finamente para facilitar su homogeneización.
- Para la homogeneización el tejido seleccionado se depositó dentro de una bolsa de Stomacher y se agregó 10 mL de agua destilada estéril (ADE)

- La muestra se homogenizó durante 2 minutos a 300 rpm de velocidad.
- Se tomaron 5 mL de la suspensión y se depositaron en tubo de 15 mL, se agregaron 2,5 mL de solución de ácido oxálico 5%. La mezcla se homogenizó periódicamente durante 20 min a temperatura ambiente.
- Se agregó a la mezcla 10 mL de solución salina estéril y homogenizó manualmente
- Se centrifugó la mezcla a 2750 g durante 10 minutos. Eliminó el sobrenadante y se procedió a la siembra del inóculo.

### 5.2.2 Siembra y cultivo de la muestra

#### **Cultivo en medio sólido.**

- Después de eliminar el sobrenadante, con hisopo estéril se inoculó parte del sedimento en un tubo con medio ST, se incubó a 37°C. Los tubos se observaron semanalmente y se descartaron a los 60 días de no haber desarrollo de colonias sospechosas a *Mycobacterium*.

#### **Cultivo en medio líquido.**

- Se agregó 0,5 mL del sedimento a un tubo MGIT, que contenía 0,8 mL de medio líquido 7H9 modificado con suplemento de crecimiento OADC (ácido oleico, albúmina, dextrosa, catalasa, estearato de polioxietileno) y PANTA (polimixina B, azlocilina, ácido nalidíxico, trimetoprima, anfotericina). Los tubos se depositaron en el instrumento BACTEC MGIT 960. El equipo leyó cada tubo cada hora, durante 7 semanas.
- Cuando el BACTEC-MGIT 960 indicó que un tubo se había convertido en positivo, por la detección de fluorescencia, el contenido del tubo se homogenizó, unas pocas gotas se colocaron en un portaobjetos de vidrio y se realizó la tinción de Kinyoun para identificar BAAR. (López, 2011; Robledo, 2011).

- Paralelamente se usó parte del inóculo para su siembra en medio de ST, y se incubó a 37°C.

### 5.2.3 RT-PCR a partir de tejidos con lesiones granulomatosas

#### Extracción de DNA genómico

- Para la extracción de DNA se utilizó el kit High pure PCR template preparation kit Roche®, siguiendo las indicaciones del productor.
- En los límites de la lesión se tomaron 50 mg aproximadamente de tejido, que se transfirieron a un microtubo con perlas de zirconia (Biospec Products, Inc) de 0,1 µm y 1 µm. Se adicionaron 200 µL buffer de lisis y 40 µL proteinasa k, se homogenizó en el equipo disruptor celular (Biospec products Inc) por 3 minutos a 3000 rpm.
- La pureza y cantidad de DNA se midió a través del espectrofotómetro Nanodrop 1000.

#### Procedimiento de RT-PCR

- Se utilizó el equipo Apply Biosystem 7500 Fast.

#### Preparación Del Kit

- Se utilizó el kit BoviMan® que contiene oligonucleótidos, sondas, control interno (CI) y control positivo, está específicamente adaptado para PCR con sondas de hidrólisis marcadas dualmente para la identificación de *M. bovis*. Un fragmento de DNA de *M. bovis* se amplifica con oligonucleótidos específicos. El producto de PCR así generado es detectado por fluorescencia usando una sonda de hidrólisis marcada dualmente detectable en el canal de 510 nm (FAM). Esta versión del kit incluye en la mezcla de PCR un fragmento de DNA sintético como CI, el cual corresponde a un fragmento del genoma de *Bos taurus*. El CI

se diseñó para asegurar la calidad del DNA extraído a partir de la muestra biológica, minimizando el efecto sobre la eficiencia de la reacción de PCR blanco (*M. bovis*). El amplicón se detectó por la medición de fluorescencia usando una sonda de hidrólisis específica detectable en el canal de 580 nm (VIC para ABI) El kit de PCR tiempo real BoviMan® se mantuvo a temperatura ambiente.

- Los tubos se centrifugaron por 30 s a 12000 rpm, antes de abrirlos.
- Se disolvió la mezcla de oligonucleótidos, sondas y CI (BoviMan® P&P) con 100 µL de agua para PCR. Se guardó refrigerado a 4°C.
- Se disolvió el control positivo [BoviMan®Positive Control (+)] con 100 µL de agua para PCR. Para Obtener una concentración final de  $10^8$  copias/µL, se procedió con diluciones seriadas en base 10 (ej: 2 µL de stock  $10^8$  copias/µL + 18 µL agua =  $10^7$  copias/µL y así sucesivamente). Esta solución se almacenó en oscuridad a 4°C hasta por un mes.
- Para construir la curva de calibración se utilizó como control positivo una dilución que contenía  $10^3$  copias/µL.
- Se preparó la misma mezcla para todas las muestras. Para validar la corrida, se incluyó muestra control negativo (agua) y un control positivo, además de un control del proceso de extracción.

### **Programa de PCR**

- Activación: 95 °C/600 segundos
- Amplificación: 45 ciclos
- Desnaturación: 95 °C/15 segundos
- Apareamiento/extensión: 95 °C/60 segundos

### **Límite de detección**

- El límite de detección se determinó usando un fragmento de DNA sintético de *M. bovis*. La PCR se llevó a cabo según lo descrito. Una dilución se consideró positiva si la fluorescencia relativa cruzó el umbral establecido por el sistema de detección del programa.

#### **5.2.4 Histopatología**

Las muestras negativas a RT-PCR; ya fijadas en formalina tamponada al 10 %, se enviaron al laboratorio de Patología, donde fueron incluidas en parafina utilizando un equipo LEICA TP1020 con bomba de vacío y centro de inclusión THERMO SCIENTIFIC MICROM EC 350-1 EC 350-2.

De cada bloque de parafina se obtuvieron dos cortes de 5 micras de espesor utilizando un micrótopo rotatorio LEICA RM 2145, para posterior tinción con H y E y ZN. Las preparaciones fueron examinadas para detectar lesiones compatibles de TBB y la presencia de BAAR.

Las muestras positivas a RT-PCR; ya fijadas en formalina tamponada al 10%, que no entraron en la rutina de trabajo del Laboratorio de Patología del complejo Lo Aguirre del SAG, fueron laminadas e incluidas en parafina. El proceso de corte y tinción se realizó en el Laboratorio de Histopatología del Departamento de Patología Animal de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad de Chile, teñidas con H y E y ZN, para detectar lesiones compatibles de TBB y la presencia de BAAR.

### **5.3 Análisis estadístico de resultados**

#### **5.3.1 Tiempo de crecimiento de *M. bovis***

Los datos fueron analizados con el programa estadístico SPSS<sup>®</sup>. Los resultados fueron interpretados con pruebas de estadística descriptiva. Se realizó una prueba T para comparación de medias de muestras relacionadas con el fin de analizar la velocidad de crecimiento y el tiempo de detección en medio sólido, y en medio líquido. Se utilizó la prueba de McNemar para determinar la significancia estadística de los resultados.

### 5.3.2 Histopatología

Se consideró lesión COMPATIBLE de tuberculosis cuando presentó lesiones de TBB y en la tinción de ZN se observó uno o más bacilos en el tejido analizado, Se consideró lesión SUGERENTE de tuberculosis cuando presentó lesiones de TBB y en la tinción ZN no se observó bacilos.

De los resultados anteriores y para efectos del análisis estadístico, se consideró POSITIVO cuando el resultado emitido por Histopatología fue COMPATIBLE o SUGERENTE, y negativo en ausencia de estos eventos.

