

Detección rápida de MTBC en tejidos bovinos mediante el uso de una PCR a Tiempo Real dirigida al elemento *IS6110*

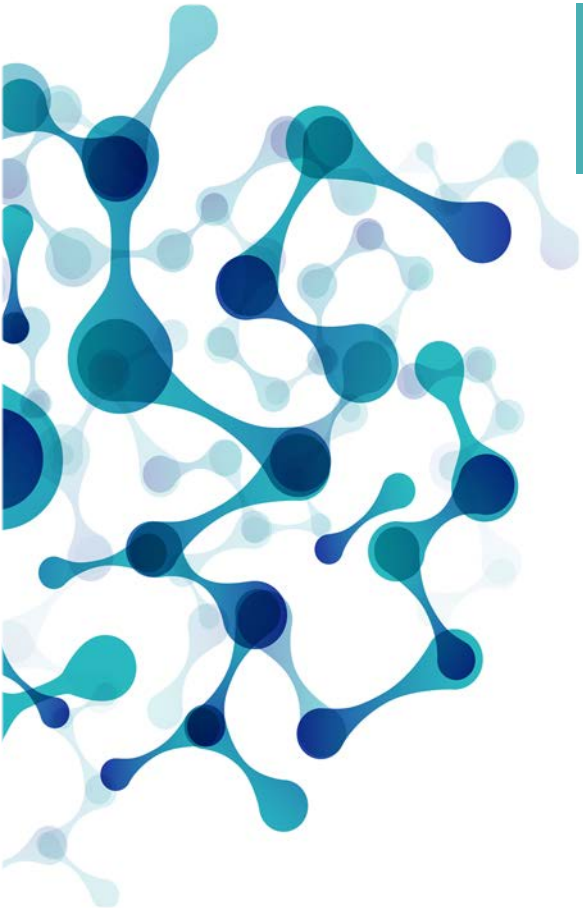
Víctor Lorente Leal

Departamento de Sanidad Animal, Facultad de Veterinaria, UCM

Centro VISAVET, UCM

Tuberculosis bovina

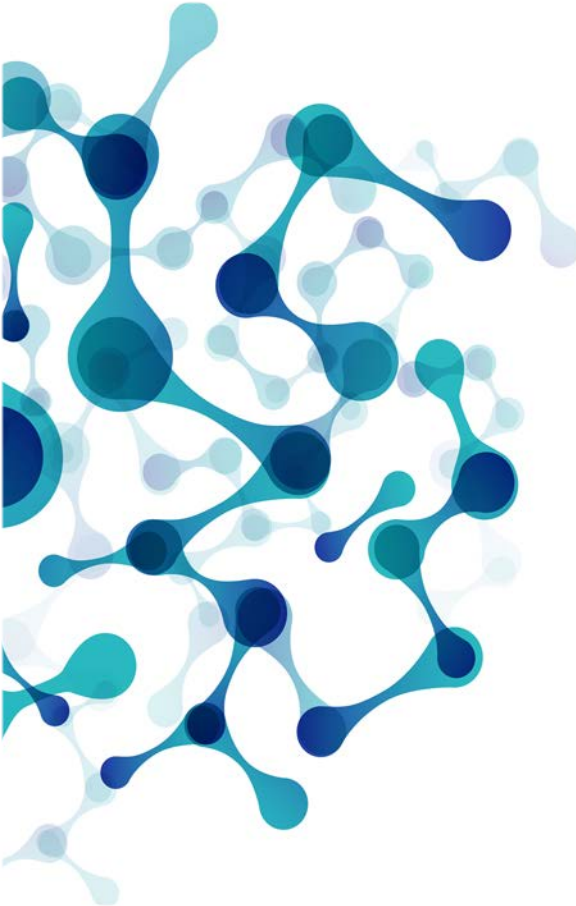
Enfermedad infecciosa producida por miembros del Complejo
Mycobacterium tuberculosis (CMTB)



Tuberculosis bovina

Enfermedad infecciosa producida por miembros del Complejo
Mycobacterium tuberculosis (CMTB)

Sujeta a programas de erradicación



Tuberculosis bovina



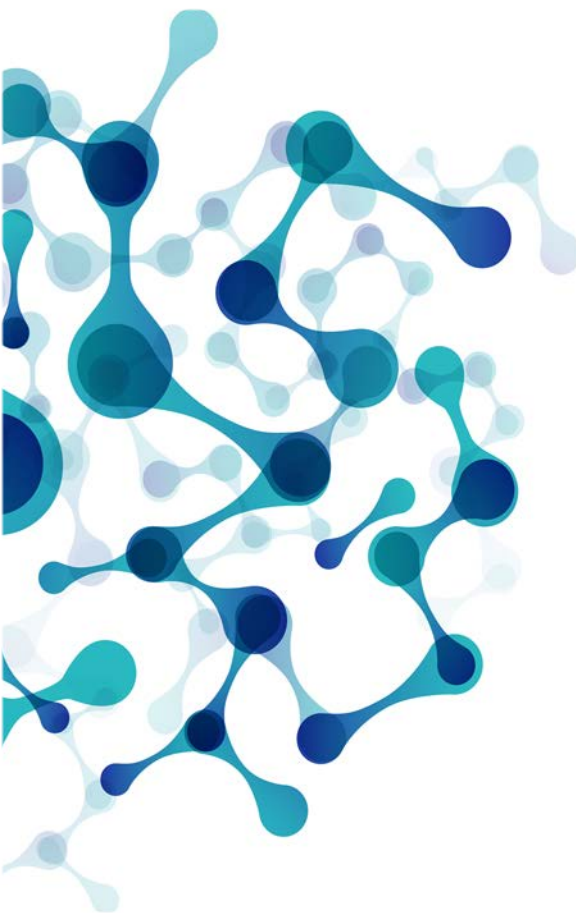
Enfermedad infecciosa producida por miembros del Complejo
Mycobacterium tuberculosis (CMTB)

