



Tesis doctoral



Eduardo Salvador Vera Salmoral

2024

# Estudio del rendimiento diagnóstico de diversas técnicas moleculares para la detección del Complejo *Mycobacterium tuberculosis* en ganado bovino.

Eduardo Salvador Vera Salmoral

Departamento de Sanidad Animal y  
Departamento de Anatomía y Anatomía Patológica  
Comparadas y Toxicología

Enero de 2024



Programa de doctorado Biociencias y Ciencias  
Agroalimentarias



UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA

Tesis doctoral



TITULO: *Estudio del rendimiento diagnóstico de diversas técnicas moleculares para la detección del Complejo Mycobacterium tuberculosis en ganado bovino*

AUTOR: *Eduardo Salvador Vera Salmoral*

---

© Edita: UCOPress. 2024  
Campus de Rabanales  
Ctra. Nacional IV, Km. 396 A  
14071 Córdoba

<https://www.uco.es/ucopress/index.php/es/ucopress@uco.es>

---

# UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA



## TESIS DOCTORAL

**Estudio del rendimiento diagnóstico de diversas técnicas  
moleculares para la detección del Complejo  
*Mycobacterium tuberculosis* en ganado bovino**

---

**Study of the diagnostic performance of various  
molecular techniques for the detection of  
*Mycobacterium tuberculosis* complex in cattle**

Memoria para optar al grado de Doctor por la Universidad de Córdoba

**Eduardo Salvador Vera Salmoral**

Directores

María Belén Huerta Lorenzo

José María Sánchez Carvajal

**Departamento de Sanidad Animal**

**Departamento de Anatomía, Anatomía Patológicas Comparadas y Toxicología**

Programa de doctorado de Biociencias y Ciencias Agroalimentarias

Córdoba, noviembre 2023





**DOCTORANDA/O**

Eduardo Salvador Vera Salmoral

**TÍTULO DE LA TESIS:*****Estudio del rendimiento diagnóstico de diversas técnicas moleculares para la detección del Complejo Mycobacterium tuberculosis en ganado bovino.*****INFORME RAZONADO DE LAS/LOS DIRECTORAS/ES DE LA TESIS****(se hará mención a la evolución y desarrollo de la tesis, así como a trabajos y publicaciones derivados de la misma)**

La tuberculosis bovina, producida por el complejo Mycobacterium tuberculosis Complex (CMT) es una enfermedad de declaración obligatoria, de carácter zoonótico, sometida a erradicación en nuestro país. Actualmente el cultivo bacteriológico es la técnica de referencia para su diagnóstico, si bien, el tiempo requerido y su moderada validez hacen necesaria la optimización y validación de nuevas técnicas que permitan alcanzar un diagnóstico rápido y fiable. Entre estas técnicas destacan la PCR digital y a tiempo real sobre tejido (qPCR), para las cuales no existe un todavía un protocolo estandarizado que permita su uso en sustitución del cultivo.

Los primeros trabajos desarrollados por nuestro grupo de investigación en este campo demostraron una notable mejora en la validez de la PCR a tiempo real al modificar el protocolo de extracción de ADN (Sánchez-Carvajal et al., 2021). Los resultados de este estudio piloto se tomaron como referencia para el desarrollo de esta tesis doctoral, cuyo objetivo es optimizar y validar diferentes protocolos de PCR sobre tejidos como alternativa al cultivo microbiológico para el diagnóstico de la tuberculosis bovina, así como estimar la utilidad diagnóstica de la PCR a tiempo real en distintos escenarios epidemiológicos y diagnósticos. Para ello, la tesis se ha estructurado en cuatro bloques. En primer lugar se presentan los resultados del estudio piloto “Real-Time PCR validation for Mycobacterium tuberculosis complex detection targeting IS6110 directly from bovine lymph nodes”, publicado en la revista Frontiers in Veterinary Sciences, en el que se comprueba un notable aumento en la sensibilidad diagnóstica de la PCR tras la incorporación de diversas disrupciones mecánicas y digestiones enzimáticas en el protocolo de extracción del ADN. Tras incorporar estas mejoras a la PCR, en el segundo bloque se determinó la validez diagnóstica de la PCR a tiempo real para la detección del complejo Mycobacterium tuberculosis en muestras frescas de nódulos linfáticos de bovino, comprobándose la elevada exactitud de las tres sondas utilizadas (IS6110, IS4 y mpb70) para confirmar la infección, así como de la sonda IS6110 para descartar la enfermedad, concluyendo que este protocolo sería el de elección para el diagnóstico de la enfermedad. Este trabajo, titulado “Optimization of real-time PCR protocols from lymph node bovine tissue for direct detection of Mycobacterium tuberculosis complex”, ha sido publicado en la revista Microbiology Spectrum (doi: 10.1128/spectrum.00348-23) y se presenta como indicio de calidad para la lectura y defensa de la Tesis Doctoral.

En el tercer bloque, se estimó la utilidad diagnóstica de la PCR a tiempo real, con la sonda IS6110, en función de la prevalencia de la enfermedad en la población de estudio y los resultados obtenidos previamente en la intradermotuberculinización y la inspección macroscópica. Comprobamos que su utilidad para confirmar la infección sería máxima en cualquier escenario epidemiológico. Asimismo, con la utilización previa de la intradermotuberculinización se podría descartar la TBb con una elevada certeza en los animales negativos a ambas pruebas, incluso en zonas con prevalencias de hasta el 80%. En base a todo ello, consideramos que la PCR a tiempo real podría constituir una alternativa rápida y eficaz al cultivo microbiológico como prueba de referencia de la tuberculosis bovina. El estudio derivado de este trabajo “Assessment of the diagnostic performance of intradermal tuberculin test and macroscopic inspection for the diagnosis of bovine tuberculosis according to WOAH guidelines” se encuentra actualmente en revisión en la revista Research in Veterinary Sciences. Finalmente, el estudio de validez de la PCR digital en muestras de tejido fresco de bovino con la sonda IS6110, demostró un rendimiento analítico (límite de detección 101 copias por 20 µl de reacción) y diagnóstico muy elevado (SE 90,76% y SP 100%), permitiendo la detección de animales infectados, sin lesiones macroscópicas pero afectados histopatológicamente, que no fueron detectados ni con el cultivo microbiológico ni con la PCR-IS6110 a tiempo real, por lo que podría constituir una herramienta muy eficaz en zonas de baja prevalencia. Los resultados de este estudio han dado lugar al trabajo “Droplet digital PCR (ddPCR) as alternative to microbiological culture for Mycobacterium tuberculosis complex detection in bovine lymph node tissue samples”, actualmente en revisión en la revista International Journal of Infectious Diseases.

Durante el desarrollo de esta tesis, el doctorando ha demostrado una gran capacidad de trabajo y dedicación, adaptándose y colaborando con todas las actividades desarrolladas en el grupo de investigación y que, sin duda, le ayudarán en su desarrollo profesional y personal. Esta tesis doctoral ha sido posible gracias al proyecto “Nuevas medidas y técnicas de control de la tuberculosis bovina en Andalucía” (GOP2i-CO-16-0010) de la Junta de Andalucía y los contratos como Personal Técnico de Apoyo a la Investigación concedidos al doctorando por la Junta de Andalucía.

Por todo ello, se autoriza la presentación de la tesis doctoral.

Córdoba, a 28 de noviembre de 2023

**Las/los directoras/es**

HUERTA  
LORENZO  
MARIA BELEN -  
52756051P

Firmado digitalmente  
por HUERTA LORENZO  
MARIA BELEN -  
52756051P  
Fecha: 2023.11.28  
12:26:32 +01'00'

SANCHEZ  
CARVAJAL JOSE  
MARIA - 14634801Q

Firmado digitalmente por  
SANCHEZ CARVAJAL JOSE  
MARIA - 14634801Q  
Fecha: 2023.12.04  
15:33:00 +01'00'

Fdo.: Belén Huerta Lorenzo  
José M<sup>a</sup> Sánchez Carvajal





## ABREVIATURAS

Ac	Anticuerpos
AECOSAN	Agencia Española de Consumo, Seguridad Alimentaria y Nutrición
BAAR	Bacilo ácido alcohol resistente
CGML	Células gigantes multinucleadas tipo <i>Langhans</i>
CMA	Complejo <i>Mycobacterium avium</i>
CMT	Complejo <i>Mycobacterium tuberculosis</i>
Ct	Umbral de ciclo
ddPCR	Reacción en cadena de la polimerasa digital
DRs	Repetición directa
DSe	Sensibilidad diagnóstica
DSp	Especificidad diagnóstica
DVR	Direct Variable Repeat
E	Especificidad
ELISA	Ensayo inmunoenzimático
FFPE	Fijados en formol e incrustados en parafina
IDTB	Intradermotuberculinización
IDTBc	Intradermotuberculinización comparada a nivel cervical
IDTBcd	Intradermotuberculinización simple a nivel del pliegue caudal
IDTBs	Intradermotuberculinización simple a nivel cervical
IFN- $\gamma$	Prueba del gamma interferón
$\kappa$	Coefficiente kappa de Cohen
LAMP	Amplificación isotérmica mediada por bucle
LOD	Límite de detección
LTB	Lesiones compatibles con tuberculosis
MAPA	Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación
MIRU	Unidades de repetición interespaciadas de micobacterias
MNT	Micobacterias no tuberculosas
NL	Nódulos linfáticos
OMSA	Organización Mundial de la Sanidad Animal
PATUBES	Plan de Actuación sobre tuberculosis en especies silvestres
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PR	Prevalencia real
qPCR	Reacción en cadena de la polimerasa a tiempo real o cuantitativa
RD	Real Decreto



RP	Razón de probabilidad
RP+	Razón de probabilidad positiva
RP-	Razón de probabilidad negativa
SE	Sensibilidad
TBb	Tuberculosis bovina
UE	Unión Europea
VP	Valores predictivos
VP-	Valor predictivo negativo
VP+	Valor predictivo positivo
VNTR	Número variable de repeticiones en tándem
WAHIS	Sistema mundial de información sanitaria
WGS	Secuenciación masiva del genoma
ZN	Ziehl-Neelsen

## ABREVIATIONS

AFB	Acid fast bacilli
bTB	Bovine tuberculosis
CI	Confidence interval
Ct	Cycle treshold
ddPCR	Droplet digital polymerase chain reaction
Dse	Diagnostic sensitivity
Dsp	Diagnostic specificity
FFPE	Formalin-fixed paraffin-embedded
FNR	False negative ratio
FPR	False positive ratio
HPF	High-power field
H&E	Haematoxylin-eosin
IAC	Internal amplification control
IFN- $\gamma$	Interferon-gamma release assays
$\kappa$	Cohen's kappa coefficient
LN	Lymph node
LOB	Limit of blank
LOD	Limit of detection
MI	Macroscopic inspection
MNGC	Langhan's type multinucleated giant cell
MTC	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> complex
NHL	No histopathological lesion
NLR	Negative likelihood ratio
NPV	Negative predictive value
NRA	Negative reference animals
NTBL	Non-tuberculosis-like lesions
NTM	Non-tuberculous mycobacteria
NVL	Non-visible lesions
PCR	Polymerase chain reaction
PLR	Positive likelihood ratio
Ppre	Pre-test probability
PPV	Positive predictive value
PRA	Positive reference animal
PV	Predictive value

qPCR	Real-time polymerase chain reaction
SE	Sensitivity
SP	Specificity
SCIT	Comparative cervical intradermal tuberculin test
SIT	Single cervical intradermal tuberculin test
TBL	Tuberculosis-like lesion
TP	True prevalence
UE	European Union
WAHIS	World Animal Health Information System
WOAH	World Organisation of Animal Health
ZN	Ziehl-Neelsen

# ÍNDICE

<b>Abreviaturas</b> .....	1
<b>Abbreviations</b> .....	3
<b>Índice</b> .....	5
<b>Índice de figuras</b> .....	7
<b>Índice de tablas</b> .....	9
<b>Resumen</b> .....	12
<b>Abstract</b> .....	18
<b>Capítulo I. Introducción</b> .....	22
1. Aproximación al sector bovino.....	24
2. Infección por el complejo <i>Mycobacterium tuberculosis</i> .....	26
2.1 Etiología .....	26
2.2 Importancia de la TBb como zoonosis .....	29
2.3 Epidemiología .....	30
2.4 Patogenia .....	33
2.5 Síntomas y lesiones .....	34
2.6 Diagnóstico .....	36
2.6.1 Diagnóstico antemortem .....	36
2.6.2 Diagnóstico postmortem .....	44
2.7 Control y erradicación de la tuberculosis bovina en España .....	58
3. Validación de las técnicas de diagnóstico .....	62
3.1 Rendimiento diagnóstico .....	63
<b>Capítulo II. Objetivos</b> .....	68

<b>Capítulo III. Estudios</b> .....	74
<b>Estudio I:</b> Real-Time PCR validation for <i>Mycobacterium tuberculosis</i> complex detection targeting IS6110 directly from bovine lymph node .....	76
<b>Estudio II:</b> Diagnostic performance of intradermal tuberculin test and macroscopic inspection for the diagnosis of bovine tuberculosis in different epidemiological scenarios .....	98
<b>Estudio III:</b> Assessment of the diagnostic performance of intradermal tuberculin test and macroscopic inspection for the diagnosis of bovine tuberculosis according to WOAHA guidelines .....	126
<b>Estudio IV:</b> Droplet digital PCR (ddPCR) as alternative to microbiological culture for <i>Mycobacterium tuberculosis</i> complex detection in bovine lymph node tissue samples .....	150
<b>Capítulo IV. Discusión general</b> .....	176
<b>Capítulo V. Conclusiones</b> .....	184
<b>Capítulo VI. Aportaciones científicas</b> .....	188
<b>Capítulo VII. Bibliografía</b> .....	196

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Sistema multihospedador de la TBb en la Península Ibérica .....	31
<b>Figura 2.</b> Detalle de lesiones macroscópicas (granulomas) en nódulos linfáticos retrofaríngeos .....	34
<b>Figura 3.</b> Representación gráfica del espectro de respuestas inmunitarias desencadenadas en el bovino tras la infección y representación de las respuestas a las pruebas de IDTB e IFN- $\gamma$ .....	40
<b>Figura 4.</b> Distribución de las lesiones en el ganado bovino .....	44
<b>Figura 5.</b> Evolución del granuloma tuberculoso .....	46
<b>Figura 6.</b> Curva de amplificación de una qPCR .....	53
<b>Figura 7.</b> Resumen gráfico de la realización de una ddPCR .....	55
<b>Figura 8.</b> Prevalencia e incidencia de tuberculosis bovina en España durante los años 2001-2022 .....	58
<b>Figura 9.</b> Comunidades Autónomas y regiones de España oficialmente libres de TBb	59
<b>Figura 10.</b> Prevalencia comarcal de TBb España durante el año 2022 .....	59
<b>Figura 11.</b> Fases de la evaluación del rendimiento analítico y diagnóstico .....	62
<b>Figura 12.</b> Amplification plot of representative samples. qPCR targeting IS6110 assay using representative fresh lymph node tissue samples belonging to different cattle. $\Delta$ RFU (Y axis) of the reaction was plotted against the Ct value (X axis). The samples with lowest DNA concentration could be detected ranging from 34 to 36 cycles roughly .....	85
<b>Figura 13.</b> Venn diagram depicted the topographical distribution of positive lymph nodes (n=77) according to their results obtained upon analysing sampled by microbiological culture, qPCR-IS6110 and Sanger sequencing. Most of positive cattle were disclosed in tracheobronchial lymph node, followed by retropharyngeal and mesenteric lymph nodes, with most positive animals presenting only one positive lymph node highlighting the choice of tissue is a cornerstone for performing an accurate direct diagnosis of MTC. ....	88



<b>Figura 14.</b> Graphical representation of the flow chart of the protocol 2.....	104
<b>Figura 15.</b> Graphical representation of the estimated negative predictive value (NPV) based on the validity of the real-time PCR targeting IS6110 (blue line), IS4 (green line) and mpb70 (orange line) and the true prevalence of bTB .....	113
<b>Figura 16.</b> Positive predictive values (PPV) of the single intradermal tuberculin Test (SIT) with severe interpretation estimated according to the pre-test probability of bovine tuberculosis (bTB) .....	134
<b>Figura 17.</b> Inverse of the positive predictive values (1/PPV) of the single intradermal tuberculin Test (SIT) with severe interpretation estimated according to the pre-test probability of bovine tuberculosis (bTB) .....	135
<b>Figura 18.</b> Positive (PPV) and negative (NPV) predictive values of macroscopic inspection, as a function of the pre-test probability of bovine tuberculosis .....	136
<b>Figura 19.</b> Optimization of the ddPCR-IS6110 assay using <i>Mycobacterium tuberculosis</i> complex (MTC) DNA isolated from LN tissue samples. The gradient of annealing temperatures (ranging from 64 °C to 56 °C) for a positive sample (A) and non-template control (NTC) (B) were plotted with positive (blue) and negative (grey) droplets. E08 plotted the optimal temperature of annealing and extension (60 °C). (C) Descending concentrations of primers and probe. D06 plotted the optimal primers and probe concentration assay (F-IS6110 (900nM), R-IS6110 (600 nM), P-IS6110 (200 nM) .....	159
<b>Figure 20.</b> Optimization of the ddPCR-IS6110 assay using <i>Mycobacterium tuberculosis</i> complex (MTC) DNA isolated from LN tissue samples. Descending concentrations of DNA isolated from MTC-positive samples with a Ct value of 26 (A) or 34 (500 ng, 250 ng, 50 ng, and 10 ng) in duplicate (B). Analytical specificity of ddPCR-targeting IS6110 evaluating the most common bacterial agents found in tuberculosis like lesion ( <i>Mycobacterium avium</i> subsp. <i>paratuberculosis</i> , <i>Mycobacterium avium</i> subsp. <i>avium</i> , <i>Trueperella pyogenes</i> , <i>Streptococcus suis</i> and <i>Staphylococcus</i> spp.) (C) .....	160

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Categorización de las enfermedades infecciosas del ganado bovino de acuerdo con la clasificación realizada por el Reglamento de ejecución (UE) 2018/1882	25
<b>Tabla 2.</b> Resumen de las principales especies de micobacterias, incluyéndose en el CMT y el CMA aquellas que tienen un mayor interés en medicina humana y veterinaria	28
<b>Tabla 3.</b> Interpretación estándar de la IDTBs y de la IDTBc	38
<b>Tabla 4.</b> Interpretación severa de la IDTBs y del IDTBc	38
<b>Tabla 5.</b> Resumen de resultados de SE y E obtenidos según la diana y la PCR utilizada en distintos estudios científicos	52
<b>Tabla 6.</b> Validez y utilidad recomendada para las pruebas de diagnóstico en función de la finalidad para la que serán utilizadas	65
<b>Tabla 7.</b> Evaluation of the microbiological culture and direct qPCR targeting <i>IS6110</i> results obtained upon analysing 687 lymph nodes, according to the presence or absence of tuberculosis like-lesions	84
<b>Tabla 8.</b> Diagnostic performance of direct qPCR targeting <i>IS6110</i> compared to microbiological culture as gold standard analysing 687 lymph nodes belonging to 230 cattle	86
<b>Tabla 9.</b> Validation of direct qPCR targeting <i>IS6110</i> for the detection of MTC analyzing 687 lymph nodes belonging to 230 cattle	87
<b>Tabla 10.</b> Assessment of the microbiological culture and direct qPCR targeting <i>IS6110</i> results obtained upon analysing 687 lymph nodes belonging to 230 cattle, according to the presence or absence of tuberculosis like-lesions	89
<b>Tabla 11.</b> Description of the obtained results by microbiological culture, real-time PCR- <i>IS6110</i> (protocol 1 and 2), <i>IS4</i> and <i>mpb70</i> in relation to the presence of tuberculosis-like-lesions	107

<b>Table 12.</b> Diagnostic performance summary of real-time PCR-IS6110 by comparing with microbiological culture assay under two different extraction protocols, 1 or 2. Estimates were calculated for an imperfect gold standard assay using EPIDAT 3.1 software (Software for Epidemiologic Analysis of Tabulated Data) .....	109
<b>Table 13.</b> Diagnostic performance summary of real-time PCR-IS6110, IS4 and mpb70 comparing with reference microbiological culture assay (imperfect gold standard assay) under the same cycling conditions .....	111
<b>Table 14.</b> McNemar test. Pairwise frequencies of real-time PCR results for IS6110, IS4 and mpb70 in 81 animals according to microbiological culture results (postive n = 40 and negative n = 41) .....	112
<b>Table 15.</b> Diagnostic sensitivity, specificity and likelihood ratios estimates for the single intradermal tuberculin test (SIT), with severe interpretation, and the macroscopic inspection .....	133
<b>Table 16.</b> Sequences of MTC specific primers and TaqMan probe targeting IS6110 for real-time PCR and droplet digital PCR (ddPCR) assays .....	155
<b>Table 17.</b> Evaluation of confirmatory real-time PCR and ddPCR targeting IS6110 from microbiological culture DNA isolation according to the presence of gross tuberculosis-like lesions (TBL), histopathological TBL or no histopathological lesion (NHL) .....	161
<b>Table 18.</b> Evaluation of real-time PCR and ddPCR targeting IS6110 from LNs DNA isolation according to the presence of gross tuberculosis-like lesions (TBL), histopathological TBL or no histopathological lesion (NHL) .....	162
<b>Table 19.</b> Diagnostic performance of droplet digital PCR (ddPCR) targeting IS6110 from microbiological culture (A) and fresh lymph node (LN) tissue samples (B) in comparison with the established reference standard (selective microbiological culture confirmed by real-time PCR-IS6110) (N=100) .....	164
<b>Table 20.</b> Summary of discordant results between different diagnostic techniques .....	164



## RESUMEN/SUMMARY

---







## RESUMEN

La tuberculosis bovina (TBb) es una enfermedad infectocontagiosa de carácter crónico, provocada por bacterias pertenecientes al Complejo *Mycobacterium tuberculosis* (CMT). Esta enfermedad afecta a un amplio rango de especies animales, tanto domésticas como silvestres, así como al propio ser humano. Su incidencia a nivel global genera un impacto significativo a nivel económico, ganadero y de salud pública, lo cual justifica el desarrollo en numerosos países de programas de control y erradicación de la enfermedad. A pesar de estos esfuerzos, el éxito de dichos programas se encuentra vinculado estrechamente a las técnicas diagnósticas disponibles. En este contexto, el cultivo microbiológico, reconocido actualmente como la técnica de referencia para confirmar la presencia de la enfermedad, presenta limitaciones en cuanto a su rendimiento, siendo un método que puede requerir hasta 3 meses para obtener resultados concluyentes.

Teniendo en cuenta esta situación, la presente tesis doctoral se centró en el estudio de la validez y el rendimiento diagnóstico de la PCR a tiempo real y la PCR digital (ddPCR), considerando diferentes protocolos, escenarios epidemiológicos y objetivos diagnósticos, con la finalidad de establecer un método estandarizado que posibilite la utilización de las técnicas moleculares como alternativa al cultivo microbiológico.

Para ello, se realizó un primer estudio dirigido a validar la PCR a tiempo real con la diana IS6110 para la detección del CMT en muestras de tejido fresco de bovino. En dicho estudio, se tomaron muestras de los nódulos linfáticos (NL) retrofaríngeo, traqueobronquial y mesentérico de 230 animales sacrificados en matadero para su análisis molecular y microbiológico. Previamente a su análisis por PCR, las muestras se sometieron a un protocolo de extracción constituido por una disrupción mecánica y una digestión enzimática mediante proteinasa K. Los resultados de este estudio preliminar revelaron el considerable potencial de la PCR a tiempo real como alternativa al cultivo microbiológico para la confirmación de la TBb, con una sensibilidad (SE) del 77,1% (95% IC: 66,5-87,6%) y una especificidad (E) del 99,4% (95% IC: 98,3-100%). Destacar, además, la detección de la bacteria mediante PCR en muestras negativas al cultivo microbiológico. Estos hallazgos se tomaron como punto de partida para la realización de los siguientes estudios que conforman la presente tesis.

A partir de las limitaciones detectadas en el primer estudio, se plantearon dos nuevos objetivos con el fin de mejorar el rendimiento diagnóstico de la PCR a tiempo real: 1) comparar diferentes

métodos de extracción desde tejido fresco de bovino para seleccionar aquel con mayor validez analítica y diagnóstica; y 2) evaluar la validez de diferentes dianas genéticas para la detección del CMT a partir del protocolo seleccionado.

Para abordar estos objetivos, se analizaron los LNs de 81 animales, sometiéndolos a un nuevo protocolo de extracción (protocolo optimizado) basado en una doble lisis mecánica y en la digestión con proteinasa K, lo que permitió mejorar la eficiencia de extracción. Con este protocolo, la PCR a tiempo real con la diana IS6110 mostró una SE del 95,9% (95% IC: 89,70-100%), una E del 100% (95% IC: 100%), una RP+ > 10 y una RP- = 0,04, lo que implica un alto valor diagnóstico para confirmar y descartar la enfermedad. Adicionalmente, se determinó la validez de la PCR a tiempo real utilizando las secuencias mpb70 e IS4 como dianas. La PCR-mpb70 presentó una SE del 83,30% (95% IC: 71,60-95,0%) y una E del 100% (95% IC: 100%), mientras que la PCR-IS4 mostró una SE del 91% (95% IC: 82,0-99,80%) y una E del 100% (95% IC: 100%).

En este segundo estudio, también se evaluó la credibilidad de los resultados de la PCR a tiempo real en función de la prevalencia de la enfermedad. Los datos obtenidos con las tres dianas mostraron una credibilidad del 100% para los resultados positivos, independientemente del escenario epidemiológico. Por su parte, la credibilidad de los resultados negativos sería superior al 80% con prevalencias del 0 al 60%, destacando especialmente para la PCR-IS6110 ( $\geq 90\%$ ).

A raíz de estos resultados, se evaluó la utilidad diagnóstica y el coste económico de la intradermotuberculinización con interpretación severa (IDTBs) y la inspección macroscópica en función de la probabilidad de la infección (pre-prueba) y el propósito diagnóstico, de acuerdo con los criterios de la Organización Mundial de la Sanidad Animal (OMSA), así como su influencia en la credibilidad de la PCR-IS6110. Para ello, en este tercer estudio, se compararon los resultados obtenidos con las técnicas mencionadas en 59 animales positivos a la tuberculosis bovina (procedentes de explotaciones T1-T2 y positivos al cultivo/PCR en al menos uno de los tres LN seleccionados) y 58 animales negativos a la tuberculosis bovina (procedentes de explotaciones T3H y positivos al cultivo/PCR en todas las muestras). La IDTBs mostró una SE del 86,4% (95% IC: 76,8% - 96%) y una E de 87,9% (95% IC: 78,7% - 97,2%), determinando un rendimiento diagnóstico adecuado tanto para descartar la enfermedad en explotaciones históricamente libres de la enfermedad como para detectar animales en estadios tempranos de infección. En función del Valor Predictivo Positivo determinado para la IDTBs, con probabilidades pre-prueba moderadas (6-30%) se sacrificarían entre

2 y 4 animales IDTBs-positivos por cada animal verdaderamente infectado detectado; mientras que, si dicha probabilidad es muy baja (entre 0,1 y 2%), se sacrificarían entre 8 y 141 animales.

Asimismo, la utilización de la intradermotuberculinización previamente a la PCR-IS6110 permitiría descartar la TBb con una elevada certeza en animales negativos a ambas pruebas, incluso en zonas con prevalencias de hasta el 80%.

En cuanto a la inspección macroscópica, mostró una SE y E del 67.8% (95% IC: 55%-80,6%) y 98,3% (95% IC: 94,1%-100%), respectivamente. En base a estos valores, la técnica resulta especialmente útil para confirmar la enfermedad (VP+ > 90% cuando la prevalencia es > 19%), lo que la convierte en una posible alternativa a la IDTB en aquellas regiones donde su aplicación pueda resultar poco viable económicamente. Por el contrario, si la probabilidad pre-prueba existente es inferior al 25%, la ausencia de lesiones macroscópicas durante la inspección post-mortem tendrá una credibilidad superior al 90%.

Finalmente, en el marco de esta tesis se realizó un cuarto estudio con el objetivo de validar la ddPCR para la detección del CMT, dado que esta modalidad de PCR tiene la capacidad de superar las limitaciones propias de la PCR a tiempo real. La ddPCR se realizó a utilizando la diana IS6110, empleando muestras tanto de cultivo como resultantes del protocolo de extracción optimizado a partir de muestras tejido fresco de bovino. Las muestras procedían de NL retrofaríngeos, traqueobronquiales y mesentéricos de 100 canales de vacuno, y fueron analizados tanto macroscópicamente como histológicamente para valorar la presencia de LTBs.

La ddPCR desde cultivo logró identificar 48 muestras como positivas, en comparación con las 49 detectadas por PCR a tiempo real desde cultivo microbiológico. De las 48 muestras positivas por ddPCR-IS6110 desde cultivo, 19 presentaban lesiones macroscópicas y 37 lesiones microscópicas. Esta ddPCR-IS6110 mostró una SE del 90,76% (95% IC: 82,58-98,96%) y una E del 100% (95% IC: 100%).

Por otro lado, la ddPCR-IS6110 realizada a partir de NL identificó 55 muestras como positivas, en contraste con las 53 positivas por PCR a tiempo real, 41 de las cuales presentaron lesiones histopatológicas. Esta ddPCR permitió detectar, por ende, un mayor número de muestras positivas al CMT que la técnica de referencia, siendo una herramienta diagnóstica de alta utilidad diagnóstica para confirmar y descartar la TBb ( $RP+ = \infty$  y  $RP- = 0,05$ ).

En conclusión, los resultados obtenidos en estos estudios apoyan la hipótesis inicial de que las técnicas moleculares, como la ddPCR o la PCR a tiempo real, podrían constituir una alternativa rápida y eficaz al cultivo microbiológico para confirmar el diagnóstico del CTM en muestras de tejido, lo que podría aumentar la eficiencia de los programas de erradicación.

## SUMMARY

Bovine tuberculosis (bTB) is an infectious and contagious disease of a chronic nature, caused by bacteria belonging to the *Mycobacterium tuberculosis* Complex (MTC). This disease affects a wide range of animal species, both domestic and wild, as well as humans themselves. Its global incidence has a significant impact on the economy, livestock, and public health, justifying the implementation of control and eradication programs in numerous countries. Despite these efforts, the success of such programs is closely linked to the available diagnostic techniques. In this context, microbiological culture, currently recognized as the reference technique to confirm the presence of the disease, has limitations in terms of its performance, being a method that may require up to 3 months to obtain conclusive results.

Given this situation, this doctoral thesis focused on studying the validity and diagnostic performance of real-time PCR and digital PCR (ddPCR), considering different protocols, epidemiological scenarios, and diagnostic objectives. The aim was to establish a standardized method that enables the use of molecular techniques as an alternative to microbiological culture.

To achieve this, an initial study was conducted to validate real-time PCR with the IS6110 target for detecting the MTC in fresh bovine tissue samples. In this study, samples were collected from retropharyngeal, tracheobronchial, and mesenteric lymph nodes (LN) of 230 animals slaughtered in the abattoir for molecular and microbiological analysis. Prior to PCR analysis, samples were subjected to an extraction protocol consisting of mechanical disruption and enzymatic digestion with proteinase K. The results of this preliminary study revealed the significant potential of real-time PCR as an alternative to microbiological culture for confirming bTB, with a sensitivity (SE) of 77.1% (95% CI: 66.5-87.6%) and specificity (SP) of 99.4% (95% CI: 98.3-100%). In addition, it is worth mentioning the detection of the bacteria by PCR in samples with negative microbiological culture. These findings served as a starting point for the subsequent studies that constitute the present thesis.

Based on the limitations identified in the initial study, two new objectives were proposed to enhance the diagnostic performance of real-time PCR: 1) compare different extraction methods from fresh bovine tissue to select the one with greater analytical and diagnostic validity, and 2) assess the validity of different genetic targets for detecting the MTC using the selected protocol.

To address these objectives, LNs from 81 animals were analyzed. They were subjected to a new extraction protocol (optimized protocol) based on double mechanical lysis and digestion with

proteinase K, which improved the extraction efficiency. With this protocol, real-time PCR targeting IS6110 showed a SE of 95.9% (95% CI: 89.70-100%), SP of 100% (95% CI: 100%), a positive likelihood ratio (PLR) > 10, and a negative likelihood ratio (NLR) = 0.04, indicating a high diagnostic value for confirming and ruling out the disease. Additionally, the validity of real-time PCR using mpb70 and IS4 sequences as targets was determined. PCR-mpb70 exhibited a SE of 83.30% (95% CI: 71.60-95.0%) and SP of 100% (95% CI: 100%), while PCR-IS4 showed a SE of 91% (95% CI: 82.0-99.80%) and SP of 100% (95% CI: 100%).

In this second study, the credibility of real-time PCR results was also assessed based on the prevalence of the disease. The data obtained with the three targets showed 100% credibility for positive results, regardless of the epidemiological scenario. On the other hand, the credibility of negative results would be above 80% with prevalences ranging from 0 to 60%, particularly noteworthy for PCR-IS6110 ( $\geq 90\%$ ).

As a result of these findings, the diagnostic utility and economic cost of the severe interpretation of single intradermal tuberculin test (SIT) and macroscopic inspection (MI) were evaluated based on the probability of infection (pre-test) and the diagnostic purpose, following the criteria of the World Organisation for Animal Health (WOAH), as well as their influence on the credibility of PCR-IS6110. In this third study, the results obtained with the mentioned techniques were compared in 59 animals positive for bovine tuberculosis (from T1-T2 farms and positive in culture/PCR in at least one of the three selected LNs) and 58 animals negative for bTB (from T3H farms and positive in culture/PCR in all samples). SIT showed a SE of 86.4% (95% CI: 76.8% - 96%) and a SP of 87.9% (95% CI: 78.7% - 97.2%), determining an appropriate diagnostic performance for both ruling out the disease in historically disease-free farms and detecting animals in early stages of infection. Based on the PPV determined for SIT, with moderate pre-test probabilities (6-30%), between 2 and 4 SIT-positive animals would be sacrificed for every truly infected animal detected; whereas, if the probability is very low (between 0.1 and 2%), between 8 and 141 animals would be sacrificed.

Likewise, the use of SIT before PCR-IS6110 would allow the exclusion of bTB with high certainty in animals negative for both tests, even in areas with prevalences of up to 80%.