### 5.3.3 Concordancia entre pruebas

Como prueba de oro para el análisis, se consideró el cultivo ST. Para evaluar los resultados se utilizó el índice de Kappa, que determina la fuerza de concordancia o grado de acuerdo entre los métodos de laboratorio evaluados a través del cálculo del coeficiente de Cohen's Kappa ( $k$ ), siguiendo la ecuación:

---

Clásicamente la fuerza de concordancia según el índice de Kappa, se interpreta como se describe en la siguiente tabla (Cortés *et al.*, 2010; Estrada *et al.*, 2004):

Tabla 1. Interpretación de Índice de Kappa

0	No acuerdo
0.0-0.2	Insignificante
0.2-0.4	Bajo
0.4-0.6	Moderado
0.6-0.8	Bueno
0.8-1.0	Muy bueno

Fuente: Cortés *et al.*, 2010.

### 5.3.4 Análisis de la eficiencia

Para valorar la eficiencia de cada prueba, se tuvieron en cuenta los parámetros costo (valor comercial de cada prueba), rapidez (tiempo requerido para la emisión del diagnóstico) y complejidad (horas dedicadas por persona).

Para calificar los parámetros de costo, rapidez, y complejidad, y con el fin de mantener la mayor objetividad al asignar los valores, se asignó un puntaje entre 0 y 10, utilizando como función de asignación una recta definida por dos puntos, dada por la siguiente ecuación:

$$y = \frac{(x - x_{\text{m}})(y_{\text{M}} - y_{\text{m}})}{x_{\text{M}} - x_{\text{m}}}$$

Dónde:

$y$  = Puntaje obtenido por el parámetro después de aplicar la fórmula

$x$  = Valor cuantitativo del parámetro (Ej.: 8 horas persona)

$x_{\text{M}}$  = Valor menos eficiente dentro de los datos del parámetro

$x_{\text{m}}$  = Valor más eficiente dentro de los datos del parámetro

$y_{\text{M}}$  = Puntaje asignado al valor más eficiente del parámetro, en este caso corresponde a 10 puntos.

$y_{\text{m}}$  = Puntaje asignado al valor menos eficiente dentro de los datos del parámetro, en este caso corresponde a 0 puntos.

De esta manera la función asigna 10 puntos al valor más eficiente y disminuye linealmente hasta asignar 0 puntos al valor menos eficiente, como muestra el siguiente gráfico.



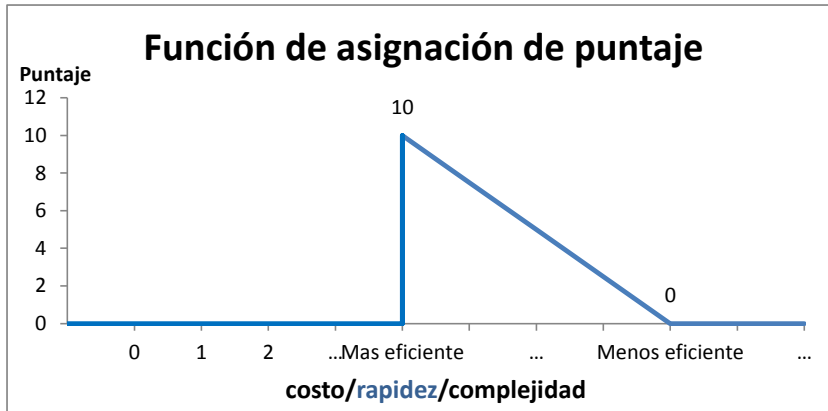


Figura 1. Recta de Asignación de puntaje para los parámetros de eficiencia

## 6 Resultados

### 6.1 Resultados obtenidos por cada muestra

En general de las 100 muestras analizadas, 28 fueron positivas a los 4 métodos, 27 positivas a 3 métodos, 20 a dos métodos, 14 a por lo menos un método y 11 a ninguno. Es decir en combinación los cuatro métodos pudieron detectar 89 muestras positivas a *M. bovis* (ANEXO 1).

Dos casos, los correspondientes a las muestras 25 y 26 fueron retirados del análisis estadístico de resultados, porque las contramuestras no ingresaron al laboratorio de Histopatología.

La Tabla 2 resume los resultados obtenidos con cada uno de los métodos evaluados.

**Tabla 2. Resultados obtenidos de las muestras sospechosas a TBB, con cada uno de los métodos evaluados**

	RT-PCR		HISTOPATOLOGÍA		STONEBRINK		BACTEC MGIT	
	Nº	Tasa de detección (%)	Nº	Tasa de detección (%)	Nº	Tasa de detección (%)	Nº	Tasa de detección (%)
POSITIVO	39	40	81	82,7	67	68,4	57	58,2
NEGATIVO	59	60	17	17,3	29	29,6	41	41,8
					*2 (cont.)	2,0		
Total	98	100,0	98	100,0	98	100,0	98	100,0

\* contaminado en el cultivo

Los resultados que emitió Histopatología fueron; compatibles con TBB, sugerentes de TBB, otro agente o sin lesión (Tabla 3), posteriormente se clasificaron como negativo o positivo para el análisis de los resultados.

**Tabla 3. Resultados de las muestras sospechosas a TBB, por la técnica de Histopatológica**

	Nº	Tasa de detección
COMPATIBLE CON TBB	53	54,1
SUGERENTE A TBB	28	28,6
SIN LESION	9	9,2
OTRO AGENTE	8	8,2
Total	98	100,0

## 6.2 Velocidad de crecimiento de *M. bovis*, en ST y BACTEC MGIT 960

En la Tabla 4 se muestran los tiempos requeridos para el diagnóstico con ambos métodos. Según McNemar, los resultados variaron significativamente entre ambas pruebas ( $p < 0,05$ ).

**Tabla 4. Tiempo promedio de crecimiento de *M. bovis*, en ST y BACTEC MGIT 960**

DIAS CRECIMIENTO	Nº	MÍNIMO	MÁXIMO	MEDIA	D.T*
MGIT 960	57	7,00	39,00	20,83	7,82
STONEBRINK	69	7,00	60,00	30,27	12,16

p : 0,00001

\*DT: Desviación Típica

### 6.3 Concordancia entre los métodos de laboratorio evaluados.

Al realizar test de Kappa para determinar el acuerdo entre pruebas, se obtuvieron los resultados que se presentan en la Tabla 5

**Tabla 5. Resultados del test de kappa entre pruebas.**

*	STONEBRIN	HISTOPATOLOGIA	RT-PCR	MGIT
ST	1	N.A	N.A	N.A
HISTOPATOLOGIA	0,44	1	N.A	N.A
RT-PCR	0,24	0,24	1	N.A
BACTEC MGIT	0,4	0,3	0,32	1

\* en las columnas la prueba de oro, en las filas la prueba que se está evaluando

\*\* N.A: No aplica

### 6.4 Coloración de Kinyoun a partir de los tubos BACTEC MGIT positivos.

A partir de los 57 tubos BACTEC MGIT positivos, con la coloración de Kinyoun se identificaron BAAR en 45 (79%) con un promedio de 1,2 bacilos observados por muestra analizada.

### 6.5 Subcultivo en medio ST a partir de los tubos BACTEC MGIT positivos.

La recuperación de las cepas desde muestras BACTEC MGIT positivos por subcultivos en medio solido ST, se logró en 45 de 57 tubos (79%).

Al realizar test de concordancia entre los resultados obtenidos con la coloración de Kinyoun y el crecimiento en los subcultivos en medio sólido, se encontró un acuerdo débil con valor de  $k = 0,05$ , que no fue estadísticamente significativo ( $p > 0,05$ )

## 6.6 Parámetros de eficiencia

La **Tabla 6** revela las calificaciones obtenidas por cada uno de los parámetros de eficiencia (costo, rapidez y complejidad) en cada método de laboratorio evaluado, utilizando la ecuación de la recta descrita en material y métodos.