Sujeta a programas de erradicación

Diagnóstico
ante mortem

Detección
post mortem

Tuberculosis bovina

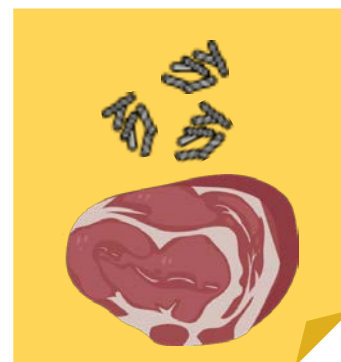


Enfermedad infecciosa producida por miembros del Complejo *Mycobacterium tuberculosis* (CMTB)

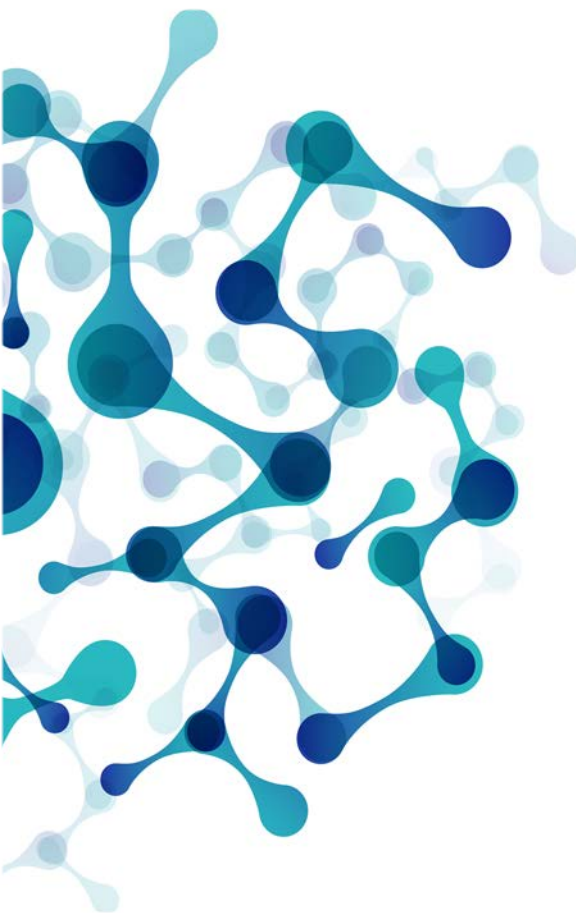
Sujeta a programas de erradicación

Diagnóstico
ante mortem

Detección
post mortem



Tuberculosis bovina

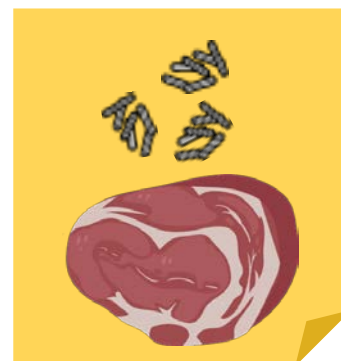


Enfermedad infecciosa producida por miembros del Complejo *Mycobacterium tuberculosis* (CMTB)

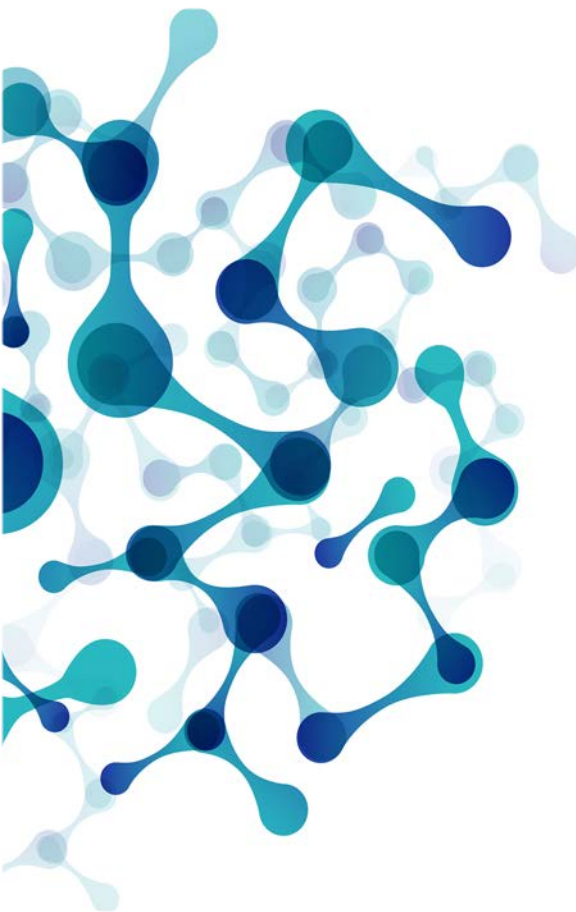
Sujeta a programas de erradicación

Diagnóstico
ante mortem

Detección
post mortem



Tuberculosis bovina

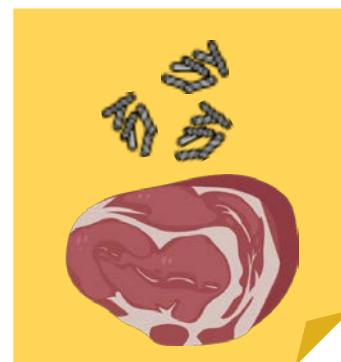


Enfermedad infecciosa producida por miembros del Complejo *Mycobacterium tuberculosis* (CMTB)

