

January 1996

Validación de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para el diagnóstico específico de la Tuberculosis Bovina.

Patricia Del Portillo

Universidad de La Salle, Bogotá, revista_uls@lasalle.edu.co

Juan Germán Rodríguez

Universidad de La Salle, Bogotá, revista_uls@lasalle.edu.co

Clara Inés León

Universidad de La Salle, Bogotá, revista_uls@lasalle.edu.co

Jaime Robledo

Universidad de La Salle, Bogotá, revista_uls@lasalle.edu.co

Follow this and additional works at: <https://ciencia.lasalle.edu.co/ruls>

Citación recomendada

Del Portillo, P., J.G. Rodríguez, C.I. León, y J.Robledo (1996). Validación de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para el diagnóstico específico de la Tuberculosis Bovina.. Revista de la Universidad de La Salle, (23), 55-57.

This Artículo de Revista is brought to you for free and open access by the Revistas de divulgación at Ciencia Unisalle. It has been accepted for inclusion in Revista de la Universidad de La Salle by an authorized editor of Ciencia Unisalle. For more information, please contact ciencia@lasalle.edu.co.

Validación de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para el diagnóstico específico de la Tuberculosis Bovina.

Investigadores principales

Patricia Del Portillo¹,
Juan Germán Rodríguez¹,
Clara Inés León²,
Jaime Robledo³

Resumen Ejecutivo

La tuberculosis bovina es una de las zoonosis más importantes a nivel mundial. La enfermedad es un problema serio de salud pública y es la causa de grandes pérdidas económicas en países que como Colombia no han logrado una erradicación de la enfermedad. La verdadera incidencia de la tuberculosis bovina en el mundo es desconocida, debido principalmente a la carencia de métodos diagnósticos específicos, que permitan una rápida y específica detección del *My-*

cobacterium bovis en muestras biológicas y a la falta de herramientas epidemiológicas que permitan un seguimiento en las rutas y fuentes de contaminación.

El método diagnóstico empleado rutinariamente es la prueba de la tuberculina una prueba de hipersensibilidad retardada, la cual mide la respuesta defensiva del animal infectado a ciertos compuestos solubles que elimina el microorganismo al medio de cultivo (Huitema, 1972). Es necesario entender que dada la complejidad del genero *Mycobacterium*, existen muchos microorganismos con antígenos de reacción cruzada con *Mycobacterium bovis* (Daniel and Janicki, 1978; Harboe and Nagai, 1984), lo que impide que la especificidad de la reacción sea la adecuada. La prueba confirmatoria de la tuberculosis bovina es el diagnóstico microbiológico, en el cual la muestra biológica es transportada al laboratorio en donde se realiza el aislamiento e identificación del microorganismo en medios de cultivo selectivos. Aquí se presenta otra de las dificultades en el diagnóstico: en primer lugar, *M. bovis* es un lento crecedor, requiere de unas condiciones de cultivo exigentes, tarda entre 8 y 12 semanas para

¹Corporación CorpoGen, Santafé de Bogotá, D.C.

²Laboratorio de Micobacterias, Instituto Nacional de Salud, Santafé de Bogotá, D.C.

³Sección de Bacteriología, Corporación de Investigaciones Biológicas, Medellín

crecer en estos medios selectivos y se necesitan al menos 100 bacilos vivos en la muestra para obtener un resultado positivo (Bates, et al., 1986).

La falta de métodos diagnósticos certeros ha llevado a la Organización Mundial de la Salud a través de la unidad de Salud Pública Veterinaria a determinar como una de sus prioridades el promover la investigación en la estandarización de nuevos métodos diagnósticos y a la búsqueda de nuevas herramientas epidemiológicas para la prevención y el control de la tuberculosis bovina (WHO, 1994).