**Tabla 6. Calificaciones (C) obtenidas por cada uno de los parámetros de eficiencia en los métodos de laboratorio evaluado**

Parámetros*		RT-PCR	HISTOPATOLOGÍA	ST	MGIT 960
COSTO	\$	42000	15660	14520	14520
	C**	0,0	9,6	10,0	10,0
RAPIDEZ	Días	2,0	4,0	31,0	21,0
	C	10,0	9,3	0,0	3,4
COMPLEJIDAD	Horas	8,0	15,0	40,0	40,0
	C	10,0	7,8	0,0	0,0
<b>CALIFICACIÓN TOTAL</b>		<b>20</b>	<b>27</b>	<b>10</b>	<b>13</b>

\* Costo = valor comercial de cada prueba  
 Rapidez = días en la emisión del resultado  
 Complejidad = horas de dedicación por persona

\*\* C = Calificación

## 7 Discusión

98 muestras se procesaron por los cuatro métodos diagnósticos: RT-PCR, Histopatología, cultivo convencional en medio solido ST y sistema líquido BACTEC MGIT 960, con el propósito de evaluar la eficiencia, y encontrar un método que disminuya el tiempo de detección y emisión de resultado de la TBB.

Como prueba de oro se utilizó el cultivo en medio solido ST, que es el método reconocido internacionalmente para el diagnóstico de TBB (OIE, 2012).

### 7.1 RT-PCR

En la rutina normal del laboratorio del SAG, cuando una muestra es positiva a RT-PCR, se emite el resultado y se cierra el caso. Las contramuestras negativas a RT-PCR se conservan fijadas en formalina tamponada al 10 % y son enviadas al Laboratorio de Patología. En el caso de esta investigación las 98 contramuestras se enviaron al Laboratorio de Patología para su respectivo análisis histopatológico.

La prueba de RT-PCR pudo detectar solamente el 48%, 51% y 54 % de los positivos identificados por Histopatología, ST, y BACTEC MGIT respectivamente.

Los análisis de concordancia mostraron concordancia baja entre RT-PCR y los demás métodos de diagnóstico evaluados en esta investigación.

Los resultados anteriores difieren con los encontrados en un estudio realizado en 2012 en Chile, en donde se encontró una concordancia moderada ( $k= 0,507$ ), cuando se compararon los resultados encontrados con RT-PCR y las lesiones compatibles a la Histopatología (Larenas, 2012). Estudios realizados anteriormente en México (Estrada *et al.*, 2004), encontraron también concordancia moderada ( $k= 0,44$ ), al comparar los resultados de Histopatología con una PCR simple, teniendo que desarrollar una técnica con PCR anidada para mejorar la sensibilidad.

Las bajas tasas de detección de RT-PCR, y las bajas concordancias con las demás pruebas puede deberse a la escasa cantidad de bacilos en las muestras o a la capacidad del método de detección de ADN, pudiendo ser necesario ajustar la prueba o en último caso implementar una técnica molecular que sea más sensible.

En cuanto a los parámetros de eficiencia, RT-PCR mostró ser la segunda prueba más eficiente, siendo la más rápida y menos compleja, a pesar de ser la más costosa (Tabla 6).

Es importante destacar que de los 38 positivos detectados por RT-PCR, 34 fueron confirmados por ST, situación que sugiere mantener la aplicación de esta técnica y optimizarla, ya que mientras RT-PCR tardó 8 horas en emitir dicho resultado, ST tardó hasta 60 días (con un promedio de 30 días). La especificidad y eficiencia de la prueba RT-PCR, pueden contribuir positivamente con la rapidez del diagnóstico y el éxito del programa de control y erradicación de la TBB.

## **7.2 Histopatología**

La técnica de Histopatología pudo detectar lesiones sugerentes de TBB en casi todas las muestras que dieron positivas por alguna de las otras pruebas, revelando la importancia de este método en el diagnóstico. Solamente dos muestras detectadas por ST y por BACTEC, no mostraron lesiones histopatológicas diagnósticas.

De las 98 muestras analizadas por Histopatología con la tinción de H y E, se detectaron 81 (82%) con lesiones sugerentes de micobacterias. Estos resultados son coincidentes con los descritos previamente en el sur de Chile, ([Larenas, 2012](#); [Araya, 2007](#)) en que se incluyeron muestras con lesiones macroscópicas provenientes de mataderos y se encontró que el 81,4% y el 84,6% presentaron respectivamente, lesiones características granulomatosas sugerentes de TBB.

La característica microscópica más frecuentemente observada en las muestras analizadas, fue la lesión de tipo nodular con extensas zonas de necrosis, calcificación central, rodeada por numerosas células gigantes de Langhans, y células inflamatorias

de tipo mononuclear (macrófagos y linfocitos). Cuando se encontró una lesión de este tipo, se identificó como un granuloma tuberculoso.

En cuanto ZN, dicha tinción permitió que de las 81 muestras con lesiones sospechosas de TBB, en 53 (65%) se pudieran observar BAAR, resultados coincidentes con lo reportado en trabajos previos, en donde se estima que ZN, es capaz de confirmar aproximadamente el 70% de lesiones compatibles con TBB detectadas por Histopatología (Estrada *et al.*, 2004).

Se destaca la concordancia positiva entre la Histopatología y las pruebas destinadas a la detección del agente biológico.

En cuanto a los parámetros de eficiencia; Histopatología mostró ser la prueba más eficiente, siendo la segunda en economía, rapidez y complejidad (Tabla 6).

En resumen la concordancia de Histopatología con la prueba de oro ( $k = 0,4$ ), la alta tasa de detección de positivos y la eficiencia, sugieren esta técnica como un método útil para apoyar otras pruebas de diagnóstico de TBB, para el diagnóstico en zonas de alta prevalencia y como prueba fundamental en programas de Control y erradicación.

### **7.3 Cultivo en medio solido Stonebrink (ST)**

En esta investigación, el cultivo en medio solido ST, fue utilizado como prueba de oro para evaluar las otras técnicas, ya que es la prueba reconocida internacionalmente como estándar para el diagnóstico de TBB (OIE, 2012).

En un promedio de 30,2 días ST pudo detectar *M. bovis* en 67 (68,4%) de las muestras incluidas en el estudio, en 29 no hubo crecimiento bacteriano y dos tubos presentaron contaminación en la segunda semana. Estos resultados coinciden con lo reportado por otros autores que afirman que aproximadamente un 70% de las muestras provenientes de lesiones granulomatosas macroscópicas, son positivas a *M. bovis* cuando se cultivan en medio sólido (Araya, 2007; Madigan, 2012).



La tasa de contaminación del 2%, con el método del ácido oxálico (AO), fue considerada como aceptable, ya que la literatura reporta valores tolerables del 2-10% (Madigan, 2012), sin embargo, podrían evaluarse otros métodos de descontaminación, que mantengan la baja probabilidad de contaminación y favorezcan la viabilidad de la bacteria.

ST confirmó el 87 %, 78% y 84% de los positivos identificados por RT-PCR, Histopatología, y BACTEC MGIT respectivamente y detectó *M.bovis* en un porcentaje importante de falsos negativos reportados por RT-PCR y BACTEC MGIT (57% y 49% respectivamente); resultados coincidentes con los trabajos realizados que destacan los medios de cultivos solidos como específicos y sensibles para el diagnóstico de *M. bovis* (Latini et al., 1997). ST permitió la recuperación de bacterias en 33 muestras negativas a RT-PCR, lo que indica que el medio puede proporcionar los requerimientos suficientes para el diagnóstico de la infección aunque haya una cantidad de bacilos escasa.