Regarding MI, it showed a SE and a SP of 67.8% (95% CI: 55%-80.6%) and 98.3% (95% CI: 94.1%-100%), respectively. Based on these values, the technique is particularly useful for confirming the disease (PPV > 90% when the prevalence is > 19%), making it a potential alternative to SIT in regions where its economic feasibility may be limited. On the contrary, if the existing pre-test probability is



less than 25%, the absence of macroscopic lesions during post-mortem inspection will have a credibility of over 90%.

Finally, within the framework of this thesis, a fourth study was conducted with the aim of validating ddPCR for the detection of MTC because this PCR modality has the ability to overcome the limitations inherent in real-time PCR. The ddPCR was performed using the *IS6110* target, employing samples from both culture and those resulting from the extraction protocol optimized from fresh bovine tissue samples. The samples originated from retropharyngeal, tracheobronchial, and mesenteric LNs of 100 bovine channels and were analyzed both macroscopically and histologically to assess the presence of tuberculosis-like lesions.

The ddPCR from culture successfully identified 48 samples as positive, compared to the 49 detected by real-time PCR from microbiological culture. Of the 48 samples positive by ddPCR-*IS6110* from culture, 19 presented macroscopic lesions and 37 presented microscopic lesions. This ddPCR-*IS6110* showed a SE of 90.76% (95% CI: 82.58-98.96%) and a SP of 100% (95% CI: 100%).

On the other hand, ddPCR-*IS6110* performed from In identified 55 samples as positive, in contrast to the 53 positives detected by real-time PCR, 41 of which showed histopathological lesions. Therefore, this ddPCR allowed for the detection of a higher number of MTC-positive samples than the reference technique, making it a highly useful diagnostic tool for confirming and ruling out bTB (PLR =  $\infty$  and NLR = 0.05).

In conclusion, the results obtained in these studies support the initial hypothesis that molecular techniques, such as ddPCR or real-time PCR, could serve as a rapid and effective alternative to microbiological culture to confirm the diagnosis of MTC in tissue samples. This could potentially enhance the efficiency of eradication programs.



# CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN

---





## 1. APROXIMACIÓN AL SECTOR BOVINO

La crianza del ganado bovino sustenta un importante sector productivo que, desde antaño, tiene una gran relevancia a nivel mundial. Esta importancia se fundamenta en los valiosos productos que aporta a la economía y alimentación a escala mundial, siendo la carne y la leche recursos de vital importancia. Además, destaca el papel crucial que desempeña esta especie en el desarrollo y la sostenibilidad de las zonas rurales. En este contexto, es esencial subrayar que el abandono progresivo de estas áreas representa un desafío creciente en los últimos años, generando un impacto significativo en la estabilidad y equilibrio de dichos entornos.

La Unión Europea (UE), con en torno a 85 millones de cabezas de vacuno, destaca mundialmente como uno de los principales productores y consumidores de carne y lácteos de origen bovino. Según datos recientes, la UE genera el 18,3% de la producción global de carne bovina posicionándose como el tercer productor mundial, solo por detrás de Estados Unidos y Brasil (Food and Agriculture Organization statistical database, 2023). Por otro lado, en el sector lácteo, la UE, con el 19,3% de la producción global, se sitúa como el primer productor mundial seguido de Estados Unidos y la India (United States Department of Agriculture, 2021).

En el caso de España, el ganado bovino aporta en torno al 27,3% de la producción final ganadera (PFG). Esta producción nacional proviene de un censo aproximado de 6,5 millones de cabezas, de las cuales alrededor de 2 millones corresponde a vacas nodrizas de más de 24 meses de edad, y cerca de 809.000 son de tipo lechero. El 22% de dichos animales se encuentran en la Comunidad Autónoma de Castilla y León, seguida de Galicia y Extremadura, con un 14% cada una (Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación (MAPA) 2021).

Considerando la gran importancia que ostenta la producción de ganado vacuno tanto en nuestro país como en la UE, resulta necesario implementar programas sanitarios y medidas de manejo destinadas al control de las principales enfermedades que afectan a este tipo de ganado. En este contexto, las enfermedades transmisibles, ya sean infecciosas o parasitarias, adquieren una relevancia destacada. Esto no solo se debe a su capacidad de propagación dentro y entre las explotaciones ganaderas, sino también a las considerables pérdidas económicas que provocan, las restricciones comerciales asociadas y las implicaciones para la salud pública y la seguridad alimentaria, debido a que muchas de estas enfermedades presentan un carácter zoonótico. En este sentido, es necesario establecer sistemas de vigilancia y control a nivel nacional e internacional (Directiva 2003/99/CE; Reglamento (CE) 2160/03).

Las enfermedades transmisibles más relevantes para el ganado bovino se encuentran enumeradas en la UE, junto con las enfermedades que afectan a otras especies domésticas,

según lo estipulado en el Reglamento (UE) 2016/429 y el Reglamento Delegado (UE) 2018/1629. Es importante destacar que estas enfermedades se han categorizado en cinco grupos distintos, como se establece en el Reglamento de Ejecución (UE) 2018/1882. Este reglamento no solo define las normas para la prevención y el control de las enfermedades mencionadas en la lista, sino que también identifica las especies y grupos de especies que representan un riesgo significativo para la propagación de dichas enfermedades.

**Categoría A:** Enfermedades que normalmente no están presentes en la UE y para las cuales se deben tomar medidas inmediatas de erradicación tan pronto como se detecte su presencia.

**Categoría B:** Enfermedades de la lista que deben controlarse en todos los estados miembros con el objetivo de erradicarlas en toda la Unión Europea.

**Categoría C:** Enfermedades de la lista que tienen importancia en determinados estados miembros y para las cuales deben implementarse medidas para evitar su propagación a regiones de la Unión Europea declaradas oficialmente libres de la enfermedad o que cuentan con programas de erradicación de la enfermedad.

**Categoría D:** Enfermedades de la lista para las cuales deben implementarse medidas para evitar su propagación relacionada con su introducción en la Unión o con los movimientos entre estados miembros.

**Categoría E:** Enfermedades de la lista que requieren vigilancia por parte de la UE.

**Tabla 1.** Categorización de las enfermedades infecciosas del ganado bovino de acuerdo con la clasificación realizada por el Reglamento de ejecución (UE) 2018/1882.

<b>Categoría</b>	<b>Enfermedades</b>
<b>A+D+E</b>	Peste bovina, fiebre aftosa, fiebre del valle del Rift, dermatitis nodular contagiosa y perineumonía contagiosa bovina.
<b>B+D+E</b>	Infección por <i>Brucella abortus</i> , <i>B. melitensis</i> y <i>B. suis</i> , <b>infección por el Complejo <i>Mycobacterium tuberculosis</i></b> , y rabia.
<b>C+D+E</b>	Infección por el virus de la lengua azul, leucosis bovina enzoótica, diarrea viral bovina y rinotraquetis infecciosa bovina
<b>D+E</b>	Campilobacteriosis genital bovina, tricomonosis, surra, carbunco, enfermedad hemorrágica epizoótica
<b>E</b>	Fiebre Q y paratuberculosis

Las distintas enfermedades podrán estar incluidas en una o más de las categorías anteriores. De acuerdo con lo anterior, en el caso del ganado bovino, el Reglamento de ejecución (UE) 2018/1882, categoriza a las enfermedades de la siguiente forma (Tabla 1).

## **2. INFECCIÓN POR EL COMPLEJO *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS***

La tuberculosis de los mamíferos o infección por el complejo *Mycobacterium tuberculosis* (CMT), es la denominación adoptada por la Organización Mundial de la Sanidad Animal (OMSA) para referirse a la tuberculosis bovina (TBb) en la actualidad. A pesar de ello, el término TBb sigue siendo de uso generalizado en el ámbito científico y administrativo, especialmente al hablar de la infección en la especie bovina.

La TBb es una enfermedad infectocontagiosa de carácter crónico que cursa con neumonía granulomatosa, pérdida de peso y, posteriormente, la muerte del animal. Esta patología está causada por bacterias pertenecientes al CMT, principalmente *M. bovis* y *M. caprae*, y puede afectar tanto a especies animales como al ser humano dado su carácter zoonótico (OMSA, 2018).

Además de su impacto en salud pública, la TBb causa cuantiosas pérdidas económicas en el sector ganadero debido a la disminución de la producción, restricciones en el movimiento de animales vivos y decomiso en el matadero de animales con lesiones compatibles con TBb (LTB) (Rodríguez-Campos et al., 2014; Larenas-Muñoz et al., 2022). Además, representa un importante riesgo para la biodiversidad, en especial para especies que ya de por sí están amenazadas como el lince ibérico en el caso de nuestro país (MAPA & Agencia Española de Consumo, seguridad alimentaria y nutrición (AECOSAN), 2017).

La TBb presenta una distribución mundial, existiendo notables diferencias entre países. En gran parte de África, América Latina y Oriente, aunque la enfermedad se cataloga endémica, no se implementan medidas dirigidas a su control y erradicación. Sin embargo, en áreas como Europa, la aplicación de programas de control y erradicación de la TBb han logrado disminuir significativamente la prevalencia y la dispersión de la enfermedad, llegando a alcanzar algunos países la calificación de libre de TBb.

### **2.1 Etiología**

El género *Mycobacterium* pertenece al Filo *Actinobacteria*, Clase *Actinobacteria*, Orden *Actinomycelates*, Suborden *Corynebacterinae* y Familia *Mycobacteriaceae* (Brener et al., 2005). Este género engloba en la actualidad más de 190 especies diferentes, que abarcan bacterias saprofitas, patógenas oportunistas y patógenas para personas y animales, con características

comunes: bacilos aerobios, no móviles, ácido-alcohol resistentes, incapaces de formar esporas (Meehan et al., 2021).

Además, las especies del género *Mycobacterium* poseen una pared celular distintiva, que es más gruesa que la de otras bacterias. Esta pared contiene tres tipos de moléculas lipídicas (ácido micólico, peptidoglicanos y arabinogalactanos) que desempeñan un papel importante en la patogenicidad de las micobacterias (Kuria, 2019; Borham et al., 2022). La capa lipídica de la pared contribuye a la resistencia de la bacteria frente a la respuesta inmunitaria del huésped, agentes desinfectantes y fármacos antituberculosos. Esto también resulta en una entrada deficiente de nutrientes en la célula, lo que explica su crecimiento lento y su largo período de incubación. Además, la pared de las micobacterias juega un papel relevante en la formación de los granulomas tuberculosos en el huésped, confiriendo ácido-alcohol resistencia a la bacteria y dando lugar a la formación de "cordones" cuando crece en medios líquidos, debido a la agregación de los complejos lipídicos (Kuria, 2019; Borham et al., 2022).

Es importante destacar que la clasificación de las micobacterias está en constante evolución. En 2018, Gupta et al. propusieron dividir el género *Mycobacterium* en 4 nuevos géneros: *Mycolicibacterium*, *Mycolicibacter*, *Mycolicibacillus* y *Mycolicibacteroides*, además de una modificación en el género *Mycobacterium*. Esta propuesta se basó en análisis de similitud promedio de aminoácidos, inserciones o deleciones de secuencias y proteínas conservadas. Sin embargo, otros autores, como (Meehan et al., 2021) sugieren que, para evitar confusiones a nivel clínico, se mantenga el género *Mycobacterium* y se realicen estas divisiones como subgéneros. Esta discusión refleja la continua revisión y refinamiento de la taxonomía de las micobacterias.

A lo largo de los años, las especies incluidas en el género *Mycobacterium* han sido clasificadas teniendo en cuenta distintas características. Una de las clasificaciones más empleadas se basa en su capacidad de crecimiento en medios de cultivo, dividiéndolas en micobacterias cultivables y micobacterias no cultivables o de difícil cultivo. Además, según su velocidad de crecimiento, se clasifican en bacterias de crecimiento lento -que requieren más de siete días de incubación para formar colonias visibles- y bacterias de crecimiento rápido -que desarrollan colonias en menos de siete días- (Wayne & Kubica, 1986; Magee & Ward, 2015). También se han realizado agrupaciones específicas de micobacterias en complejos y grupos (Meehan et al., 2021).

Las micobacterias de crecimiento rápido, por lo general son micobacterias saprófitas de vida libre, conocidas como "micobacterias ambientales o no tuberculosas" (MNT). Por otro lado,



las bacterias de crecimiento lento incluyen a la mayoría de las micobacterias de relevancia clínica, tanto para la medicina humana como veterinaria, dentro de las cuales se encuadran las bacterias del CMT y del Complejo *Mycobacterium avium* (CMA) (Tabla 2) (Goodfellow & Magee, 1998).

**Tabla 2.** Resumen de las principales especies de micobacterias, incluyéndose en el CMT y el CMA aquellas que tienen un mayor interés en medicina humana y veterinaria.

<b>Complejo <i>Mycobacterium tuberculosis</i> (CMT)</b>		<b>Complejo <i>Mycobacterium avium</i> (CMA)</b>	
<i>M. tuberculosis</i>	<i>M. pinnipedii</i>	<i>M. a. avium</i>	<i>M. chimaero</i>
<i>M. bovis</i>	<i>M. canetti</i>	<i>M. a. silvaticum</i>	<i>M. columbiense</i>
<i>M. africanum</i>	<i>M. orygis</i>	<i>M. paratuberculosis</i>	<i>M. marseillense</i>
<i>M. microti</i>	Var. genética <i>Dassie bacillus</i>	<i>M. a. hominissuis</i>	<i>M. bouchedurhonense</i>
	Var. genética <i>M. mungi</i>		<i>M. timonense</i>
<b>Micobacterias no cultivables o difícilmente cultivables</b>		<b>Micobacterias atípicas de importancia zoonótica</b>	
<i>M. leprae</i>	<i>M. lepraemurium</i>	<i>M. kansasii</i>	<i>M. marinum</i>
		<i>M. fortuitum</i>	<i>M. chelonae</i>

Las micobacterias responsables de la Tbb pertenecen al CMT y se diferencian en distintas especies según su hospedador principal y su filogenia. Algunas de estas especies son *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. bovis* BCG, *M. caprae*, *M. africanum*, *M. microti*, *M. pinnipedii*, *M. canettii*, *M. orygis*, y las variedades genéticas *Dassie bacillu* y *M. mungi* (Rodríguez-Campos et al., 2014; Romha et al., 2018). Estas micobacterias comparten una alta homología genética (99,95%) a nivel de secuencia de nucleótidos y poseen un gen que codifica el ARN ribosómico 16S con una secuencia idéntica (Brosch et al., 2002). Estas características genéticas son útiles para identificar y diferenciar las especies dentro del CMT.

Las bacterias pertenecientes al CMT tienen la capacidad de sobrevivir en una amplia variedad de ambientes, desde pocos minutos hasta 2 años. La supervivencia de estas bacterias en el medio está determinada, en gran medida, por tres factores principales: la temperatura, la exposición a la luz solar y la humedad relativa (Broughan et al., 2016). Dicha supervivencia es óptima en entornos frescos, húmedos y sombríos, mientras que se ve limitada en climas calurosos y secos (Humblet et al., 2009; Broughan et al., 2016; Borham et al., 2022). De esta

forma, la bacteria se inactiva cuando es sometida a temperaturas superiores a 65°C durante al menos 30 minutos y por la acción de la luz ultravioleta. Sin embargo, puede resistir la congelación durante períodos prolongados. A temperaturas normales, la bacteria es capaz de permanecer viable en el estiércol almacenado hasta 6 meses, mientras que en los pastos puede sobrevivir en las heces entre 2 meses en verano y 6 en invierno (Allen et al., 2021; Borham et al., 2022). Estas características favorecen la transmisión de las micobacterias tanto a nivel de granja como en zonas de pastos compartidos.

En cuanto a la resistencia a productos químicos y desinfectantes, la pared celular de las micobacterias del CMT les confiere cierta resistencia a estos agentes. Sin embargo, se ha observado que, compuestos como el hexaclorofeno, los amonios cuaternarios o la clorhexidina tienen un efecto bacteriostático sobre las micobacterias, mientras que otros compuestos, como los derivados del cloro, el etanol al 70%, el peróxido de hidrógeno o el fenol al 5% tienen un efecto bactericida (Kuria, 2019; Borham et al., 2022).

## **2.2 Importancia de la TBb como zoonosis**

La TBb, como enfermedad zoonótica, tiene un impacto significativo en la salud pública a nivel global. Dentro del CMT existen especies como *M. tuberculosis* y *M. africanum* que afectan de forma casi exclusiva al ser humano (Dean et al., 2018). Sin embargo, existen otros miembros del CMT que, a pesar de poseer la capacidad de infectar al ser humano, presentan una mayor adaptación a los animales. Algunas de las micobacterias con potencial zoonótico identificadas hasta el momento son *M. bovis*, *M. caprae*, *M. microti*, *M. pinnipedii* y *M. orygis* (van Ingen et al., 2012; Pérez-Lago et al., 2014).

Históricamente la tuberculosis ha llegado a ser considerada como la enfermedad infecciosa con una mayor tasa de mortalidad, sin embargo, ha sido superada recientemente por la COVID-19. Anualmente se siguen registrando alrededor de 10 millones de nuevos casos de tuberculosis en seres humanos y 1,5 millones de muertes relacionadas con esta enfermedad. No obstante, diversos autores señalan que dichas estimaciones pueden estar subestimadas y que, por tanto, la tuberculosis zoonótica podría ser un problema de salud pública mucho mayor (Thoen et al., 2006; Olea-Popelka et al., 2017). En este sentido, Houben & Dodd (2016) estiman que alrededor de 1,7 mil millones de personas, o lo que es lo mismo, aproximadamente una cuarta parte de la población mundial, padecen tuberculosis latente.

Una de las razones por las cuales las estimaciones de casos de tuberculosis zoonótica pueden ser bajas es la dificultad para distinguir entre *M. tuberculosis* y otras micobacterias del complejo, especialmente *M. bovis*. Esta situación es especialmente problemática en países en

vías de desarrollo donde la enfermedad es endémica en los humanos y cuentan con recursos económicos limitados. Además, en ausencia de sistemas de vigilancia adecuados y procedimientos de laboratorio efectivos para la identificación precisa de las micobacterias, se asume que todos los casos diagnosticados de tuberculosis son causados por *M. tuberculosis* (Pérez-Lago et al., 2014; Olea-Popelka et al., 2017).

La vulnerabilidad del ser humano a la infección por *M. bovis* es mayor en aquellas áreas donde la tuberculosis animal es endémica, posibilitando la transmisión de manera directa (por contacto con animales enfermos) e indirecta. Históricamente, el consumo de leche y derivados lácteos no pasteurizados ha sido una importante fuente de infección y, en la actualidad, sigue siendo relevante en aquellos países donde los programas de erradicación no se ejecutan de manera efectiva. Asimismo, el contagio puede producirse, además, por el consumo de carne cruda o insuficientemente cocida de animales enfermos (De La Rúa-Domenech, 2006; Michel et al., 2015; Olea-Popelka et al., 2017).

Paralelamente, varios estudios han señalado la posibilidad de transmisión de *M. bovis* de las personas al ganado bovino, actuando el ser humano como vector de la enfermedad (Romero et al., 2011; Krajewska-Wędzina et al., 2019; Lombard et al., 2021). En este sentido, un estudio realizado en nuestro país, donde la incidencia en el ser humano es baja según los datos proporcionados por la Organización Mundial de la Salud (OMS), describe 3 casos no vinculados donde los animales se infectaron de *M. tuberculosis* a partir del ser humano (Romero et al., 2011). Esta evidencia sugiere la posibilidad de que en aquellos países con una incidencia humana significativamente más elevada, dicha transmisión podría representar un desafío adicional para el control de la de la TBb.

Considerando la enorme trascendencia que tiene el ganado bovino en la transmisión de la tuberculosis animal al ser humano, es necesario realizar un esfuerzo a nivel global para desarrollar nuevas herramientas de diagnóstico que mejoren la fiabilidad y rapidez en la detección y confirmación de la TBb (Courcoul et al., 2014). En este sentido, el desarrollo de nuevas técnicas de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) directa desde tejido se erige como un método de diagnóstico rápido y una alternativa válida en el ámbito de la sanidad animal.

### **2.3 Epidemiología**

De todas las especies que conforman el CMT, *M. bovis*, principal agente etiológico de la TBb, es la que presenta un mayor rango de hospedadores, siendo capaz de infectar al hombre y a un gran número de especies animales, tanto domésticas como silvestres (De Lisle et al., 2001; Broughan et al., 2016; Good & Duignan, 2011; Ramos et al., 2015). Este amplio rango de

hospedadores justifica que actualmente a la enfermedad se la conozca como tuberculosis de los mamíferos.

El bovino, considerado como el principal reservorio de la enfermedad, suscita una mayor preocupación debido a su relevancia económica a nivel mundial justificando la implantación de medidas de erradicación de la enfermedad en esta especie. No obstante, en nuestro entorno, existe un amplio rango de especies susceptibles de ser infectadas, contribuyendo así a la persistencia de la enfermedad (Serrano et al., 2018). *M. bovis* y *M. caprae* tienen la capacidad de infectar a diversas especies presentes en un mismo ecosistema, dando lugar a un complejo epidemiológico multi-hospedador. Este complejo epidemiológico dificulta enormemente el éxito de los programas de erradicación y control de la TBb, siendo especialmente preocupante en aquellas zonas donde el ganado se cría en extensivo, favoreciendo el contacto con especies silvestres, como es el caso de las regiones del suroeste de la península ibérica (Gortazar et al., 2011; MAPA & AECOSAN, 2017). Por lo tanto, es necesario que las medidas de control tengan aborden esta complejidad y consideren a todas las especies animales implicadas en la transmisión de la TBb.



**Figura 1:** Sistema multi-hospedador de la TBb en la Península Ibérica. *Elaboración propia*

En nuestro país, este complejo sistema multi-hospedador (Figura 1) se compone principalmente de cuatro especies de animales silvestres -jabalí, ciervo, gamo y tejón común-, junto con especies domésticas como el caprino, el ovino o el porcino ibérico, que también son susceptibles a la infección. En consecuencia, estas especies también contribuyen a la persistencia de la enfermedad y presencia endémica (Gortazar et al., 2011; MAPA & AECOSAN, 2017).

El jabalí constituye el principal reservorio silvestre de la TBb en la Península Ibérica (Naranjo et al., 2008). Su actuación como reservorio es especialmente destacada en la zona Mediterránea, donde diversos estudios estiman que la prevalencia en la especie ronda el 60%, pudiendo alcanzar el 100% en algunas poblaciones (Vicente et al., 2006; Naranjo et al., 2008; Gortazar et al., 2011). Por su parte, en la zona atlántica se considera prácticamente un hospedador accidental (Muñoz-Mendoza et al., 2013).

Por otra parte, el tejón europeo, principal reservorio silvestre de la enfermedad en Reino Unido e Irlanda, se considera el principal obstáculo para lograr el control y erradicación de la TBb en el ganado vacuno en estos países (Donnelly & Nouvellet, 2013; Broughan et al., 2016). Sin embargo, el tejón juega un papel residual en la zona atlántica de nuestro país (Asturias, Galicia, Cantabria) (Balseiro et al., 2013; MAPA & AECOSAN, 2017; Acevedo et al., 2019).

En cuanto a las especies domésticas, la importancia que ha alcanzado la enfermedad en el ganado caprino (Guta et al., 2014; Pesciaroli et al., 2014; MAPA & AECOSAN, 2017) ha obligado al desarrollo en algunas regiones de programas de control de la TBb (Reglamento (UE) 2020/689; Orden de 22 de junio de 2018; (MAPA, 2023). En lo que respecta al cerdo, su capacidad para mantener la infección se restringe a la cría en extensivo, como ocurre frecuentemente con el cerdo ibérico en la dehesa del suroeste de España y, con el cerdo negro en Sicilia, donde comparten pastos con otras especies susceptibles (Di Marco et al., 2012; Barasona et al., 2013; Guta et al., 2014; Cano-Terriza et al., 2018).

En este sentido, es importante conocer el papel epidemiológico que juega cada especie en su hábitat de cara a lograr la eliminación de la enfermedad (Gavier-Widén et al., 2009; Nugent, 2011).

El contagio de los animales puede producirse de forma directa e indirecta por vía respiratoria, digestiva, genital, transplacentaria y cutánea, siendo la ruta de infección más frecuente, en el caso del ganado bovino a través de la inhalación de aerosoles (Pollock & Neill, 2002; Thoen et al., 2006b; Domingo et al., 2014) La vía digestiva, aunque menos frecuente, también se ha descrito en la especie bovina a partir del consumo de leche y/o pastos contaminados (Neill et al., 1994). No obstante, existe una importante diferencia en la dosis infectiva, estimándose que se requieren entre 1 y 5 bacterias para la infección por vía inhalatoria, mientras que se necesitan alrededor de  $10^7$  bacterias para la infección por vía oral (Francis, 1971; Corner, 2006).

## 2.4 Patogenia

Cuando la infección se produce por vía inhalatoria, las micobacterias llegan a los espacios alveolares donde son reconocidas por las células dendríticas que activan la respuesta inflamatoria. Así se produce el “foco primario” de la enfermedad, constituido tanto por las micobacterias como por los macrófagos alveolares pulmonares que las fagocitan, y por los monocitos y células inflamatorias que son atraídos por diferentes señales quimiotácticas en el sitio de infección (Arentz & Hawn, 2007). Una vez son fagocitadas, las micobacterias disponen de diversos mecanismos que evitan que estas sean destruidas en el interior de los fagolisosomas de los macrófagos. Entre estos mecanismos se encuentran los lípidos micobacterianos o las proteínas del complejo antígeno 85. Gracias a estos elementos, las micobacterias son capaces de sobrevivir y de multiplicarse dentro de los fagosomas, y destruir a estos fagocitos (Thoen et al., 2006b; Borham et al., 2022). Tras eso, nuevos macrófagos fagocitarán sucesivamente a las micobacterias con la finalidad de eliminarlas, dando lugar al granuloma tuberculoso o “lesión primaria”.

Posteriormente, si la enfermedad progresa, las micobacterias que escapan de los macrófagos concentrados en el foco primario llegan al intersticio desde donde son transportados, las micobacterias son transportadas por las células fagocíticas, principalmente macrófagos, a través de los vasos linfáticos hacia los nódulos linfáticos (NL) de drenaje regionales, en los cuales donde se establece un nuevo foco de infección (Orme & Cooper, 1999). Este doble foco de infección, característico de la enfermedad, es lo que se denomina “complejo primario”, y que puede ser tanto completo como incompleto (Domingo et al., 2014; Borham et al., 2022). Se dice que el complejo primario está “completo” cuando las lesiones son observables tanto en el foco primario como en el NL regional que lo drena, mientras que se denominará “incompleto” si solo se observa la lesión en el NL (Domingo et al., 2014).

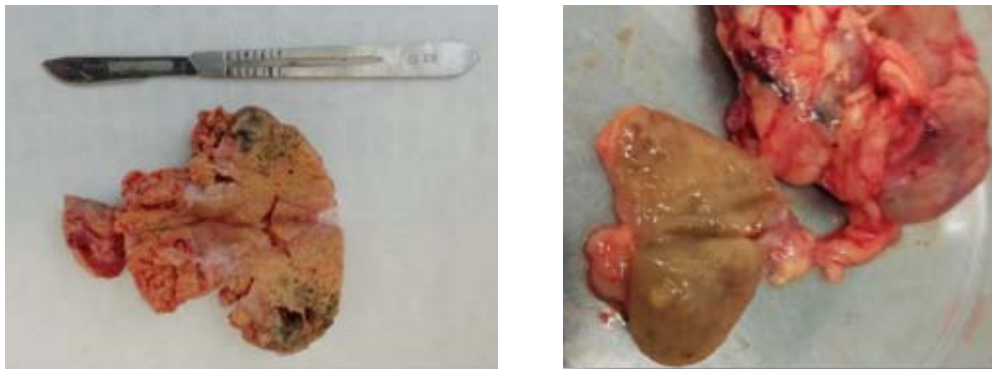
Una vez que se ha producido la entrada del agente en el animal, dependiendo de la respuesta inmune desencadenada puede darse el avance de las micobacterias hasta la circulación sistémica produciéndose una diseminación orgánica a través de vía hemática o linfática, o bien, puede producirse su latencia e incluso la curación del animal (Domingo et al., 2014).

En cuanto a la respuesta inmune desencadenada por el animal, al producirse la infección, se desencadena una respuesta de tipo celular como mecanismo principal de defensa, mientras que la respuesta inmune humoral solo es detectable en etapas avanzadas de la infección. Sin

embargo, en casos de infección con una alta carga bacteriana, esta respuesta puede ocurrir de manera más temprana (Pollock & Neill, 2002; de la Rúa-Domenech et al., 2006).

### 2.5 Síntomas y lesiones

En relación con la sintomatología de la enfermedad, la TBb es una enfermedad crónica de curso lento con un periodo de incubación variable (entre 2 meses y varios años), siendo actualmente poco frecuente la observación de signos clínicos y lesiones en nuestra zona debido a la aplicación del programa de erradicación por el que se produce el sacrificio de los animales a edades tempranas. No obstante, esta sintomatología clínica está bien descrita, y se caracteriza por unos signos clínicos inespecíficos que incluyen emaciación progresiva, debilidad, fiebre leve o intermitente, tos, falta de apetito y linfadenopatía. Además, dependiendo de la localización de las lesiones pueden aparecer otros signos adicionales como tos crónica, disnea, problemas de deglución y eructación, diarrea o constipación, timpanismo ruminal, mastitis persistente, hipertrofia mamaria, infertilidad, abortos y descarga vaginal crónica purulenta en casos de tuberculosis genital (OMSA, 2018; Kuria, 2019; Borham et al., 2022).



**Figura 2.** Detalle de lesiones macroscópicas (granulomas) en nódulos linfáticos retrofaríngeos.

En relación a las LTBs (Figura 2), la enfermedad se caracteriza por la formación de granulomas tuberculosos. Estos granulomas pueden presentar histopatológicamente diferentes grados de encapsulación y un centro de necrosis variable (Di Marco et al., 2012; Domingo et al., 2014; Martín-Hernando et al., 2007; Silva Miranda et al., 2012). En el ganado bovino, estas lesiones se observan frecuentemente en los NLs de la cabeza y el tórax, aunque también pueden afectarse los pulmones, bazo, hígado y las superficies de las cavidades corporales (O'Reilly & Daborn, 1995; Domingo et al., 2014).

Las lesiones presentes en el animal dependerán de la fase de la enfermedad en la que se encuentre. En fases iniciales, las lesiones, si están presentes, aparecen a nivel del complejo

primario y suelen consistir en un solo nódulo, que puede medir desde 0,3 cm hasta varios centímetros. Al corte, es posible identificar la presencia de un material grumoso amarillento, que se corresponde con la necrosis caseosa y puede estar o no calcificado. La ubicación de este nódulo suele depender de la vía de entrada del agente patógeno y, generalmente, se encuentra en el sistema respiratorio o digestivo (Domingo et al., 2014).

En caso de que se produzca una diseminación del microorganismo, aparecería una tuberculosis miliar, que puede ser aguda o tardía, y se caracteriza por la presencia de pequeños nódulos caseosos, de un color gris o amarillo, en diversos órganos como el pulmón, hígado, bazo o la pleura (Gázquez & Sierra, 2012; Domingo et al., 2014; Borham et al., 2022). Cuando la progresión de la enfermedad es gradual, se pueden dar dos tipos de tuberculosis: la "tuberculosis precoz" y la "tuberculosis lenta". En la tuberculosis precoz, se desarrollan pocos nódulos de tamaño variable. En contraste, en la tuberculosis lenta, los nódulos son más grandes. También puede ocurrir la "tuberculosis de grandes nódulos", en la cual los nódulos son más grandes debido a la fusión de varios nódulos individuales. Otra variante es la "tuberculosis perlada", que se caracteriza por la presencia de múltiples lesiones de color blanquecino, que son nodulares o pediculadas y tienen un tamaño que oscila entre 0,5 y 1 cm. Estas lesiones suelen encontrarse en las serosas, como la pleura, el pericardio y el peritoneo (Gázquez & Sierra, 2012; Domingo et al., 2014).

La tuberculosis orgánica crónica se caracteriza por la presencia de grandes lesiones caseosas, a menudo formadas por la confluencia de múltiples lesiones más pequeñas, que se caracterizan por la presencia de fibrosis y calcificación. En el ganado bovino, estas lesiones suelen manifestarse principalmente en los pulmones, resultado de la difusión intra-canalicular del patógeno, dando lugar a la llamada tuberculosis pulmonar acinosa o acino-nodular. Esta forma de tuberculosis se caracteriza por la presencia de grandes lesiones caseosas en el órgano, la formación de cavernas en el parénquima y la aparición de lesiones de tipo ulcerativo en tráquea y bronquios (Gázquez & Sierra, 2012; Domingo et al., 2014).

Las formas avanzadas de la enfermedad son cada vez menos comunes en nuestro territorio, debido al éxito de los programas de erradicación que permiten que los animales sean eliminados en fases tempranas de la enfermedad. Sin embargo, este tipo de cuadros se pueden observar en especies no sometidas a programas de erradicación, como el porcino o el ovino en extensivo, y en animales anérgicos, que al no responder a las pruebas de inmunidad celular no son detectables (Pollock & Neill, 2002; Johnson et al., 2008; Domingo et al., 2014). Por el contrario,



en países en vías de desarrollo, la falta de programas de control hace que este tipo de cuadros sean frecuentes (Dibaba et al., 2019)

## **2.6 Diagnóstico**

En el contexto actual, realizar un diagnóstico temprano es crucial para detectar y eliminar los animales infectados con el objetivo de lograr la erradicación de la TBb. En los países desarrollados, el diagnóstico oficial se basa principalmente en tres aspectos: 1) la detección mediante intradermotuberculinización (IDTB) y gamma-interferón (IFN- $\gamma$ ), y posterior sacrificio de los animales que muestran una respuesta inmune celular frente al CMT; 2) la confirmación de los casos detectados; y 3) la vigilancia en matadero mediante la inspección macroscópica de la canal para identificar la presencia de lesiones (Reglamento (UE) 2020/689; OMSA, 2022).