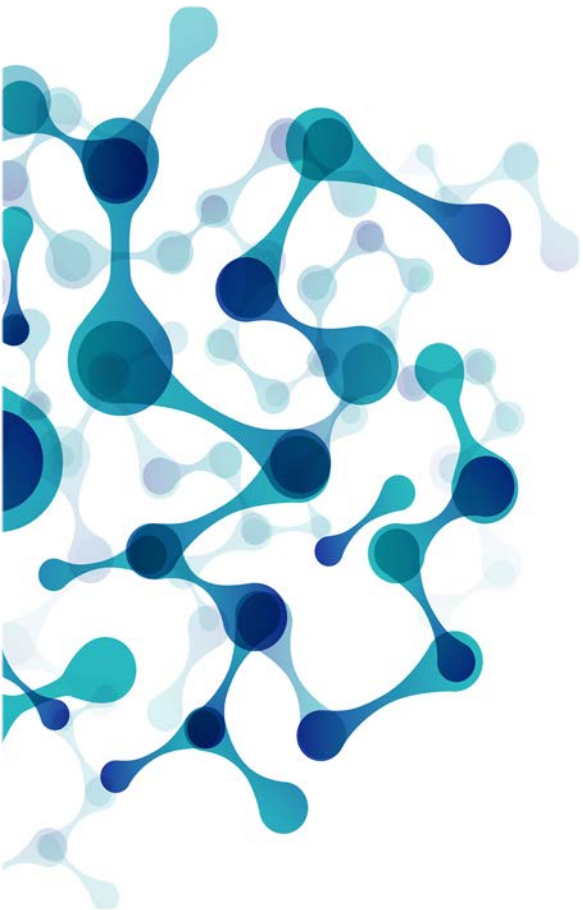
Sujeta a programas de erradicación

Diagnóstico
ante mortem

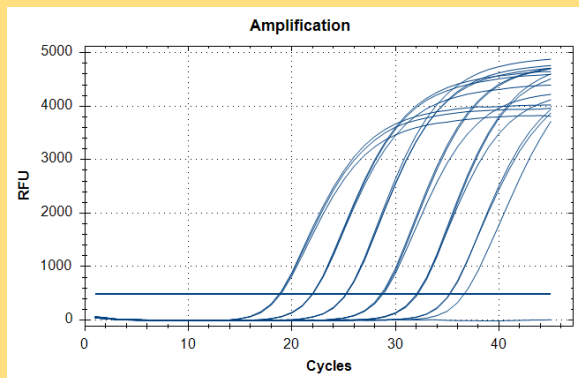
Detección
post mortem



PCR a Tiempo Real Directa



IS6110 (Michelet *et al.*, 2018)

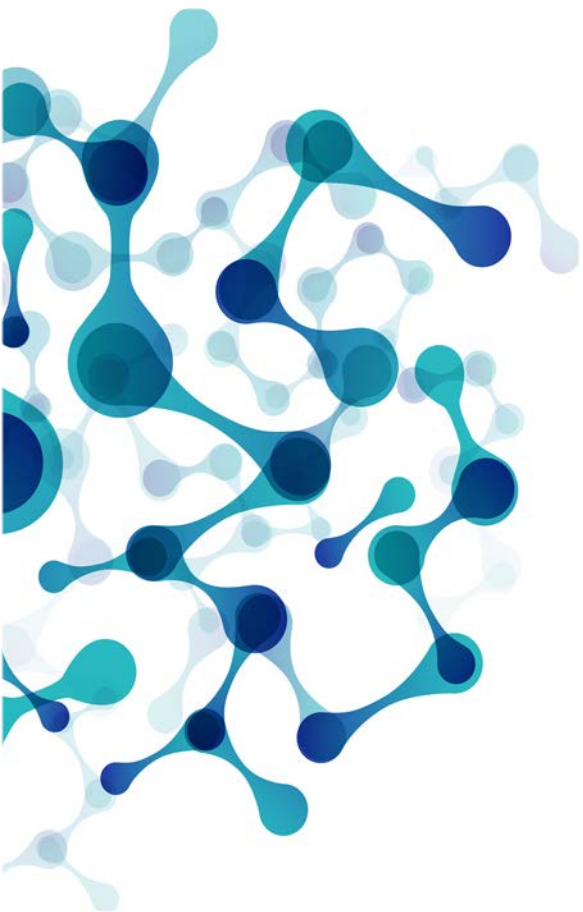


**QUANTIFAST
PATHOGEN + IC
PCR kit**

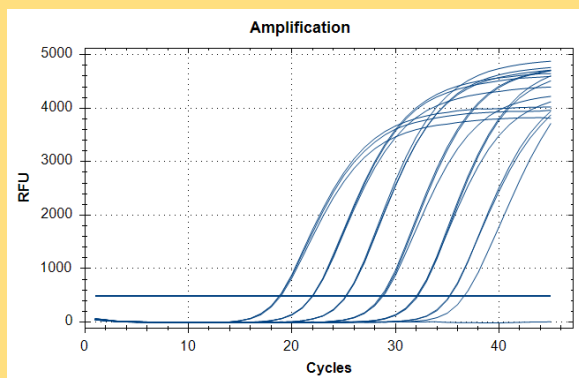
LOD (95%)

13,6 fg/reacción

PCR a Tiempo Real Directa



IS6110 (Michelet *et al.*, 2018)



**QUANTIFAST
PATHOGEN + IC
PCR kit**

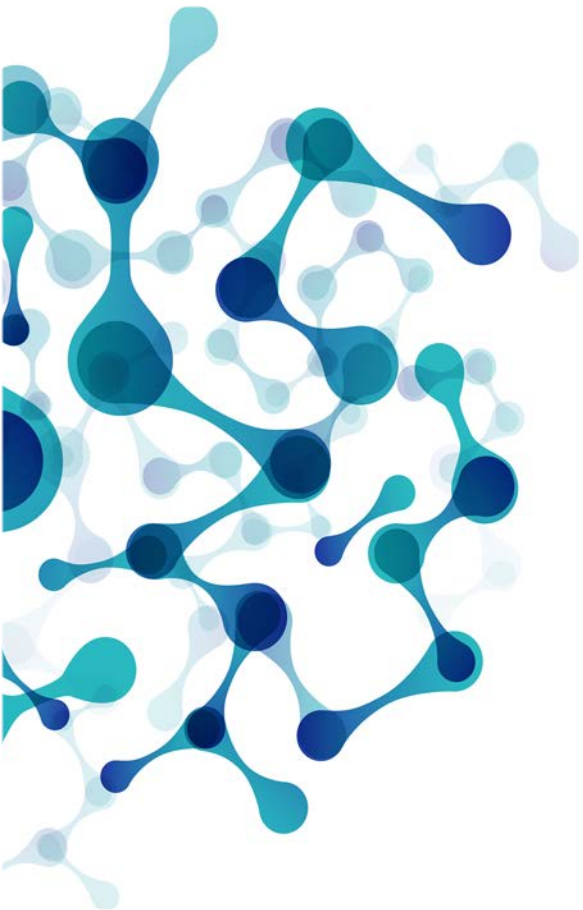
LOD (95%)