Al comparar los resultados de la concordancia (Tabla 5) con lo reportado por Araya en 2007, se encuentran coincidencias y diferencias. En dicho estudio se encontró una concordancia débil entre el Cultivo y RT-PCR ( $k = 0,37$ ), coincidente con este estudio, pero al comparar el cultivo con la Histopatología, Araya encontró una concordancia excelente ( $k = 0,97$ ), mientras que la concordancia en este estudio fue moderada ( $k = 0,4$ ).

Los resultados de concordancia entre el Cultivo en medio sólido y la Histopatología, encontrados en este estudio, coinciden con lo reportado por otros autores (Estrada et al., 2004), al determinar una buena concordancia entre ambos (valor de Cohen's Kappa,  $k = 0.52$ )

En cuanto a los parámetros de eficiencia, el cultivo en medio solido ST, mostró ser la prueba menos eficiente, teniendo el tiempo de respuesta más prolongado, (menos rápida), y tan compleja como BACTEC MGIT. Por ello es importante que se complemente con alguna(s) de las otras pruebas.

#### 7.4 Cultivo en sistema BACTEC MGIT 960

En esta investigación, se evaluó el sistema de cultivo líquido automatizado BACTEC MGIT 960 con el fin de determinar si este sistema puede favorecer la detección de *M. bovis* a partir de tejidos bovinos con lesiones granulomatosas.

Este método detectó el agente en el 58% de las muestras analizadas, y no se registró contaminación en ninguna de ellas.

La mayoría de las muestras que indicaron crecimiento lo hicieron en las tres primeras semanas, con un promedio de 20,8 días; en un rango de 7 – 39 días (Tabla 4), promedio casi 5 días más (20,8 v/s 15,5) a lo reportado en la literatura, (Hines et al., 2006; Madigan, 2012). Por lo tanto el desempeño de la técnica podría mejorar si se ajustan algunas variables como cantidad de inóculo y cantidad de suplemento. Trabajos publicados anteriormente han demostrado que el MGIT 960 comparado con los sistemas de cultivo sólidos favorece el crecimiento de *M. tuberculosis* a partir de muestras clínicas humanas, pero poco se sabe del comportamiento de BACTEC MGIT con *M. bovis* a partir de muestras de tejido de la especie bovina, situación que podría explicar las diferencias observadas.

Sin embargo, es importante destacar que el tiempo promedio de crecimiento fue casi de 10 días menos que con el medio ST, resultados que fueron estadísticamente significativos ( $p < 0,05$ ), y permiten alcanzar el objetivo general de la investigación que es el de implementar un método que acorte tiempo de detección y favorezca la rapidez en la emisión del resultado en el diagnóstico de TBB.

De los 57 positivos detectados por BACTEC MGIT, 93% y 84% fueron identificados por Histopatología y ST respectivamente, lo que confirma lo hallado en algunos estudios donde reportan que BACTEC MGIT permite el crecimiento hasta de 93,2 % de muestras positivas a TBB, en un tiempo menor que los medios sólidos (Madigan, 2012)

La concordancia con las otras técnicas fue en general moderada (Tabla 5), resultados que sugieren la complementariedad con otras pruebas.

En cuanto a los parámetros de eficiencia, BACTEC MGIT mostró ser más eficiente que el cultivo en medio sólido porque acorta el tiempo de detección *M. bovis* y con ello el tiempo de emisión de resultado, pero fue menos eficiente que RT-PCR e Histopatología, pues aunque es menos costosa, resulta tan compleja como ST. Adicionalmente BACTEC MGIT requiere confirmar el crecimiento con coloración de Kinyoun y subcultivos en medio sólido, para el diagnóstico definitivo de la infección.

Con la coloración de Kinyoun a partir de los 57 tubos MGIT positivos, se identificaron BAAR en 45 (79%), con un promedio de 1,3 bacilos por muestra. Valor muy superior al logrado cuando se realiza ZN directamente del tejido, lo que podría entenderse como mayor disponibilidad de la bacteria en el medio, que facilita su detección por técnicas de tinción; pero también puede pensarse en la calidad de la muestra que llega a patología, pues es posible que en el momento de la toma y envío se favorezca la muestra con lesiones para bacteriología y la que llega a patología no sea de igual calidad.

La recuperación de las colonias por subcultivos en medio sólido a partir de los 57 tubos MGIT positivos se logró en un 79% (45/57), valor favorable aunque distante de lo logrado por otros autores, que reportan recuperaciones del 94%. (Hines et al., 2006). La baja tasa de recuperación en los subcultivos podría explicarse por varias razones, entre ellas la pérdida de viabilidad de las micobacterias a través del tiempo, a través de los diferentes pasajes por los medios de cultivo, por el método de descontaminación y por la presencia de otras micobacterias.

Al realizar un test de concordancia entre los resultados con la coloración de Kinyoun y el crecimiento en los subcultivos en medio sólido, se encontró una concordancia baja ( $k = 0,05$ ), que no fue estadísticamente significativo ( $p > 0,05$ ). La concordancia baja también podría atribuirse a que los BAAR observados sean micobacterias diferentes a *M. bovis*.

### **Consideración final**

El sistema BACTEC MGIT demostró que puede acortar el tiempo para la detección de *M. bovis*, en aproximadamente 10 días con respecto al cultivo en medio sólido ST. Esto puede estar favorecido por el enriquecimiento adicional del medio de cultivo líquido con OADC y PANTA y/o la capacidad de las bacterias dentro de un medio líquido para acceder a todos los nutrientes mientras que con medios sólidos, las bacterias están limitadas a los nutrientes más próximos a la colonia. A pesar de lo anterior y de lo reportado por la literatura, la tasa de crecimiento de *M bovis* en BACTEC MGIT fue 12 % menos que en cultivo sólido ST, por lo que podría pensarse en ajustar algunas variables como cantidad de inóculo y cantidad de suplemento.

Las cuatro pruebas tuvieron concordancia positiva entre sí, que varió entre débil a moderada y en conjunto detectaron 89 muestras positivas. Quiere decir que en combinación aumentaron la sensibilidad de detección, ya que se obtuvieron resultados positivos por todos los métodos.

En cuanto a la eficiencia, cada método sobresalió por un parámetro diferente, siendo RT-PCR menos compleja y más rápida e Histopatología la más eficiente en general. Los cultivos aunque más económicos comercialmente, su costo aumenta al considerar que deben permanecer más de dos meses en incubación y las colonias deben ser confirmadas por PCR.

A pesar que el cultivo de *M. bovis* en medio ST, es la prueba de oro para el diagnóstico definitivo de TBB, puede mostrar resultados falsos negativos, posiblemente debido a efectos de los procesos de descontaminación o a la escasez de microorganismos viables o cultivables provenientes de lesiones crónicas. Esto demuestra que cada método puede aportar con la certidumbre y la eficiencia del diagnóstico de *M. bovis*; lo que sugiere la necesidad de implementar un esquema que incluya un método histopatológico, uno molecular, un cultivo en medio sólido y un cultivo en medio líquido para contribuir con la calidad y eficiencia del diagnóstico.

Se espera que los resultados de esta investigación contribuyan con la eficiencia del diagnóstico de la TBB, y con el perfeccionamiento del Plan Nacional de control y erradicación de la TBB del SAG. Contar con un resultado veraz en el menor tiempo posible, permite detectar animales positivos a TBB oportunamente e instaurar medidas de control que van a favorecer tanto la sanidad animal como la salud pública.