Sin embargo, este protocolo de diagnóstico enfrenta desafíos significativos. Las pruebas utilizadas como método de cribado no alcanzan valores suficientemente elevados de sensibilidad (SE) y especificidad (E) diagnóstica. Además, dado que estas técnicas se centran en detectar la respuesta celular temprana, es frecuente que los animales sacrificados no muestren LTBs visibles en el matadero, contando generalmente con cargas bacterianas muy bajas. Por otro lado, aunque el cultivo bacteriano es considerado la técnica de referencia, este presenta una capacidad limitada para confirmar animales infectados (Lilenbaum et al., 1999; Corner et al., 2012; Courcoul et al., 2014; Domingo et al., 2014; Gormley et al., 2014).

### **2.6.1 Diagnóstico antemortem**

#### **a) Intradermotuberculinización**

La IDTB está ampliamente reconocida tanto por la OMSA como por la UE como la técnica de cribado de elección para el diagnóstico de la TBb en el ganado vacuno, tanto en programas de control como en el contexto de los movimientos de animales (Bezoz et al., 2014; de la Rua-Domenech et al., 2006; Schiller et al., 2010; OMSA, 2022). Esta técnica se basa en la inoculación intradérmica de un derivado proteico purificado (PPD), comúnmente conocido como tuberculina, con el propósito de inducir una reacción de hipersensibilidad retardada o de tipo IV, la cual puede ser medida en los animales infectados. La IDTB es adecuada para realizar diagnósticos a nivel de rebaño, aunque presenta limitaciones en el diagnóstico a nivel individual (de la Rua-Domenech et al., 2006; Schiller et al., 2010).

La inoculación de la tuberculina, generalmente, no provoca una reacción inflamatoria a nivel local ni ningún otro tipo de respuesta en aquellos animales que no han sido previamente sensibilizados. Sin embargo, en animales cuyo sistema inmunológico ha sido previamente

expuesto al antígeno, se desencadena una respuesta inmune mediada por células, específicamente una respuesta de hipersensibilidad de tipo IV, que se puede observar y medir 72 horas después de la inoculación (de la Rua-Domenech et al., 2006; Bezos et al., 2014).

Esta respuesta inflamatoria está inducida por ciertas poblaciones de linfocitos Th1. Estas células se sensibilizan cuando se exponen al CMT y, al ser expuestas nuevamente al mismo antígeno, en este caso, la tuberculina, desencadenan una reacción inflamatoria local en el sitio de infección. Esta reacción en el punto de inoculación de la tuberculina se caracteriza por la atracción y acumulación de diversas células inflamatorias, como células de Langerhans, linfocitos T y basófilos (Monaghan et al., 1994; Salinas, 2012). En caso de que se produzca la reacción, ésta puede ir acompañada de signos locales, como edema, exudado, necrosis, dolor o linfadenopatía regional (Real Decreto (RD) 2611/1996).

Dependiendo de la prevalencia de TBb y la probabilidad de exposición a otras micobacterias, esta técnica puede realizarse de acuerdo con dos procedimientos diferentes, que se distinguen por la tuberculina utilizada, la interpretación de los resultados y su validez diagnóstica (SE y E). Estos procedimientos son la IDTB simple (IDTBs) y la IDTB comparada (IDTBc) (Monaghan et al., 1994).

Como indicamos anteriormente, la IDTBs se caracteriza por medir la reacción de hipersensibilidad generada tras la inoculación de la PPD bovina, que puede administrarse en dos localizaciones: la región cervical (protocolo seguido en la UE) y el pliegue caudal (protocolo seguido en Estados Unidos, Australia y Nueva Zelanda) (Monaghan et al., 1994; Bezos et al., 2014). Según Schiller et al. (2010), la piel del cuello es más sensible a la tuberculina, por lo que en caso de inoculación a nivel del pliegue caudal (IDTBcd) se administra una dosis mayor de PPD.

Por otro lado, cuando existe sospecha de que la reacción a la PPD bovina puede deberse a una reacción cruzada con otras micobacterias, se utiliza la IDTB comparada (IDTBc), que compara las respuestas generadas por la PPD bovina y la PPD aviar en ambos lados del cuello (Schiller et al., 2010; Bezos et al., 2014). En estos casos, un animal sensibilizado por *M. bovis* manifiesta una mayor respuesta a la tuberculina bovina que a la aviar, mientras que las infecciones por micobacterias del CMA u otras micobacterias no patógenas ambientales promueven una mayor respuesta de la tuberculina aviar (Monaghan et al., 1994; de la Rua-Domenech et al., 2006). Estos procedimientos se encuentran perfectamente descritos por la OMSA (2022) y en el RD 2611/1996, en el ámbito español.

En la tabla 3 se resumen la interpretación estándar de los resultados de acuerdo con la OMSA y la normativa, en la cual únicamente aquellos animales que muestran un resultado

positivo son considerados como tales (RD 2611/1996; OMSA, 2022). Además, existe una interpretación estricta, representada en la tabla 4, en la cual los resultados considerados dudosos o inconcluyentes se considerarán como positivos (Álvarez et al., 2012; Karolemeas et al., 2012). Esta interpretación tiene como objetivo acelerar los programas de erradicación ya que, al considerar a los animales dudosos como positivos, se busca eliminar cualquier animal que haya podido tener contacto con el CMT en la explotación, previniendo el mantenimiento y la propagación de la enfermedad durante los 60 días que transcurren entre las pruebas (Bezou et al., 2014).

**Tabla 3:** Interpretación estándar de la IDTBs y de la IDTBc.

<i>Tipo de IDTB</i>	<i>Resultado</i>	<i>Interpretación estándar</i>
<i>IDTB cervical simple (IDTBs)</i>	Incremento del grosor $\leq 2$ mm. No signos clínicos.	Negativo
	Incremento del grosor $>2 - <4$ mm. No signos clínicos.	Inconcluyente
	Incremento del grosor $\geq 4$ mm y/o presencia de signos clínicos	Positivo
<i>IDTB cervical comparada (IDTBc)</i>	Incremento del grosor de la reacción bovina $< 2$ mm.	Negativo
	Incremento $\geq 2$ mm de la reacción bovina, pero sea $\leq$ que la reacción aviar.	
	Reacción bovina $> 2$ mm y entre $\geq 0$ y $\leq 4$ mm superior a la reacción aviar	Inconcluyente
	Incremento del grosor de la reacción bovina $\geq 4$ mm que la reacción aviar y/o presencia de signos clínicos.	Positivo

**Tabla 4:** Interpretación severa de la IDTBs y IDTBc.

<i>Tipo de IDTB</i>	<i>Resultado</i>	<i>Interpretación severa</i>
<i>IDTB cervical simple (IDTBs)</i>	Incremento superior a 2 mm	Positivo
<i>IDTB cervical comparada (IDTBc)</i>	Reacción bovina $> 2$ mm a tuberculina aviar, o respuesta positiva a tuberculina bovina y negativa a aviar	Positivo

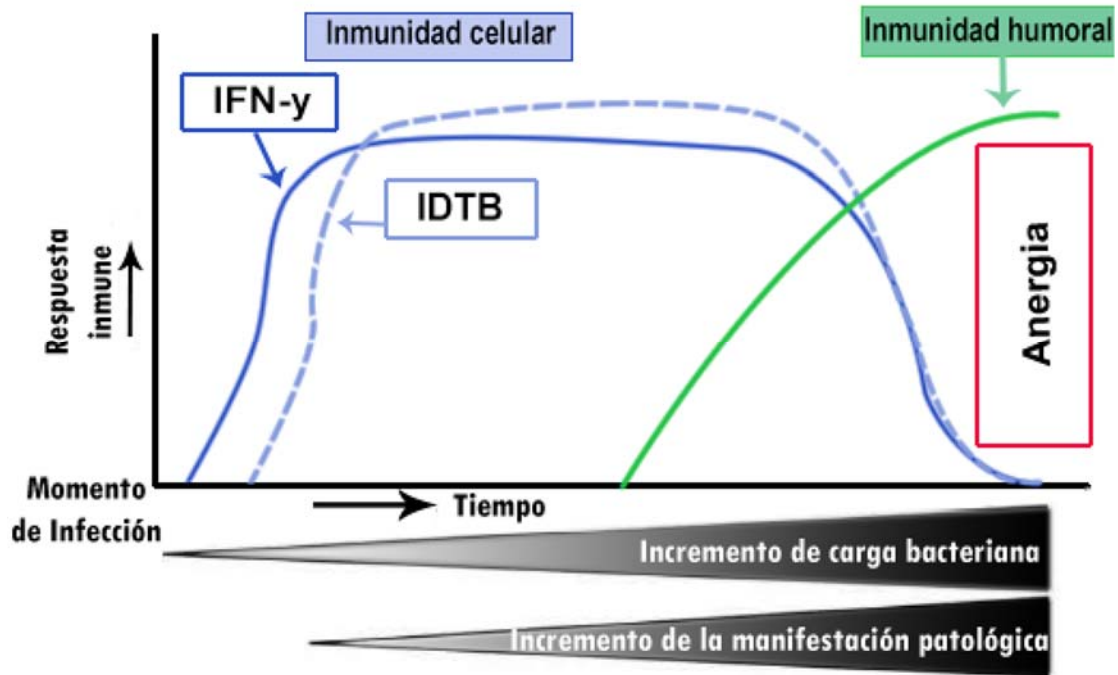
Los tres protocolos de la IDTB han sido evaluados en numerosos estudios con resultados diversos. En el caso de la IDTBs con inoculación cervical e interpretación estándar, de la Rúa-

Domenech et al. (2006) señalan una SE del 80,2%-100% y una E del 75,5%-96,8%, mientras que los resultados mostrados por el estudio bayesiano de Álvarez et al. (2012) indican una SE entre el 53% (27,3%-81,5%) y el 56,6% (29,2%-83,2%) y una E entre el 99,6% y el 99,7% (99%-100%). En el caso de la inoculación caudal (IDTBcd), la SE y E disminuyen, oscilando entre el 63,2% y el 84,4% en el caso de la SE y entre el 96,8% y el 99% la E (de la Rua-Domenech et al., 2006; Good & Duignan, 2011).

En cuanto a la IDTBc con interpretación estándar, al permitir diferenciar entre animales afectados por el CMT y aquellos infectados por otras micobacterias, la técnica muestra mayor E (94,4%-100%), a expensas de disminuir su SE (55,1%-93,3%). Si se aplica una interpretación severa, la SE varía entre el 68,6% y el 100% (de la Rua-Domenech et al., 2006).

El resultado de la IDTB puede verse influenciado, además, por diversos factores, entre los que se incluye la edad del animal, su estado inmunológico, el estrés, la habilidad del profesional que realiza la prueba o el tipo de tuberculina utilizada, lo que puede influir en el rendimiento de la prueba y conducir al diagnóstico de falsos positivos y/o falsos negativos (de la Rua-Domenech et al., 2006; Álvarez et al., 2014). Entre los aspectos relacionados con el sistema inmunológico del animal, destacar que la reactividad a la tuberculina puede tardar entre 3-6 semanas post-infección en producirse. Por lo tanto, si se realiza la prueba antes de transcurrido ese periodo de tiempo, existe la posibilidad de obtener un resultado falso negativo (Bezós et al., 2014). Además, después de realizar una IDTB se produce una especie de desensibilización a la técnica, que persiste durante un cierto período de tiempo. Es por ello que, para garantizar una respuesta precisa a la técnica, resulte crucial respetar el período mínimo de 42 días entre dos pruebas sucesivas en el mismo animal (de la Rua-Domenech et al., 2006).

Asimismo, para lograr una respuesta adecuada del animal a la técnica, es necesario que el animal sea inmunocompetente. En este sentido, factores relacionados con la inmunodepresión, como la malnutrición, la edad avanzada o enfermedades concomitantes, pueden influir en el resultado de la prueba (de la Rua-Domenech et al., 2006). Algunos estudios sugieren que los animales de edad avanzada y enfermos pueden experimentar un estado de anergia, lo que disminuye su reactividad ante el diagnóstico ante mortem (Figura 3) (Álvarez et al., 2014; Mekonnen et al., 2019). Por tanto, estos animales representarían un obstáculo para el avance de los programas de erradicación ya que permanecen en las explotaciones como animales negativos a las técnicas, actuando como fuente de contagio para el resto de los animales y promoviendo así el mantenimiento de la enfermedad.



**Figura 3.** Representación gráfica del espectro de respuestas inmunitarias desencadenadas en el bovino tras la infección y representación de las respuestas a las pruebas de IDTB e IFN- $\gamma$ . (Modificado de de la Rúa-Domenech et al., 2006).

Otros factores determinantes son el operador y el equipamiento. Así, errores en la inoculación o en la lectura son causas comunes de resultados falsos negativos (de la Rúa-Domenech et al., 2006). En este sentido, se ha observado que ciertos animales o razas, como los de lidia, debido a su temperamento y manejo complicado pueden dificultar la correcta ejecución de la prueba por parte del operador (Álvarez et al., 2014). Estos factores suponen una limitación para el éxito de los programas de erradicación, ya que pueden ocasionar fallos en el diagnóstico, por los cuales animales positivos permanezcan en la explotación favoreciendo la diseminación de la infección.

Finalmente, es esencial considerar el tipo de antígeno utilizado para provocar la reacción de hipersensibilidad. Actualmente, se emplea la PPD bovina, un derivado proteico purificado obtenido a partir de la cepa de *M. bovis* AN5, para la realización de la IDTB simple. En el caso de la IDTB comparada, se utiliza la PPD aviar, que se obtiene a partir de las cepas D4ER o TB56 (Monaghan et al., 1994; de la Rúa-Domenech et al., 2006; Bezos et al., 2014). Sin embargo, la PPD contiene antígenos que son compartidos por *M. bovis*, *M. avium* subespecie *paratuberculosis* y diversas micobacterias ambientales, lo que puede llevar a la aparición de reacciones cruzadas. Por lo tanto, una de las principales líneas de investigación en el ámbito del diagnóstico de la TBb ha sido la búsqueda de antígenos alternativos con el objetivo de

incrementar la E de la técnica, como ESAT-6, CFP10, MPB64, MPB70, MPB83 (Buddle et al., 2003; Bezos et al., 2014). Además, se han destacado antígenos como Rv3020c (Jones et al., 2012) o DST (Srinivasan et al., 2019), los cuales no solo permiten distinguir entre *M. bovis* y otras micobacterias, sino también con las cepas de la vacuna BCG.

#### **b) Prueba del interferón gamma**

El IFN- $\gamma$  es una prueba de diagnóstico *in vitro*, que al igual que la IDTB, mide la respuesta inmune celular del organismo. Tradicionalmente, la OMSA ha recomendado la aplicación de esta prueba de forma complementaria a la IDTB, con el objeto de maximizar el número de animales infectados por el CMT, reduciendo simultáneamente el tiempo necesario para eliminar la infección en la explotación (Gormley et al., 2013; Bezos et al., 2014; Clegg et al., 2019). Generalmente, dicho uso ha sido en paralelo a la IDTBc con la finalidad de incrementar el número de animales infectados detectados, alcanzando dicho protocolo una SE del 93% (Gormley et al., 2006, 2013). Actualmente, esta prueba es considerada una prueba oficial de diagnóstico de la TBb a nivel de la UE, pudiéndose utilizar sola o en combinación con la IDTB (Reglamento (UE) 2020/689).

Esta técnica se fundamenta en la medición del IFN- $\gamma$  producido, una citoquina que liberan los linfocitos T que han sido sensibilizados por la presencia de las micobacterias y que constituye el principal factor de activación de los macrófagos (de la Rúa-Domenech et al., 2006).

Diversos estudios han analizado esta técnica, mostrando datos de SE generalmente superiores a los obtenidos con la IDTB (63,1%-100%), aunque con una E similar (85%-99,6%) (de la Rúa-Domenech et al., 2006; Gormley et al., 2013; Clegg et al., 2019). Esta mayor SE de la técnica en comparación con la IDTB se atribuye a su capacidad para detectar animales positivos tan solo 14 días después de la infección, lo que supone un diagnóstico temprano de 60 a 120 días en comparación con la IDTBc (Lilenbaum et al., 1999). Sin embargo, al igual que ocurre con la IDTB, la E se ve limitada debido a la utilización de la PPD como antígeno, lo que plantea la posibilidad de reacciones cruzadas con micobacterias ambientales y, consecuentemente, la aparición de falsos positivos (Pollock et al., 2000; Schiller et al., 2010; Borham et al., 2022).

Frente a la disminución de la SE y E, el desarrollo de nuevos antígenos, tales como ESAT-6, CFP10, Rv3020c, DST, MPB64, MPB70 o MPB83, mencionados anteriormente en el caso de la IDTB, (Buddle et al., 2003; Schiller et al., 2010; Jones et al., 2012; Bezos et al., 2014; Srinivasan et al., 2019) es una de las líneas de investigación existentes. En este caso, se ha observado que el uso individual de estos antígenos en ensayos de IFN- $\gamma$  permite aumentar la E de la prueba en comparación con la utilización de PPD bovina y aviar, aunque a costa de una disminución de la

SE (Pollock et al., 2000; Buddle et al., 2001, 2003; Aagaard et al., 2006; Schiller et al., 2010). Por otro lado, el uso de combinado de estos antígenos ya sea en forma de péptidos o proteínas recombinantes, puede contribuir a mejorar la SE manteniendo una alta E (Vordermeier et al., 1999; Bezos et al., 2014) como se observa en diversos estudios (Aagaard et al., 2006; Schiller et al., 2009; Alvarez et al., 2017).

Esta técnica diagnóstica presenta ventajas y desventajas en comparación con la IDTB. En primer lugar, se trata de una prueba comparada, al igual que la IDTBc, lo que permite determinar si el animal está infectado por el complejo CMT o por otras micobacterias. Además, su ejecución es más rápida y requiere solo una visita a la explotación, simplificando la gestión de la explotación, especialmente cuando se trata de animales difíciles de manejar, fácilmente excitables o peligrosos, como los animales de lidia. Por otro lado, el procedimiento y la interpretación de esta técnica son más objetivos que los de la IDTB (Schiller et al., 2010; Borham et al., 2022).

También es importante destacar que esta prueba tiene mayor SE que la IDTB, ya que, como mencionamos previamente, permite detectar animales infectados de manera más temprana (Lilenbaum et al., 1999). Además, dado que es una prueba *in vitro*, su realización no provoca ninguna reacción en el animal vivo, a diferencia de la IDTB, lo que permite repetirla sin necesidad de esperar un período específico (Schiller et al., 2010).

Entre los inconvenientes de la técnica destaca su mayor coste, lo que limita su uso a nivel mundial (de la Rúa-Domenech et al., 2006). Este mayor coste va unido a una mayor dificultad para transportar la sangre, la cual debe mantenerse estable a una temperatura entre 18-25 °C. Además, el ensayo laboratorio debe llevarse a cabo en el mismo día, ya que se ha observado una reducción del 30% en la densidad óptica del ensayo inmunoenzimático (ELISA, del inglés *Enzyme-Linked Immunosorbent assay*) a partir de las 24 horas de retraso (Rothel et al., 1992; de la Rúa-Domenech et al., 2006; Gormley et al., 2006; Clegg et al., 2019). Por otro lado, al igual que en el caso de la IDTB, en estadios avanzados de la enfermedad, la respuesta celular disminuye simultáneamente con el incremento de la inmunidad humoral, lo que reduce la probabilidad de detectar a estos animales (de la Rúa-Domenech et al., 2006; Borham et al., 2022).

Finalmente, otro gran inconveniente de esta técnica es que no puede realizarse en animales menores de 6 meses, ya que a esa edad pueden presentar una producción inespecífica de IFN- $\gamma$ , en la cual intervienen las células “*natural killer*”. Esto contrasta con la IDTB, en la cual los

animales son analizados desde las 6 semanas de vida (Olsen et al., 2005; de la Rua-Domenech et al., 2006).

### **c) Serología**

Se han desarrollado diversas técnicas serológicas como el ELISA, el ensayo de polarización de la fluorescencia, la prueba de flujo lateral, el inmunoensayo de impresión multiantigénico o el inmunoblot, basadas en la detección de la respuesta inmune humoral (Bezós et al., 2014; Thomas & Chambers, 2021; OMSA, 2022). En el caso de la TBb, se caracteriza por ser una respuesta bastante tardía (Figura 3), apareciendo los Ac protectores en estadios avanzados de la enfermedad (Pollock & Neill, 2002). Por ello, las técnicas serológicas no se consideran herramientas diagnósticas eficaces para detectar animales infectados, presentando una utilidad diagnóstica menor comparada con otras técnicas, y siendo esta especialmente baja en estadios tempranos de la enfermedad (Harboe et al., 1990; Bezós et al., 2014; Casal et al., 2014; Larenas-Muñoz et al., 2022). Así mismo, al igual que ocurre en las pruebas descritas anteriormente, la validez de las técnicas serológicas está muy condicionada por el antígeno elegido (Mpb70, Mpb83; P22, ESAT-6, CFP10), variando su utilidad en función de la especie analizada (Thomas & Chambers, 2021). Uno de los más recomendados es el antígeno Mpb83, ya que induce una elevada respuesta humoral y puede utilizarse a partir de las 3-4 semanas post-infección, con resultados aceptables, en diversas especies, incluido bovino, cerdo, ciervo, jabalí y tejón (Bezós et al., 2014; Cardoso-Toset et al., 2015; Thomas & Chambers, 2021; OMSA, 2022).

El ELISA es la técnica serológica más extendida para la detección de los animales infectados por el CMT, debido a que permite el análisis simultáneo de múltiples muestras de forma rápida, simple y barata (Bezós et al., 2014). Existen numerosos estudios que describen la validez diagnóstica de esta técnica, oscilando la SE entre el 24 y el 98,6%, y su E entre el 52,5 y el 100% (Bezós et al., 2014; Casal et al., 2014; Ramos et al., 2015; Larenas-Muñoz et al., 2022).

No obstante, se ha observado que en animales que son sometidos a IDTB se produce un efecto *booster* en torno a los 15-30 días tras la inoculación de la tuberculina. Este *booster* supone un incremento en los niveles de anticuerpos (Ac) circulantes que permite aumentar la SE del ELISA de forma importante, pasando de un 24% hasta un 70% (Harboe et al., 1990; Casal et al., 2014; Garbaccio et al., 2019). No obstante, Waters et al. (2015) señalaron que este efecto *booster* depende así mismo del antígeno empleado, mostrando un incremento en la respuesta cuando se utiliza Mpb83 o Mpb70.

Además de la utilidad del ELISA para detectar los animales en estadios avanzados de la enfermedad, destacar su capacidad para detectar individuos anérgicos, que no responden a los



métodos diagnósticos basados en la respuesta inmune celular y constituyen un grave riesgo epidemiológico, al contribuir al mantenimiento y la difusión de la enfermedad en la explotación (Pollock & Neill, 2002; de la Rúa-Domenech et al., 2006; Bezos et al., 2014).

Por último, el empleo de técnicas serológicas es especialmente apropiado para la vigilancia de la infección en la fauna salvaje. Esto se debe a que la obtención de muestras de sangre es relativamente sencilla, proporciona resultados aceptables y, además, la realización de otros tipos de pruebas en estos animales es particularmente complicado (Bezos et al., 2014; Thomas & Chambers, 2021).

## **2.6.2 Técnicas de diagnóstico post mortem**

### **a) Diagnóstico anatomopatológico**

El diagnóstico anatomopatológico de la TBb se realiza a lo largo de tres fases consecutivas: 1) la inspección de la canal a nivel de matadero para la detección de lesiones macroscópicas compatibles con la enfermedad, 2) el estudio histológico de las lesiones y 3) la identificación de la presencia de los bacilos tuberculosos en dichas lesiones (Balseiro et al., 2020).

- **Inspección macroscópica en matadero**

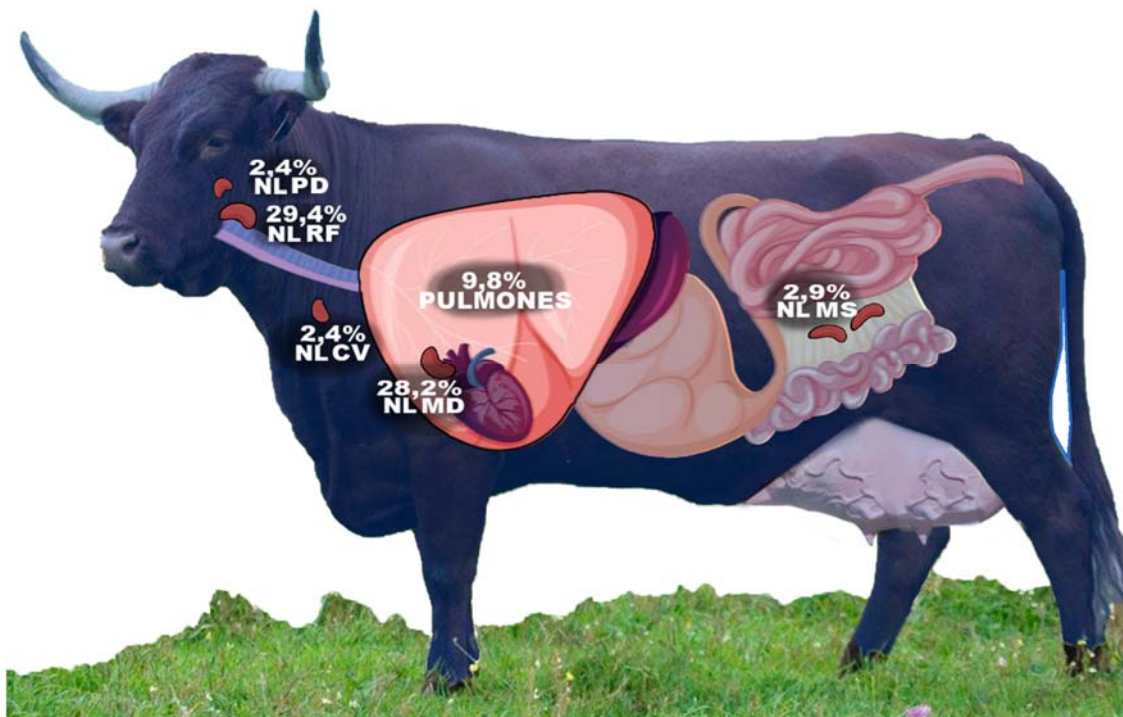
La vigilancia a nivel de matadero se basa en el examen visual y, en su caso, palpación e incisión de la canal y las vísceras de los animales sacrificados con el objetivo de detectar la presencia de LTBs (Zhu et al., 2021). Dicha inspección se realiza tanto en el caso de animales positivos a las técnicas de cribado (IDTB e IFN- $\gamma$ ) como en el caso de animales sacrificados de forma rutinaria, incluso procediendo de rebaños negativos. Esta vigilancia ha demostrado ser fundamental en la detección de brotes de la enfermedad, como muestran los estudios realizados en diversos países (Probst et al., 2011; Abernethy et al., 2013; Guta et al., 2014).

A nivel macroscópico, la lesión característica de la enfermedad es el granuloma tuberculoso. En el ganado bovino, se trata de una lesión nodular de naturaleza granulomatosa y tamaño variable. Suelen estar bien delimitadas y rodeadas por una cápsula de tejido conectivo. En su parte central, presentan un área de color blanquecino-amarillento con evidencia de caseificación y calcificación (Gázquez & Sierra, 2012; Domingo et al., 2014).

Diversos estudios han evaluado las localizaciones orgánicas en las cuales es más frecuente la detección de LTBs en la especie bovina, señalándose que generalmente las lesiones quedan limitadas a NLs de la cabeza y tórax, pulmón, y tonsilas (Corner et al., 1994; Gázquez & Sierra, 2012; Garcia-Saenz et al., 2015; Zhu et al., 2021). En este sentido, los resultados indican que la

localización más afectada en el ganado bovino es el LN retrofaríngeo (29,4%), seguido por el NL mediastínico (28,2%). Otras ubicaciones que también muestran una incidencia significativa incluyen el NL traqueobronquial (18%), los pulmones (9,8%), el NL mesentérico (2,9%), el NL parotídeo (2,4%) y el NL cervical caudal (2,4%) (Figura 4) (Corner, 1994). De esta forma, la inspección de las localizaciones torácicas y cefálicas descritas anteriormente permitirá detectar con un 95% de probabilidad la presencia de lesiones en un animal infectado (García-Saenz et al., 2015).

En cuanto a la validez de la inspección post-mortem en matadero, las estimaciones de su SE oscilan entre el 31,4%, descrito por García-Saenz et al. (2015) y un 88,88% (70,10%-99,41%) (EFSA, 2013; Zhu et al., 2021). En cuanto a su E, ronda el 90,18% (82,33-97,17%) de acuerdo con Zhu et al. (2021), existiendo otros agentes infecciosos que producen LTBs de carácter granulomatoso y que pueden conducir a errores en el diagnóstico. Este es el caso de determinados hongos, parásitos, otras bacterias como MNT, *Trueperella pyogenes*, *Corynebacterium* o *Nocardia* y reacciones no específicas (Ramos et al., 2015; Nuru et al., 2017). Por lo tanto, es fundamental identificar el agente etiológico responsable de la enfermedad, lo cual se puede lograr mediante el uso de cultivos microbiológicos selectivos y técnicas moleculares.



**Figura 4:** Distribución de las lesiones en el ganado bovino. NL PD: nódulo linfático NL parotídeo; NL RF: nódulo linfático retrofaríngeo, NL CV: nódulo linfático cervical caudal; NL MD: nódulo linfático mediastínico; NL MS: nódulo linfático mesentérico.

- **Diagnóstico histopatológico**

El diagnóstico histopatológico se basa en la detección de LTBs histológicas y la observación de bacilos ácido alcohol resistentes (BAAR) en dichas lesiones, hallazgos que permiten orientar un diagnóstico provisional.

El granuloma tuberculoso es la lesión característica de la enfermedad. Sin embargo, en ocasiones, la infección por CMT también puede ocasionar la presencia de lesiones de carácter piogranulomatoso (Cardoso-Toset et al., 2015; Larenas-Muñoz et al., 2022). A medida que la enfermedad avanza, los granulomas tuberculosos experimentan una serie de cambios a nivel microscópico en términos de tamaño, composición celular y la presencia o ausencia de fibrosis, clasificándose en cuatro estadios diferentes (Figura 5) (Wangoo et al., 2005; Palmer et al., 2022).

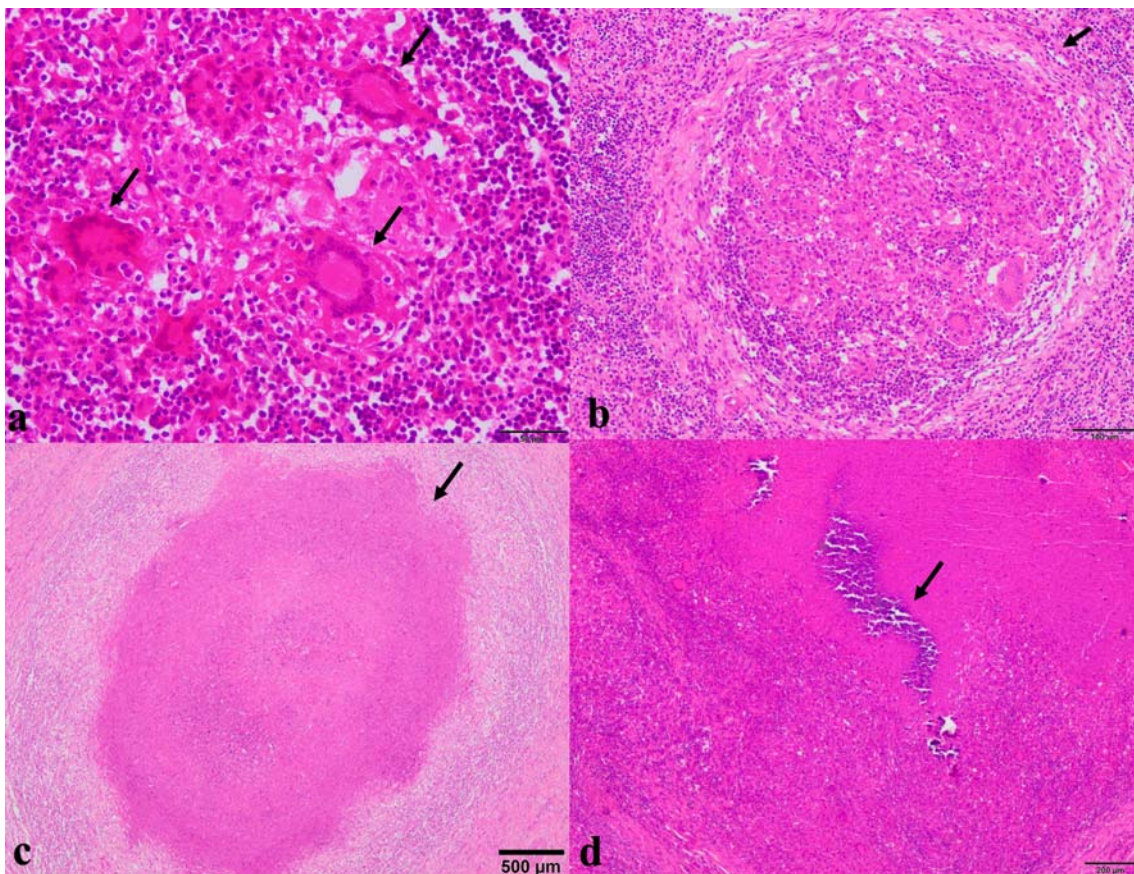
- **Estadio I (granuloma inicial):** el granuloma se caracteriza por la presencia de grupos de macrófagos epitelioides, linfocitos, neutrófilos, así como, ocasionalmente, células gigantes multinucleadas de Langhans (CGML). No se forma una cápsula alrededor del granuloma y no se observa necrosis. La presencia de BAAR es escasa y, generalmente, se localizan dentro de los macrófagos o las CGML, que son raras en esta fase.

- **Estadio II (granuloma sólido):** el granuloma está compuesto por macrófagos epitelioides, linfocitos y CGML, pero ahora se desarrolla una fina cápsula alrededor del granuloma. También se presenta un pequeño foco de necrosis. La presencia de BAAR sigue siendo limitada y pueden encontrarse tanto dentro de las células como en la zona necrótica.

- **Estadio III (necrosis central mínima):** los granulomas están encapsulados y presentan áreas centrales necróticas, mineralizadas y caseosas. Estas áreas necróticas están rodeadas de CGML y macrófagos epitelioides, con una zona periférica que se extiende hacia la cápsula fibrosa. En esta zona periférica, aparecen macrófagos, grupos de linfocitos y, ocasionalmente, neutrófilos. En esta etapa, los BAAR son más numerosos y, generalmente, se encuentran libres en las áreas necróticas, así como en el interior de las CGML o los macrófagos.