13,6 fg/reacción

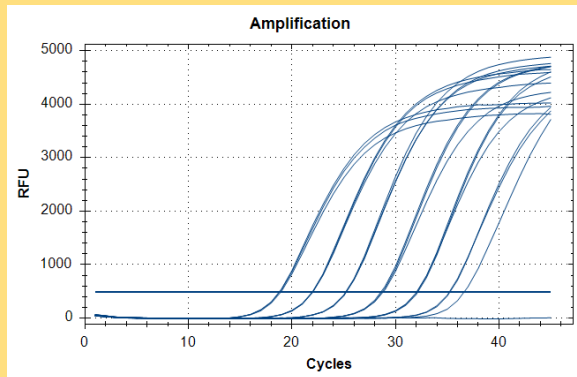
Species (N°)

<i>M. avium</i> subsp. <i>avium</i> (12)	<i>M. neoaurum</i> (1)
<i>M. avium</i> subsp. <i>hominissuis</i> (6)	<i>M. nonchromogenicum</i> (10)
<i>M. avium</i> subsp. <i>paratuberculosis</i> (3)	<i>M. palustre</i> (1)
<i>M. avium</i> complex (12)	<i>M. parascrofulaceum</i> (1)
<i>M. chitae</i> (2)	<i>M. peregrinum</i> (1)
<i>M. elephantis</i> (1)	<i>M. Phlei</i> (5)
<i>M. europaeum</i> (2)	<i>M. seoulense</i> (1)
<i>M. flavescens</i> (1)	<i>M. shimodei</i> (1)
<i>M. Fortuitum</i> (8)	<i>M. Smegmatis</i> (12)
<i>M. Gordonae</i> (4)	<i>M. terrae</i> (2)
<i>M. holsaticum</i> (1)	<i>M. thermoresistible</i> (3)
<i>M. intermedium</i> (1)	<i>M. vaccae</i> (1)
<i>M. intracellulare</i> (5)	<i>Corynebacterium</i> sp. (5)
<i>M. kansasii</i> (3)	<i>Streptomyces</i> sp. (5)
<i>M. Marinum</i> (2)	<i>Lactobacillus brevis</i> (1)

PCR a Tiempo Real Directa



IS6110 (Michelet *et al.*, 2018)



**QUANTIFAST
PATHOGEN + IC
PCR kit**

LOD (95%)

13,6 fg/reacción

Extracción de ADN

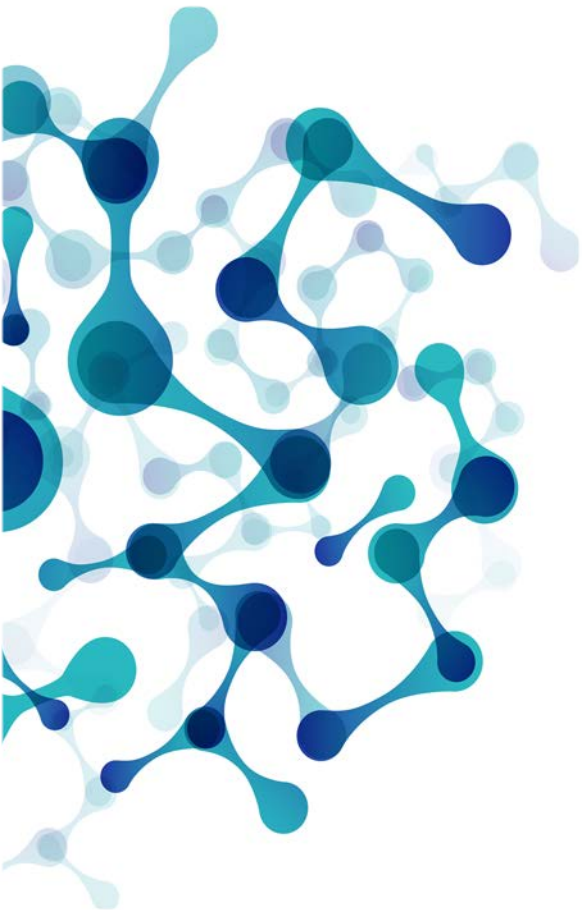
2-2,5 g de tejido

QIAGEN Blood & Tissue
(modificaciones)

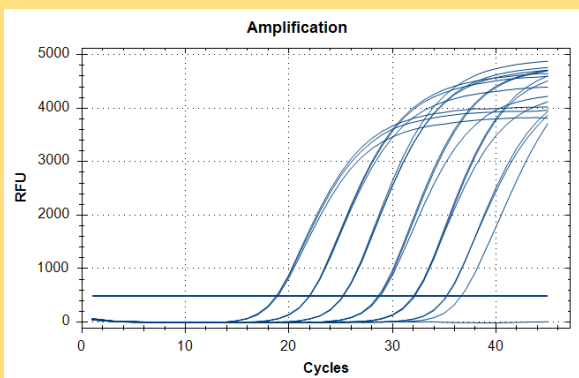
Species (Nº)