## 8 Conclusiones

- El cultivo en el sistema BACTE MGIT 960 es un método que puede disminuir el tiempo de detección de *M. bovis* y aumentar la rapidez en la emisión del resultado en el diagnóstico de TBB.
- El Cultivo en medio Stonebrink es una prueba que muestra altas tasas de detección y confirmación de positivos y moderada concordancia con las demás técnicas, pero requiere de mucho tiempo, por lo que puede complementarse con otros métodos que acorten los tiempos de respuesta y favorezcan la eficiencia del diagnóstico.
- La baja concordancia de RT- PCR con las demás pruebas indica que no puede reemplazar ninguno de los otros métodos; su rapidez, constituye el único parámetro que justifica su empleo.
- La positiva concordancia de la Histopatología con la prueba de oro, sugiere su importancia para el diagnóstico presuntivo, principiantemente en los programas de control y erradicación.
- El sistema de cultivo líquido BACTEC MGIT 960 presenta ventajas en la eficiencia y tiempo detección de *M. bovis*, cuando se compara con cultivo en medio ST, en costos cuando se compara con Histopatología y RT-PCR, y en tasa de detección cuando se compara con RT-PCR; a partir de muestras de tejidos bovinos con lesiones granulomatosas. Por lo tanto la hipótesis de trabajo se demuestra parcialmente.

## 9 Recomendaciones

Al concluir esta investigación se recomienda:

- Incluir el método BACTE MGIT 960 dentro del esquema de diagnóstico de la TBB, con el fin de favorecer la rapidez en la emisión del resultado.
- Ajustar algunas variables como cantidad de inóculo y cantidad de suplemento, con el cultivo en sistema BACTEC MGIT 960, para favorecer el crecimiento de *M. bovis* y mejorar la tasa de detección
- A partir de muestras positivas a *M. bovis*, realizar ensayos que permitan determinar sensibilidad, especificidad, y valor predictivo de los métodos RT-PCR, Histopatología, ST y BACTEC MGIT 960.
- Evaluar otros métodos de descontaminación que favorezcan el crecimiento de *M. bovis*, en los medios de cultivo.
- Implementar un esquema que incluya los cuatro métodos (histopatológico, molecular, un medio sólido y un medio líquido), para detectar el número máximo de positivos, en el menor tiempo posible y con mayor certidumbre.

## 10 Bibliografía

- ANGELA, D.P.; GIUSEPPINA, C.; TONY, F.V.; BIJO, B.; FATMIRA, S.** (2006). Detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex in milk using polymerase chain reaction (PCR). *Food Control* 17(10): 776-780.
- ARAYA, C.R.** (2007). Estudio comparativo entre métodos diagnósticos tradicionales y moleculares para la detección de *Mycobacterium bovis* en lesiones tuberculosas. Tesis, Magister. Ciencias Veterinarias. Universidad Austral de Chile, Facultad de Ciencias Veterinarias. Valdivia, Chile.
- CASTAÑEDA, D. M.; BOLÍVAR, M.; RODRÍGUEZ, A. J.** (2012). La investigación científica en tuberculosis: Evaluación bibliométrica de las contribuciones de la literatura colombiana. *Revista Médica de Risaralda* 19(1).
- CORTÉS R. E.; RUBIO, J.A.; GAITÁN, H.** (2010). Métodos estadísticos de evaluación de la concordancia y la reproducibilidad de pruebas diagnósticas. *Revista Colombiana de Obstetricia y Ginecología*: 61: 247-55.
- COLLINS, D. M.** (2011). Advances in molecular diagnostics for *Mycobacterium bovis*. *Veterinary Microbiology* 151(1-2): 2-7
- COLLINS, D. M.** (2001). Virulence factors of *Mycobacterium bovis*. *Tuberculosis* 81(1-2): 97-102
- CRUCIANI, M.; SCARPARO, C.; MALENA, M. O.; BOSCO, G. S.; MENGOLI, C.** (2004). Meta-analysis of BACTEC MGIT 960 and BACTEC 460 TB, with or without solid media, for detection of mycobacteria. *Journal of Clinical Microbiology* 42(5): 2321-2325.
- DE KANTOR, I. N.; AMBROGGI, S.; POGGI, N.; MORCILLO, M. A.; SILVA, DA.** (2008). Human *Mycobacterium bovis* infection in ten Latin American countries. *Tuberculosis* 88(4): 358-365.
- DORRONSORO, I.; TORROBA, L.** (2007). Microbiología de la tuberculosis. *Anales del Sistema Sanitario de Navarra*; 30: 2: 67-85.
- ESTRADA, C.; DIAZ, O. F.; ARRIAGA, N.; VILLEGAS, R.** (2004). Concordancia de PCR y métodos rutinarios para el diagnóstico de tuberculosis bovina. *Veterinaria México*. 35: 225-236.
- FADZILAH, M. N.** (2009). The manual MGIT system for the detection of *M. tuberculosis* in respiratory specimens: an experience in the University Malaya Medical Centre. *Journal of Pathology* 31(2): 93-97.
- FLYNN, O.; QUIGLEY, F.; COSTELLO, E.; O'GRADY, D.; GOGARTY, A.; MCGUIRK, J.; TAKAI, S.** (2001). Virulence-associated protein characterisation



- of *Rhodococcus equi* isolated from bovine lymph nodes. *Veterinary Microbiology* 78: 221-228
- GARRIGÓ, M.; ARAGÓN, L. M.; ALCAIDE, F.; BORRELL, S.; CARDENOSA, E.** (2007). Multicenter laboratory evaluation of the MB/BacT *Mycobacterium* detection system and the BACTEC MGIT 960 system in comparison with the BACTEC 460TB system for susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of Clinical Microbiology* 45(6): 1766-1770.
- GYLLEN-LOS RIOS, C. E. P.** (2014). Optimización y Validación de Kit PCR Tiempo Real para el Diagnóstico de Tuberculosis Animal en Sangre y Leche. [en línea]. <repositoriodigital.corfo.cl/handle/11373/9398> [consulta: 12-06- 2014].
- HERNÁNDEZ, P. R.** (2012). Tuberculosis bovina: la importancia de los factores de riesgo en la introducción y exposición-diseminación de *M. bovis* en el rebaño bovino, Universidad de Chile.
- HINES, N.; PAYEUR, J. B.; HOFFMAN, L. J.** (2006). Comparison of the recovery of *Mycobacterium bovis* isolates using the BACTEC MGIT 960 system, BACTEC 460 system, and Middlebrook 7H10 and 7H11 solid media. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 18(3): 243-250.
- JENKINS, A. O.; CADMUS, S. I. B.; VENTER, E. H.; POURCEL, C.; HAUKE, Y.; VERGNAUD G.; GODFROID, J.** (2011). Molecular epidemiology of human and animal tuberculosis in Ibadan, Southwestern Nigeria. *Veterinary Microbiology* 151(1-2): 139-147.
- JOHNSON, L.; DEAN, G.; RHODES, S.; HEWINSON, G.; VORDERMEIER, M.; WANGOO, A.** (2007). Low-dose *Mycobacterium bovis* infection in cattle results in pathology indistinguishable from that of high-dose infection. *Tuberculosis* 87(1): 71-76.
- KEATING, L. A.; WHEELER, P. R.; MANSOOR, H.; INWALD, J. K.; DALE, J.; HEWINSON, R. G.; GORDON, S. V.** (2005). The pyruvate requirement of some members of the *Mycobacterium tuberculosis* complex is due to an inactive pyruvate kinase: implications for in vivo growth. *Molecular Microbiology* 56(1): 163-174.
- LARENAS MUÑOZ, F. I.** (2012). Análisis de concordancia entre Reacción en Cadena de La Polimerasa (PCR) y el diagnóstico Histopatológico para Tuberculosis Bovina. Memoria de título. Medicina Veterinaria. Universidad de Concepción, Facultad de Ciencias Veterinarias. Concepción, Chile 38 p
- LATINI, O.; CANAL, A. M.; FERRARA, M. E.; SEQUEIRA, G.; BAGNAROLI, R.; TORRES, P.** (1997). Confiabilidad en la determinación de prevalencia de infección por *Mycobacterium bovis* en ganado bovino por decomisos en frigoríficos. *Archivos de Medicina Veterinaria*, 29: 197-204.