- **Estadio IV (necrosis y mineralización):** En el cuarto y último estadio, se observan granulomas coalescentes con una mineralización significativa y una necrosis central bien encapsulada. Están rodeados por macrófagos epitelioides y CGML. En esta etapa, los BAAR son numerosos y se encuentran tanto en las áreas necróticas como en las áreas de mineralización.

El estudio histopatológico nos permite identificar animales infectados con lesiones que pasaron inadvertidas en matadero, pudiendo, incluso, observarse en dichas lesiones la presencia de micobacterias mediante pruebas complementarias como la tinción Ziehl-Neelsen (ZN). Además, se trata de una técnica económica que permite la obtención de resultados de forma rápida, en un periodo aproximado de dos días (Varello et al., 2008; Larenas-Muñoz et al., 2022). El análisis histopatológico ofrece una SE del 93,6% (89,9%-96,9%) y una E 83,3% (78,7%-87,6%). Sin embargo, es importante tener en cuenta que la presencia de macrófagos epitelioides, CGML o, incluso, la necrosis caseosa, puede observarse en otros procesos patológicos, lo que significa que la observación microscópica, por sí sola, puede no ser suficiente para un diagnóstico definitivo (WatreLOT-Virieux et al., 2006).



**Figura 5:** Evolución del granuloma tuberculoso. (A) Granuloma en estadio I, en el que se observa macrófagos epitelioides agrupados con células gigantes multinucleadas (flechas). (B) Granuloma en estadio II con abundantes macrófagos epitelioides, linfocitos, células gigantes multinucleadas y una cápsula fibrosa (flecha). (C) Granuloma en estadio III, con una cápsula fibrosa completa y necrosis central con escasa mineralización (flecha). (D) Granuloma coalescente en estadio IV con encapsulación fibrosa completa, necrosis central extensa y mineralización (flecha) (Fuente: Larenas-Muñoz et al., 2022).

Para completar el diagnóstico, las muestras que contengan LTBs pueden analizarse mediante pruebas complementarias, encaminadas a poner de manifiesto la presencia de BAAR en un frotis o tejido.

La tinción de ZN constituye una de las pruebas más utilizadas como complemento de la histopatología. Esta tinción destaca la presencia de los bacilos tiñéndolos de color rojo sobre un fondo azulado (Watrelet-Virieux et al., 2006). En base al número de bacilos presentes en las lesiones, éstas pueden clasificarse como paucibacilares o pluribacilares. Una lesión será paucibacilar cuando existan de 1 a 10 bacilos presentes y pluribacilar cuando su número supere los 10 bacilos (Johnson et al., 2008; García-Jiménez et al., 2013; Larenas-Muñoz et al., 2022). Según la literatura científica, la tinción de ZN presenta una elevada E (alcanzando el 100% en algunos estudios), pero una SE muy limitada (15,4%-33,9%), debido a la necesidad de que las bacterias estén vivas y con su estructura intacta para ser detectadas (Cancela & García, 1993; Watrelet-Virieux et al., 2006; Varello et al., 2008; Kundu et al., 2014).

Por su parte, la inmunohistoquímica permite la localización de antígenos específicos en el tejido mediante el uso de Ac específicos. Esto la convierte en una técnica más sensible, capaz de detectar no solo bacterias intactas, sino también restos de bacilos (Karimi et al., 2014; Kundu et al., 2014). La SE y E de la inmunohistoquímica varían en función del antígeno a detectar y el Ac seleccionado, y pueden oscilar entre el 64% y el 100% (Watrelet-Virieux et al., 2006; Goel & Budhwar, 2007; Karimi et al., 2014; Kundu et al., 2014). En este sentido, la elección de un epítipo que sea común a otras micobacterias o incluso a otros tipos de bacterias, podría resultar en la clasificación errónea de algunas muestras como positivas (Thorns & Morris, 1986; Watrelet-Virieux et al., 2006).

Finalmente, también cabe la posibilidad de realizar una extracción de ADN a partir de muestras histológicas fijadas en formol e incrustadas en parafina (FFPE). La finalidad es la realización de pruebas moleculares como la PCR a tiempo real (qPCR) o PCR digital (ddPCR), lo que permite la detección de muestras que, presentando LTBs, pueden ser negativas a técnicas como la IDTBs, el cultivo o la qPCR desde tejido fresco como demuestran diversos estudios (Gómez-Laguna et al., 2010; Larenas-Muñoz et al., 2022).

#### **b) Cultivo microbiológico**

Actualmente, el cultivo microbiológico es la prueba diagnóstica de referencia para confirmar la infección por el CMT (Borham et al., 2022). No obstante, se trata de una técnica laboriosa y lenta, que precisa del empleo de laboratorios especializados con un alto nivel de bioseguridad y personal muy cualificado, debido al riesgo biológico que supone trabajar con este tipo de

patógenos zoonóticos de elevada virulencia. Además, la técnica presenta una importante falta de SE y requiere de técnicas adicionales para obtener resultados concluyentes (Corner et al., 2012; Borham et al., 2022).

Entre los estudios realizados para estimar la validez del cultivo microbiológico, destaca el análisis de clases latentes realizado por Courcoul et al. (2014), que refleja una SE del 78,1% (IC95: 72,9%-82,8%) y una E del 99,1% (IC 95%: 97,1%-100%). En base a estos datos, es importante destacar que un resultado positivo al cultivo confirmaría la infección, pero la ausencia de crecimiento de micobacterias no permitiría descartarla (Gormley et al., 2014). Esta falta de SE de la técnica se debe, entre otros factores, al estadio de la infección del animal, el proceso de obtención y transporte de las muestras, el tipo de tejido muestreado, los procedimientos de descontaminación y el medio de cultivo utilizado (Corner et al., 2012; Gormley et al., 2014; Murray et al., 2020; OMSA, 2022).

Las micobacterias del CMT, incluyendo *M. bovis*, son bacterias de crecimiento lento, por lo que requieren de un período prolongado de incubación, especialmente en el aislamiento primario. Se recomienda una incubación de 6 a 12 semanas, ya que períodos más cortos pueden dar lugar a resultados falsos negativos y períodos de incubación más prolongados pueden propiciar el crecimiento de microorganismos contaminantes, incluyendo MNT (Corner et al., 2012; Courcoul et al., 2014). Por lo tanto, es esencial llevar a cabo un proceso de descontaminación previo de las muestras (Corner & Trajstman, 1988). Este proceso de descontaminación implica el uso de productos químicos tóxicos para los microorganismos, si bien las micobacterias son relativamente resistentes debido a su pared celular. Sin embargo, esto disminuye la viabilidad de los bacilos tuberculosos y, por lo tanto, reduce la SE de la técnica (Corner & Trajstman, 1988).

Para el aislamiento primario de la bacteria, se pueden utilizar tres tipos de medios, de acuerdo con Gormley et al. (2014): medios sólidos con huevo (Lowenstein-Jensen o Stonebrink), medios sólidos con agar (Middlebrook 7H10, 7H11 o medios con sangre) y medios líquidos (Middlebrook 7H9).

Actualmente, se utilizan principalmente los sistemas de cultivo automatizados con medios líquidos, como el sistema BACTECTM MGIT 960, que emplea métodos fluorométricos para medir el crecimiento bacteriano. En comparación con los medios sólidos tradicionales, estos medios aumentan la SE y reducen el tiempo de cultivo (SE: 94,6%, tiempo medio de cultivo: 16 días) (Hines et al., 2006).



Por otro lado, es esencial llevar a cabo la identificación de cada cepa aislada. En la actualidad, el método más utilizado para la identificación del CMT es la PCR, aunque también se puede utilizar la espectrofotometría de masas u otras pruebas bioquímicas (Murray et al., 2020).

### **c) Técnicas moleculares**

Las técnicas moleculares representan una herramienta de diagnóstico fundamental, que ha sido reconocida a nivel comunitario a través del Reglamento (UE) 2020/689. Este reglamento establece en su artículo 9 que un animal o grupo de animales pueden ser clasificados como *casos confirmados de enfermedad* si se detecta el ácido nucleico específico del agente patógeno responsable de la enfermedad que figura en la lista correspondiente.

En el caso de la TBb, la detección del ácido nucleico del CMT puede llevarse a cabo a partir de cepas obtenidas en el cultivo bacteriano (Romero et al., 2021) o bien directamente sobre muestras clínicas o de tejido (Thacker et al., 2011; Cardoso-Toset et al., 2015; Lorente-Leal et al., 2019, 2021). Ambos enfoques son válidos y ofrecen una forma eficaz de confirmar la presencia del CMT y diagnosticar la TBb (OMSA, 2022).

- **Reacción en cadena de la polimerasa**

La PCR es una de las técnicas de diagnóstico molecular más utilizadas actualmente, basada en la identificación del agente patógeno mediante la amplificación enzimática de un fragmento específico de su material genético, conocido como diana genética. La PCR se utiliza rutinariamente en el diagnóstico de la TBb como una herramienta complementaria al cultivo microbiológico para la confirmación de la identidad de los aislados positivos, lo que garantiza la E del diagnóstico. Sin embargo, la técnica presenta numerosas ventajas y se plantea como una alternativa real al cultivo, al permitir la detección directa del CMT a partir de tejido fresco (Lorente-Leal et al., 2019, 2021).

Entre las ventajas que presenta la PCR encontramos, en primera instancia, su rapidez en la obtención de los resultados, con una SE que puede incluso superar la del cultivo microbiológico (Courcoul et al., 2014; Lorente-Leal et al., 2019, 2021). Además, el éxito de la técnica no depende de que las bacterias se encuentren vivas o muertas, debido a que detecta su material genético, y tampoco es necesario realizar la descontaminación previa de las muestras (Araújo et al., 2014; Courcoul et al., 2014; Lorente-Leal et al., 2019; Borham et al., 2022).

Sin embargo, la PCR no está exenta de limitaciones. Así se trata de una técnica más costosa que otras pruebas de diagnóstico anteriormente mencionadas, y que además se ve afectada por varios factores que influyen en su rendimiento diagnóstico, entre los cuales se encuentran el

riesgo de contaminación cruzada entre muestras, el proceso de extracción de la muestra, la presencia de sustancias inhibidoras, la secuencia genética utilizada como diana y el tipo de PCR utilizada (Costa, 2004; Lorente-Leal et al., 2019; Borham et al., 2022).

El **riesgo de contaminación** es una de las principales limitaciones que presenta esta técnica desde sus inicios. En este sentido, la alta sensibilidad analítica de la técnica, una virtud cuando se trata de detectar muestras con una baja carga microbiana, se convierte en un problema potencial cuando se manejan las muestras de manera inapropiada, lo que podría desencadenar reacciones cruzadas (Kwok & Higuchi, 1989). Este riesgo es particularmente importante cuando se trabaja con muestras que ya han sido amplificadas previamente, como el caso de la PCR anidada. Por ello, es necesario adoptar una serie de buenas prácticas laborales y de manejo de las muestras descritas por Kwok & Higuchi (1989) que incluyen el autoclavado del agua y de las soluciones buffer utilizadas, hacer alícuotas de los reactivos, evitar salpicaduras al abrir los tubos, utilizar controles negativos y positivos adecuados o añadir el ADN en último lugar a la reacción.

El **protocolo de extracción** es crítico, ya que afecta tanto a la cantidad como a la calidad del material genético disponible, lo que, a su vez, influye en la SE de la PCR. Este protocolo se encuentra determinado por la cantidad de tejido utilizado, el método de digestión seleccionado (químico, enzimático, mecánico) y la posibilidad de introducir inhibidores de PCR durante la extracción (Fell et al., 2016; Lorente-Leal et al., 2019). Es importante destacar que, debido a las características particulares del proceso, principalmente su naturaleza crónica y el carácter paucibacilar del CMT, es común enfrentarse a dificultades en la detección por PCR en estadios tempranos. Esto se debe a la baja carga bacteriana presente en dichos estadios (Liébana et al., 1995; Taylor et al., 2007; Johnson et al., 2008; Radomski et al., 2013).

Por su parte la **elección de la diana genética** (secuencia que se amplificará y detectará en la PCR) determinará la E de la reacción. En el diagnóstico de la TBb, la diana más utilizada es la IS6110, una secuencia de inserción altamente específica de las micobacterias pertenecientes al CMT y que se encuentra repetida varias veces en su genoma, lo que contribuye a aumentar la SE de la PCR (Thacker et al., 2011; Costa et al., 2013; Courcoul et al., 2014; Barandiaran et al., 2019). Sin embargo, diversos estudios han identificado reacciones cruzadas con ciertas cepas de *M. smegmatis* y *M. avium* subsp. *hominissuis* (Coros et al., 2008; Stewart et al., 2013; Zhou et al., 2019; Lorente-Leal et al., 2021), lo que ha determinado la valoración de otras secuencias genéticas. Estos estudios han arrojado resultados variables tanto a nivel de SE como de E, debido



a diversos factores como el tipo de muestra, la presencia o ausencia de lesiones, el procedimiento de extracción y el tipo de PCR (Tabla 5).

**Tabla 5:** Resumen de resultados de SE y E obtenidos según la diana y la PCR utilizada en distintos estudios científicos. *Elaboración propia.*

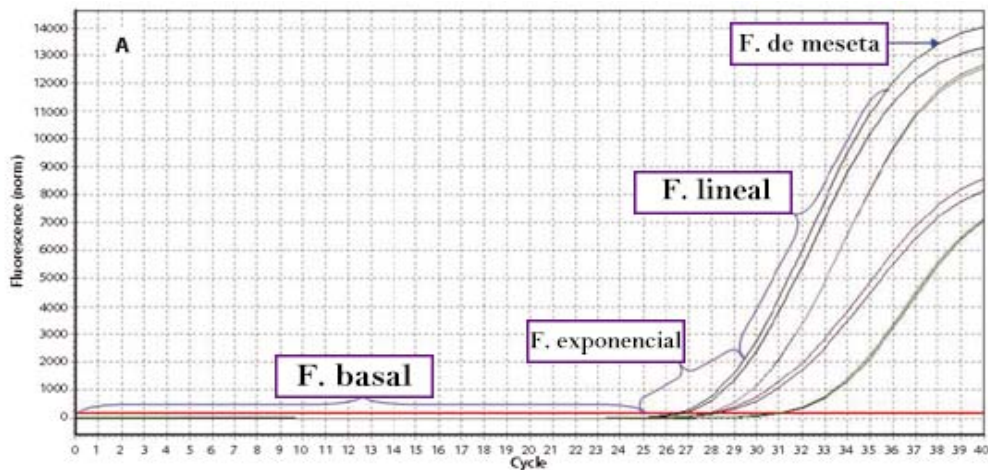
DIANA	TIPO DE PCR	SE	E	BIBLIOGRAFÍA
<i>hupB</i>	PCR convencional	87,50%	71,42%	Algammal et al., 2019
	PCR anidada	97,30%	22,20%	Mishra et al., 2005
<i>DevR</i>	PCR convencional	80%	96,40%	Hallur et al., 2013
	PCR convencional	64,90%	100%	
<i>IS1081</i>	PCR a tiempo real	65,2-87,9%	98,8-99,2%	Pucken et al., 2017
	PCR convencional	90,70%	22,22%	Taylor et al., 2007
<i>RD4</i>	PCR convencional	59,30%	55,60%	Taylor et al., 2007
<i>Ku gene</i>	PCR a tiempo real	100%	100%	Zhou et al., 2019
<i>16S-23S</i>	PCR a tiempo real	73,87%	-	Parra et al., 2008
<i>TbD1</i>	PCR anidada	76%	-	Araújo et al., 2014
		-	100%	
<i>Mpb70</i>	PCR a tiempo real	94,59%	96,03%	Lorente-Leal et al. 2019
<i>IS4</i>	PCR a tiempo real	92,11%	82,61%	Wang et al., 2019
<i>IS6110</i>	PCR a tiempo real	87,70%	97%	Courcoul et al., 2014
	PCR a tiempo real semi-anidada	98,20%	88,70%	Costa et al., 2013
	PCR a tiempo real	96,45%	93,66%	Lorente-Leal et al., 2021

Existen cuatro modalidades de PCR: la PCR convencional, la PCR cuantitativa (qPCR, del inglés *quantitative PCR*), también llamada PCR a tiempo real (del inglés, *real-time PCR*), PCR anidada (del inglés, *Nested PCR*), y la PCR digital (ddPCR, del inglés *droplet digital PCR*).

- La **PCR convencional, o PCR a punto final**, mide la cantidad de producto de PCR acumulado al final del proceso de ciclado. Su principal desventaja, con respecto a otros tipos de PCR, es la necesidad de emplear técnicas de electroforesis para visualizar los resultados de las muestras evaluadas (Mackay, 2004). Además, entre sus limitaciones se citan una precisión deficiente, un rango dinámico corto (<2 logaritmos), una baja resolución, una discriminación basada

únicamente en el tamaño y la ausencia de resultados numéricos (de Dios, 2013; Staggemeier et al., 2015). Por su parte, los estudios para estimar la validez de esta PCR a partir de tejido fresco refieren una enorme variabilidad, tanto en la SE (63%-97%) como en la E (50%-97%) (Liébana et al., 1995; Wards, 1995; Stewart et al., 2013).

- La **PCR a tiempo real (qPCR)** se caracteriza, principalmente, por la realización simultánea tanto del proceso de amplificación del material genético como su detección y cuantificación. El aumento de la fluorescencia es directamente proporcional a la cantidad de producto de amplificación generado durante el proceso de ciclado, y el software muestra este aumento en tiempo real mediante una curva de amplificación con forma sigmoideal (Figura 6). Cuanto mayor sea la cantidad inicial de la diana de ácido nucleico, antes se observará un aumento significativo de la fluorescencia, es decir, se precisará un menor número de ciclos para ser detectable, lo que se mide por “umbrales de ciclos” (Ct) (Quan et al., 2018).



**Figura 6:** Curva de amplificación de una qPCR.

La qPCR ofrece varias ventajas en comparación con la PCR convencional. La principal es que no requiere ninguna técnica posterior para la detección del producto generado en la PCR, ya que esta detección se realiza directamente en el termociclador. Además, al eliminar la necesidad de procesamiento posterior, se ahorra tiempo y se reduce el riesgo de contaminación. La qPCR tiene también un rango dinámico de detección mayor (5-6 logaritmos) y mayor SE (Costa, 2004; Mackay, 2004; Lorente-Leal et al., 2019).

Entre sus inconvenientes, un coste inicial más elevado, especialmente en lo que respecta a la adquisición del equipo. Además, al igual que ocurre con la PCR convencional, el resultado puede verse afectado por la presencia de sustancias inhibidoras de la amplificación, lo que requiere el uso de controles internos de inhibición en cada una de las muestras (Mackay, 2004; Lorente-Leal et al., 2019, 2021).

Numerosos autores han estudiado la validez de la qPCR para el diagnóstico de la TBb, alcanzando resultados muy diversos (SE del 65,2% al 96,45% y E del 82,61% al 100%) (Tabla 5) (Courcoul et al., 2014; Pucken et al., 2017; Lorente-Leal et al., 2019; Wang et al., 2019).

- La **PCR anidada**, implica la realización de dos rondas de amplificación consecutivas, en las cuales el producto obtenido en la primera PCR sirve como molde para la segunda PCR. Se utilizan *primers* diferentes en cada una de estas rondas, lo que contribuye a aumentar tanto la SE como la E de la técnica (Green & Sambrook, 2019). Una de las ventajas destacadas de este tipo de PCR es su capacidad para la detección a nivel de especie, permitiendo discernir, incluso, infecciones mixtas según los *primers* utilizados (Mishra et al., 2005). Sin embargo, la PCR anidada conlleva, en comparación con la qPCR, un mayor riesgo de contaminación cruzada (Araújo et al., 2014b). Los estudios que emplean esta técnica a partir de tejido fresco para la detección del CMT han reportado una SE del 97,3% al 76,7%, y una E del 22,22% al 100% (Mishra et al., 2005; Araújo et al., 2014a, 2014b).

- La **ddPCR**, es una variante de la PCR convencional, que implica la realización de múltiples PCR simultáneas a partir de una misma muestra, lo que permite incrementar la precisión de los resultados con respecto a la qPCR (Quan et al., 2018; Badia-Bringué et al., 2022). Esa mayor SE la ha convertido en una técnica ideal para realizar diagnósticos y detecciones complejos como la detección de mutaciones y variantes genéticas, análisis de expresión genética, genotipado o detección de agentes infecciosos presentes en baja concentración como es el caso de las micobacterias (Tadmor et al., 2011; Nyaruaba et al., 2020; Chen et al., 2021). No obstante, en el campo de la tuberculosis, hasta el momento su utilización se ha limitado al campo de la medicina humana, para la detección de ADN en muestras de sangre o plasma (Yang et al., 2017; Lyu et al., 2020).

La ejecución de la ddPCR (Figura 7) posee diferencias respecto a la qPCR. En primer lugar, las muestras se colocan en un generador de nanogotas junto a los reactivos, y se produce una emulsión en la cual se divide la mezcla en miles de pequeñas partículas o nanogotas. Cada una de dichas nanogotas puede contener una, varias o ninguna molécula del material genético diana a amplificar (Baker, 2012). A continuación, las emulsiones anteriores son transferidas a una placa de reacción de ddPCR, en la cual se realizará la amplificación del material genético presente en cada nanogota. La lectura de las gotas se realiza en un equipo específico cuyo funcionamiento es similar al de un citómetro de flujo, y que detecta en cada una de las gotas si la reacción de amplificación se ha producido o no (Baker, 2012). Los resultados se interpretan mediante un programa específico, el cual, de acuerdo al número de nanogotas positivas o negativas presentes

en la muestra, permite lograr una cuantificación absoluta de la secuencia diana (Kuyppers & Jerome, 2017; Quan et al., 2018; Cao et al., 2020; Badia-Bringué et al., 2022).

Este tipo de PCR presenta numerosas ventajas respecto a las PCRs anteriores, destacando su mayor SE, una mayor tolerancia a inhibidores exógenos y a cambios en las condiciones de la reacción, y una elevada reproducibilidad (Dingle et al., 2013; Huggett & Whale, 2013; Quan et al., 2018; Badia-Bringué et al., 2022; Fan et al., 2022). Sin embargo, la principal limitación de esta técnica, en comparación con las técnicas de PCR anteriores, es su coste, ya que los equipos necesarios son significativamente más caros, lo que puede restringir su uso, incluso en medicina humana. Además, hasta la fecha, no se han realizado estudios sobre la validez de la ddPCR para el diagnóstico de la TBb en animales (Fan et al., 2022).

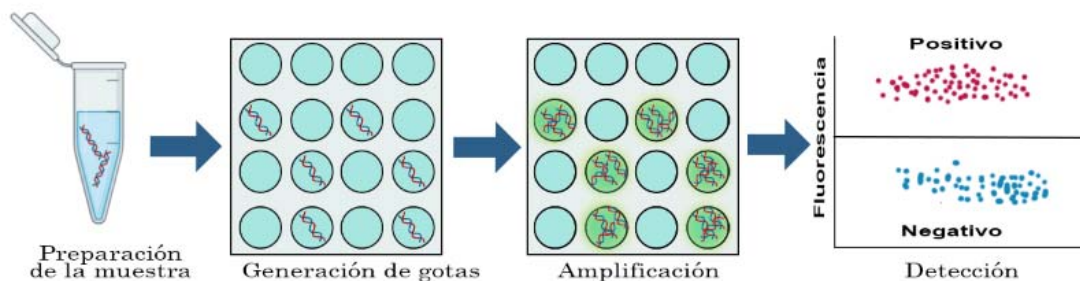


Figura 7: Resumen gráfico de la realización de una ddPCR. *Elaboración propia*

- **Amplificación isotérmica mediada por bucle**

La técnica de amplificación isotérmica mediada por bucle (LAMP; del inglés *Loop-mediated isothermal amplification*) es un método que permite amplificar ácidos nucleicos, tanto ADN como ARN, a una temperatura constante en condiciones isotérmicas. Fue desarrollada como una alternativa a la PCR, utilizando una polimerasa y cuatro *primers* diseñados específicamente para reconocer y amplificar seis regiones distintas del gen diana (Notomi et al., 2000; Kapalamula et al., 2021).

Entre las ventajas de esta técnica se encuentran su alta eficiencia de amplificación, su alta E, una SE analítica comparable a la de la PCR y la capacidad de realizarse en condiciones isotérmicas. Además, los resultados pueden ser observados visualmente, lo que facilita su implementación sin necesidad de grandes inversiones económicas (Notomi et al., 2000; Zhang et al., 2016), lo que la convierte en una alternativa diagnóstica importante, especialmente en regiones con recursos limitados. Además, en algunos casos, LAMP ha demostrado ser capaz de distinguir entre *M. bovis* y *M. tuberculosis* (Zhang et al., 2016; Tao et al., 2020; Kapalamula et al., 2021; Singhla et al., 2022).

- **Espoligotipado**

El espoligotipado es una técnica que se basa en la detección del polimorfismo de ADN en una región del cromosoma llamada *locus DR*, permitiendo la diferenciación a nivel de cepa entre las diferentes especies del CMT. El *locus DR* está compuesto por secuencias repetidas de 36 nucleótidos de longitud (repetición directa o DRs), intercaladas con secuencias no repetidas de entre 35 y 41 pares de bases (espaciadores). La organización de estos DRs, junto a los espaciadores, se denomina *secuencia DVR* (del inglés, *direct variable repeat*). La diferencia entre cepas radica en la presencia o ausencia de espaciadores en dicho *locus DR*, ya que cada genoma contiene un único *locus DR* con la posibilidad de hasta 43 espaciadores únicos (Durr et al., 2000; Guimaraes & Zimpel, 2020). El polimorfismo entre cepas surge de la duplicación y de la eliminación sucesiva de uno o varios DVRs (Durr et al., 2000; Balseiro et al., 2020; Guimaraes & Zimpel, 2020).

Aunque el espoligotipado es ampliamente utilizado en epidemiología molecular, su poder discriminatorio disminuye cuando las cepas son filogenéticamente cercanas entre sí (Romero et al., 2011; Guimaraes & Zimpel, 2020). La distribución geográfica de los espoligotipos, especialmente entre países y regiones, es un indicador epidemiológico valioso para rastrear la propagación de las bacterias pertenecientes al CMT. Además, se ha observado que diversas especies animales, tanto silvestres como domésticas, pueden compartir los mismos espoligotipos de la micobacteria, lo que sugiere la transmisión inter-especie, que sería, como se ha comentado anteriormente, una de las principales limitaciones con las que se encuentran los programas de erradicación de la TBb (Aranaz et al., 1996, 1998; Musoke et al., 2015).

- **Análisis del número variable de repeticiones en tándem**

Otra técnica utilizada para la caracterización de cepas del CMT es el análisis del número variable de repeticiones en tándem (VNTR, del inglés *Variable Number Tandem Repeat*) (Guimaraes & Zimpel, 2020).

Un VNTR es un locus en el cual una secuencia de nucleótidos se repite en tándem, lo que implica que los nucleótidos se agrupan y se orientan en la misma dirección. A diferencia del *locus DR* utilizado en el espoligotipado, en el genoma de las bacterias del CMT existen varios loci VNTR que pueden ser detectados mediante PCR. Los VNTR más comunes se conocen como Unidades de Repetición Interespaciadas de Micobacterias (MIRU, del inglés *minimum number of repetitive elements*) y constan de entre 50 y 100 pares de bases. Estos MIRU suelen estar ubicados en regiones intergénicas (Supply, 2005).

Aunque los VNTR tienden a ser estables, pueden sufrir pequeñas variaciones que permiten la diferenciación entre cepas (Frothingham & Meeker-O'Connell, 1998). La técnica se basa en la detección de estas variaciones mediante una PCR utilizando *primers* específicos para las regiones anexas de los VNTR. El tamaño del producto de PCR refleja el número de copias de VNTR y puede determinarse mediante electroforesis capilar o en gel, o mediante cromatografía líquida de alto rendimiento sin desnaturalización. Los resultados de la técnica se representan de forma numérica (Supply et al., 2006).

No obstante, no todos los VNTR presentan suficiente poder discriminatorio (Frothingham & Meeker-O'Connell, 1998; Magdalena et al., 1998; Supply, 2005; Guimaraes & Zimpel, 2020). Supply et al. (2005) sugieren la utilización de 15 loci MIRU-VNTR para la discriminación epidemiológica habitual de aislados de *M. tuberculosis* y el uso de 24 loci MIRU-VNTR para estudios filogenéticos. Sin embargo, en el caso de *M. bovis* no existe un conjunto estandarizado de loci, ya que se han realizado diversos estudios con resultados variables dependiendo de la región geográfica (Guimaraes & Zimpel, 2020). En base a ello, Hauer et al. (2016) propusieron que en cada territorio se definan los loci con mayor poder discriminatorio para los complejos clonales presentes en la población.

De esta forma, la técnica posee mayor poder discriminatorio que el espigotipado (Trewby et al., 2016), si bien, se recomienda su empleo junto con otras técnicas para mejorar la caracterización de las cepas (OMSA, 2022).

- **Secuenciación masiva del genoma (WGS, del inglés *Whole Genome Sequencing*)**

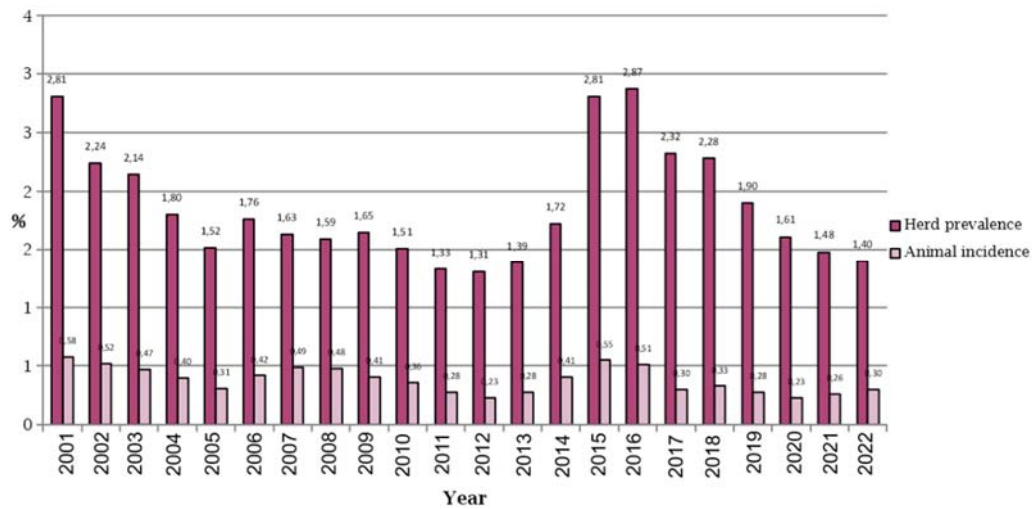
La WGS permite determinar la secuencia completa de bases de ADN de un microorganismo, así como la relación filogenética entre diferentes linajes y cepas. En el caso de *M. bovis*, la secuenciación de su genoma completo ha determinado un total de 3.952 genes y 4.345.492 pares de bases, así como una similitud genética superior al 99,95% con *M. tuberculosis* (Trewby et al., 2016).

De esta forma, y a diferencia del espigotipado y el análisis de VNTR, esta técnica permite, no solo diferenciar entre cepas distribuidas en todo el mundo, sino también a nivel de granja, proporcionando información detallada sobre su genética y evolución; lo que es esencial para comprender la epidemiología y la variabilidad genética del CMT. Estas características hacen de la WGS una herramienta cada vez más valiosa tanto para el diagnóstico como para el control y la investigación de la TBb (Guimaraes & Zimpel, 2020).

## 2.7 Control y erradicación de la TBb en España

### 2.7.1 Problemática para erradicar la enfermedad en la Península Ibérica

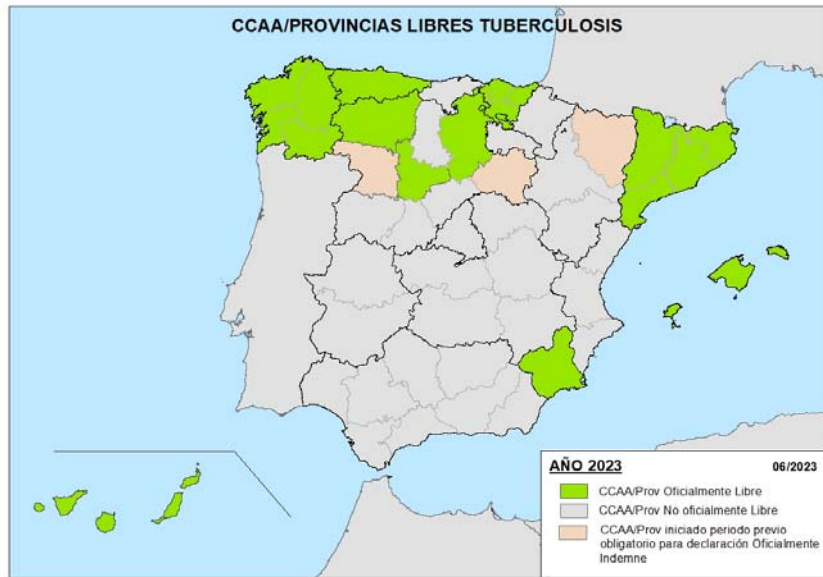
En España, aunque las primeras intervenciones en la lucha colectiva contra la TBb comenzaron en la década de 1950, no fue hasta la implementación del plan de lucha contra la TBb y brucelosis bovinas en 1965, y sus posteriores desarrollos plasmados en el actual Programa Nacional de Erradicación, cuando se observó una disminución significativa de la prevalencia de la enfermedad en los rebaños bovinos. Esta disminución fue notable, pasando de aproximadamente el 20% en la década de 1970 a un 1,48% en el año 2022 (Figura 8) ((MAPA & AECOSAN, 2017; MAPA, 2023). En la última década, sin embargo, la prevalencia nacional no solo no ha experimentado una disminución significativa, sino que muestra una tendencia a la estabilización e incluso se han registrado repuntes, especialmente en el período comprendido entre 2013 y 2016. Esto se atribuye a las deficiencias en las medidas de bioseguridad con las que cuentan las explotaciones, sin embargo, al aumento de la presión diagnóstica sobre la enfermedad y al incremento en la SE de las técnicas diagnósticas ha permitido la detección de las llamadas “*infecciones residuales*”. Este término hace referencia a explotaciones infectadas donde no se han eliminado todos los animales positivos (MAPA, 2023).