<i>M. avium</i> subsp. <i>avium</i> (12)	<i>M. neoaurum</i> (1)
<i>M. avium</i> subsp. <i>hominissuis</i> (6)	<i>M. nonchromogenicum</i> (10)
<i>M. avium</i> subsp. <i>paratuberculosis</i> (3)	<i>M. palustre</i> (1)
<i>M. avium</i> complex (12)	<i>M. parascrofulaceum</i> (1)
<i>M. chitae</i> (2)	<i>M. peregrinum</i> (1)
<i>M. elephantis</i> (1)	<i>M. Phlei</i> (5)
<i>M. europaeum</i> (2)	<i>M. seoulense</i> (1)
<i>M. flavescens</i> (1)	<i>M. shimodei</i> (1)
<i>M. Fortuitum</i> (8)	<i>M. Smegmatis</i> (12)
<i>M. Gordonae</i> (4)	<i>M. terrae</i> (2)
<i>M. holsaticum</i> (1)	<i>M. thermoresistible</i> (3)
<i>M. intermedium</i> (1)	<i>M. vaccae</i> (1)
<i>M. intracellulare</i> (5)	<i>Corynebacterium</i> sp. (5)
<i>M. kansasii</i> (3)	<i>Streptomyces</i> sp. (5)
<i>M. Marinum</i> (2)	<i>Lactobacillus brevis</i> (1)

PCR a Tiempo Real Directa



IS6110 (Michelet *et al.*, 2018)



LOD (95%)

13,6 fg/reacción

Extracción de ADN

2-2,5 g de tejido

QIAGEN Blood & Tissue
(*modificaciones*)

vs.
cultivo

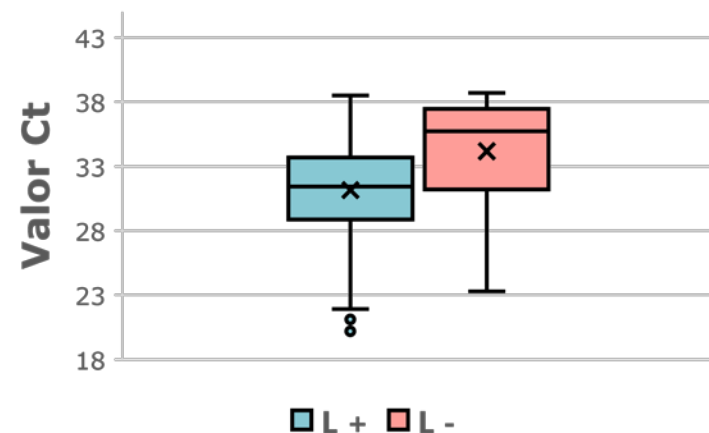
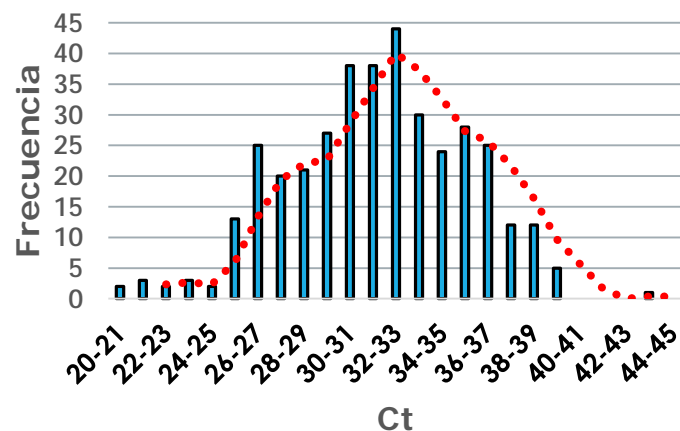
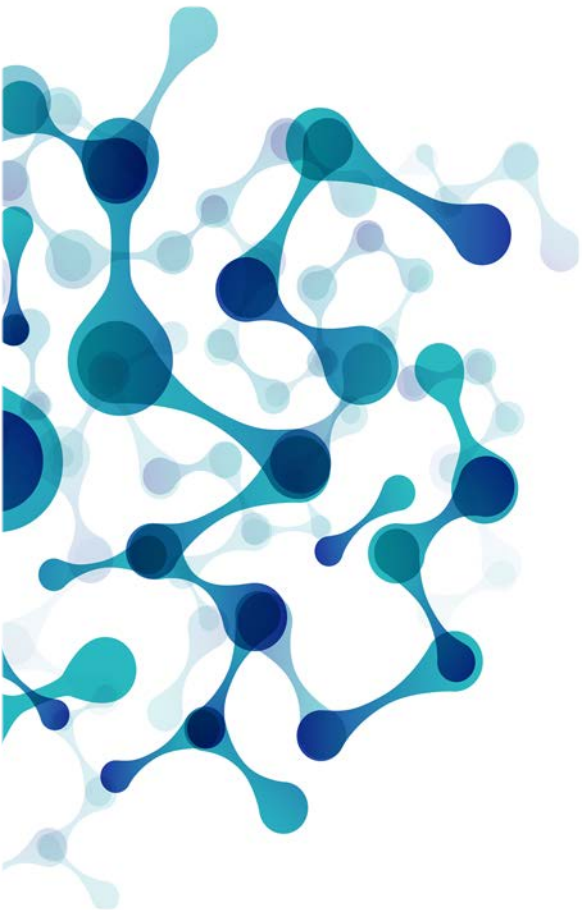
985 muestras procedentes de las
campañas de erradicación 2013-2018