- LÓPEZ, L. M.; VÉLEZ, C. I.; ZULUAGA, L. M.; MEJÍA, G. I.; ESTRADA, S.; POSADA, P.; MORENO, S.; GUZMÁN A.; ROBLEDO J.** (2001). Evaluación de medios de cultivo alternativos para el diagnóstico de la tuberculosis pulmonar. *Revista Colombiana de Infectología* 5(4).
- MADIGAN, G.** (2012). Evaluation of Different Methods for the Detection of *Mycobacterium bovis* in Lymph Node Tissue, Masters thesis, National University of Ireland Maynooth.147 p
- MANCILLA, M.; MARTÍNEZ, A.; PALAVECINO, C.; REHREN, G.; LUCERO, P.; LEÓN, G.; ZÁRRAGA, A.M.** (2006). Variantes genéticas de *Mycobacterium tuberculosis* aisladas de pacientes de la Xª Región de Chile. *Revista Chilena De Infectología* 23(3): 220-225.
- MENZIES, F. D.; NEILL, S. D.** (2000). Cattle-to-Cattle Transmission of Bovine Tuberculosis. *The Veterinary Journal* 160(2): 92-106.
- MÜLLER B.; DÜRR S.; ALONSO, S.; HATTENDORF, J.; LAISSE, C.; PARSONS, S.** (2013). Zoonotic *Mycobacterium bovis* induced Tuberculosis in Humans. *Emerging Infectious Diseases*. Jun; 19(6): 899-908.
- ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE SANIDAD ANIMAL (OIE).** (2012). Manual de la OIE sobre animales terrestres Volumen I. Capítulo 2.4.7. Tuberculosis bovina 18 p.
- PFYFFER, G. E.; WELSCHER, H.M.; KISSLING, P.; CIESLAK, C.; CASAL, M. J.; GUTIERREZ, J.; RÜSCH-GERDES, S.** (1997). Comparison of the Mycobacteria Growth Indicator Tube (MGIT) with radiometric and solid culture for recovery of acid-fast bacilli. *Journal of Clinical Microbiology*, 35(2): 364-368.
- RISHI, S.; SINHA, P.; MALHOTRA, B.; PAL, N.** (2007). A comparative study for the detection of Mycobacteria by BACTEC MGIT 960, Lowenstein Jensen media and direct AFB smear examination. *Indian Journal of Medical Microbiology*, 25(4): 383.
- ROBLEDO, J.; MEJÍA, G. I.** (2001). Actualidad en el diagnóstico de tuberculosis por el laboratorio. *Revista Colombiana de Infectología* 5(4).
- SAG** (2013). Plan Nacional de Control y Erradicación de Tuberculosis Bovina. Informe de Avance 1er Semestre 2013. Servicio Agrícola y Ganadero. División de Protección Pecuaria. Santiago de Chile: [http://webdesa.sag.gob.cl/sites/default/files/informe\\_avance\\_plan\\_tb\\_i\\_semestre\\_2013.pdf](http://webdesa.sag.gob.cl/sites/default/files/informe_avance_plan_tb_i_semestre_2013.pdf).
- SCARPARO, C.; RICORDI, P.; RUGGIERO, G.; y PICCOLI, P.** (2004). Evaluation of the fully automated BACTEC MGIT 960 system for testing susceptibility of *Mycobacterium tuberculosis* to pyrazinamide, streptomycin,

isoniazid, rifampin, and ethambutol and comparison with the radiometric BACTEC 460TB method. *Journal of Clinical Microbiology* 42(3): 1109-1114.

**SOLER, D.; BRIEVA C.; RIBÓN, W.** (2009). Mycobacteriosis in Wild Birds : the Potential risk of Disseminating a Little-known Infectious Disease. *Revista de Salud Pública* 11: 134-144.

**TAYLOR, G.M.; WORTH, D.R.; PALMER, S.; JAHANS, K.; HEWINSON, R.G.** (2007). Rapid detection of *Mycobacterium bovis* DNA in cattle lymph nodes with visible lesions using PCR. *BMC Veterinary Research*. 3: 12.

**THOEN, C.; LOBUE, P.; DE KANTOR, I.** (2006). The importance of *Mycobacterium bovis* as a zoonosis. *Veterinary Microbiology* 112(2-4): 339-345.

## ANEXO 1

**Tabla 7. Resultado de cada muestra por cada uno de los métodos evaluados.**

<b>CODIGO</b>	<b>HISTOPATOLOGIA</b>	<b>ST</b>	<b>BACTEC MGIT</b>	<b>RT-PCR</b>	<b>GENERAL</b>
1	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	4
2	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	4
7	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	4
15	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	4
20	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	4
50	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	4
53	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	4
54	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	4
56	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	4
57	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	4
60	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	4
61	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	4
62	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	4
63	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	4
64	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	4
65	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	4
72	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	4
74	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	4
83	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	4
84	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	4
85	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	4
86	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	4
87	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	4
88	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	4
90	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	4
92	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	4
96	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	4
99	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	4
3	Positivo	Positivo	Positivo	Negativo	3
4	Positivo	Positivo	Positivo	Negativo	3
11	Positivo	Positivo	Positivo	Negativo	3

<b>CODIGO</b>	<b>HISTOPATOLOGIA</b>	<b>ST</b>	<b>BACTEC MGIT</b>	<b>RT-PCR</b>	<b>GENERAL</b>
12	Positivo	Positivo	Positivo	Negativo	3
23	Positivo	Positivo	Positivo	Negativo	3
32	Positivo	Positivo	Positivo	Negativo	3
33	Positivo	Positivo	Positivo	Negativo	3
34	Positivo	Positivo	Positivo	Negativo	3
35	Positivo	Positivo	Positivo	Negativo	3
37	Positivo	Positivo	Positivo	Negativo	3
42	Positivo	Positivo	Positivo	Negativo	3
59	Positivo	Positivo	Positivo	Negativo	3
71	Positivo	Positivo	Positivo	Negativo	3
91	Positivo	Positivo	Positivo	Negativo	3
93	Positivo	Positivo	Positivo	Negativo	3
94	Positivo	Positivo	Positivo	Negativo	3
98	Positivo	Positivo	Positivo	Negativo	3
100	Positivo	Positivo	Positivo	Negativo	3
49	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo	3
52	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo	3
66	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo	3
68	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo	3
70	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo	3
80	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo	3
44	Positivo	Negativo	Positivo	Positivo	3
58	Positivo	Negativo	Positivo	Positivo	3
55	Positivo	Contaminado	Positivo	Positivo	3
5	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo	2
6	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo	2
8	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo	2
9	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo	2
13	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo	2
14	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo	2
18	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo	2
27	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo	2
67	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo	2
81	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo	2
97	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo	2
36	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo	2