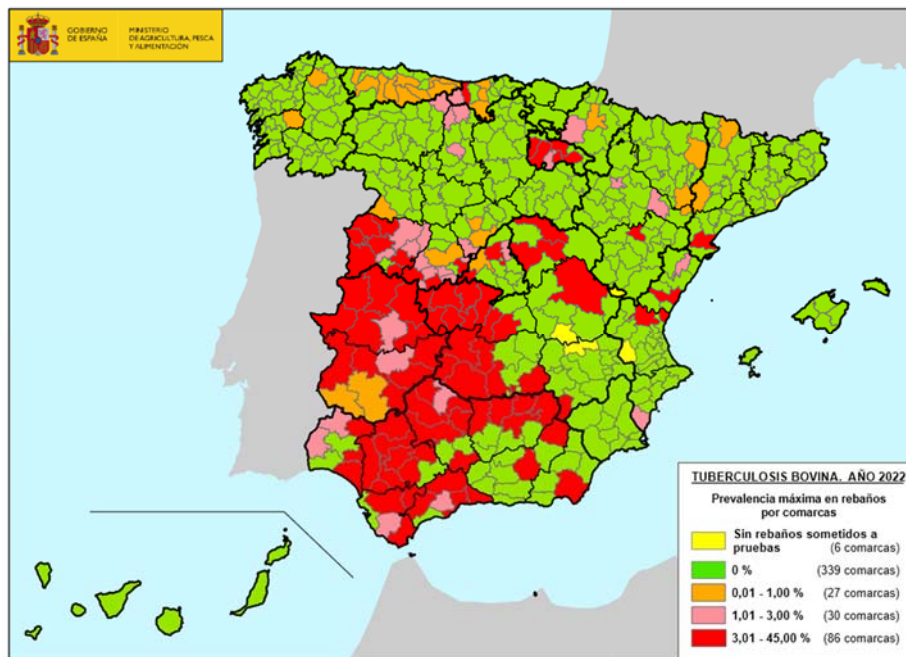
**Figura 8:** Prevalencia e incidencia de TBb en España durante los años 2001-2022. Fuente: MAPA, 2022

En este contexto, las consecuencias de la implantación del programa de erradicación frente a la TBb no han sido iguales en todas las regiones. Así, mientras las Comunidades Autónomas de Baleares, Canarias, Cataluña, Galicia, Murcia, País Vasco y Principado de Asturias y las provincias de León, Valladolid y Burgos han alcanzado la calificación de libres de la enfermedad (Figura 9), y las provincias de Zamora, Soria y Huesca han iniciado el periodo

previo para alcanzar dicha calificación (RD 2611/1996; Reglamento (UE) 2020/689), en Castilla-La Mancha y Andalucía se siguen alcanzando prevalencias del 8,96% y del 6,57%, respectivamente (Figura 10) (MAPA, 2023).



**Figura 9:** Comunidades Autónomas y regiones de España oficialmente libres de Tb. Fuente: MAPA, 2023.



**Figura 10:** Prevalencia comarcal de Tb España durante el año 2022. Fuente: MAPA, 2023.

En cuanto a la incidencia de la enfermedad, la cifra media a nivel nacional es del 0,89%, alcanzándose los niveles más altos en Castilla-La Mancha, con un 3,51%, y en Andalucía, con un 3,22% (MAPA, 2023). Las elevadas tasas alcanzadas en estas zonas se deben al sistema



multi-hospedador característico de la TBb, ya que el ganado bovino de esas zonas se cría tradicionalmente en extensivo asociado al sistema de dehesa mediterránea, el cual comparte con otras especies como el cerdo ibérico, el jabalí y el ciervo. Este sistema multihospedador propicia el mantenimiento de la enfermedad debido a la transmisión entre especies y dificulta la erradicación de la TBb (Gortazar et al., 2011; Barasona et al., 2014, 2017).

### 2.7.2 Programa de erradicación

Actualmente, la lucha frente a la TBb hay que entenderla en un contexto comunitario, enmarcada por el Reglamento (UE) 2016/429, en el Reglamento (UE) 2020/689 y en el Reglamento (UE) 2020/688 desde el punto de vista de la sanidad animal, junto a la que hay que considerar la normativa dimanante del paquete de higiene (Reglamento (CE) 2004/852, Reglamento (CE) 2004/853, que afecta a los controles relativos a la higiene de los productos alimenticios y los controles a realizar sobre estos, incluyendo los controles realizados en las canales de los animales sacrificados. El objetivo es lograr la eliminación total de la enfermedad en el ganado bovino en todo el territorio comunitario, entendiendo como tal, la existencia de una tasa de incidencia de establecimientos confirmados como infectados por el CMT no superior al 0,1% en los últimos 3 años; mantenimiento de la calificación oficialmente libre en al menos un 99,8% de establecimientos que comprendan al menos un 99,9% de los animales en al menos esos 3 últimos años; y la inclusión en el programa de vigilancia de los últimos 3 años la vigilancia ante y post-mortem de todos los bovinos sacrificados mediante la búsqueda sistemática e investigación de lesiones compatibles. La consecución de este objetivo se plantea para el año 2030 (MAPA, 2023).

En el caso de nuestro país, este programa está amparado, además, en la ley 8/2003 de sanidad animal, el RD 2611/96 relativo a los programas nacionales de erradicación de enfermedades de los animales y en el propio Programa Nacional de Erradicación de la TBb (MAPA, 2023).

Este programa está basado en la aplicación de una serie de medidas (RD 2611/1996; MAPA, 2023):

- **Realización de pruebas diagnósticas obligatorias en los rebaños.** En nuestro país, con carácter general, la prueba de elección es la IDTBs (aunque a criterio de la autoridad competente podría usarse la IDTBc). Aunque la UE también autoriza la realización del ensayo de IFN- $\gamma$  de manera rutinaria, en España se recomienda su aplicación simultánea en rebaños infectados después de la retirada de la calificación. El propósito de estas pruebas es obtener la calificación T3 para las explotaciones en nuestro territorio. Las posibles categorías incluyen

T1, que corresponde a explotaciones de las cuales se desconocen los antecedentes clínicos y la situación de la Infección en cuanto a la IDTB en los últimos dos años; T2, que engloba explotaciones con antecedentes conocidos y puede ser clasificada como "T2 negativa" o "T2 positiva" dependiendo de si todos los animales han arrojado resultados favorables o no en la prueba de cribado, respectivamente; y T3, que indica oficialmente la ausencia de TBb. La frecuencia y la interpretación de estas pruebas variarán según el riesgo y la prevalencia en la comunidad autónoma, la comarca y la explotación en la que se ubiquen los animales.

- **Sacrificio obligatorio de los animales positivos** y de los considerados como tales por la autoridad competente, y que podrá alcanzar la consideración de vacío sanitario en determinados casos.

- **Aplicación de medidas profilácticas en las explotaciones consideradas infectadas** tras la detección de animales positivos a las pruebas de cribado, con la finalidad de evitar la propagación. Entre dichas medidas están: la prohibición de movimientos desde o hacia la explotación, aislar a los bovinos confirmados hasta su sacrificio y a los que puedan haberse contagiado, efectuar medidas de limpieza y desinfección de las instalaciones, rociar con desinfectantes el estiércol procedente de los alojamientos o locales utilizados por los animales, control exhaustivo de los movimientos y reposición.

- **Realización de pruebas previas a los movimientos de animales** a partir de las 6 semanas de vida y en los 30 días previos al movimiento, con el objeto de evitar la difusión de la enfermedad a territorios y rebaños libres. El test de elección será la IDTB, si bien, también se contempla la posibilidad de utilizar el IFN- $\gamma$ .

- **Realización de pruebas diagnósticas en rebaños de ganado caprino** que constituyan un riesgo de infección para los rebaños de bovino debido a que conviven con ellos, aprovechan pastos comunes o tienen una relación epidemiológica.

- **Formación de nuevos veterinarios** que comiencen a realizar las pruebas de diagnóstico, así como la realización de cursos de actualización para los veterinarios de campo, con el objeto de asegurar la correcta ejecución de las pruebas diagnósticas.

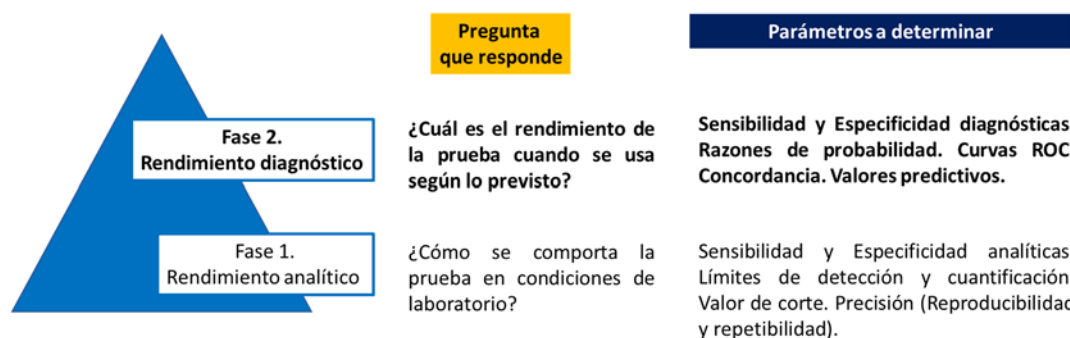
- Se establece un **protocolo de actuación en mataderos** para la vigilancia de la TBb, con el objetivo de optimizar el rendimiento de esta vigilancia y determinar la tasa base de remisión de granulomas no tuberculosos.

- Se regula la **actuación sobre la fauna silvestre** de acuerdo al Plan de Actuación sobre Tuberculosis en Especies Silvestres (PATUBES)(MAPA & AECOSAN, 2017). Este plan tiene

como objetivo conocer la influencia que tiene la fauna salvaje en la transmisión de la enfermedad en los 4 escenarios epidemiológicos existentes en nuestro país (regiones insulares, costa norte, provincias de clima mediterráneo o continental que detectan poca TBb en la fauna silvestre, y provincias de clima mediterráneo o continental que tienen un mayor riesgo de TBb en fauna silvestre). Además, mediante el PATUBES se pretende actualizar el programa de vigilancia sanitaria en dicha fauna y establecer medidas que permitan disminuir la transmisión entre el ganado y las especies silvestres. En este sentido, hay que señalar que la sola presencia de una especie en el entorno no implica que vaya a transmitirse la enfermedad a los animales de granja, sino que entran en juego otros factores, como las medidas de bioseguridad de cada explotación, la abundancia de animales de la especie en cuestión y de la prevalencia de dicha especie en el área en cuestión.

### 3. VALIDACIÓN DE LAS TÉCNICAS DE DIAGNÓSTICO

La validación y verificación del rendimiento de las pruebas de diagnóstico son fundamentales para garantizar que son aplicadas e interpretadas de forma adecuada (Gardner et al., 2021). A este respecto, la normativa europea Reglamento (UE) 2017/746 establece que, al igual que los fármacos y los productos sanitarios, las pruebas y procedimientos diagnósticos deben evaluarse atendiendo a su intención de uso, en diferentes poblaciones diana y teniendo en cuenta la prevalencia de la enfermedad.



**Figura 11.** Fases de la evaluación del rendimiento analítico y diagnóstico. Fuente: García-Fernández et al., 2022

La validación es el proceso por el cual se determina la idoneidad de una prueba para un fin concreto, mediante la estimación de su rendimiento analítico y diagnóstico (figura 11). Es un proceso riguroso que requiere importantes recursos, por lo que las pruebas tienden a ser validadas sólo en algunas muestras (suero, heces, tejido) de unas pocas especies animales. Esto supone que la validación de una técnica para una muestra y/o especie determinadas no garantiza un rendimiento similar en otra matriz o especie animal (OMSA, 2018).

### 3.1 Rendimiento diagnóstico

El rendimiento diagnóstico hace referencia a la capacidad de una prueba para generar resultados que reflejen el verdadero estado de salud de la población a la que va destinada. Clásicamente, la idoneidad de las pruebas de diagnóstico para confirmar o descartar la enfermedad se ha basado en su capacidad para discriminar entre sanos y enfermos, estimada con la sensibilidad y especificidad diagnósticas (OMSA, 2018; García-Fernández et al., 2022;).

- La **sensibilidad diagnóstica** se refiere a la capacidad de una técnica para detectar correctamente a los individuos enfermos. Se calcula como la proporción de animales de referencia que se sabe que están infectados y que dan positivo a la prueba; su opuesto es la proporción de falsos negativos (animales infectados que son erróneamente clasificados como negativos) (Salech et al., 2008; OMSA, 2018; Grilli, 2020; García-Fernández et al., 2022).
- La **especificidad diagnóstica** se refiere a la capacidad de una técnica para identificar correctamente a los individuos sanos. Se calcula como la proporción de animales de referencia que se sabe que no están infectados y que dan negativo a la prueba; su opuesto es la proporción de falsos positivos (animales no infectados que son erróneamente clasificados como positivos) (Salech et al., 2008; OMSA, 2018; Grilli, 2020; García-Fernández et al., 2022).

Así, de forma general se considera que es importante contar con una prueba de *alta sensibilidad* cuando el propósito del diagnóstico es descartar la presencia de un agente específico o demostrar la ausencia de una enfermedad particular (p.e. pruebas de cribado). Por su parte, es importante tener una prueba de *alta especificidad* cuando el propósito del diagnóstico es confirmar la presencia de un agente o enfermedad específica. Sin embargo, y aunque lo más sencillo sería fijarnos en uno solo de estos parámetros para elegir las pruebas, este sistema puede conducir a conclusiones erróneas. Dado que no existen pruebas con una  $Se$  y  $Sp$  perfectas, muchos autores recomiendan valorar su efectividad mediante las *Razones o Cocientes de Probabilidad (RP)*, que permiten comparar en un sólo parámetro la probabilidad de acierto y de fallo de una técnica (Caraguel & Colling, 2021).

De esta forma, las RP de los resultados positivos y negativos nos permiten determinar cuántas veces es mayor la probabilidad de obtener un determinado resultado (+ o -) en un animal con la enfermedad que en un animal sin la enfermedad. Este parámetro tiene tres grandes ventajas sobre la SE y la E:

- Nos da una estimación del poder diagnóstico de la técnica.

- Nos permite calcular de forma rápida los Valores Predictivos y, en consecuencia, la utilidad final de la técnica en función de las condiciones en las que se aplica.
- En protocolos que combinan varias pruebas, nos permite ir recalculando la probabilidad que tiene un animal de padecer o no la enfermedad en función de los datos y resultados que se van conociendo y ajustar, de esta forma, nuestras decisiones sanitarias (Caraguel & Colling, 2021).

En última instancia, la utilidad de una técnica para un determinado propósito diagnóstico vendrá determinada por los *Valores Predictivos* (VP) o probabilidad post-prueba, definidos como la probabilidad de que un animal que haya salido + o – en la prueba tenga realmente, o no, la enfermedad. A diferencia de la SE y la E, los VP dependen de la probabilidad pre-prueba de que el animal tenga la enfermedad, determinada principalmente por su prevalencia en la población de estudio, así como por los signos clínicos y lesiones que presente el animal, exposición a factores de riesgo (edad, sexo, raza, etc.) y resultados previos de otras pruebas (Salech et al., 2008; Arias & Molina, 2013; Vizcaíno-Salazar, 2017; Caraguel & Colling, 2021). De esta forma, una técnica podrá ser más o menos útil para confirmar o descartar un diagnóstico según el escenario (probabilidad pre-prueba) en el que se aplique.

Además, dado que durante la aplicación de los programas de control la prevalencia de la infección cambia continuamente, como consecuencia de la aplicación de medidas de lucha, la OMSA recomienda el seguimiento de la *inversa del valor predictivo positivo* (número de animales positivos al test que son sacrificados por cada animal verdaderamente enfermo detectado) como una forma de evaluar los costes asociados al rendimiento de la prueba y la necesidad de cambiarla por otra de mayor SE o E para reducirlos (OMSA, 2018).

En la siguiente tabla (Tabla 6), se detallan las características exigidas a las pruebas en función de la finalidad del diagnóstico (OMSA, 2018; Reid et al., 2021).

**Tabla 6.** Validez y utilidad recomendada para las pruebas de diagnóstico en función de la finalidad para la que serán utilizadas (OMSA, 2018).

Finalidad	Características diagnósticas recomendadas en función de la finalidad de la prueba (Reid et al., 2021)
<p><i>1a) Mantener el estatus histórico de libre de la enfermedad</i> (con o sin vacunación).</p>	<p>En una población históricamente libre de una enfermedad/agente patógeno concreto, la prevalencia es cero (o cercana a cero). Para ser adecuada para la finalidad definida, la prueba debe minimizar la probabilidad de falsos positivos e idealmente requiere una <b>DSp alta, un VP+ alto y un RP+ alto</b>. Esto puede lograrse mediante una sola prueba con una DSp alta o pruebas seriadas.</p>
<p><i>1b) Recuperación del estatus de libre de la enfermedad después de un brote.</i></p>	<p>En el transcurso de un programa exitoso de control de una enfermedad, se puede esperar un cambio gradual en la prevalencia, de alta (durante el pico del brote) a baja (al final del brote).</p> <p>Durante las <b>primeras fases de un programa</b> de pruebas destinadas a demostrar la ausencia de una enfermedad, cuando la prevalencia de la enfermedad se mantiene en niveles no insignificantes, para que la prueba sea adecuada para su finalidad necesita una <b>DSe alta, un VP - alto y un RP- alto</b>. Este método minimiza la probabilidad de falsos negativos y permite la detección de individuos positivos. Esto puede lograrse mediante una única prueba con una DSe alta o con pruebas en paralelo.</p> <p><b>Al final del programa de control</b> de una enfermedad, cuando se hayan eliminado de la población los animales infectados restantes, la prevalencia de la enfermedad será muy baja, por lo que probablemente habrá que modificar las pruebas de detección para <b>augmentar la DSp para mejorar el PV+ y el RP+</b>, de forma similar a como se hace en 1a.</p>
<p><i>2) Certificar el estatus de libre de la infección o del agente patógeno en animales o productos para su comercio o desplazamiento.</i></p>	<p>A efectos del comercio y los desplazamientos, es necesario minimizar la probabilidad de falsos negativos. De lo contrario, animales infectados podrían ser objeto de comercio o traslado, con la posibilidad de propagar la infección a poblaciones sanas no infectadas. Dado que la prueba se aplica a individuos, no se dispone de información, o ésta es escasa, sobre la prevalencia o la probabilidad de infección antes de la prueba. Para que la prueba o el algoritmo de la prueba sean adecuados para su finalidad, deben minimizar la probabilidad de falsos negativos y, en condiciones ideales, deben tener una <b>DSe, un VP- y un RP- altos</b>. Esto puede lograrse mediante una única prueba con una DSe alta o con pruebas en paralelo.</p>
<p><i>3) Contribuir a la erradicación de la enfermedad o a la eliminación de la infección de poblaciones definidas.</i></p>	<p>Esta finalidad sigue un patrón similar al de 1b, donde se espera que la prevalencia disminuya de alta a baja a lo largo del tiempo en una población definida.</p>

<p>4) <b>Confirmar el diagnóstico de casos sospechosos o clínicos.</b></p>	<p>El objetivo de una prueba confirmativa es minimizar la probabilidad de un falso positivo.</p> <p><b>Confirmación de casos clínicos</b></p> <p>Lo ideal es una prueba con una <b>DSp alta, un VP+ alto y un RP+ alto</b>. Debido a la manifestación clínica de la enfermedad y a la alta carga patógena esperada, la DSe no se considera tan relevante.</p> <p><b>Confirmación de positivos a pruebas de cribado</b></p> <p>Las pruebas de cribado se aplican a poblaciones teóricamente sanas. Suelen tener una DSe alta para garantizar que no se pasen por alto individuos infectados. Se considera que el animal es positivo sólo si se confirma posteriormente (en serie) mediante una prueba con una <b>DSp alta, un VP+ alto y un RP+ alto</b>.</p>
<p>5) <b>Estimar la prevalencia de infección o exposición para facilitar el análisis del riesgo.</b></p>	<p>Los epidemiólogos necesitan estimaciones fiables de la precisión de las pruebas para diseñar planes de muestreo para estudios de prevalencia, encuestas, determinaciones de la situación sanitaria de los rebaños respecto a la infección y decisiones acerca de medidas de control de enfermedades. El uso en serie de una <b>prueba de cribado con una DSe alta seguida de una prueba confirmativa con una DSp alta</b> es un método común para las estimaciones de prevalencia.</p>
<p>6) <b>Determinar el estatus inmunitario post-vacunación respecto a una enfermedad</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>•en animales individuales.</li> <li>•investigación y seguimiento de la eficacia vacunal (estimación de la seroprevalencia).</li> </ul>	<p>Para esta finalidad, el objetivo es tener una <b>DSp, un VP+ y un RP+ altos</b>. Un falso positivo podría tener consecuencias fatales, ya que dicho animal podría, de hecho, no estar vacunado/protegido. Cuanto mayor sea la precisión de la prueba, más exacta será la estimación de la seroconversión post-vacunal en individuos y poblaciones.</p>

DSe: sensibilidad diagnóstica; DSp: especificidad diagnóstica; VP: Valor predictivo positivo; VPN: Valor predictivo negativo; RPP: Razón de probabilidad de los resultados positivos; RPN: Razón de probabilidad de los resultados negativos.





## CAPÍTULO II: OBJETIVOS

---





## OBJETIVOS

El **objetivo principal** de esta tesis fue optimizar y validar diferentes protocolos de PCR sobre tejidos como alternativa al cultivo microbiológico para el diagnóstico de la tuberculosis bovina. Como **objetivo secundario**, se estimó la utilidad diagnóstica de la PCR a tiempo real en distintos escenarios epidemiológicos y diagnósticos. Para ello, nos planteamos cuatro **objetivos específicos**:

**Objetivo 1:** Optimizar y comparar protocolos de extracción de ADN, utilizando muestras frescas de diferentes nódulos linfáticos, a fin de seleccionar el método de extracción y las muestras que ofrecen mayor validez analítica y diagnóstica.

Estudio 1: “Real-Time PCR validation for Mycobacterium tuberculosis complex detection targeting IS6110 directly from bovine lymph nodes”. Publicado en: *Frontiers in Veterinary Sciences* (doi: 10.3389/fvets.2021.643111)

Estudio 2: “Optimization of real-time PCR protocols from lymph node bovine tissue for direct detection of Mycobacterium tuberculosis complex”. Publicado en: *Microbiology Spectrum* (doi: 10.1128/spectrum.00348-23) y se presenta como indicio de calidad para la lectura y defensa de la Tesis Doctoral.

**Objetivo 2:** Determinar la validez diagnóstica de la PCR a tiempo real para la detección del complejo *Mycobacterium tuberculosis* en muestras frescas de nódulos linfáticos de bovino, con distintas dianas (IS6110, mpb70 e IS4).

Estudio 2: “Optimization of real-time PCR protocols from lymph node bovine tissue for direct detection of Mycobacterium tuberculosis complex”. Publicado en: *Microbiology Spectrum*, (doi: 10.1128/spectrum.00348-23) y se presenta como indicio de calidad para la lectura y defensa de la Tesis Doctoral.

**Objetivo 3.** Estimar la utilidad diagnóstica de la PCR a tiempo real en función de la prevalencia de la enfermedad en la población de estudio y los resultados obtenidos previamente en la intradermotuberculinización y la inspección macroscópica (probabilidad pre-test).

**Subobjetivo 3.1.** Determinar la probabilidad pre-test asociada a la validez y los resultados de la intradermotuberculinización cervical con interpretación severa y la inspección macroscópica.

Estudio 3: “Assessment of the diagnostic performance of intradermal tuberculin test and macroscopic inspection for the diagnosis of bovine tuberculosis according to WOAH guidelines”. En revisión en: *Research in Veterinary Sciences*.

**Subobjetivo 3.2.** Estimar la credibilidad de la PCR a tiempo real para diferentes probabilidades pre-test.

Estudio 2: “Optimization of real-time PCR protocols from lymph node bovine tissue for direct detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex”. Publicado en: *Microbiology Spectrum*, (doi: 10.1128/spectrum.00348-23) y se presenta como indicio de calidad para la lectura y defensa de la Tesis Doctoral.

**Objetivo 4:** Optimización y validación analítica y diagnóstica de la PCR digital para la detección del complejo *Mycobacterium tuberculosis* en muestras de tejido fresco de bovino con la sonda IS6110.

Estudio 4: “Droplet digital PCR (ddPCR) as alternative to microbiological culture for *Mycobacterium tuberculosis* complex detection in bovine lymph node tissue samples”. En revisión en: *International Journal of Infectious Diseases*.





## CAPÍTULO III: ESTUDIOS

---







## **Estudio I.**

### **Real-Time PCR validation for *Mycobacterium tuberculosis* complex detection targeting IS6110 directly from bovine lymph nodes**

Sánchez-Carvajal J.M., Galán-Relaño Á., Ruedas-Torres I., Jurado-Martos F, Larenas-Muñoz F, Vera E., Gómez-Gascón L., Cardoso-Toset F, Rodríguez-Gómez I.M, Maldonado A., Carrasco L., Tarradas C., Gómez-Laguna J., Luque I.

Publicado en *Frontiers in Veterinary Sciences*, 2021

**Objetivo 1:** Optimizar y comparar protocolos de extracción de ADN, utilizando muestras frescas de diferentes nódulos linfáticos, a fin de seleccionar el método de extracción y las muestras que ofrecen mayor validez analítica y diagnóstica.



**Real-Time PCR validation for *Mycobacterium tuberculosis* complex detection targeting IS6110 directly from bovine lymph nodes**

Sánchez-Carvajal J.M.<sup>a,\*†</sup>, Galán-Relaño Á.<sup>b,\*†</sup>, Ruedas-Torres I.<sup>a</sup>, Jurado-Martos F.<sup>c</sup>, Larenas-Muñoz F.<sup>a</sup>, Vera E.<sup>a,b</sup>, Gómez-Gascón L.<sup>b</sup>, Cardoso-Toset F.<sup>c</sup>, Rodríguez-Gómez I.M.<sup>a</sup>, Maldonado A.<sup>b</sup>, Carrasco L.<sup>a</sup>, Tarradas C.<sup>b</sup>, Gómez-Laguna J.<sup>a,‡</sup>, Luque I.<sup>c,‡</sup>

<sup>a</sup> Department of Anatomy and Comparative Pathology and Toxicology, University of Córdoba, International Excellence Agrifood Campus 'Ceia3', 14014 Córdoba, Spain

<sup>b</sup> Department of Animal Health, University of Córdoba, International Excellence Agrifood Campus 'Ceia3', 14014 Córdoba, Spain

<sup>c</sup> CICAP – Food Research Centre, 14400, Pozoblanco, Córdoba, Spain.

\*Corresponding author at:

E-mail address: v42sancj@uco.es (José María Sánchez-Carvajal)

agalanr12@gmail.com (Ángela Galán-Relaño)

†These authors have contributed equally to this work and share first authorship

‡These authors have contributed equally to this work and share senior authorship

**Abstract**

Rapid and accurate diagnostic tools, such as qPCR, need to be implemented as confirmatory test in the framework of bovine tuberculosis (bTB) surveillance and control programs, shortening the turnaround time to confirm bTB infection. The present study aimed to evaluate a direct qPCR from fresh tissue samples targeting the insertion sequence IS6110 using individually homogenised bovine lymph nodes compared to microbiological culture. Retropharyngeal, tracheobronchial and mesenteric lymph nodes fresh tissue samples (n=687) were collected from 230 different cattle carcasses at the slaughterhouse. Only 23 out of the 230 examined animals showed tuberculosis-like lesions (TBL) with 62 out of 230 considered as positive. Among these 62 animals, 61 resulted as culture-positive, whereas 48 were qPCR-positive. Thus, this qPCR targeting IS6110 showed an apparent diagnostic sensitivity and specificity values of 77.1% (95% CI: 66.5-87.6%) and 99.4% (95% CI: 98.3-100.6%), respectively, and a positive-predictive-value (PPV) of 97.9% (95% CI: 93.9-102.0%) and negative-predictive-value (NPV) of 92.3% (95% CI: 88.4-96.2%). Positive and negative-likelihood-ratio (PLR and NLR)

were 130.2 and 0.2, respectively, and the agreement between microbiological culture and this qPCR was almost perfect ( $\kappa=0.82$ ). These results highlight this qPCR targeting IS6110 as a suitable complementary method to confirm bTB in animals with either TBL or NTBL, decreasing the number of samples subjected to microbiological culture and, hence, its overall associated costs and the turnaround time (under 48 hours) to confirm bTB infection. Besides, sampling mesenteric lymph node, which is uncommonly sampled, together with tracheobronchial and retropharyngeal ones, is advisable during post-mortem inspection in bTB surveillance programs at the slaughterhouse, especially in areas with a low bTB prevalence scenario.

**Keywords:** Bovine tuberculosis (bTB), gold standard test, IS6110, direct qPCR, Mycobacterium tuberculosis complex (MTC).

## 1. Introduction

Bovine tuberculosis (bTB) is a chronic infectious disease caused by *Mycobacterium bovis* (*M. bovis*), and other members of the Mycobacterium tuberculosis complex (MTC) (Aranaz et al., 2004; Alexander et al., 2010), that affects various species of mammals, including human (Palmer et al., 2013; Pesciaroli et al., 2014). bTB is still one of the largely neglected zoonotic diseases, particularly in developing countries, since the control and surveillance programs for this disease are inadequate or are not carried out, and domestic and wild animals, which act as reservoirs, often share pasture areas. Thereby, it has been estimated that a quarter of the world population has latent tuberculosis, requiring a global effort to develop new tools for the diagnostic and treatment of this disease (Houben et al., 2016). In the European Union (UE), bTB primarily affecting livestock, which is economic importance due to its impact on trade. Indeed, bTB subjected to national eradication programs based on skin testing of all registered cattle herds, slaughtered policy and abattoir surveillance (Council Directive 64/432/EEC). According to the UE legislation, the official diagnosis of bTB is based on the detection of the cellular immune response (single intradermal tuberculin testing, SIT) in reactor animals (skin test-positive animals) which is followed by slaughtering, histopathological examination of atypical or enlarged lymph nodes or parenchymatous organs with tuberculosis-like lesions (TBL), and/or culture of MTC in primary isolation medium (Anon, 2020). Despite the fact that a substantial economic expenditure is addressed to ensure efficient surveillance systems and control programs, the detection and confirmation of bTB infection in cattle herds should be more reliable and swifter (Courcoul et al., 2014).

Microbiological culture is considered the reference technique for bTB diagnosis with recovery rates ranging from 30% to 95% (Hines et al., 2006; Comer et al., 2012; Yates et al., 2017)

and sensitivity (SE) and specificity (SP) values of 78.1% and 99.1%, respectively (Courcoul et al., 2014). It is reported that culture is an imperfect, laborious and time-consuming technique that requires high biosecurity facilities and relatively high expertise (Comer et al., 2012; Courcoul et al., 2014), whose performance can, moreover, be affected by several factors (Hines et al., 2006; Comer et al., 2012; Yates et al., 2017; Lorente-Leal et al., 2019). A major drawback is the delayed culturing process (up to two to three months) which makes longer the time required to reach a final diagnosis (Courcoul et al., 2014; Barandiaran et al., 2019; Lorente-Leal et al., 2019).

In the current landscape, rapid, cost-effective and accurate diagnostic tools could pave the way for managing and controlling bTB in cattle herds (Babafemi et al., 2017). Although ELISA testing is useful to detect anergic tuberculous cattle as a complement to SIT, this assay is not routinely applied in bTB control programs because of its reduced SE (Silva et al., 2001; de la Rua-Domenech et al., 2006; Costa et al., 2013). By contrast, real-time PCR assays (so-called quantitative PCR, qPCR) have been shown to directly detect MTC in fresh bovine tissue samples with moderate to high estimates of SE and SP (Courcoul et al., 2014; Lorente-Leal et al., 2019; Pucken et al., 2017). Direct qPCR is able to detect small amounts of MTC DNA independently of its viability with a turnaround time of 24 - 48 hours, shortening the required time to reach confirmatory results (Silva et al., 2001; de la Rua-Domenech et al., 2006; Courcoul et al., 2014).

IS6110 is a target sequence with multiple copies only present in pathogens belonging to MTC, which has been commonly used for MTC detection by PCR (Thacker et al., 2011; Costa et al., 2013; Courcoul et al., 2014; Barandiaran et al., 2019). Besides IS6110, other targets have been also used for the same purpose, including IS1081 (Taylor et al., 2007; Pucken et al., 2017), hupB (Mishra et al., 2005; Algammal et al., 2019), 16S-23S rRNA Internally Transcribed Spacer (Parra et al., 2008), p34 gene (Cardoso-Toset et al., 2015), TbD1 (Araújo et al., 2014) or mpb70 (Lorente-Leal et al., 2019) with varying results.

In the light of the above mentioned, rapid and accurate diagnostic tools, such as qPCR, may be implemented as confirmatory test in the framework of bTB surveillance and control programmes at the slaughterhouse to shorten turnaround time and inform decision-makers on a timely manner. Therefore, the present study firstly aimed to evaluate the diagnostic performance of a direct qPCR from fresh tissue samples targeting *IS6110* using individually homogenised lymph nodes, and secondly, to validate the *IS6110* qPCR for the detection of MTC positive samples and animals in the framework of the bTB eradication campaign.

## **2. Material and methods**

### **2.1. Samples selection and processing**

Fresh retropharyngeal, tracheobronchial and mesenteric lymph node tissue samples (n=687) were collected from 230 cattle carcasses at the slaughterhouse during the period of 2018–2019. All samples were collected during routine *post-mortem* veterinary examination within an official context and agreeing with national and European regulations. No purpose killing of animals was performed for this study, so no ethical or farmer's consent approval was required.

Every lymph node was independently sliced and the presence of visible-TBL or NTBL was recorded. Individual homogenisation was carried out to obtain a uniform mixture of every lymph node independently using a tissue homogeniser (Fisherbrand, Fisher Scientific, Madrid, Spain). Briefly, 4–7 g of each lymph node tissue was placed into a 15 ml Falcon™ tube (Corning, Madrid, Spain) with the same volume (w/v: 1/1) of 0.85% sterile NaCl and grinded until a homogeneous mixture was obtained. Tissue homogenate was used for DNA isolation and selective bacterial culture.