272 IDTB negativas
588 IDTB positivas
105 detección en matadero
20 Inconclusas

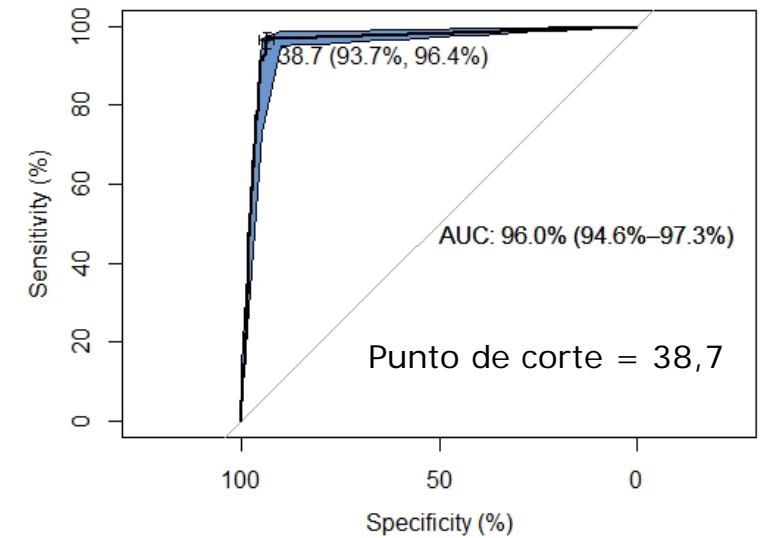
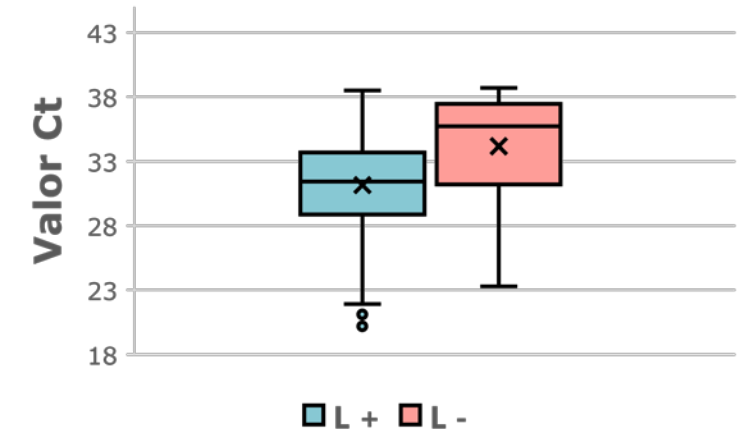
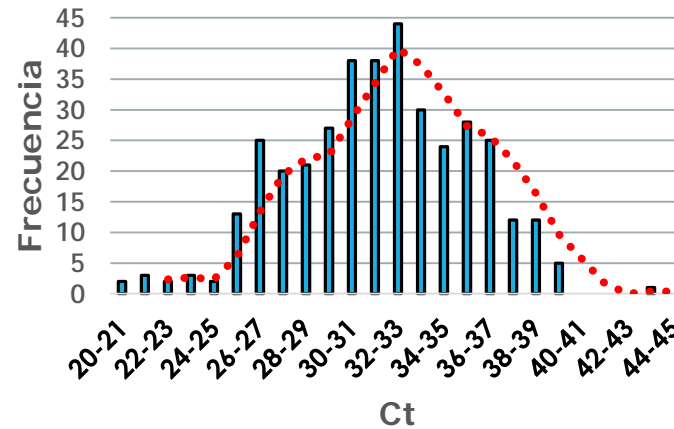
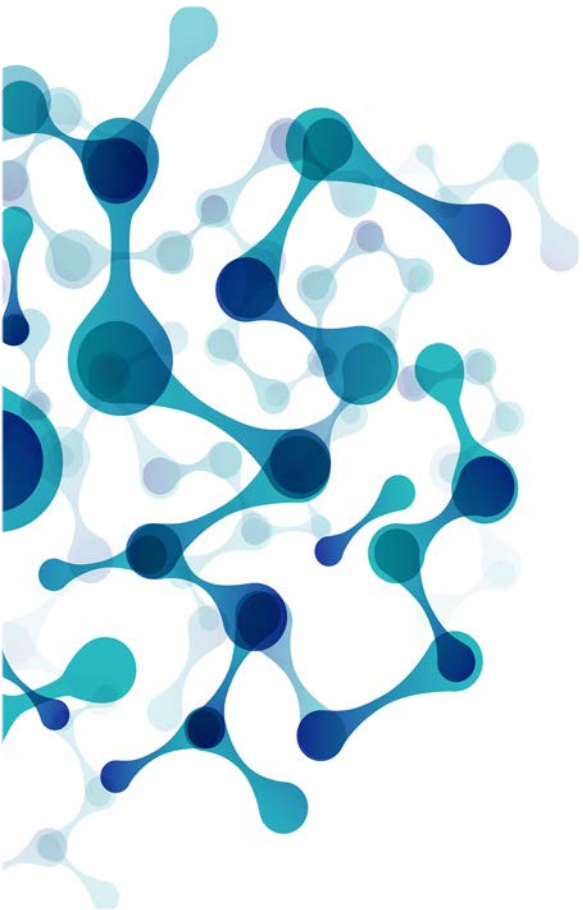
408 con lesiones macroscópicas (L)
577 sin lesiones macroscópicas (NL)