<b>CODIGO</b>	<b>HISTOPATOLOGIA</b>	<b>ST</b>	<b>BACTEC MGIT</b>	<b>RT-PCR</b>	<b>GENERAL</b>
38	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo	2
39	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo	2
46	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo	2
43	Positivo	Negativo	Negativo	Positivo	2
45	Positivo	Negativo	Negativo	Positivo	2
26	No Ingresa Muestra	Positivo	Negativo	Positivo	2
24	Negativo	Positivo	Positivo	Negativo	2
31	Negativo	Positivo	Positivo	Negativo	2
17	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo	1
19	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo	1
28	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo	1
30	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo	1
69	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo	1
73	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo	1
77	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo	1
89	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo	1
22	Positivo	Contaminado	Negativo	Negativo	1
25	No Ingresa Muestra	Positivo	Negativo	Negativo	1
10	Negativo	Positivo	Negativo	Negativo	1
21	Negativo	Positivo	Negativo	Negativo	1
29	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo	1
41	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo	1
16	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	0
40	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	0
47	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	0
48	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	0
51	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	0
75	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	0
76	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	0
78	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	0
79	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	0
82	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	0
95	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	0
	<b>81</b>	<b>69</b>	<b>57</b>	<b>40</b>	

## ANEXO 2

Tabla 8. Lesiones observadas por Histopatología

	TIPO MUESTRA	TIPO INSPEC	DX	TIPO DE CELULA	TIPO DE LESION	MORF	BAAR
1	NRM	R	COMPATIBLE CON TBB	langhans	granuloma	calcificacion	positivo
2	NRM	R	COMPATIBLE CON TBB	langhans	granuloma	calcificacion	positivo
3	NTB	R	COMPATIBLE CON TBB	langhans	granuloma	necrosis	positivo
4	NRM	R	SUGERENTE DE TBB	langhans	granuloma	calcificacion	negativo
5	NH	R	COMPATIBLE CON TBB	langhans	granuloma	necrosis	positivo
6	NTB	R	SUGERENTE DE TBB	langhans	granuloma	calcificacion	negativo
7	NTB	R	COMPATIBLE CON TBB	langhans	granuloma	calcificacion	positivo
8	NTB	R	SUGERENTE DE TBB	langhans	granuloma	calcificacion	negativo
9	NTB	R	SUGERENTE DE TBB	langhans	granuloma	calcificacion	negativo
10	NCS	R	OTRO AGENTE	neutrofilos	difusa	necrosis	negativo
11	NME	R	COMPATIBLE CON TBB	langhans	granuloma	necrosis	positivo
12	NTB	R	COMPATIBLE CON TBB	langhans	granuloma	necrosis	positivo
13	NRM	R	COMPATIBLE CON TBB	langhans	granuloma	necrosis	positivo
14	NME	R	COMPATIBLE CON TBB	langhans	granuloma	necrosis	positivo
15	NRM	R	SUGERENTE DE TBB	langhans	granuloma	necrosis	negativo
16	NCS	R	OTRO AGENTE	neutrofilos	drusas	necrosis	negativo
17	NRM	R	SUGERENTE DE TBB	langhans	granuloma	calcificacion	negativo
18	NRM	R	COMPATIBLE CON TBB	langhans	granuloma	necrosis	positivo
19	NTB	R	SUGERENTE DE TBB	langhans	granuloma	calcificacion	negativo
20	NRM	R	COMPATIBLE CON TBB	langhans	granuloma	calcificacion	positivo
21	NMES	S	SIN LESION	sin lesion	sin lesion	sin lesion	negativo
22	NMES	S	COMPATIBLE CON TBB	langhans	granuloma	necrosis	positivo
23	NMES	S	COMPATIBLE CON TBB	langhans	granuloma	necrosis	positivo
24	NMES	S	SIN LESION	sin lesion	sin lesion	sin lesion	negativo
25	NTB	R	NO INGRESA MUESTRA	x	x	x	negativo
26	NTB	R	NO INGRESA MUESTRA	x	x	x	x
27	NH	R	COMPATIBLE CON TBB	langhans	granuloma	necrosis	positivo
28	NH	R	COMPATIBLE CON TBB	langhans	granuloma	necrosis	positivo
29	NM	R	OTRO AGENTE	neutrofilos	drusas	necrosis	negativo
30	PREESCAPUL	S	COMPATIBLE CON	langhans	granuloma	necrosis	positivo

	TIPO MUESTRA	TIPO INSPEC	DX	TIPO DE CELULA	TIPO DE LESION	MORF	BAAR
	AR		TBB				
31	NH	R	Sin Lesión	sin lesión	sin lesión	sin lesión	negativo
32	PLEURA	R	COMPATIBLE CON TBB	langhans	granuloma	necrosis	positivo
33	NRM	R	COMPATIBLE CON TBB	langhans	granuloma	calcificacion	positivo
34	NRM	R	COMPATIBLE CON TBB	langhans	granuloma	calcificacion	positivo
35	NME	R	COMPATIBLE CON TBB	langhans	granuloma	calcificacion	positivo
36	NP	R	COMPATIBLE CON TBB	langhans	granuloma	calcificacion	positivo
37	NME	R	SUGERENTE DE TBB	langhans	granuloma	calcificacion	negativo
38	NME	R	SUGERENTE DE TBB	langhans	granuloma	calcificacion	negativo
39	NRM	R	SUGERENTE DE TBB	linfocitos	granuloma	calcificacion	negativo
40	NME	R	SIN LESION	sin lesion	sin lesion	sin lesion	negativo
41	NRM	R	OTRO AGENTE	neutrofilos	difusa	necrosis	negativo
42	NH NMES	R	SUGERENTE DE TBB	langhans	granuloma	calcificacion	negativo
43	NRM NM NME NMES	R	COMPATIBLE CON TBB	langhans	granuloma	calcificacion	positivo
44	NRM NME P NH NMES	R	COMPATIBLE CON TBB	langhans	granuloma	calcificacion	positivo
45	NRM NME P NH NMES	R	SUGERENTE DE TBB	langhans	granuloma	calcificacion	negativo
46	NRM NME P NH NMES	R	COMPATIBLE CON TBB	langhans	granuloma	calcificacion	positivo
47	NRM NME NH	R	SIN LESION	sin lesion	sin lesion	sin lesion	negativo
48	NRM NME NH	R	SIN LESION	sin lesion	sin lesion	sin lesion	negativo
49	NME NH	R	SUGERENTE DE TBB	langhans	granuloma	calcificacion	negativo
50	NME	R	SUGERENTE DE TBB	langhans	granuloma	necrosis	negativo
51	TEJIDO MAMARIO	R	OTRO AGENTE	neutrofilos	drusas	necrosis	negativo
52	NRM	R	SUGERENTE DE TBB	linfocitos	granuloma	necrosis	negativo
53	NH	R	COMPATIBLE CON TBB	linfocitos	granuloma	calcificacion	positivo
54	NRM	R	COMPATIBLE CON TBB	langhans	difusa	necrosis	positivo
55	NMES	R	COMPATIBLE CON TBB	langhans	granuloma	calcificacion	positivo
56	NMES	R	COMPATIBLE CON TBB	langhans	granuloma	calcificacion	positivo
57	NTB	R	COMPATIBLE CON TBB	linfocitos	granuloma	calcificacion	positivo
58	NTB	R	SUGERENTE DE TBB	langhans	difusa	necrosis	negativo
59	NTB	R	COMPATIBLE CON TBB	langhans	granuloma	calcificacion	positivo
60	NRM	R	COMPATIBLE CON TBB	langhans	granuloma	calcificacion	positivo
61	NRM	SD	SUGERENTE DE TBB	langhans	granuloma	calcificacion	negativo
62	NRM	R	COMPATIBLE CON TBB	langhans	granuloma	calcificacion	positivo