En una investigación previa, se identificó un fragmento genómico especie-específico de *Mycobacterium bovis* empleando la técnica de Amplificación Arbitraria de fragmentos polimórficos de ADN (RAPD). Este fragmento fue clonado y su secuencia de nucleótidos determinada. Basados en esta información se desarrolló un método diagnóstico específico para la tuberculosis bovina mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR). En condiciones de laboratorio, este método de PCR discrimina al bacilo bovino de todas las otras especies de micobacterias y bacterias relacionadas, incrementándose la

"La verdadera incidencia de la tuberculosis bovina en el mundo es desconocida, debido principalmente a la carencia de métodos diagnósticos específicos, que permitan una rápida y específica detección del Mycobacterium bovis."

especificidad con respecto a los métodos tradicionales empleados para su detección (Fig. 1). La técnica permite el reconocimiento del *Mycobacterium bovis* en muestras biológicas como leche y sangre con una sensibilidad cercana a 10 bacilos/ml de muestra, incrementando la sensibilidad en varios ordenes de magnitud. Los resultados de esta investigación han sido publicados en: (Rodríguez JG, Mejía GA, Del Portillo P, Patarroyo ME and Murillo LA. 1995. Species-specific identification of *Mycobacterium bovis* by PCR. Microbiology 141: 2131-2138).

Este proyecto, realizará la validación en campo del método diagnóstico de PCR, con el ánimo de evaluar la sensibilidad

y la especificidad de la reacción con respecto a los métodos tradicionales de diagnóstico y mostrar su posible utilidad en el control de la tuberculosis bovina. Las muestras biológicas serán directamente obtenidas de animales sospechosos y animales libres de la enfermedad a los cuales se les haya aplicado la reacción de la tuberculina y los resultados de la PCR serán confrontados con estos resultados. Las muestras biológicas (leche, sangre y biopsias de animales sacrificados), serán procesadas y fraccionadas para

realizar sobre ellas la prueba de PCR, el cultivo en medios selectivos y su posterior tipificación bioquímica. Los resultados del estudio serán comparados con el fin de establecer la validez del nuevo método diagnóstico. Subsecuentemente, los bacilos aislados y tipificados bioquímicamente como *Mycobacterium bovis* serán caracterizados más detalladamente empleando técnicas de epidemiología molecular como la huella genética o restricción de fragmentos polimórficos largos de ADN (RFLP).

Hipótesis

La presencia de *Mycobacterium bovis* en muestras biológicas puede ser detectada mediante la utilización de la PCR con mayor o igual eficacia y confiabilidad que el método bacteriológico y el diagnóstico clínico-epidemiológico de la tuberculina.

Aproximación al Problema

Con la colaboración del Instituto Agropecuario ICA, se aplicará la prueba de la tuberculina en fincas de la sabana de Bogotá, tanto sospechosas como libres de tuberculosis. Teniendo en cuenta la incidencia de tuberculosis bovina y el número de cabezas de ganado, se tomarán muestras de sangre y leche de aproximadamente 350 animales. Las muestras se analizarán tanto a nivel microbiológico como por PCR. También

se procesarán muestras de biopsias de animales sacrificados. Los resultados de estas pruebas serán evaluados y confrontados al final del estudio para asegurar la validez de los mismos. Los análisis de RFLPs de los aislados de *Mycobacterium bovis* permitirán establecer las diferentes subcepas que circulan en la sabana de Bogotá e inferir posibles relaciones epidemiológicas.

Bibliografía

- HUITEMA, H. (1972). Prueba de la tuberculina en bovinos y otros animales. En: Seminario internacional sobre TB bovina para las Americas. Santiago de Chile, Washington D.C. OPS/OMS, 1972.
- DANIEL, TM and Janicki, BW. (1978). Mycobacterial antigens: a review of the isolation, chemistry and immunological properties. *Microbiol Rev* **42**, 84-113
- HARBOE, M and Nagai, S. (1984). MPB70 a unique antigen of *Mycobacterium bovis* BCG. *Am Rev Respir Dis* **129**, 444-452
- BATES, JH., Brennan, P., Douglas, WG., Feely, JC., et. al. (1986). Improvements in the diagnosis of tuberculosis. *Am Rev Resp Dis* **135**, 1137-1151.
- WORLD Health Organization. (1994). Zoonotic tuberculosis (*Mycobacterium bovis*): Memorandum from a WHO meeting (with the participation of FAO). *Bull WHO* **72**, 851-857
- RODRÍGUEZ, JG., Mejía, GA., Del Portillo, P., Patarroyo, ME and Murillo, LA. (1995). Species-specific identification of *Mycobacterium bovis* by PCR. *Microbiology* **141**, 2131-2138