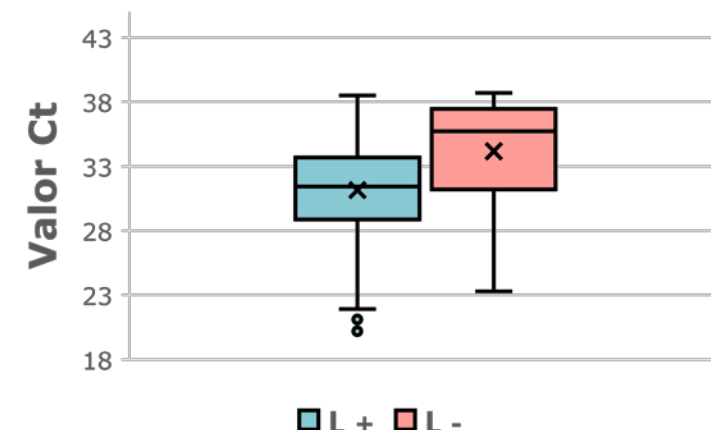
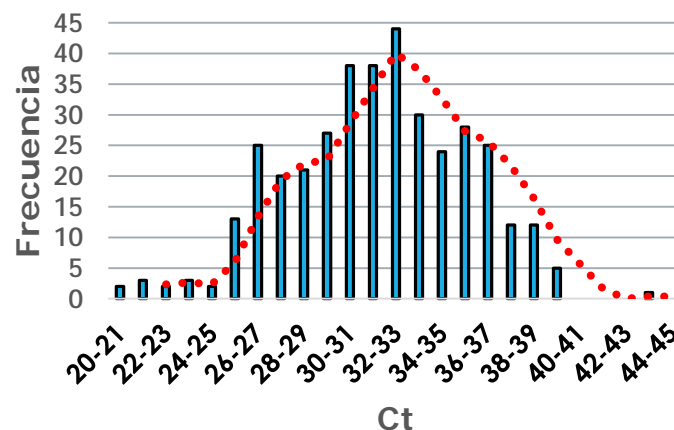
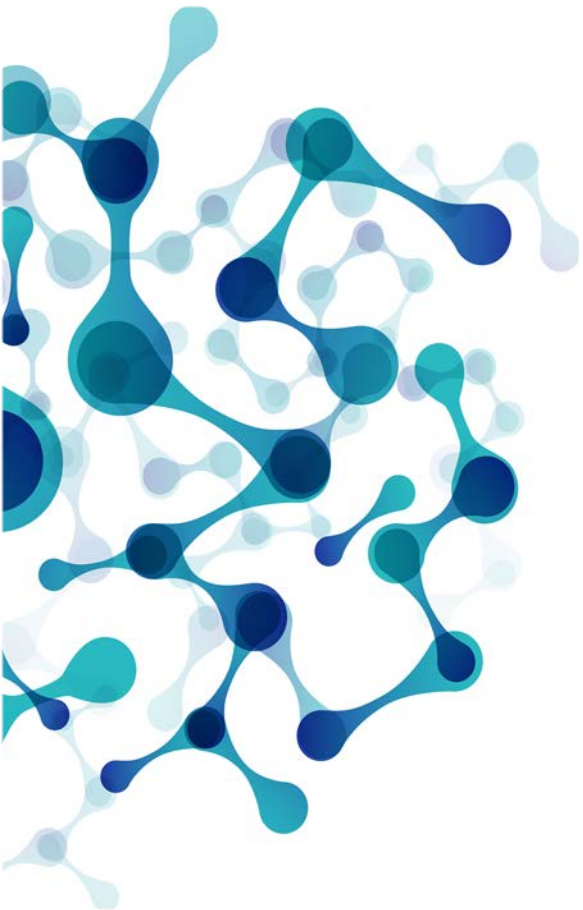
PCR a Tiempo Real Directa



PCR a Tiempo Real Directa

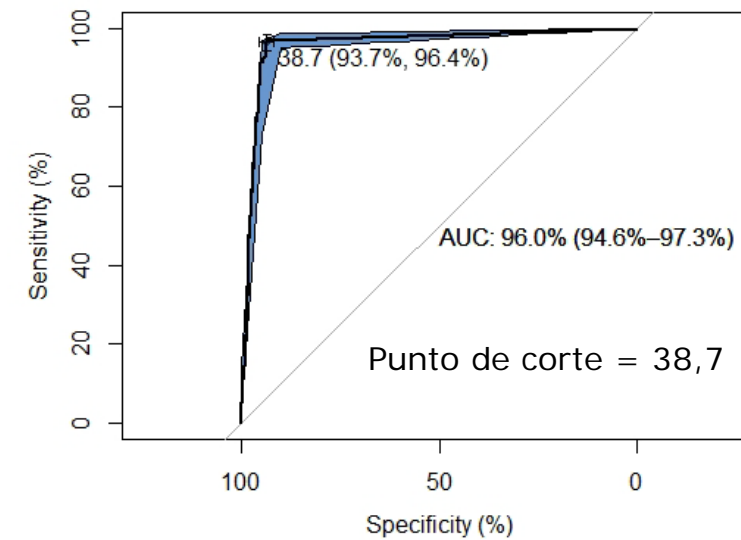


PCR a Tiempo Real Directa

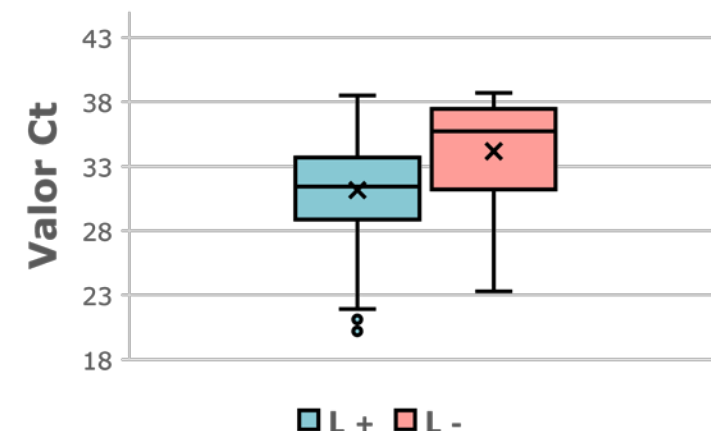
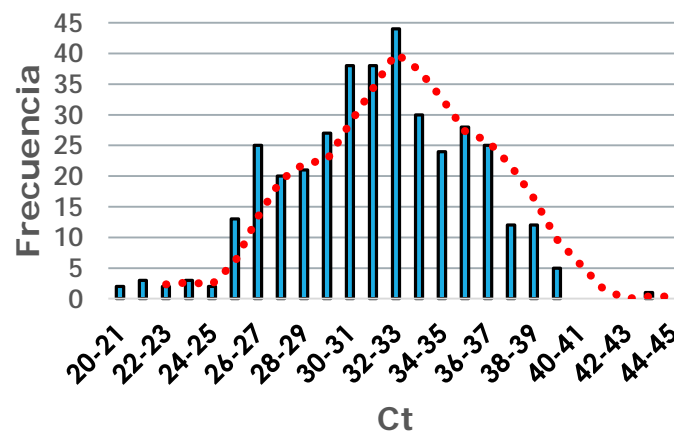
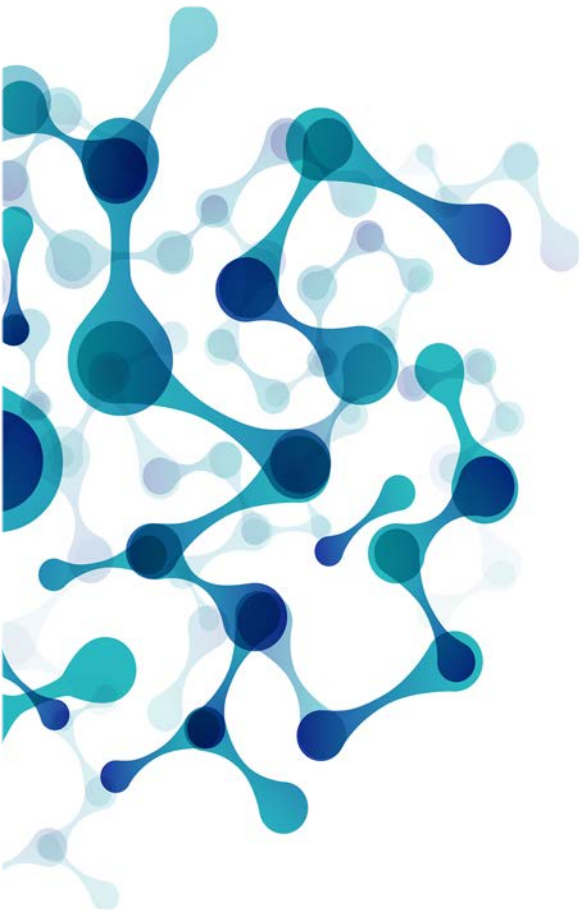