### **2.2. MTC microbiological culture**

Selective bacterial culture was performed in the BSL3 facilities of Production and Animal Health Laboratory of Córdoba (LPSACo, Regional Government of Andalusia). Briefly, the homogenate was decontaminated with an equal volume of 0.75% (w/v: 1/1) hexadecyl pyridinium chloride solution in agitation for 30 minutes (min) (Corner et al., 1988). Samples were centrifuged during 30 min at 1,500 g. The pellets were collected with swabs and cultured in liquid media (MGIT™ 960, Becton Dickinson, Madrid, Spain) using an automatised BD Bacter™ MGIT™ System (Becton Dickinson). Culture was considered positive when isolates were confirmed as MTC by qPCR (Thierry et al., 1990).

### **2.3. DNA extraction from homogenised lymph nodes**

DNA extraction from homogenised tissue samples was performed using DNA Extract VK (Vacunek, Bizkaia, Spain) according to the manufacturer's guidelines with several modifications. In brief, a mix of 300 mg of homogenate, 250 µl of sterile distilled water and 250 µl of Sample Lysis Buffer VK-SB were added in a 2 ml tube containing 300 mg of 0.5 mm glass beads and submitted to mechanical disruption at 30 Hz during 20 min. Then, the lysed tissue was centrifuged for 5 min at 7,000 g, transferring 200 µl of supernatant to a new 1.5 ml tube. An enzymatic digestion was carried out with 25 µl of 20 mg/ml proteinase K at 56 °C for 3 hours in a thermo-shaker at 750 rpm. After that, 200 µl of Lysis Buffer VK-LB3 were added and the

mixture was incubated during 10 min at 70 °C. Finally, 210 µl ethanol (96–100%) were added to the sample that was applied in a spin column following the manufacturer's guidelines. DNA elution was run using 100 µl of Tris/HCL Buffer supplied with the kit pre-heated at 70 °C. Positive and negative extraction controls were also included. All the DNA extraction products were stored at – 20 °C until use.

#### **2.4. qPCR from fresh tissue samples**

The transposon IS6110, which is present in all species of the MTC, was the target of this qPCR. Specific primers (IS6110-forward: 5'-GGTAGCAGACCTCACCTATGTGT-3'; IS6110-reverse: 5'-AGGCGTCCGGTGACAAAGG-3') and a probe (IS6110- probe: 5'-FAM-CACGTAGGCGAACCC-MGBNFQ-3') targeting a conserved region of IS6110 transposon were used (Martínez-Guijosa et al., 2020). The diagnostic performance of the qPCR was conducted using the QuantiFast® Pathogen PCR + IC Kit (QIAGEN, Hilden, Germany). Amplifications were run in duplicate for each sample in the MyiQ™2 Two-Colour qPCR Detection System (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) under the following cycling conditions: 95 °C for 5 min followed by 45 cycles of 95 °C for 15 seconds (s) and 60 °C for 30 s. Following the manufacturer's guidelines, an exogenous inhibition heterologous control (internal amplification control, IAC) supplied with the kit was included. An inter-run calibrator with a known Ct value of 32 was introduced in each assay to self-control intra-assay repeatably and accuracy. Complete inhibition of amplification was considered when IAC did not amplify, and partial inhibition when it showed a Cycle threshold (Ct) > 33. When any inhibition was detected, samples were diluted up to a final concentration of 450 ng/µl and qPCR was run again. Serial 10-fold dilution series of *Mycobacterium bovis* genomic DNA with known quantities, ranging from 106 to 100 were used as standards to estimate the limit of detection (LOD) or analytical sensitivity. The reactions were carried out in triplicate per each dilution in three different assays and, LOD was determined as the lowest concentration in which that 95% of replicates were positive according to the Clinical and Laboratory Standards Institute guidelines.

In the case of culture-positive and qPCR-negative samples, DNA extraction and qPCR were repeated to verify the results. Then, proteinase K digestion was increased up to 12 hours (overnight incubation) at 56 °C in thermo-shaker at 750 rpm. Positive (MTC confirmed sample) and negative (MTC negative sample) controls were included, as well as an inter-run calibrator. The IS6110 PCR product of culture negative and PCR-positive samples were EtOH precipitated, purified using ExoSAP-IT™ (Thermo Fisher Scientific, Barcelona, Spain), and further analysed by Sanger sequencing (performed at STABvida, Lisbon, Portugal). The obtained sequences were studied using the Bioedit software version 7.1.3.0. Samples confirmed by sequencing were

considered as true positives and used to recalculate the diagnostic parameters of the qPCR targeting IS6110.

### **2.5 Validation of diagnostic tests**

The results of qPCR targeting IS6110 were compared with microbiological culture ones (gold standard) to estimate the diagnostic SE and SP, positive and negative predictive values (PPV and NPVs) and positive and negative likelihood ratios (PLR and NLRs) (WinEpi software 2.0, Faculty of Veterinary Medicine, University of Zaragoza, Spain). Moreover, agreement between culture and qPCR results was assessed using Cohen's kappa coefficient ( $\kappa$ ) (values  $\leq 0$  indicated no agreement and 0.01–0.20 as none to slight, 0.21–0.40 as fair, 0.41–0.60 as moderate, 0.61–0.80 as substantial, and 0.81–1.00 as almost perfect agreement) (WinEpi software 2.0).

## **3. Results**

### **3.1. Topographical distribution of TBL**

A total of 687 retropharyngeal, tracheobronchial and mesenteric lymph nodes samples, belonging to 230 cattle carcasses were analysed to evidence the presence of MTC using microbiological culture and qPCR directly from lymph nodes. Due to the logistic of the slaughterhouse and the timing of slaughtering, it was not always possible to collect the three lymph nodes samples from all 230 carcasses, lacking one retropharyngeal and two mesenteric lymph nodes. Prior to be analysed, every single tissue sample was subjected to a visual inspection to disclosure gross lesions, with 26 out of 687 (3.8%) tissue samples belonging to 23 different cattle (23/230, 10.0%) showing TBL (Table 7). Most of the lesions were evidenced in only one lymph node (tracheobronchial = 11; retropharyngeal = 9), while in 3 animals TBL were observed in two lymph nodes (tracheobronchial-retropharyngeal = 1; tracheobronchial-mesenteric = 1; retropharyngeal-mesenteric = 1).



**Table 7.** Evaluation of the microbiological culture and direct qPCR targeting IS6110 results obtained upon analysing 687 lymph nodes, according to the presence or absence of tuberculosis like-lesions.

		TBL				NTBL			
		RF	TB	MS	Total	RF	TB	MS	Total
Culture	+	5	13	2	20	17	29	7	53
	-	6	0	0	6	201	188	219	608
qPCR	+	8	13	2	23	9 (10)	22 (24)	3	37
	-	3	0	0	3	209 (208)	195 (193)	223	624
Total		11	13	2	26	218	217	226	661

*+*, Positive; *-*, Negative; *qPCR*, real-time PCR; *TBL*, tuberculosis like-lesion; *NTBL*, non-tuberculosis like-lesion; *RF*, retropharyngeal lymph nodes (*n*=229); *TB*, tracheobronchial lymph node (*n*=230); *MS*, mesenteric lymph nodes (*n*=228).

*Culture-positive and qPCR-negative samples that were finally positive and/or negative to qPCR after DNA extraction was repeated (in brackets).*

### 3.2. MTC microbiological culture results

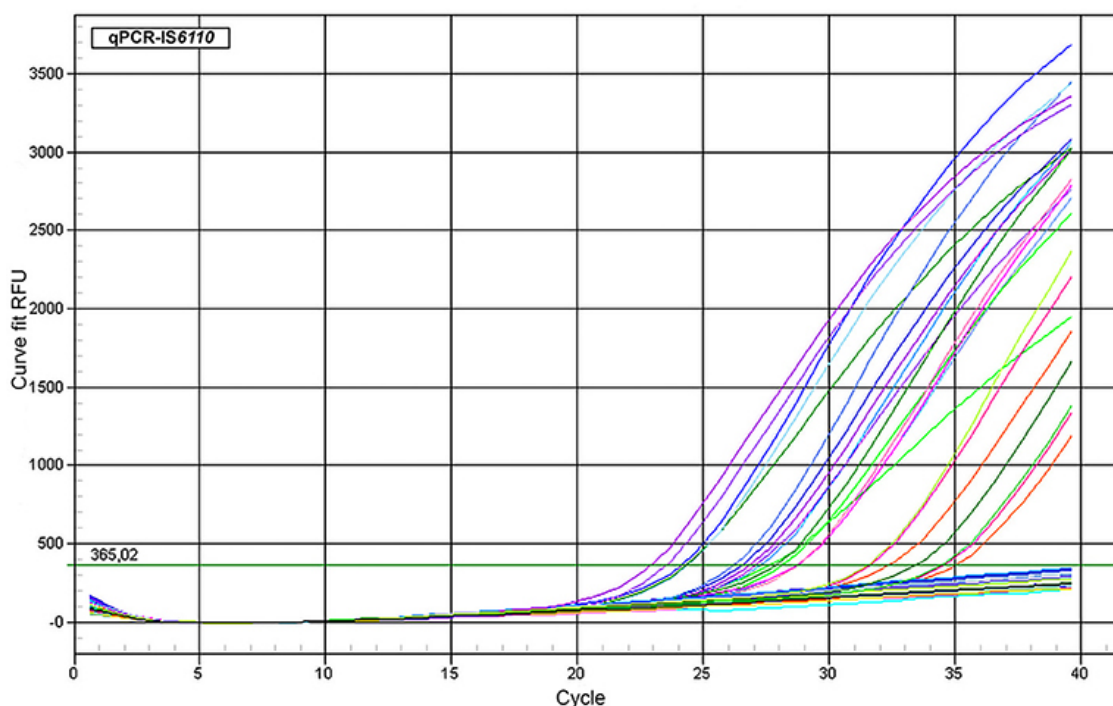
Seventy-three out of 687 tissue samples (10.6%) were positive to microbiological culture, while 614 were negative (89.4%). Bacteria were detected in tracheobronchial lymph nodes (42 out of 73; 57.5%), followed by retropharyngeal (22 out of 73; 30.1%) and mesenteric ones (9 out of 73; 12.3%) (Table 7). An animal was considered cultured-positive when MTC was detected by culture in at least one lymph node. Thus, 61 out of 230 animals (26.5%) were positive to culture, whereas 169 were negative (73.5%). MTC was detected in most of the animals (50, 82.0%) in one lymph node (tracheobronchial = 31; retropharyngeal = 16; mesenteric = 3), whereas in 10 animals (16.4%) MTC was detected in two lymph nodes (retropharyngeal-tracheobronchial = 5; tracheobronchial-mesenteric = 5) and in one animal in the three lymph nodes.

### 3.3. qPCR targeting IS6110

Fifty-seven out of 687 tissue samples (8.3%) were detected as positive by means of qPCR targeting IS6110, with Ct values ranging from 24.2 to 37.5 (Figure 12). The IAC amplified in most of the samples without partial inhibition, showing complete inhibition in 8 out of the 687 samples due to high yield of DNA (over 1,000 ng/μl). These samples were diluted up to a final

concentration of 450 ng/ $\mu$ l and re-evaluated by qPCR, keeping all of them a negative result for MTC, but with IAC amplification. The LOD for this qPCR-IS6110 was determined to be ranging from 10 to 100 genomic equivalents and the cut-off was established to Ct < 38. Most of qPCR-positive results were obtained from tracheobronchial lymph node (35 out of 57; 61.4%), followed by retropharyngeal (17 out of 57; 29.8%) and mesenteric (5 out of 57; 8.8%) lymph nodes, reflecting the same trend as observed in the microbiological culture (Table 7).

Following the same criterion that was used for the microbiological culture, an animal was considered PCR-positive when at least one of the examined lymph nodes yielded a positive result to the qPCR. Thus, 44 out of 230 cattle (19.1%) were qPCR-positive, whereas 185 were negative (80.4%). Briefly, 36 out of the 44 qPCR positive animals (81.8%) were detected in only one lymph node (tracheobronchial = 24; retropharyngeal = 11; mesenteric = 1), 7 animals (15.9%) in two lymph nodes (retropharyngeal-tracheobronchial = 5; tracheobronchial-mesenteric = 2) and one animal (2.3%) in the three lymph nodes.



**Figure 12.** Amplification plot of representative samples. qPCR targeting IS6110 assay using representative fresh lymph node tissue samples belonging to different cattle.  $\Delta$ RFU (Y axis) of the reaction was plotted against the Ct value (X axis). The samples with lowest DNA concentration could be detected ranging from 34 to 36 cycles roughly.

#### 3.4. Diagnostic performance of qPCR compared to microbiological culture

Fifty-three out of the 73 lymph node samples positive to culture were also positive to qPCR

targeting IS6110. Because extraction is a rate-limiting factor that determines the success of downstream bTB detection by PCR, this step was repeated in those culture-positive and qPCR-negative samples (20/73 samples, 27.4%) to verify the results. Thereby, previous extraction conditions were changed by a proteinase K digestion up to 12 hours at 56 °C in thermo-shaker at 750 rpm (overnight incubation), obtaining this time 3 positive samples out of the 20 and remaining the rest (n = 17) negative to qPCR. Hence, an apparent SE of 76.7% (95% CI: 67-86.4%) was found. On the other hand, only 4 out of the 614 samples negative to culture were positive to qPCR, with the remaining samples also giving a negative result to qPCR, with an apparent SP value of 99.3% (95% CI: 98.7-100%). The PPV and NPV were 93.3% (95% CI: 87.0-99.6%) and 97.3% (95% CI: 96.0-98.6%), respectively. In addition, the PLR and NLR were 117.8 and 0.23, respectively. Finally, the concordance or level of agreement between both diagnostic assays for tissue samples was substantial ( $\kappa = 0.83$ ) (Table 7 and 8).

Considering this re-run of the extraction step, 47 out of 61 MTC culture-positive animals were also positive for qPCR targeting IS6110, resulting in an apparent SE of 77.0% (95% CI: 66.5-87.6%). Only one of the 169 MTC culture-negative animals was positive to qPCR, finding an apparent SP of 99.4% (95% CI: 98.3-100.6%). The measures of PPV and NPV were 97.9% (95% CI: 93.9-102.0%) and 92.3% (95% CI: 88.4-96.2%), respectively. The PLR and NLR were 130.2 and 0.23, respectively. The agreement between microbiological culture and qPCR at animal level was almost perfect ( $\kappa = 0.82$ ) (Table 8).

**Table 8.** Diagnostic performance of direct qPCR targeting IS6110 compared to microbiological culture as gold standard analysing 687 lymph nodes belonging to 230 cattle.

		True positives			Measures of diagnostic accuracy (95% CI)				
		Result	+	-	Total	Sensitivity	Specificity	Reliability	<i>k</i> Value
Lymph nodes	qPCR	+	56	4	60	76.7%	99.3%	96.9%	0.83
		-	17	610	627	(67–	(98.7 –	(95.7 -	
	Total	73	614	687	86.4%)	100%)	98.2%)		
Animals	qPCR	+	47	1	48	77.1%	99.4%	93.5%	0.82
		-	14	168	182	(66.5-	(98.3 -	(90.3 –	
	Total	61	169	230	87.6%)	100.6%)	96.7%)		

+, Positive; -, Negative; qPCR, real-time PCR; 95% CI, 95% confidence level.

### 3.5. Validation of IS6110 qPCR for the detection of MTC

Since microbiological culture is considered an imperfect test for bTB diagnosis in which SE may be affected by several factors (Corner et al., 2012; Courcoul et al., 2014; Pucken et al., 2017), combination of culture and IS6110 qPCR was validated for the detection of MTC positive samples or animals. In this sense, culture-negative and PCR-positive samples obtained in our study could be considered as MTC positives. This way, the four IS6110 qPCR-positive and culture negative lymph nodes samples were further subjected to Sanger sequencing and the presence of MTC DNA was evidenced in all of them. Consequently, the diagnostic estimates of the direct qPCR for MTC detection were evaluated, considering as MTC corrected positive samples, culture-positive samples as well as those in which MTC was revealed by Sanger sequencing. For tissue samples, 60 out of the 77 MTC corrected positive samples were successfully amplified by means of qPCR targeting IS6110 with a corrected SE of 77.9% (95% CI: 68.7-87.2%) and SP of 100% (95% CI: 100-100%) and a reliability of 97.5% (95% CI: 96.4-98.7%). The PPV and NPV were increased to 100% (95% CI: 100-100%) and 97.3% (95% CI: 96-98.6%), respectively. The PLR and NLR were 160 and 0.22, respectively, with a level of agreement between assays almost perfect ( $\kappa = 0.86$ ) (Table 9).

**Table 9.** Validation of direct qPCR targeting IS6110 for the detection of MTC analyzing 687 lymph nodes belonging to 230 cattle.

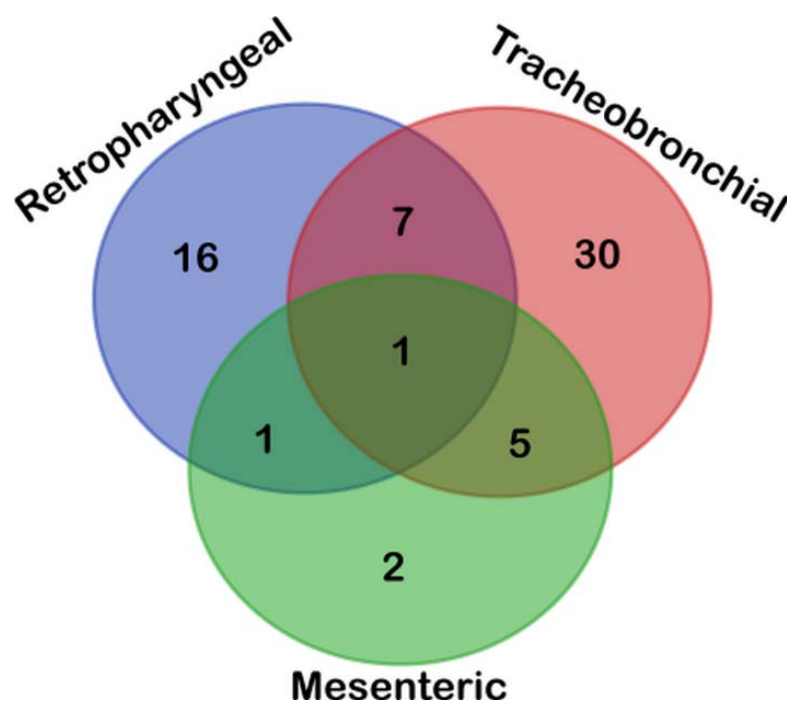
		MTC corrected positive results				Measures of diagnostic accuracy (95% CI)			
		Culture / Sanger sequencing							
		Result	+	-	Total	Sensitivity	Specificity	Reliability	<i>k</i> Value
Lymph nodes	qPCR	+	60	0	60	77.9%	100% (100%)	97.5%	0.86
		-	17	610	627	(68.7- 87.2%)		(96.4- 98.7%)	
		Total	77	610	687				
Animals	qPCR	+	48	0	48	77.4%	100% (100%)	94%	0.83
		-	14	168	182	(67.0 - 87.8%)		(90.8 - 97.0%)	
		Total	62	168	230				

+, Positive; -, Negative; qPCR, real-time PCR; 95% CI, 95% confidence level. MTC corrected positive results: (i) samples that were positive to culture, and (ii) culture-negative samples and PCR-positive after Sanger sequencing.

At animal level, 48 out of the 62 MTC corrected positive animals were also positive for qPCR

targeting IS6110 with a corrected SE and SP of 77.4% (95% CI: 67-87.8%) and 100% (95% CI: 100-100%), respectively, and a reliability of 93.9% (90.8-97.0%). The measures of PPV and NPV were 100% (95% CI: 100-100%) and 92.3% (95% CI: 88.4%-96.2%). The PLR and NLR were 100.2 and 0.2, respectively, and the  $\kappa$  value was 0.83 (almost perfect agreement of both assays) (Table 9).

Finally, according to the distribution of MTC corrected positive results for the lymph nodes (77), the majority of MTC corrected positive animals (48) were detected in only one lymph node (tracheobronchial = 30; retropharyngeal = 16; mesenteric = 2), 13 animals in two lymph nodes (retropharyngeal-tracheobronchial = 7; tracheobronchial-mesenteric = 5; retropharyngeal-mesenteric = 1) and one animal in the three lymph nodes, as showed in Figure 13.



**Figure 13.** Venn diagram depicted the topographical distribution of positive lymph nodes (n=77) according to their results obtained upon analysing sampled by microbiological culture, qPCR-IS6110 and Sanger sequencing. Most of positive cattle were disclosed in tracheobronchial lymph node, followed by retropharyngeal and mesenteric lymph nodes, with most positive animals presenting only one positive lymph node highlighting the choice of tissue is a cornerstone for performing an accurate direct diagnosis of MTC.

### 3.6. Bacteriology and qPCR results distribution according to TBL

Analysing MTC and qPCR results together with the presence of TBL, 26 out of 687 tissue samples (3.8%) showed TBL, and 20 out of these 26 samples (76.9%) resulted both culture and qPCR positive (Table 10). The remaining 6 were negative to culture, being 3 of them also negative

to qPCR. In contrast, the other 3 were positive to qPCR and subsequently confirmed by Sanger sequencing.

Thirty-six out of 661 NTBL tissue samples (5.4%) were positive to either microbiological or qPCR assays, 17 were only culture-positive (2.6%) and 1 only qPCR-positive (0.2%). Of note, this culture-negative and qPCR-positive sample was confirmed as positive after Sanger sequencing. Thus, 607 NTBL tissue samples (91.8%) were negative for both techniques (Table 9).

**Table 10.** Assessment of the microbiological culture and direct qPCR targeting *IS6110* results obtained upon analysing 687 lymph nodes belonging to 230 cattle, according to the presence or absence of tuberculosis like-lesions.

		Microbiological culture			Total
		+	-		
NTBL	qPCR +	36	1	37	661
	qPCR -	17	607	624	
TBL	qPCR +	20	3	23	26
	qPCR -	0	3	3	

+, Positive; -, Negative; qPCR, real-time PCR; 95% CI, 95% confidence level; NTBL, non-tuberculosis like-lesion; TBL, tuberculosis like-lesion.

#### 4. Discussion

bTB is one of the oldest and most relevant zoonoses worldwide, being its eradication the main objective of the UE. As a consequence, rapid, cost-effective and sensitive tools for the diagnosis of different pathogens belonging to MTC play a pivotal role to control and prevent its transmission in countries where it is still especially present in dairy and meat cattle herds (Costa et al., 2013; Che' Amat et al., 2015; Babafemi et al., 2017). Therefore, direct qPCR from tissue samples could work as an accurate and rapid diagnostic alternative in animal health (Courcoul et al., 2014; Cardoso-Toset et al., 2015; Babafemi et al., 2017; Lorente-Leal et al., 2019) which could be implemented by public health agencies not only to reduce the turnaround time on reaching a confirmatory diagnosis compared with microbiological culture, but also to shorten the time of exposure to MTC, facilitating the decision-making process. In this context, the main objective of the present study was to evaluate a qPCR targeting *IS6110* to detect MTC directly

from fresh tissue bovine lymph node samples.

In the present study, the direct qPCR targeting *IS6110* showed an apparent SE and SP for individual tissue samples of 76.7% and 99.3%, respectively, when compared to microbiological culture. In addition, the agreement between both assays was almost perfect ( $\kappa = 0.83$ ). Several factors make challenging to run a direct detection of MTC, such as the paucibacillary nature of this complex, the extremely hardy disruption of mycobacterial cells or the extensive necrosis, fibrosis and mineralisation associated with TBL, interfering all of them with mycobacterial DNA isolation and leading to false-negative results, which limits the final diagnosis performance (Liebana et al., 1995; Taylor et al., 2007; Liebana et al., 2008). In our case, samples were individually homogenised prior to be processed with the goal of reaching a uniform distribution of MTC in the whole matrix, but also trying to restrict a dilution effect beyond the detection limit of the qPCR. Despite that, 20 samples were positive to microbiological culture but negative for qPCR. It is well-known that the yield and quality of DNA after extraction could depend on multiple factors (de la Rúa-Domenech et al., 2006; Lorente-Leal et al., 2019), consequently, DNA isolation was repeated in all qPCR-negative samples increasing proteinase K digestion up to 12 hours at 56 °C (overnight incubation), obtaining three additional qPCR-positive samples, and slightly improving SE from 71.2% to 76.7%. A similar approach was conducted to improve diagnostic SE and SP of direct qPCR targeting *mpb70* from 88.4% and 92.3% to 94.5% and 96.0%, respectively (Lorente-Leal et al., 2019). These results suggest that DNA extraction protocol is certainly relevant impacting directly on diagnostic SE of direct qPCR from fresh tissue samples.

Several alternative methods have been previously performed to improve diagnostic SE of direct qPCR from tissues. Thus, nested-PCR targeting *TbD1* (Araújo et al., 2014) or *IS6110* (Costa et al., 2013) have been suggested as a method to improve the detection of MTC in bovine tissue samples with a diagnostic SE and SP ranging from 76.0% to 98.2%, and from 88.7% to 100%, respectively. Nevertheless, a nested-PCR requires two different amplification steps, increasing the concern about cross-contamination which could negatively affect diagnostic SP values. On the other hand, Parra et al., (2008) used a manual extraction method with capture probes targeting 16S-23S ITS region to isolate a higher yield of mycobacterial DNA from tissue homogenate samples obtaining a diagnostic SE ranging from 61.1% for samples with NTBL to 80.6% for TBL samples, with an average SE of 73.8%. In this sense, Taylor et al., (2007) reported an increase of diagnostic SE from 70.1% to 91.2% targeting *IS1081* and carrying out DNA isolation only from TBL ruling out positive samples without readily macroscopic lesion. In our case, 23 out of 26 lymph nodes with TBL (88.5%) were amplified targeting *IS6110*, nevertheless, when all samples were considered, both TBL and NTBL samples, a SE of 76.7% was obtained, highlighting

the potential of using this target for qPCR screening not only in TBL but also in NTBL.

Previous studies targeting *mpb70* (Lorente-Leal et al., 2019) or *IS6110* (Courcoul et al., 2014) have reported higher SE and SP results than those herein reported, however, it is noteworthy to mention that in those studies there was a high proportion of the evaluated samples with TBL (39.8% and 100%, respectively). This feature evidences that animals included in those studies were in more advanced stages of bTB-infection (Corner et al., 1994; de la Rua-Domenech et al., 2006). Unlikely, in the present study, most of tissue samples lacked TBL (661/687) with only 3.6% of them presenting TBL, which points to animals were sampled in earlier stages of the infection. In addition, qPCR targeting *IS6110* showed a moderate diagnostic SE and high SP. These results highlight the diagnostic potential of direct qPCR from fresh tissue to detect MTC at early stages of infection and, therefore, when mycobacterial load is lower.

Regarding to the topographical distribution of the lesions, most of TBL samples were disclosed in tracheobronchial lymph node, followed by retropharyngeal and mesenteric lymph nodes, with most positive animals presenting only one affected lymph node (77.4%). One of the strengths of the present study is that a detailed evaluation of topographical distribution of the results was made, since the choice of tissue samples at abattoir is a key player for carrying out an accurate direct diagnosis of MTC. In addition, the diagnosis from a pool of lymph nodes from reactor animals with TBL or NTBL is probably to have a dilution impact on the results. According to our results, most of true positive animals reacted in one single lymph node, highlighting that not only tracheobronchial and retropharyngeal lymph nodes but also mesenteric lymph node, which is uncommonly sampled during *post-mortem* inspection in bTB surveillance systems at the slaughterhouse, should be evaluated and collected for TB diagnosis. These results turn out to be relevant in areas with a low TB prevalence scenario in order to enhance diagnostic accuracy of direct detection methods.

Although microbiological culture is considered the *gold standard* for bTB confirmation, this technique is time-consuming and imperfect inducing false negative results (Corner et al., 2012), and SE and SP will always be biased (Toft et al., 2005; Courcoul et al., 2014), therefore, combination with other techniques is required in order to truly identify MTC positive samples. Thereby, three out of 6 samples with TBL and culture-negative were detected as positive for direct qPCR and confirmed by Sanger sequencing, displaying a SE and SP of 77.9% and 100%, respectively, for MTC detection. It is worthy of note that the other 3 culture-negative and qPCR-negative TBL samples presented pyogranulomatous lesions and Ziehl-Neelsen negative result when examined under the light microscope (data not shown). These results suggest that other



microorganisms may be involved in the production of these lesions, as has already been demonstrated in pigs (Cardoso-Toset et al., 2015), which could be taken into account for future studies.

Several factors impact on the success of microbiological culture such as decontamination process (Corner et al., 2012) or encapsulation of the granulomas (Menin et al., 2013), however, DNA amplification of MTC can be successfully performed from fibrotic and encapsulated granulomas. Our results highlight that direct qPCR is able to detect more positive samples from fresh lymph nodes tissue with TBL than microbiological culture (23 vs 20), resulting in a faster and effective confirmatory method for MTC during official *post-mortem* inspection at the slaughterhouse. Nonetheless, microbiological culture remains as a required method to mycobacterial isolation and molecular epidemiology studies so far (Courcoul et al., 2014).

Finally, direct qPCR targeting *IS6110* was also used to run the diagnostic performance of all animals included in this study, showing a diagnostic SE and SP of 77.0% and 99.4%, respectively, values that are very close to those previously reported for microbiological culture (Courcoul et al., 2014). In addition, a predictive value of 97.9% PPV and 92.3% NPV, together with a PLR and NLR of 130.2 and 0.23, respectively, point to a qPCR-positive animal could be considered as true positive. Previous reports on animals have indicated either a barely higher SE for qPCR targeting *IS6110* (Courcoul et al., 2014) or lower SE for *IS1081* (Pucken et al., 2017) compared with the diagnostic SE herein reported. In addition, if diagnostic estimates for MTC detection were considered SE and SP values could be increased up to 77.4% and 100%, respectively. The disparities among studies may be attributed to differences in the approach for data analysis, epidemiologic situation, or the sample size. On the other hand, *gross post-mortem* examination is a critical stage for detection of bTB-infected animals at slaughterhouses. Nevertheless, the number of reactors with TBL is currently reduced at the slaughterhouse due to the success of surveillance and control programmes decreasing bTB prevalence in cattle herds. Therefore, in the present framework, qPCR assay targeting *IS6110* might work as a suitable complementary method to confirm bTB in reactor animals with either TBL or NTBL, decreasing the number of samples subjected to microbiological culture and, hence, the overall associated cost as well as the turnaround time, less than 48 hours, for confirming bTB infection.

## 5. Conclusion

The present study revealed that qPCR targeting *IS6110* is an efficient confirmatory test which may be implemented in bTB surveillance and control programmes, shortening turnaround time to keep decision makers noticed promptly, as well as reducing economic costs.

### Conflict of interest

The authors declare that they have no competing interest.