	TIPO MUESTRA	TIPO INSPEC	DX	TIPO DE CELULA	TIPO DE LESION	MORF	BAAR
63	NCS	R	COMPATIBLE CON TBB	langhans	granuloma	calcificacion	positivo
64	NRM	R	COMPATIBLE CON TBB	langhans	granuloma	calcificacion	positivo
65	NRM	R	COMPATIBLE CON TBB	linfocitos	granuloma	calcificacion	positivo
66	NRM NH NM	R	SUGERENTE DE TBB	langhans	granuloma	calcificacion	negativo
67	NRM	R	SUGERENTE DE TBB	langhans	granuloma	calcificacion	negativo
68	NME/NH	R	SUGERENTE DE TBB	linfocitos	difusa	necrosis	negativo
69	NRM	R S	SUGERENTE DE TBB	langhans	granuloma	calcificacion	negativo
70	NRM	R S	SUGERENTE DE TBB	langhans	difusa	necrosis	negativo
71	NME	R	COMPATIBLE CON TBB	langhans	granuloma	calcificacion	positivo
72	NMES	R	COMPATIBLE CON TBB	langhans	granuloma	calcificacion	positivo
73	NME	R	COMPATIBLE CON TBB	langhans	granuloma	calcificacion	positivo
74	NME	R	COMPATIBLE CON TBB	langhans	granuloma	calcificacion	positivo
75	NMES	R	OTRO AGENTE	neutrofilos	difusa	necrosis	negativo
76	NH	R	OTRO AGENTE	neutrofilos	difusa	necrosis	negativo
77	NM	R	SUGERENTE DE TBB	langhans	granuloma	calcificacion	negativo
78	PREESCAPU	S	SIN LESION	sin lesion	sin lesion	sin lesion	negativo
79	PREESCAPU	S	SIN LESION	sin lesion	sin lesion	sin lesion	negativo
80	NME	R	SUGERENTE DE TBB	linfocitos	granuloma	necrosis	negativo
81	NPF	SD	COMPATIBLE CON TBB	langhans	granuloma	calcificacion	positivo
82	NPF	SD	OTRO AGENTE	neutrofilos	difusa	necrosis	negativo
83	NME	SD	COMPATIBLE CON TBB	langhans	granuloma	calcificacion	positivo
84	NPF	R	COMPATIBLE CON TBB	langhans	granuloma	calcificacion	positivo
85	NME	R	COMPATIBLE CON TBB	langhans	granuloma	calcificacion	positivo
86	NME	R	COMPATIBLE CON TBB	langhans	granuloma	calcificacion	positivo
87	NME	R	COMPATIBLE CON TBB	linfocitos	granuloma	necrosis	positivo
88	NMES	R	COMPATIBLE CON TBB	langhans	granuloma	calcificacion	positivo
89	NCS	R	SUGERENTE DE TBB	langhans	granuloma	calcificacion	negativo
90	NRM	R	COMPATIBLE CON TBB	langhans	granuloma	calcificacion	positivo
91	NTB	R	COMPATIBLE CON TBB	langhans	granuloma	calcificacion	positivo
92	NP	R	COMPATIBLE CON TBB	linfocitos	difusa	necrosis	positivo
93	NH	R	COMPATIBLE CON TBB	langhans	granuloma	calcificacion	positivo
94	NH	R	SUGERENTE DE TBB	langhans	granuloma	calcificacion	negativo
95	NRM	R	SIN LESION	sin lesion	sin lesion	sin lesion	negativo
96	NTB	R	COMPATIBLE CON	langhans	granuloma	calcificacion	positivo

	TIPO MUESTRA	TIPO INSPEC	DX	TIPO DE CELULA	TIPO DE LESION	MORF	BAAR
			TBB				
97	NTB	R	SUGERENTE DE TBB	langhans	granuloma	calcificacion	negativo
98	NRM	R	SUGERENTE DE TBB	langhans	granuloma	calcificacion	negativo
99	NH	R	COMPATIBLE CON TBB	langhans	granuloma	calcificacion	positivo
100	NH	R	COMPATIBLE CON TBB	langhans	granuloma	calcificacion	positivo

N	LINFONODULO	NME	MEDIASTINICO
NCS	CERVICAL SUPERFICIAL	NP	POPLITEO
NH	HEPATICO	NPF	POPLITEO PROFUNDO
NMES	MESENTERICO	NRM	RETROFARINGEO MEDIO
NM	MAMARIO	NTB	TAQUEOBRONQUIAL

R=RUTINA S=SEGUIMIENTO NP=NECROPSIA EN PREDIO

### ANEXO 3. Tablas de contingencia y resultados de concordancia

Tabla de contingencia						Medidas simétricas				
Recuento										
		RESULTADOST			Total					
		NEGATIVO	POSITIVO			Valor	Sig. Aprox			
RESULTAD	NEGATIVO	1,0	21,0	19,0	41,0	Medida de Kappa	0,4	0,0001		
OBACKTEC	POSITIVO	1,0	8,0	48,0	57,0	N de casos válidos	98,0			
Total		2,0	29,0	67,0	98,0	a. Asumiendo la hipótesis alternativa.				
						b. Empleando el error típico asintótico basado				
Tabla de contingencia						Medidas simétricas				
Recuento										
		RESULTADOST			Total					
		NEGATIVO	POSITIVO			Valor	Sig. Aprox			
RESULTAD	NEGATIVO	1,0	25,0	33,0	59,0	Medida de Kappa	0,3	0,0007		
OPCR	POSITIVO	1,0	4,0	34,0	39,0	N de casos válidos	98,0			
Total		2,0	29,0	67,0	98,0	a. Asumiendo la hipótesis alternativa.				
						b. Empleando el error típico asintótico basado				
Tabla de contingencia						Medidas simétricas				
Recuento										
		RESULTADOST			Total					
		NEGATIVO	POSITIVO			Valor	Sig. Aprox			
RESULTAD	NEGATIVO	0,0	13,0	4,0	17,0	Medida de Kappa	0,4	0,0000		
HISTOPAT	POSITIVO	2,0	16,0	63,0	81,0	N de casos válidos	98,0			
LOGIA2		2,0	29,0	67,0	98,0	a. Asumiendo la hipótesis alternativa.				
Total		2,0	29,0	67,0	98,0	b. Empleando el error típico asintótico basado				
Tabla de contingencia						Medidas simétricas				
Recuento										
		RESULTADOPCR			Total					
		NEGATIVO	POSITIVO			Valor	Sig. Aprox			
RESULTAD	NEGATIVO	33,0	8,0	41,0	Medida de Kappa	0,3	0,0005			
OBACKTEC	POSITIVO	26,0	31,0	57,0	N de casos válidos	98,0				
Total		59,0	39,0	98,0	a. Asumiendo la hipótesis alternativa.					
						b. Empleando el error típico asintótico basado				
Tabla de contingencia RESULTADOPCR - RESULTADHISTOPATOL						Medidas simétricas				
Recuento										
		LOGIA2			Total					
		NEGATIVO	POSITIVO			Valor	Sig. Aprox			
RESULTAD	NEGATIVO	17,0	42,0	59,0	Medida de Kappa	0,2	0,0002			
OPCR	POSITIVO	0,0	39,0	39,0	N de casos válidos	98,0				
Total		17,0	81,0	98,0	a. Asumiendo la hipótesis alternativa.					
						b. Empleando el error típico asintótico basado				
Tabla de contingencia RESULTADOPCR - RESULTADHISTOPATOL						Medidas simétricas				
Recuento										
		LOGIA2			Total					
		NEGATIVO	POSITIVO			Valor	Sig. Aprox			
RESULTAD	NEGATIVO	13,0	28,0	41,0	Medida de Kappa	0,3	0,0015			
OBACKTEC	POSITIVO	4,0	53,0	57,0	N de casos válidos	98,0				
Total		17,0	81,0	98,0	a. Asumiendo la hipótesis alternativa.					
						b. Empleando el error típico asintótico basado				