	Cultivo +	Cultivo -
IS6110 +	326 (361)	41 (6)
IS6110 -	12	647

Sn Relativa	96,78% (94,46% - 98,15%)
Sp Relativa	99,02% (97,88% - 99,55%)
PPV	98,37% (96,48% - 99,25%)
NPV	98,06% (96,64% - 98,89%)
K	0,96 (0,94 - 0,98)

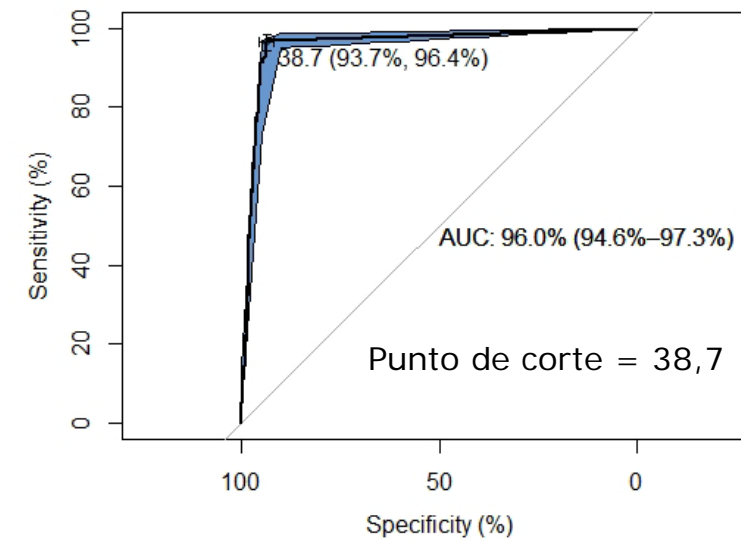


PCR a Tiempo Real Directa



	Cultivo +	Cultivo -
IS6110 +	326 (361)	41 (6)
IS6110 -	12	647

Sn Relativa	96,78% (94,46% - 98,15%)
Sp Relativa	99,02% (97,88% - 99,55%)
PPV	98,37% (96,48% - 99,25%)
NPV	98,06% (96,64% - 98,89%)
K	0,96 (0,94 - 0,98)



PCR a Tiempo Real Directa

Elevado rendimiento y concordancia con respecto al cultivo

Sensibilidad mayor que el cultivo

PCR a Tiempo Real Directa

Elevado rendimiento y concordancia con respecto al cultivo

Sensibilidad mayor que el cultivo

Elementos IS6110-like

Aislados IS6110 negativos

Confirmación mediante *mpb70*

PCR a Tiempo Real Directa

Elevado rendimiento y concordancia con respecto al cultivo

Sensibilidad mayor que el cultivo

Elementos IS6110-like

Aislados IS6110 negativos

Confirmación mediante *mpb70*



Epidemiología molecular

Secuenciación masiva

IS6110 + (*mpb70* +)
PCR inhibidas



Muchas gracias



UNIVERSIDAD
COMPLUTENSE
MADRID



Bibliografía

- Courcoul, A., Moyen, J.-L., Brugère, L., Faye, S., Hénault, S., Gares, H., Boschioli, M.-L., 2014. *Estimation of Sensitivity and Specificity of Bacteriology, Histopathology and PCR for the Confirmatory Diagnosis of Bovine Tuberculosis Using Latent Class Analysis* PLOS One 9.
- Garnier *et al.*, 2003. *The complete genome sequence of Mycobacterium bovis*. PNAS 100 (13).
- Ministerio de Agricultura y Pesca, Alimentación y Medioambiente (2019). *Programa nacional de erradicación de tuberculosis bovina presentado por España para el año 2019*.
- Lorente-Leal, V., Liandris, E., Castellanos, E., Bezos, J., Dominguez, L., de Juan, L., Romero, B., 2019. *Validation of a Real-Time PCR for the Detection of Mycobacterium tuberculosis Complex Members in Bovine Tissue Samples*. Front Vet Sci 6, 61.
- Michelet, L., de Cruz, K., Karoui, C., Tambosco, J., Moyen, J.L., Henault, S., Boschioli, M.L., 2018. *Second line molecular diagnosis for bovine tuberculosis to improve diagnostic schemes*. PLoS One 13, e0207614.