### References

1. Aranaz A, De Juan L, Montero N, Sánchez C, Galka M, Delso C, Alvarez J, Romero B, Bezos J, Vela AI, et al. Bovine tuberculosis (*Mycobacterium bovis*) in wildlife in Spain. *J Clin Microbiol* (2004) 42:2602–2608. doi:10.1128/JCM.42.6.2602-2608.2004
2. Alexander KA, Laver PN, Michel AL, Williams M, van Helden PD, Warren RM, van Pittius NCG. Novel mycobacterium tuberculosis complex pathogen, *M. Mungi*. *Emerg Infect Dis* (2010) 16:1296–1299. doi:10.3201/eid1608.100314
3. Palmer M V. *Mycobacterium bovis*: Characteristics of wildlife reservoir hosts. *Transbound Emerg Dis* (2013) 60:1–13. doi:10.1111/tbed.12115
4. Pesciaroli M, Alvarez J, Boniotti MB, Cagiola M, Di Marco V, Marianelli C, Pacciarini M, Pasquali P. Tuberculosis in domestic animal species. *Res Vet Sci* (2014) 97:S78–S85. doi:10.1016/j.rvsc.2014.05.015
5. Houben RMGJ, Dodd PJ. The Global Burden of Latent Tuberculosis Infection: A Re-estimation Using Mathematical Modelling. *PLOS Med* (2016) 13:e1002152. doi:10.1371/journal.pmed.1002152
6. Anon. EN EN Working Document on Eradication of Bovine Tuberculosis in the EU. Available at: <http://www.oie.int/international-standard-> [Accessed December 17, 2020]
7. Courcoul A, Moyen J-L, Brugère L, Faye S, Hénault S, Gares H, Boschioli M-L. Estimation of Sensitivity and Specificity of Bacteriology, Histopathology and PCR for the Confirmatory Diagnosis of Bovine Tuberculosis Using Latent Class Analysis. *PLoS One* (2014) 9:e90334. doi:10.1371/journal.pone.0090334
8. Corner, Gormley E, Pfeiffer DU. Primary isolation of *Mycobacterium bovis* from bovine tissues: Conditions for maximising the number of positive cultures. *Vet Microbiol* (2012) 156:162–171. doi:10.1016/j.vetmic.2011.10.016
9. Yates GF, Price-Carter M, Bland K, Joyce MA, Khan F, Surrey M, de Lisle GW. Comparison of the BBL mycobacteria growth indicator tube, the BACTEC 12B, and solid media for the isolation of *Mycobacterium bovis*. *J Vet Diagnostic Investig* (2017) 29:508–512. doi:10.1177/1040638717697763
10. Hines N, Payeur JB, Hoffman LJ. Comparison of the recovery of *Mycobacterium bovis*

isolates using the BACTEC MGIT 960 system, BACTEC 460 system, and Middlebrook 7H10 and 7H11 solid media. *J Vet Diagnostic Investig* (2006) 18:243–250. doi:10.1177/104063870601800302

11. Lorente-Leal V, Liandris E, Castellanos E, Bezos J, Domínguez L, de Juan L, Romero B. Validation of a real-time PCR for the detection of mycobacterium tuberculosis complex members in Bovine tissue samples. *Front Vet Sci* (2019) 6: doi:10.3389/fvets.2019.00061

12. Barandiaran S, Aguirreburualde MSP, Marfil MJ, Vivot MM, Aznar N, Zumárraga M, Perez AM. Bayesian assessment of the accuracy of a PCR-based rapid diagnostic test for bovine tuberculosis in swine. *Front Vet Sci* (2019) 6:204. doi:10.3389/fvets.2019.00204

13. Babafemi EO, Cherian BP, Banting L, Mills GA, Ngianga K. Effectiveness of real-time polymerase chain reaction assay for the detection of Mycobacterium tuberculosis in pathological samples: A systematic review and meta-analysis. *Syst Rev* (2017) 6: doi:10.1186/s13643-017-0608-2

14. Silva E. Evaluation of an enzyme-linked immunosorbent assay in the diagnosis of bovine tuberculosis. *Vet Microbiol* (2001) 78:111–117. doi:10.1016/S0378-1135(00)00282-0

15. de la Rua-Domenech R, Goodchild AT, Vordermeier HM, Hewinson RG, Christiansen KH, Clifton-Hadley RS. Ante mortem diagnosis of tuberculosis in cattle: A review of the tuberculin tests,  $\gamma$ -interferon assay and other ancillary diagnostic techniques. *Res Vet Sci* (2006) 81:190–210. doi:10.1016/j.rvsc.2005.11.005

16. Pucken V-B, Knubben-Schweizer G, Döpfer D, Groll A, Hafner-Marx A, Hörmansdorfer S, Sauter-Louis C, Straubinger RK, Zimmermann P, Hartnack S. Evaluating diagnostic tests for bovine tuberculosis in the southern part of Germany: A latent class analysis. *PLoS One* (2017) 12:e0179847. doi:10.1371/journal.pone.0179847

17. Costa P, Ferreira AS, Amaro A, Albuquerque T, Botelho A, Couto I, Cunha M V., Viveiros M, Inácio J. Enhanced Detection of Tuberculous Mycobacteria in Animal Tissues Using a Semi-Nested Probe-Based Real-Time PCR. *PLoS One* (2013) 8:e81337. doi:10.1371/journal.pone.0081337

18. Thacker TC, Harris B, Palmer M V., Waters WR. Improved specificity for detection of Mycobacterium bovis in fresh tissues using IS6110 real-time PCR. *BMC Vet Res* (2011) 7:50. doi:10.1186/1746-6148-7-50

19. Taylor GM, Worth DR, Palmer S, Jahans K, Hewinson RG. Rapid detection of Mycobacterium bovis DNA in cattle lymph nodes with visible lesions using PCR. *BMC Vet Res*

(2007) 3:12. doi:10.1186/1746-6148-3-12

20. Mishra A, Singhal A, Chauhan DS, Katoch VM, Srivastava K, Thakral SS, Bharadwaj SS, Sreenivas V, Prasad HK. Direct detection and identification of *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium bovis* in bovine samples by a novel nested PCR assay: Correlation with conventional techniques. *J Clin Microbiol* (2005) 43:5670–5678. doi:10.1128/JCM.43.11.5670-5678.2005

21. Algammal AM, Wahdan A, Elhaig MM. Potential efficiency of conventional and advanced approaches used to detect *Mycobacterium bovis* in cattle. *Microb Pathog* (2019) 134:103574. doi:10.1016/j.micpath.2019.103574

22. Parra A, García N, García A, Lacombe A, Moreno F, Freire F, Moran J, Hermoso de Mendoza J. Development of a molecular diagnostic test applied to experimental abattoir surveillance on bovine tuberculosis. *Vet Microbiol* (2008) 127:315–324. doi:10.1016/j.vetmic.2007.09.001

23. Cardoso-Toset F, Luque I, Amarilla SP, Gómez-Gascón L, Fernández L, Huerta B, Carrasco L, Ruiz P, Gómez-Laguna J. Evaluation of rapid methods for diagnosis of tuberculosis in slaughtered free-range pigs. *Vet J* (2015) 204:232–234. doi:10.1016/j.tvjl.2015.01.022

24. Araújo CP, Osório ALAR, Jorge KSG, Ramos CAN, Filho AFS, Vidal CES, Roxo E, Nishibe C, Almeida NF, Júnior AAF, et al. Detection of *Mycobacterium bovis* in Bovine and Bubaline Tissues Using Nested-PCR for TbD1. *PLoS One* (2014) 9:e91023. doi:10.1371/journal.pone.0091023

25. Corner LA, Trajstman AC. An evaluation of 1-hexadecylpyridinium chloride as a decontaminant in the primary isolation of *Mycobacterium bovis* from bovine lesions. *Vet Microbiol* (1988) 18:127–134. doi:10.1016/0378-1135(88)90058-2

26. Thierry D, Brisson-Noel A, Vincent-Levy-Frebault V, Nguyen S, Guesdon JL, Gicquel B. Characterization of a *Mycobacterium tuberculosis* insertion sequence, IS6110, and its application in diagnosis. *J Clin Microbiol* (1990) 28:2668–2673. doi:10.1128/jcm.28.12.2668-2673.1990

27. Martínez-Guijosa J, Romero B, Infantes-Lorenzo JA, Díez E, Boadella M, Balseiro A, Veiga M, Navarro D, Moreno I, Ferreres J, et al. Environmental DNA: A promising factor for tuberculosis risk assessment in multi-host settings. *PLoS One* (2020) 15:e0233837. doi:10.1371/journal.pone.0233837

28. Che' Amat A, González-Barrio D, Ortiz JA, Díez-Delgado I, Boadella M, Barasona JA, Bezos J, Romero B, Armenteros JA, Lyashchenko KP, et al. Testing Eurasian wild boar piglets for serum

antibodies against *Mycobacterium bovis*. *Prev Vet Med* (2015) 121:93–98. doi:10.1016/j.prevetmed.2015.05.011

29. Liebana E, Johnson L, Gough J, Durr P, Jahans K, Clifton-Hadley R, Spencer Y, Hewinson RG, Downs SH. Pathology of naturally occurring bovine tuberculosis in England and Wales. *Vet J* (2008) 176:354–360. doi:10.1016/j.tvjl.2007.07.001

30. Liebana E, Aranaz A, Mateos A, Vilafranca M, Gomez-Mampaso E, Tercero JC, Alemany J, Suarez G, Domingo M, Dominguez L. Simple and rapid detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex organisms in bovine tissue samples by PCR. *J Clin Microbiol* (1995) 33:33–36. doi:10.1128/jcm.33.1.33-36.1995

31. Corner. Post mortem diagnosis of *Mycobacterium bovis* infection in cattle. *Vet Microbiol* (1994) 40:53–63. doi:10.1016/0378-1135(94)90046-9

32. Toft N, Jørgensen E, Højsgaard S. Diagnosing diagnostic tests: Evaluating the assumptions underlying the estimation of sensitivity and specificity in the absence of a gold standard. in *Preventive Veterinary Medicine* (Elsevier), 19–33. doi:10.1016/j.prevetmed.2005.01.006

33. Cardoso-Toset F, Gómez-Laguna J, Amarilla SP, Vela AI, Carrasco L, Fernández-Garayzábal JF, Astorga RJ, Luque I. Multi-Etiological Nature of Tuberculosis-Like Lesions in Condemned Pigs at the Slaughterhouse. *PLoS One* (2015) 10:e0139130. doi:10.1371/journal.pone.0139130

34. Menin Á, Fleith R, Reck C, Marlow M, Fernandes P, Pilati C, Báfica A. Asymptomatic Cattle Naturally Infected with *Mycobacterium bovis* Present Exacerbated Tissue Pathology and Bacterial Dissemination. *PLoS One* (2013) 8:e53884. doi:10.1371/journal.pone.0053884



## Estudio II.

### Optimization of real-time PCR protocols from lymph node bovine tissue for direct detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex

Eduardo Vera-Salmoral, Jaime Gómez-Laguna, Ángela Galán-Relaño, Inés Ruedas-Torres, Librado Carrasco, Inmaculada Luque, Belén Huerta, José María Sánchez-Carvajal

Publicado en *Microbiology Spectrum*, 2023

**Objetivo 1:** Optimizar y comparar protocolos de extracción de ADN, utilizando muestras frescas de diferentes nódulos linfáticos, a fin de seleccionar el método de extracción y las muestras que ofrecen mayor validez analítica y diagnóstica

**Objetivo 2:** Determinar la validez diagnóstica de la PCR a tiempo real para la detección del complejo *Mycobacterium tuberculosis* en muestras frescas de nódulos linfáticos de bovino, con distintas dianas (IS6110, mpb70 e IS4).

**Objetivo 3.** Estimar la utilidad diagnóstica de la PCR a tiempo real en función de la prevalencia de la enfermedad en la población de estudio y los resultados obtenidos previamente en la intradermotuberculinización y la inspección macroscópica (probabilidad pre-test).





**Optimization of real-time PCR protocols from lymph node bovine tissue for direct detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex**

Eduardo Vera-Salmoral<sup>a,b</sup>, Jaime Gómez-Laguna<sup>a</sup>, Ángela Galán-Relaño<sup>b</sup>, Inés Ruedas-Torres<sup>a</sup>, Librado Carrasco<sup>a</sup>, Inmaculada Luque<sup>b</sup>, Belén Huerta<sup>b</sup>, José María Sánchez-Carvajal<sup>a,c</sup>

<sup>a</sup> Department of Anatomy and Comparative Pathology and Toxicology, Pathology and Immunology Group (UCO-PIG), UIC Zoonosis y Enfermedades Emergentes ENZOEM, University of Córdoba, International Excellence Agrifood Campus 'CeIA3', 14014 Córdoba, Spain

<sup>b</sup> Department of Animal Health, UIC Zoonosis y Enfermedades Emergentes ENZOEM, University of Córdoba, International Excellence Agrifood Campus 'CeIA3', University of Córdoba, 14014, Córdoba, Spain

<sup>c</sup> Institute of Virology and Immunology IVI, Sensemattstrasse 293, 3147 Mittelhäusern, Switzerland

**Abstract**

Bovine tuberculosis (bTB) is a zoonotic disease and a global health problem that is subjected to obligatory eradication programs in the European Union. Microbiological culture is an imperfect technique for bTB diagnosis. This study aims to compare and validate two DNA isolation protocols and three different specific DNA targets IS6110, IS4 and mpb70, to confirm *Mycobacterium tuberculosis* complex (MTC) infection by real-time PCR directly from fresh tissue samples. Fresh lymph node samples were collected from 81 cattle carcasses at the slaughterhouse. A comparison of both extraction protocols was performed with IS6110-real-time PCR showing an adjusted sensitivity (SE) of 78.34% and 95.9% for protocols 1 and 2, respectively, while the specificity (SP) was 100% in both cases. Afterward, the comparison between IS4 and mpb70 targets was performed from the samples extracted with protocol 2, obtaining an adjusted SE of 90.87% and 83.3%, respectively, and an SP of 100% in both cases. Positive likelihood ratio was  $\infty$  for the three targets, and negative likelihood ratio was 0.04, 0.091, and 0.16 for IS6110, IS4 and mpb70 respectively. Negative predictive values were  $\geq 90\%$ ,  $\geq 85\%$  and  $\geq 80\%$  for real-time PCR targeting IS6110, IS4 and mpb70, respectively when the true prevalence is  $\leq 60\%$ , and the positive predictive value is 100% in any scenario of true prevalence. According to these results, the DNA extraction protocol 2 and real-time PCR targeting- IS6110 or IS4 could be potential first-choices molecular assays to detect MTC directly in fresh bovine tissue samples.

**Keywords:** direct real-time PCR, extraction protocol, fresh tissue, IS6110, IS4, mpb70, bovine tuberculosis.

### 1. Introduction

Bovine tuberculosis (bTB) is a chronic infectious and zoonotic disease caused by mainly *Mycobacterium bovis* and *M. caprae*, but also other members of *Mycobacterium tuberculosis* complex (MTC) (Domingo et al., 2014; Casal et al., 2017). bTB is considered to be a neglected disease of global importance causing a detrimental impact on public health, particularly in developing countries where tuberculosis is likely to remain a major health problem (Dean et al., 2018). In the European Union, bTB is subjected to obligatory eradications programs based on the detection of the cellular immune response by single or comparative intradermal tuberculin testing (SIT or SCIT), gamma interferon test, and surveillance in slaughterhouse of the presence of tuberculosis like-lesions (TBL), characterised by granulomatous lesions (Commission Delegated Regulation (UE) 2020/689). Even though enormous sums of public fundings are mobilized to ensure efficient surveillance systems and control programs, currently, there are territories struggling to eradicate bTB at the herd-level in several European countries where debate around the efficacy of these measures is an ongoing matter of concern. Thus, the failure to eradicate the disease could be explained by a combination of factors though, a poor diagnostic performance is likely to be one of the most relevant since many truly infected animals will be misclassified as bTB free. In the case of cattle, the main reservoir of MTC, these misclassified infected animals will not only be contributing to keep the chain of infection in the farm but also sharing pasture areas with other domestic and wild animals, which are likely to play a key role as reservoir as well, hindering the success of bTB eradication programs.

Nowadays, selective microbiological culture is considered the gold standard technique for bTB diagnosis with recovery rates ranging from 30% to 95% (Courcoul et al., 2014). Nevertheless, it has been proved that microbiological culture is also an imperfect technique, with sensitivity (SE) and specificity (SP) values of 78.10% (72.90–82.80%) and 99.10% (97.10–100.0%), respectively (Courcoul et al., 2014). In addition, this technique requires high biosecurity facilities, the technicians should hold a relatively high expertise, and every bacterial growth needs to be confirmed by PCR (Corner et al., 2012; Courcoul et al., 2014). Another point to take into consideration is the extremely slow growth of the members of MTC requiring long incubation periods of up to 12 weeks (WOAH, 2018a), which delays the turnaround time to get a confirmatory result. Because of these weaknesses, it would be necessary to develop rapid, cost-effective, and accurate diagnostic tools, particularly in the

current framework of European bTB surveillance and control program where macroscopic lesion disclosed at the slaughterhouse and prevalence have been decreasing over the last years.

Accordingly, real-time PCR assay has been reported to be a rapid and accurate diagnostic tool, resulting in a potential first-line assay for a speedy and direct detection of MTC in fresh bovine tissue samples (Lorente-Leal et al., 2021; Sánchez-Carvajal et al., 2020). DNA isolation protocol is a crucial first step in the real-time PCR pipeline determining the amount and quality of isolated DNA. In the case of MTC, it is important to underline several intrinsic limitations and/or factors challenging to run a direct detection of MTC, such as a robust cell envelope, the paubacillary nature of this complex, or the extensive necrosis, fibrosis, and mineralization associated with TBLs (Liebana et al., 2008; Taylor et al., 2007; Liebana et al., 1995; Radomski et al., 2013). In addition, some inhibitors including an excess of host DNA and organic compounds, can also play an important role impairing the performance of real-time PCR. These inhibitors could be stayed or already brought in the sample accidentally during DNA extraction performance. These limiting factors could have a negative impact on the yield and quality of isolated DNA, and consequently, the success of real-time PCR leading to false-negative results.

Likewise, DNA regions selected as PCR-target could be a key player to the success of the PCR in diagnosis. Consequently, IS6110 sequence, which is found in multiple copies in pathogens belonging to MTC, is commonly used for PCR detection of MTC (Thacker et al., 2011; Costa et al., 2013; Courcoul et al., 2014; Barandiaran et al., 2019). Nevertheless, a cross-reactivity with certain primer pairs or probes has been previously reported (Lorente-Leal et al., 2019). Besides IS6110, other targets have also been used for the same purpose with differing SE and SP results, including IS1081 (Taylor et al., 2007; Pucken et al., 2017), DevR (Hallur et al., 2013), Ku gene (Zhou et al., 2019), mpb83 (Charlet et al., 2005), hupB (Algammal et al., 2019; Mishra et al., 2005), 16S-23S rRNA internally transcribed spacer (Parra et al., 2008), p34 gene (Cardoso-Toset et al., 2015), TbD1 (Araújo et al., 2014), or IS4 (Wang et al., 2019) and mpb70 (Lorente-Leal et al., 2019) more recently.

According to these issues, not only IS6110 but also, mpb70, a gene encoding a highly specific and immunogenic protein conserved in all members of the MTC (Harboe et al., 1990), and the insertion sequence IS4, a 141-base pair (bp) reported as one of the most highly conserved regions found in IS6110 (Wang et al., 2019), represent potential DNA targets for MTC diagnosis by using real-time PCR in fresh tissue samples. Consequently, the goal of the present study was, first, to optimize and compare the performance of two DNA extraction

protocols for MTC detection by real-time PCR using bovine fresh lymph nodes as input samples and, second, to evaluate and validate a real-time PCR targeting IS6110, mpb70, IS4 and/or a combination of these specific regions in comparison with microbiological culture in bTB eradication programs.

## **2. Materials and methods**

### **2.1. Samples selection and processing**

This study was part of a larger project focused on improving rapid and accurate diagnostic tools in the framework of bTB surveillance and control program in Spain. In brief, fresh lymph node (LN) tissue samples were collected from cattle carcasses at the slaughterhouse from 2018 to 2019 in the context of Spanish bTB eradication programme. All samples were collected during routine post-mortem veterinary examination within an official context and according with national and European regulations. No purpose killing of animals was performed for this study, so no ethical or farmer's consent approval was required.

In order to perform this study, LN fresh tissue samples were collected from 81 animals, verifying the presence of either visible TBLs or non-visible lesions (NVLs). Individual homogenization of each LN was run using a tissue homogenizer (Fisherbrand, Fisher Scientific, Madrid, Spain) to obtain a uniform mixture. Tissue homogenate was split up in paired samples that were used for DNA isolation and selective microbiological culture, respectively.

### **2.2. Mycobacterium tuberculosis complex microbiological culture**

The samples were analysed by the reference technique, microbiological culture, followed by PCR confirmation according to the previously described protocol (Corner & Trajstman, 1988). Briefly, the homogenate was decontaminated with an equal volume of 0.75% (w/v: 1/1) hexadecyl pyridinium chloride solution in agitation for 30 min. Samples were centrifuged for 30 min at 1,500 g (Corner & Trajstman, 1988). The pellets were collected with swabs and cultured in liquid media (MGITTM 960, Becton Dickinson, Madrid, Spain) using an automatized BD BacterTM MGITTM System (Becton Dickinson). The culture was considered positive when colonies were confirmed as MTC by real-time PCR (Thierry et al., 1990).

### **2.3. Optimization of DNA extraction protocols from homogenized fresh tissue lymph nodes**

#### *DNA extracting using a commercial kit (Protocol 1)*

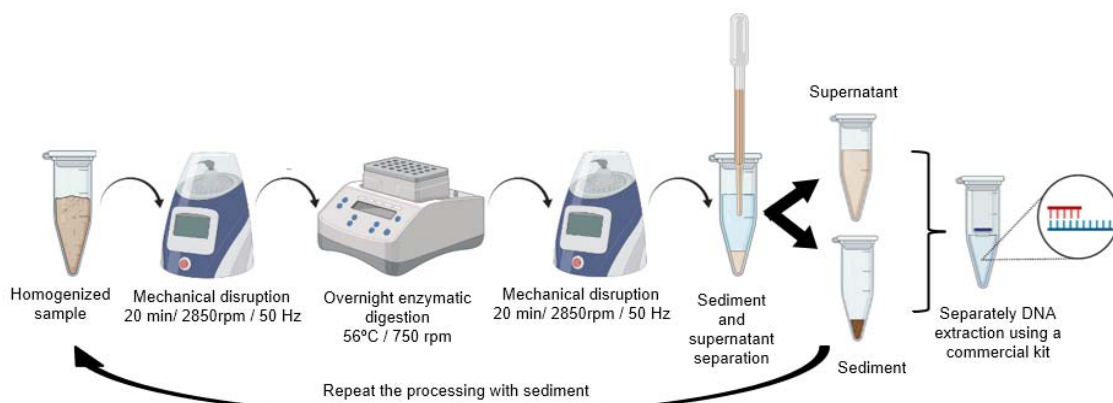
DNA extracting using a commercial kit (Protocol 1) from homogenized tissue samples was conducted by using DNA Extract VK (Vacunek, Bizkaia, Spain) according to the manufacturer's

guidelines with several modifications. Briefly, a mix of 300 mg of homogenized tissue was submitted to mechanical disruption (30 Hz/20 min) together with 250 µl of sterile distilled water, 250 µl of sample lysis buffer VK-SB and 300 mg of 0.5-mm glass beads. After that, tissue samples were centrifuged, the supernatant was discarded, and the sediment was subjected to an enzymatic digestion with proteinase K at 56 °C in a thermo-shaker (750 rpm/12 h). Next, lysis buffer VK-LB3 was added, and the mixture was incubated for 10 min at 70 °C. Finally, 210 µl ethanol (96-100%) was added to the sample and it was applied in a spin column following the manufacturer's guidelines.

*Mechanical lysis, proteinase K digestion and DNA extraction using a commercial kit (Protocol 2)*

In the case of protocol 2, which consist on mechanical lysis, proteinase K digestion and DNA extraction using a commercial kit (figure 14), was performed according to Lorente-Leal et al. (2019) with several modifications, by using NucleoSpin Tissue Kit® (Macherey-Nagel, Düren, Germany). In brief, 1 mL of homogenized tissue (1,000 mg) was centrifuged during 5 min at 9,000 g. The resulting tissue pellet was transferred into a tube together with 250 µl of sample buffer T1 and 150 mg of 0.5-mm and 50 mg of 0.1-mm glass beads. Then, samples were subjected to mechanical disruption using Scientific Industries SI™ Disruptor Genie™ (2,850 rpm/50 Hz/20 min). After an overnight enzymatic digestion at 56 °C with 30 µl proteinase K in a thermo-shaker (750 rpm/12 h), a new mechanical disruption step was conducted. Samples were centrifuged 2 min at 9,000 g, and then, the supernatant was transferred to a new tube, preserved to be processed afterwards, while sediments were treated again with a new cycle of mechanical disruption and enzymatic digestion according to the steps of DNA extraction performed as outlined above in this protocol 2.

**Figure 14.** Graphical representation of the flow chart of the protocol 2



Then, both the sediment and supernatant of each sample were processed independently, mixed with 200 µl of Buffer T3, incubating the mixture for 10 min at 70 °C. The lysate was transferred to a silica-based nucleic acid purification column and managed according to manufacturer's instructions. Positive and negative extraction controls were included for both protocol 1 and 2. All DNA extraction products were stored at - 20 °C until use.

#### 2.4. Optimization of real-time PCR from fresh tissue samples

Specific primers and probes targeting IS6110, IS4 and mpb70 were used for this study. Specific primers IS6110-forward: 5'-GGTAGCAGACCTCACCTATGTGT-3'; IS6110-reverse: 5'-AGGCGTCGGTGACAAAGG-3' and probe (IS6110-probe: 5'-FAM-CACGTAGGCGAACCC-MGBNFQ-3') were selected from previous studies (Michelet et al., 2018; Lorente-Leal et al., 2021). These oligonucleotides target a 68 bp region of the transposon IS6110, specific for MTC pathogens. For IS4, the following primers, IS4-forward: 5'-CTCGACCTGAAAGACGTTATCC-3'; and IS4-reverse: 3'-CTCGGCTAGTGCATTGTCATA-5'; and the probe (IS4-probe: 5'-AGTACACAT/ZEN/CGATCCGGTCAAGCG-3); targeting a 141 bp highly conserved region in the transposon IS6110 were used (Wang et al., 2019). For mpb70, the following oligonucleotides, previously reported by Lorente-Leal et al. (2019), targeting a 133 bp region of the mpb70 gene, which encodes one of the most specific and immunogenic protein conserved in all members of the MTC (Harboe et al., 1990), were used: mpb70-forward: 5'-CTCAATCCGCAAGTAAACC-3'; mpb70-reverse: 5'-TCAGCAGTGACGAATTGG-3'), and the probe (mpb70-probe: 5'-FAM-CTCAACAGCGGTCAGTACACGGT-BHQ1-3').

QuantiFast® Pathogen PCR + IC Kit (Qiagen, Hilden, Germany) was used to conduct the real-time PCR evaluating each sample in duplicate in the MyiQ™2 Two-Color real-time PCR Detection System (Bio-Rad, Hercules, Ca, USA) under the following cycling conditions: 95 °C for 5 min to activate the DNA polymerase followed by 42 amplification cycles that consisted of a denaturation step at 95 °C for 15 s, an annealing-extension step at 60 °C for 30 s. Moreover, as the manufacturer's guidelines described, an exogenous inhibition heterologous control [internal control assay (IAC)] was included to evaluate the presence of certain inhibitors on the samples. The setup for 10 µl of reaction volume was 4 µl of ultrapure distilled water, 1 µl of sample, 2 µl of Quantifast pathogen master mix, 1 µl of internal control assay (IAC), 1 µl of internal control DNA, and for IS6110, 0.4 µl of forward (10 pmol/µl), 0.4 µl of reverse (10 pmol/µl), and 0.2 µl of probe (10 pmol/µl), or for IS4 and mpb70, 0.6 µl of forward (10 pmol/µl), 0.3 µl of reverse (10 pmol/µl), and 0.1 µl of probe (10 pmol/µl). The IAC Ct should range between 30 ± 3.

Complete inhibition of amplification was considered when IAC did not amplify, and partial inhibition of amplification when it shows a Ct > 33. When inhibition was detected, the samples were diluted 1:2, and the real-time PCR was run again. An inter-run calibrator with a known Ct value of 32.0 was introduced in each assay to self-control intra-assay repeatably and accuracy. In the case of culture-positive and real-time PCR-negative samples, Ct value > 38, DNA extraction and real-time PCR were repeated to verify the results. In the case of the protocol 2, for every sample PCR was firstly conducted from the DNA extraction obtained from the sediment. When a negative result was obtained, amplification was carried out using the DNA isolated from the supernatant as template.

### **2.5. Limit of detection**

The analytical sensitivity or limit of detection (LOD) was estimated for the proposed primers and probes. LOD is defined as the lowest concentration in which 95% of replicates are positives, according to the Clinical and Laboratory Standard Institute guidelines. A serial 10-fold dilution series of *M. bovis* genomic DNA with known quantities ranging from 10<sup>6</sup> to 10<sup>0</sup> were used. The reactions were performed in triplicate for each dilution in three different assays.

### **2.6. Statistical analysis**

The performance of both DNA extraction protocols and real-time PCR targeting IS6110, IS4, and mpb70 were evaluated by comparing them with microbiological culture, which is considered an imperfect reference technique for bTB diagnosis (Corner et al., 2012; Courcoul et al., 2014; Pucken et al., 2017). Using statistical Epidat 3.1 software (Galician Health Service, Spain) it was estimated the adjusted SE and SP, false positives rate (FPR), and false negative rate (FNR). In addition, positive and negative likelihood ratio (PLR and NLR) results were determined and interpreted following the criteria published below by Sackett et al. (2001): (I)  $PLR \geq 10$  or  $NLR \leq 0.1$ , technique of high diagnostic value that will normally allow discrimination between healthy and diseased animals; (II)  $PLR = 5-10$  or  $NLR = 0.1-0.2$ , technique involving moderate changes in probability and whose diagnostic utility will depend on prevalence; (III)  $PLR = 2-5$  or  $NLR = 0.2-0.5$ , technique involving small changes in probability and whose diagnostic utility will depend on prior probability; and, (IV)  $PLR = 1-2$  and  $NLR \leq 0.5$ , rarely discernible changes. Positive and negative predictive values (PPV and NPV) for different infection prevalence were subsequently estimated using a Bayesian approach (EPIDAT 3.1, Galician health service, Spain). Results were plotted using GraphPad Prism 9 (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA).

The SE and SP for each DNA extraction protocol and each real-time PCR target, IS6110, IS4 or mpb70, the confidence interval (95%) and the McNemar’s chi-squared test for correlated proportions in subgroups of MTC-infected and non-infected animals (H0 = equal detection proportion, P value below 0.05) (Trajman & Luiz, 2008) (IBM SPSS Statistics versión 28.0.1.1, IBM Corp.) were calculated. Finally, agreement between microbiological culture and real-time PCR targeting IS6110, IS4 or mpb70 was assessed using Cohen’s kappa coefficient ( $\kappa$ ):  $\kappa = 0$  indicated no agreement;  $0.01 \leq \kappa \leq 0.20$ , slight agreement;  $0.21 \leq \kappa \leq 0.40$ , fair agreement;  $0.41 \leq \kappa \leq 0.60$ , moderate agreement;  $0.61 \leq \kappa \leq 0.80$ , substantial agreement; and,  $0.81 \leq \kappa \leq 1.00$ , almost perfect agreement (Mchugh, 2012) (WinEpi software 2.0, Faculty of Veterinary Medicine, University of Zaragoza, Spain).

### 3. Results

#### 3.1. Mycobacterium tuberculosis complex microbiological culture results

Results of MTC microbiological culture were used as the reference assay for comparing extraction protocols 1 and 2 (Table 11).

**Table 11.** Description of the obtained results by microbiological culture, real-time PCR-IS6110 (protocol 1 and 2), IS4 and mpb70 in relation to the presence of tuberculosis-like lesions.

Overall comparison in relation to the presence or absence of tuberculosis-like lesion (TBL)										
	Microbiological culture		IS6110 (protocol 1)		IS6110 (protocol 2)		IS4		mpb70	
	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-
TBL	14	2	16	0	16	0	16	0	15	1
NVL	26	39	17	48	29	36	27	38	24	41
<b>Total</b>	<b>40</b>	<b>41</b>	<b>33</b>	<b>48</b>	<b>45</b>	<b>36</b>	<b>43</b>	<b>38</b>	<b>39</b>	<b>42</b>

+, Positive; -, Negative; TBLs, tuberculosis-like lesions; NVLs, non-visible lesions.

Consequently, a sample was considered as culture-positive sample when an obtained colony from grown culture was confirmed by real-time PCR-IS6110. Thus, 49.38% of animals (n = 81) were disclosed as culture-positive (n = 40), whereas 50.62% were tested as culture-



negative (n = 41). Besides, in order to disclose TBL, every LN was subjected to a gross evaluation revealing 19.75% of animals with TBLs (n = 16), with 87.50% of them being culture-positive (n = 14).

### **3.2. Optimization of DNA extraction protocols from homogenized fresh tissue lymph nodes by using IS6110 target.**

DNA isolation protocol is a critical first step in the real-time PCR pipeline. In order to identify a DNA extraction method that yields suitable genomic DNA in terms of quality and amount, we tested two different DNA extraction protocols. The performance of both extraction protocols was evaluated running a real-time PCR targeting IS6110, as previously described by our laboratory, with LOD ranges from 10 to 100 genomic equivalents, and the cut-off set at Ct <38.

#### *MTC real-time PCR-IS6110 results according to DNA extraction by protocol 1*

Eighty-one animals were evaluated by protocol 1, with Ct values ranging from 24.60 to 37.50 (average = 30.20) after real-time PCR-IS6110 (Table 11). Thus, 40.74% of animals were tested as MTC-positive (n = 33) and 59.26% tested as MTC-negative (n = 48). The IAC amplified in most of the samples without partial inhibition, but when a complete inhibition was observed because of a high yield of DNA (over 1,000 ng/μl), samples (n = 6) were diluted up to a final concentration of 450 ng/μl and re-evaluated by real-time PCR keeping a negative result for MTC but with IAC amplification. Taking into consideration TBLs, 100% of LN samples with TBLs that were evaluated by protocol 1 were tested as MTC positive (n = 16 animals) by real-time PCR-IS6110 (Table 11).

#### *MTC real-time PCR-IS6110 results according to DNA extraction by protocol 2*

In the case of extraction protocol 2, 55.56% of all analysed animals were tested as MTC-positive (n = 45) and 44.44% tested as MTC-negative (n = 36) (Table 11). Whereas 86.67% MTC-positive samples (n = 39) came from the sediment, 13.30% MTC-positive samples (n = 6) were finally detected from the supernatant, after obtaining negative or inconclusive results from the sediment (data not shown). The Ct values ranged from 21.00 to 37.50 (average = 32.91) for sediments, and, from 27.00 to 37.00 (average = 32.67) in the case of supernatants. Although the IAC amplification was observed in most of the samples, several partial (n = 10) or complete inhibitions (n = 14) were found. Then, samples were diluted 1:2 and re-evaluated by real-time PCR. Five samples were detected as positive, and the remainder kept negative results for MTC but with IAC amplification. All the samples with TBLs, that were evaluated by protocol 2, were tested as MTC positive (n = 16 animals) by real-time PCR-IS6110 (Table 11).

*DNA extraction protocols 1 and 2: Validation and comparison*

Taking into consideration that microbiological culture is considered an imperfect assay for performing bTB diagnosis (Corner et al., 2012; Courcoul et al., 2014; Pucken et al., 2017), the diagnostic performance results, summarized in Table 12, were calculated for an imperfect gold standard using EPIDAT 3.1 software. In the case of DNA extraction protocol 1, thirty-one out of 40 animals positive to microbiological culture were also classified as MTC-positive by real-time PCR-IS6110 [adjusted SE = 78% (95% CI: 65-91%)], while 39 out of 41 culture-negative animals resulted to be negative by real-time PCR-IS6110 [adjusted SP = 100% (95% CI: 100%)], with an adjusted FNR and FPR of 21.70% (95% CI: 9-35%) and 0% (95% CI: 0%), respectively. In base of the positive and negative likelihood ratios (PLR=  $\infty$ , and NLR = 0.22) (Table 12), the protocol 1 would have a high diagnostic value for the positive results, normally allowing discrimination between healthy and diseased animals, while the diagnostic utility of negative results would be dependent on the prior probability of TB in the area. The agreement with microbiological culture was substantial ( $\kappa = 0.72$ ).

**Table 12.** Diagnostic performance summary of real-time PCR-IS6110 by comparing with microbiological culture assay under two different extraction protocols, 1 or 2. Estimates were calculated for an imperfect gold standard assay using EPIDAT 3.1 software (Software for Epidemiologic Analysis of Tabulated Data).

Diagnostic accuracy (95% CI)						
	Sensitivity	Specificity	FPR	FNR	PLR	NLR
IS6110 (Extraction protocol 1)	78.30% (65.40%- 91.20%)	100% (100%)	0% (0%)	21.70% (8.80- 34.60%)	$\infty$	0.22
IS6110 (Extraction protocol 2)	95.90% (89.70%- 100%)	100% (100%)	0% (0%)	4.10% (0- 10.30%)	$\infty$	0.04

FPR: False positive ratio; FNR: False negative ratio; PLR: Positive likelihood ratio; NLR: Negative likelihood ratio; 95% CI: 95% confidence interval.

By contrast, in the case of DNA extraction protocol 2, 38 out of the 40 animals positive to culture were classified as MTC-positive [adjusted SE 96% (95% CI: 90-100%)], while 34 of 41

culture-negative animals were classified as MTC-negative [adjusted SP = 100% (95% CI: 100%)]. It is important to mention that 7 animals negative to culture were disclosed as positive (2 out of 7 confirmed to present TBLs), while we found 2 culture-positive samples without TBLs but PCR-IS6110-negative. Consequently, the adjusted FNR of 4% (95% CI: 0-10%) and FPR of 0% (95% CI: 0%) were estimated (see Table 12). According with the values estimated for LR (PLR > 10 and NLR = 0.04), this protocol demonstrated a high diagnostic utility to confirm and discard bTB regardless of the true prevalence. The agreement with microbiological culture was substantial ( $\kappa = 0.77$ ).

Mcnemar test was used to compare both protocols finding a statistically significant difference ( $P = 0.016$ ) between the number of culture-positive animals detected using DNA extraction protocol 2 compared with protocol 1. No differences were found for culture-negative animal between both protocols.

### **3.3. Validation and diagnostic performance of real-time PCR targeting IS4 and mpb70**

According with these results, DNA from samples processed by protocol 2 were further analysed by real-time PCR targeting IS4 or mpb70, comparing these results with microbiological culture to validate these targets for MTC detection by real-time PCR from fresh cattle tissue samples.

#### *Real-time PCR targeting IS4*

Forty-three out of 81 animals (53.10%) were disclosed as positive by real-time PCR-IS4 and 38 were tested as MTC-negative (46.90%). All the samples with TBLs ( $n = 16$  animals) were tested as PCR-IS4-positive (Table 12). The analysis from the sediment disclosed 86.05% of MTC-positive samples ( $n = 37$ ) while 13.95% of MTC-positive samples ( $n = 6$ ) yielded a positive result from the supernatant. The Ct values were ranging from 22.96 to 38.10 (average = 32.06) for the sediment, and, in the case of the supernatant, Ct values ranged from 26.00 to 37.00 (average = 32.87). A partial inhibition of IAC was found in 5 out of 81 samples, probably due to the presence of some inhibitors, with 2 out of 5 samples disclosing a positive result after dilution 1:2 and re-evaluation. The LOD for this real-time PCR-IS4 ranged from 50 to 100 genomic equivalents, and the cut-off was established at  $Ct < 39$ .

Comparing with the microbiological culture as the reference assay, 36 out of 40 animals positive to culture were also found to be positive to real-time PCR-IS4 [SE adjusted 91% (95% CI: 82.00 -99.80%)], and 34 out of 41 culture-negative animals were also tested as real-time PCR-IS4-negative [SP adjusted = 100% (95% CI: 100%)]. Noteworthy, 7 culture-negative animals but

PCR-IS6110-positive were disclosed also as positive by real-time PCR targeting IS4. According to these results, the protocol would have an adjusted FNR of 9% (95% CI: 0.20-18.00%) and an adjusted FPR of 0% (95 CI: 0%). Regardless of the true prevalence, real-time PCR-IS4 were found to have a high diagnostic utility to confirm and discard MTC (PLR > 10 and NLR of 0.09) (Table 13), with similar values than real-time PCR-IS6110. The concordance with microbiological culture ( $\kappa = 0.72$ ) was substantial.

**Table 13.** Diagnostic performance summary of real-time PCR-IS6110, IS4 and mpb70 comparing with reference microbiological culture assay (imperfect gold standard assay) under the same cycling conditions. Estimates were calculated for imperfect gold standard using EPIDAT 3.1 software (Software for Epidemiologic Analysis of Tabulated Data). FPR: False positive ratio; FNR: False negative ratio; PLR: Positive likelihood ratio; NLR: Negative likelihood ratio; 95% CI: 95% confidence interval.

Diagnostic accuracy (95% CI)						
Target	Sensitivity	Specificity	FPR	FNR	PLR	NLR
IS6110	95.90% (89.70%-100%)	100% (100%)	0% (0%)	4.10% (0-10.30%)	$\infty$	0.04
IS4	91% (82.0-99.80%)	100% (100%)	0% (0%)	9.10% (0.20-18.0%)	$\infty$	0.091
mpb70	83.30% (71.60-95.0%)	100% (100%)	0% (0%)	16.70% (5.0-28.4%)	$\infty$	0.16

FPR: False positive ratio; FNR: False negative ratio; PLR: Positive likelihood ratio; NLR: Negative likelihood ratio; 95% CI: 95% confidence interval.

*Real-time PCR targeting mpb70*

In the case of real-time PCR-mpb70, thirty-nine of 81 tested animals were detected as MTC-positive (48.14%) and 42 as negative (51.86%). Thus, thirty-five samples positive to real-time PCR-mpb70 (89.74%) were disclosed from the sediment and 4 from the supernatant (10.25%). Besides, 100% of lymph nodes with TBLs (n = 16 animals), were tested to be PCR-mpb70 positive (Table 12). The Ct values ranged from 21.83 to 36.80 (average = 31.5) for the sediment and from 27.90 to 35.0 (average = 30.36) for the supernatant. As above mentioned for the other targets, because of some inhibitors, amplifications were found to be partially inhibited in 5 out of 81 samples, which were diluted 1:2 and re-evaluated allowing the detection of 3 inhibited samples as positive. The LOD for real-time PCR-mpb70 was determined to be lower than 100 genome equivalents, and the cut-off was set to a Ct < 38.

The real-time PCR targeting mpb70 detected 33 out of 40 culture positive animals [SE adjusted 83.30% (95% CI: 71.60-95.00%)], and 35 out of 41 culture negative animals resulted to be mpb70-negative [SP adjusted = 100% (95% CI: 100%)]. Of note, 6 out of the 7 culture negative animals but positive to IS6110 and IS4 targets were also classified as MTC positive by real-time PCR targeting mpb70. Thus, an adjusted FNR of 16.70% (95% CI: 5.00-28.40%) and FPR of 0% (95% CI: 0%) were estimated (see Table 13). The PLR value (PLR = ∞) implies a high diagnostic value for the positive results discriminating between MTC-infected and uninfected animals, however, the NLR value was 0.16 meaning that the true prevalence (TP) of the area could impact on the diagnostic utility of negative results for this assay (Table 13).

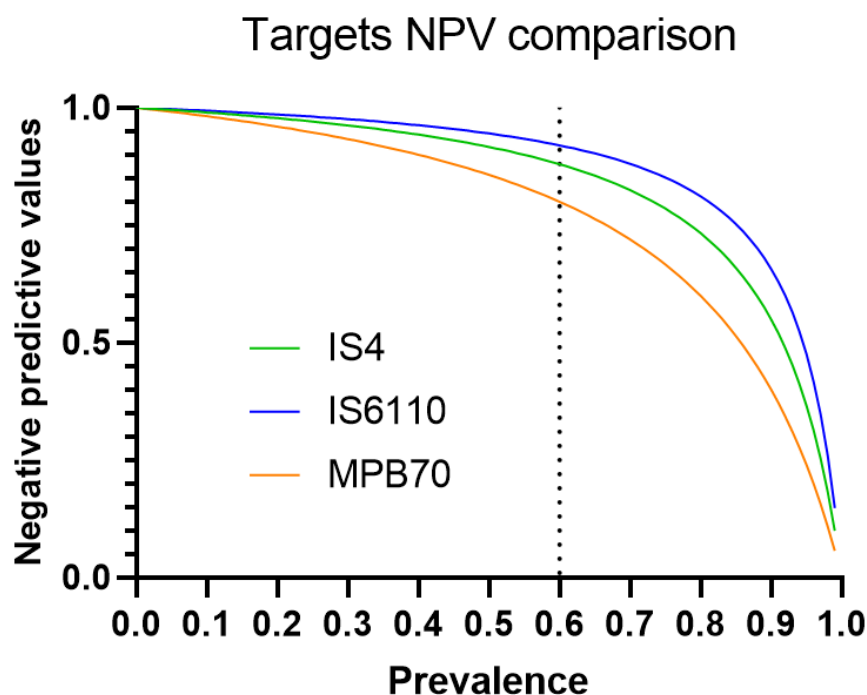
### 3.4. Comparison between real-time PCR targets to detect MTC

In order to statistically evaluate the differences observed in the SE and SP of the real-time PCR depending on the DNA target, 95% CI and correlated proportions McNemar's test were estimated (Table 14). No significant differences were found between DNA targets ( $P > 0.05$ ). Cohen's kappa coefficient ( $\kappa$ ) showed an almost perfect agreement between all the targets (data not shown): IS6110 - IS4 ( $\kappa = 0.95$ ), IS6110 - mpb70 ( $\kappa = 0.90$ ) and IS4 - mpb70 ( $\kappa = 0.93$ ).

**Table 14.** McNemar test. Pairwise frequencies of real-time PCR results for IS6110, IS4 and mpb70 in 81 animals according to microbiological culture results (positive n = 40 and negative n = 41).

		IS4				Mpb70				IS4			
		IS6110	+	-	McNemar	IS6110	+	-	McNemar	Mpb70	+	-	McNemar
Microbiological culture	Positive (n=40)	+	36	2	0.5	+	33	5	0.1	+	33	0	0.25
		-	0	2		-	0	2		-	3	4	
	Negative (=41)	+	7	0	1.0	+	6	1	1.0	+	6	0	1.0
		-	0	34		-	0	34		-	1	34	

In addition, the diagnostic utility of the positive and negative results obtained with each probe were compared based on true prevalence (predictive values). When the true prevalence (TP) ranging from 0 to 60% (Figure 15), a NPV for real-time PCR targeting IS6110 is  $\geq 90\%$ , NPV  $\geq 85\%$  for IS4, NPV  $\geq 80\%$  for mpb70. According to PPV (100%), the real-time PCR targeting IS6110, IS4 and mpb70 are able to confirm bTB infection in any scenario of true prevalence.



**Figure 15.** Graphical representation of the estimated negative predictive value (NPV) based on the validity of the real-time PCR targeting IS6110 (blue line), IS4 (green line) and mpb70 (orange line) and the true prevalence of bTB.

#### 4. Discussion

bTB is one of the most relevant animal diseases worldwide, and, hence, a major concern for public health. Even though the eradication is the main goal for the UE, this neglected zoonosis is still present in dairy and cattle herds, especially in several European regions. Nowadays, the approved surveillance systems, which are mainly based on cellular immune reaction, have facilitated the diagnosis of infected cattle at the early stage of the disease, therefore, animals with clinical signs or gross post-mortem TBLs are lack or rarely found at the slaughterhouse (Ramos et al., 2015; Pozo et al., 2021). This success of surveillance systems has challenged the direct detection of MTC or its DNA using microbiological culture and/or PCR since *in-vivo* immune response have to be confirmed post-mortem (MAPA, 2022). The selective microbiological culture is the gold standard technique for confirm bTB diagnosis, although is considered an imperfect assay (Corner et al., 2012; Courcoul et al., 2014; Pucken et al., 2017). Therefore, development and validation of sensitive and specific real-time PCR protocols, including sample processing and DNA extraction steps, as an alternative to microbiological culture, is likely to pave the way to bTB diagnosis. The present study aimed to evaluate two different DNA isolation protocols and three different specific DNA targets IS6110, IS4 and mpb70, to confirm MTC infection by real-time PCR directly from fresh LN tissue samples.

DNA isolation is an essential step in the real-time PCR pipeline, therefore there are no standardized protocols to isolate mycobacterial DNA from fresh post-mortem samples, and different approaches can be found among studies (Parra et al., 2008; Araujo et al., 2014; Courcoul et al., 2014; Fell et al., 2016; Lorente-Leal et al., 2019). Mycobacteria belonging to MTC have some distinctive features that could potentially hinder diagnostic performance, including the characteristics of MTC cell wall, a non-homogeneous distribution and intracellular location of MTC-bacillus, the well-known paucibacillary nature of this complex and early infected-animals with NVLs at the slaughterhouse (Liebana et al., 1995; Taylor et al., 2007; Liebana et al., 2008; Radomski et al., 2013). In order to solve these issues, a novel DNA extraction protocol (protocol 2) was compared with a traditional one (protocol 1) and microbiological culture, revealing promising results with the real-time PCR-IS6110. To do so, protocol 2 used a larger amount of tissue sample (300 mg for protocol 1 vs 1,000 mg for protocol 2), as well as additional mechanical disruption and enzymatic digestion steps. Accordingly, protocol 2 disclosed 38 out of 40 culture-positive (95%) and 7 culture-negative samples (2 out of 7 showed TBLs) as PCR-IS6110-positive. Furthermore, several animals with a negative result to protocol 1, turned out to be positive (n=12) when protocol 2 was performed. Consequently, and according to the literature (Fell et al., 2016; Lorente-Leal et al., 2019), these results point out that the use of small amount of tissue sample seems to decrease the chances to target mycobacterial DNA leading to false negative results, particularly in the case of infected animals with NVL.

Secondly, the incubation time before conducting the mechanical lysis step and the kind of disruption procedure have been reported to potentially impact on downstream real-time PCR application after DNA isolation reducing the number of discording results (Park et al., 2014; Fell et al., 2016; Lorente-Leal et al., 2019). Therefore, real-time PCR-IS6110 showed higher diagnostic efficiency in our study after conducting protocol 2 than protocol 1 because tissue samples were submitted to a more intense lysis during DNA extraction process, including four mechanical disruptions and two overnight chemical lysis steps with proteinase K. In addition, protocol 2 allows analysing both the sediment and the supernatant increasing the diagnostic sensitivity of the technique. As a result, in our study, 39 animals were detected as positive from the sediment samples, and the re-analysis of negative and inconclusive samples allowed detecting 6 additional PCR-positive animals from the supernatant. In order to optimize protocol 2, we considered the possibility of pooling the sediment and supernatant of the different samples to avoid performing two PCRs per sample. Although, this step has the disadvantage of

diluting the samples and therefore certain samples whose Ct is close to the detection limit could be lost.

Another significant point to consider is the presence of several inhibitors associated with the extraction protocol or an excess of host DNA that could lead to false negative results, and therefore decrease sensitivity as a consequence of a partial or total inhibition of amplification, impacting negatively on the performance of the real-time PCR diagnosis. An exogenous heterologous IAC supplied by the manufacturer, which enjoys several advantages over the endogenous or exogenous homologous IACs, was used to identify inhibitors (Lorente-Leal et al., 2019) and allowed the detection of *partial* or *total* inhibition phenomenon. Thus, 6 samples were found to be completely or partially inhibited for protocol 1, whereas 24 for protocol 2, respectively. After diluting these samples, 5 out of the 30 inhibited samples became positive, underlining the relevance of including an exogenous heterologous IAC.

Overall, diagnostic SE and SP for protocol 2 and PCR-IS6110 were very good when compared to microbiological culture, 95.93% (95% CI: 89.70-100%) and 100% (95% CI: 100%), respectively. By contrast, protocol 1 and PCR-IS6110 DNA yield an adjusted diagnostic SE of 78.30% (95% CI: 65.40-91.20%) and SP of 100% (95% CI: 100%).

Previous studies targeting IS6110 (Costa et al., 2013; Lorente-Leal et al., 2019) have reported quite similar SE and SP results than those herein reported for protocol 2. In addition, it is noteworthy to remark that in those studies, there was a high proportion of the evaluated samples with TBL (from 39% to 57.81% of the total samples vs 19.80% in our study), and hence, these animals should undergo an advanced stage of bTB infection. These results mean that both protocols work as a suitable tool to confirm bTB in reactor animals with either TBLs or NVLs, but specially for bTB diagnosis under current field conditions in the case of protocol 2, which presented a higher sensitivity to diagnose reactor animals without evident gross lesions at the slaughterhouse. In addition, our results evidence that extraction protocol is a definitely relevant step directly influencing on the diagnostic SE of real-time PCR from fresh tissue samples.

On the other hand, not only does DNA extraction method play a critical role for detection of MTC, but also the selection of the genetic target (Radomski et al., 2013). MTC-specific IS6110 transposon is reported as one of the main targets of election for the diagnosis of MTC complex by real-time PCR (Sevilla et al., 2015), providing a tool capable of differentiating between MTC and other bacteria, including non-tuberculous mycobacteria (NTM). However, a IS6110-like element has been recently found in the genome of other NTM, which may also



potentially cross-react with certain *IS6110* primer pairs or probes (Mchugh et al., 1997; Coros et al., 2008; Thacker et al., 2011; Lorente-Leal et al., 2021). Although this finding is expected to minimally impact on the specificity of the real-time PCR-*IS6110*, cross-reactivity cannot be ruled out and the use of additional MTC-specific targets would be desirable to improve the diagnostic performance of direct real-time PCR from tissue samples. Thus, DNA isolated by protocol 2 was evaluated in the present study using two additional different genetic targets, *IS4* and *mpb70*. *IS4* DNA target, described by Wang et al. (2019) on human clinical samples but never tested for veterinary diagnostic, is a highly conserved region inside *IS6110* found exclusively within the MTC. *Mpb70* gene encodes an antigenic protein, which is highly expressed by all members of the MTC but it is a single copy gene (Lorente-Leal et al., 2021). The *IS4* and *mpb70* real-time PCR, in combination with the obtained DNA with the extraction protocol 2, resulted in a rapid technique with good diagnostic performance (SE, 91% (82-99.80%), and SP, for *IS4*; SE, 83.30% (71.60-95%), and SP, 100% for *mpb70*) compared to microbiological culture. Considering previous real-time PCR studies (Costa et al., 2013; Courcoul et al., 2014; Cardoso-Toset et al., 2015; Lorente-Leal et al., 2019; Wang et al., 2019), the estimated diagnostic SE for both DNA targets, *IS4* and *mpb70*, was significantly higher or similar to that previously reported, along with a higher estimated SP. Nevertheless, an individual comparison between studies could be problematic and, definitely, biased due to differences in molecular targets, DNA extraction protocols and validation methods (Toft et al., 2005). Moreover, we found a substantial agreement between microbiological culture and real-time PCR-targeting *IS6110* ( $\kappa = 0.77$ ), *IS4* ( $\kappa = 0.72$ ) or *mpb70* ( $\kappa = 0.67$ ).

Even if SE and SP are the main diagnostic performance indicators used, there are other factors that could influence in the final utility of a technique, as the disease true prevalence in the region, the available lab resources or the acceptability by the veterinary professionals. The predictive values allow to estimate the variations in the diagnostic utility of a test based on the prevalence, so these values have a great importance allowing veterinary practitioners interpreting their results (WOAH, 2018b). Based on the obtained PLR and NLR, a real-time PCR targeting *IS6110*, *IS4* or *mpb70* positive results would confirm the bTB infection in any true prevalence scenario with a 100% security (PPV). Regarding to the credibility of the negative results, it was estimated a NPV of 90%, 85% and 80% for real-time PCR targeting *IS6110*, *IS4* and *mpb70* respectively, when the true prevalence ranging from 0% to 60%. These results highlight the usefulness of *IS6110*, *IS4* and *mpb70* as targets of interest in the direct molecular diagnosis of bTB infection.

Despite the described results, several contradictory results between microbiological culture and real-time PCR assays were observed. Of the 41 culture-negative animals, MTC DNA was detected in 5 animals with PCR targeting both, *IS6110* and *IS4*, whereas PCR targeting *mpb70* detected 4 animals as positive. These findings could be associated to different factors impacting the sensitivity and/or specificity of microbiological culture and real-time PCR. Among the limitations of microbiological culture impacting on MTC detection, lack of analytical specificity due to growth of other microorganisms, including non-tuberculous mycobacteria (NTM) (Corner et al., 2012; Courcoul et al., 2014), or decontamination process reducing cell viability of a slow-growing bacteria with a paubacillary presentation (Taylor et al., 2007; Liebana et al., 2008; Corner et al., 2012; Radomski et al., 2013), should be taken into account. Furthermore, cross-reactivity of the probes with other bacteria should be also considered as a limitation of the real-time PCR. As above mentioned, although *IS6110* is commonly used for the diagnosis of bTB, it may present cross-reactivity with NTM. To address this issue, *IS4* and *mpb70* primer pairs, which have been reported to be MTC-specific (Wang et al., 2019; Lorente-Leal et al., 2021), were used in our study proving that non-cross-reaction was found in culture-negative but real-time PCR-*IS6110* positive animals. Besides, 2 out of 41 culture-negative animals and real-time PCR targeting *IS6110*, *IS4* and *mpb70* positive animals presented TBL confirmed by histopathology (data not shown). These results suggests that DNA extraction protocol 2 working together real-time PCR targeting *IS6110*, *IS4* or *mpb70* could be a faster and more efficient assay for MTC detection in TBL or NVL samples during official post-mortem inspection, compared to microbiological culture. Nevertheless, microbiological culture is actually an essential technique to mycobacterial isolation and molecular epidemiology studies so far (Courcoul et al., 2014).

On the other hand, a small number of animals positive to microbiological culture were found to be PCR-negative targeting *IS6110* (2 out of 41), *IS4* (4 out of 41) or *mpb70* (7 out of 41). The presence of inhibitors impairs real-time PCR performance, nevertheless, this factor was ruled out since IAC amplifications were observed in all of these PCR-negative samples. Another reason that could explain these negative results could be a low mycobacterial load that would be beyond the LOD, resulting undetectable for these assays, especially in the case of *mpb70* which is a single copy gene (Lorente-Leal et al., 2019). In addition, although it seems to be an uncommon case, several isolates lacking the *IS6110* element have been reported for *M. tuberculosis* (Tabet et al., 1994; Das et al., 1995; Kamerbeek et al., 1997) but also for *M. bovis* (Steensels et al., 2013).

The present study describes a complete protocol including the sample pre-processing, DNA purification and real-time PCR analysis. According with our results, the DNA extraction protocol 2 and real-time PCR targeting *IS6110* or *IS4* could be potential first-choice molecular assays to detect MTC directly in fresh bovine tissue samples. These protocols proved to be rapid, highly sensitive and specific diagnostic tools as alternative to microbiological culture which could take up to three months to complete shortening turnaround time for decision makers to be promptly informed. Furthermore, the low proportion of animals tested with TBL (16 out of 81) in our study highlights the diagnostic potential of this real-time PCR protocol to detect MTC directly from fresh LN tissue samples at early stages of infection and, therefore, when the mycobacterial load is low. This would be essential in the current framework, in which the successful eradication schemes have reduced the number of reactors with TBL at the slaughterhouse; thus, the implementation of these cost-effective molecular tools in surveillance and control programs would pave the way to eradicate bTB. However, the major limitation of this study to hinder its wide application in the present setting is the lack of a ring trial that would allow its validation in different laboratories as well as different epidemiological scenarios. Therefore, further work on the re-validation of the present protocol should be performed in the future.

#### **Author Contributions**

EVS and JMSC performed all experiments in this study and Animal Health and Production Laboratory of Córdoba supported with microbiological culture and technical assistance. EVS, JGL, JMSC, AGR and IRT were involved in obtaining and processing tissue samples. IL, LC, JGL, and BH designed the study. EDV, BH and JMSC wrote the manuscript down with the invaluable insights of JGL, IL, LC, IRT and AGR. BH, JMSC and directed and supervised the whole study. All authors contributed to the article and approved the submitted version.

#### **Conflict of Interest**

The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

#### **Acknowledgments**

We appreciate the technical support offered by the Animal Health and Production Laboratory of Córdoba (Spain). This work was supported by the investigation project New measures and techniques to control Bovine Tuberculosis in Andalusia (Financial support for Operational Groups of the European Innovation Partnership for Agricultural Productivity and

Sustainability, EIP-AGRI; GOP2I-CO-16-0010). AGR and JMSC was supported by a Margarita Salas contract of the Spanish Ministry of Science and Innovation.

### References

Algammal, A. M., Wahdan, A., & Elhaig, M. M. (2019). Potential efficiency of conventional and advanced approaches used to detect *Mycobacterium bovis* in cattle. *Microbial Pathogenesis*, *134*. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2019.103574>

Araújo, C. P., Osório, A. L. A. R., Jorge, K. S. G., Ramos, C. A. N., Filho, A. F. S., Vidal, C. E. S., Roxo, E., Nishibe, C., Almeida, N. F., Júnior, A. A. F., Silva, M. R., Neto, J. D. B., Cerqueira, V. D., Zumárraga, M. J., & Araújo, F. R. (2014). Detection of *Mycobacterium bovis* in bovine and bubaline tissues using nested-PCR for TbD1. *PLoS ONE*, *9*(3). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0091023>

Bana, E. L., Aranaz, A., Mateos, A., Vilafranca, M., Gomez-Mampaso, E., Tercero, J. C., Alemany, J., Suarez, G., Domingo, M., & Dominguez, L. (1995). Simple and rapid detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex organisms in bovine tissue samples by PCR. *Journal of Clinical Microbiology*, *33* (1), 33-36. <https://journals.asm.org/journal/jcm>

Barandiaran, S., Aguirreburualde, M. S. P., Marfil, M. J., Vivot, M. M., Aznar, N., Zumárraga, M., & Perez, A. M. (2019). Bayesian assessment of the accuracy of a PCR-based rapid diagnostic test for bovine tuberculosis in swine. *Frontiers in Veterinary Science*, *6*, 204. <https://doi.org/10.3389/fvets.2019.00204>

Cardoso-Toset, F., Luque, I., Amarilla, S. P., Gómez-Gascón, L., Fernández, L., Huerta, B., Carrasco, L., Ruiz, P., & Gómez-Laguna, J. (2015). Evaluation of rapid methods for diagnosis of tuberculosis in slaughtered free-range pigs. *Veterinary Journal*, *204* (2), 232–234. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2015.01.022>

Casal, C., Infantes, J. A., Rivalde, M. A., Díez-Guerrier, A., Domínguez, M., Moreno, I., Romero, B., de Juan, L., Sáez, J. L., Juste, R., Gortázar, C., Domínguez, L., & Bezos, J. (2017). Antibody detection tests improve the sensitivity of tuberculosis diagnosis in cattle. *Research in Veterinary Science*, *112*, 214–221. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2017.05.012>

Charlet, D., Mostowy, S., Alexander, D., Sit, L., Wiker, H. G., & Behr, M. A. (2005). Reduced expression of antigenic proteins MPB70 and MPB83 in *Mycobacterium bovis* BCG strains due to a start codon mutation in sigK. *Molecular Microbiology*, *56*(5), 1302–1313. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2005.04618.x>

Commission delegated regulation (EU) 2020/689 of 17 December 2019 supplementing Regulation (EU) 2016/429 of the European Parliament and of the Council as regards rules for surveillance, eradication programmes, and disease-free status for certain listed and emerging diseases (2021).

Corner', A., & Trajstman, A. C. (1988). *Mycobacterium bovis* from Bovine Lesions. In *Vctcrinary Microbiology* (Vol. 18).

Corner, L. A. L., Gormley, E., & Pfeiffer, D. U. (2012). Primary isolation of *Mycobacterium bovis* from bovine tissues: Conditions for maximising the number of positive cultures. *Veterinary Microbiology*, 156(1–2), 162–171. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2011.10.016>

Coros, A., DeConno, E., & Derbyshire, K. M. (2008). IS6110, a *Mycobacterium tuberculosis* complex-specific insertion sequence, is also present in the genome of *Mycobacterium smegmatis*, suggestive of lateral gene transfer among mycobacterial species. *Journal of Bacteriology*, 190(9), 3408–3410. <https://doi.org/10.1128/JB.00009-08>

Costa, P., Ferreira, A. S., Amaro, A., Albuquerque, T., Botelho, A., Couto, I., Cunha, M. v., Viveiros, M., & Inácio, J. (2013). Enhanced detection of tuberculous mycobacteria in animal tissues using a semi-nested probe-based real-time PCR. *PLoS ONE*, 8(11), e81337. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0081337>

Courcoul, A., Moyen, J. L., Brugère, L., Faye, S., Hénault, S., Gares, H., & Boschirolì, 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(3), e90334. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0090334>

Das, S., Paramasivan, C. N., Lowrie, D. B., Prabhakar, R., & Narayanan, P. R. (1995). IS6110 restriction fragment length polymorphism typing of clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis* from patients with pulmonary tuberculosis in Madras, South India. In *Tubercle and Lung Disease*, 76(6), 550-554. doi: 10.1016/0962-8479(95)90533-2.

Dean, A. S., Forcella, S., Olea-Popelka, F., Idrissi, A. el, Glaziou, P., Benyahia, A., Mumford, E., Erlacher-Vindel, E., Gifford, G., Lubroth, J., Raviglione, M., & Fujiwara, P. (2018). A roadmap for zoonotic tuberculosis: a One Health approach to ending tuberculosis. *The Lancet Infectious Diseases*, 18(2), 137–138. [doi.org/10.1016/S1473-3099\(18\)30013-6](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(18)30013-6)

Domingo, M., Vidal, E., & Marco, A. (2014). Pathology of bovine tuberculosis. *Research in Veterinary Science*, 97(S), S20–S29. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2014.03.017>

Fell, S., Bröckl, S., Büttner, M., Rettinger, A., Zimmermann, P., & Straubinger, R. K. (2016). Two alternative DNA extraction methods to improve the detection of *Mycobacterium tuberculosis*-complex members in cattle and red deer tissue samples. *BMC Microbiology*, *16*(1), 213. <https://doi.org/10.1186/s12866-016-0816-2>

Hallur, V., Sharma, M., Sethi, S., Sharma, K., Mewara, A., Dhatwalia, S., Yadav, R., Bhasin, D., Sinha, S. K., Rana, S., & Joshi, K. (2013). Development and evaluation of multiplex PCR in rapid diagnosis of abdominal tuberculosis. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, *76*(1), 51–55. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2013.02.022>

Harboe, M., Wiker, H. G., Duncan, J. R., Garcia, M. M., Dukes, T. W., Brooks, B. W., Turcotte, C., & Nagai3, S. (1990). Protein G-based enzyme-linked immunosorbent assay for anti-MPB70 antibodies in bovine tuberculosis. *Journal of Clinical Microbiology*, *28*(5), 913-921. <https://journals.asm.org/journal/jcm>

Kamerbeek, J., Schouls, L., Kolk, A., van Agterveld, M., van Soolingen, D., Kuijper, S., Bunschoten, A., Molhuizen, H., Shaw, R., Goyal, M., & van Embden, J. (1997). Simultaneous detection and strain differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* for diagnosis and epidemiology. *Journal of Clinical Microbiology*, *35*(4), 907-914. doi: 10.1128/jcm.35.4.907-914.1997.

Liébana, E., Johnson, L., Gough, J., Durr, P., Jahans, K., Clifton-Hadley, R., Spencer, Y., Hewinson, R. G., & Downs, S. H. (2008). Pathology of naturally occurring bovine tuberculosis in England and Wales. *Veterinary Journal*, *176*(3), 354–360. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2007.07.001>

Liébana, E. L., Aranaz, A., Mateos, A., Vilafranca, M., Gomez-Mampaso, E., Tercero, J. C., Alemany, J., Suarez, G., Domingo, M., & Dominguez, L. (1995). Simple and Rapid Detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex organisms in bovine tissue samples by PCR. *Journal of Clinical Microbiology*, *33*(1), 33-36. doi: 10.1128/jcm.33.1.33-36.1995.

Lorente-Leal, V., Liandris, E., Castellanos, E., Bezos, J., Domínguez, 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. *Frontiers in Veterinary Science*, *6*, 61. doi: 10.3389/fvets.2019.00061.

Lorente-Leal, V., Liandris, E., Pacciarini, M., Botelho, A., Kenny, K., Loyo, B., Fernández, R., Bezos, J., Domínguez, L., de Juan, L., & Romero, B. (2021). Direct PCR on tissue samples to detect *Mycobacterium tuberculosis* complex: an alternative to the bacteriological culture. *Journal of Clinical Microbiology*, *59*(2), e01404-20. doi: 10.1128/JCM.01404-20.

MAPA (2022). Programa nacional de erradicación de tuberculosis bovina 2022 (Infección por el complejo *Mycobacterium tuberculosis*). [www.mapa.es](http://www.mapa.es)

Mchugh, M. L. (2012). Interrater reliability: the kappa statistic. *Biochemia Medica (Zagreb)* 22(3), 276.

Mchugh, T. D., Newport, L. E., & Gillespie, S. H. (1997). IS6110 homologs are present in multiple copies in mycobacteria other than tuberculosis-causing mycobacteria. *Journal of Clinical Microbiology*, 35(7), 1769-1771. doi: 10.1128/jcm.35.7.1769-1771.1997.

Michelet, L., de Cruz, K., Karoui, C., Tambosco, J., Moyen, J. L., Hénault, S., & Boschioli, M. L. (2018). Second line molecular diagnosis for bovine tuberculosis to improve diagnostic schemes. *PLoS ONE*, 13(11). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0207614>

Mishra, A., Singhal, A., Chauhan, D. S., Katoch, V. M., Srivastava, K., Thakral, S. S., Bharadwaj, S. S., Sreenivas, V., & Prasad, H. K. (2005). Direct detection and identification of *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium bovis* in bovine samples by a novel nested PCR assay: Correlation with conventional techniques. *Journal of Clinical Microbiology*, 43(11), 5670–5678. <https://doi.org/10.1128/JCM.43.11.5670-5678.2005>

Park, K. T., Allen, A. J., & Davis, W. C. (2014). Development of a novel DNA extraction method for identification and quantification of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* from tissue samples by real-time PCR. *Journal of Microbiological Methods*, 99(1), 58–65. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2014.02.003>

Parra, A., García, N., García, A., Lacombe, A., Moreno, F., Freire, F., Moran, J., & Hermoso de Mendoza, J. (2008). Development of a molecular diagnostic test applied to experimental abattoir surveillance on bovine tuberculosis. *Veterinary Microbiology*, 127(3–4), 315–324. doi:10.1016/j.vetmic.2007.09.001

Pozo, P., Cardenas, N. C., Bezos, J., Romero, B., Grau, A., Nacar, J., Saez, J. L., Minguez, O., & Alvarez, J. (2021). Evaluation of the performance of slaughterhouse surveillance for bovine tuberculosis detection in Castilla y Leon, Spain. *Preventive Veterinary Medicine*, 189, 105307. doi:10.1016/j.prevetmed.2021.105307

Pucken, V. B., Knubben-Schweizer, G., Döpfer, D., Groll, A., Hafner-Marx, A., Hörmansdorfer, S., Sauter-Louis, C., Straubinger, R. K., Zimmermann, P., & Hartnack, S. (2017). Evaluating diagnostic tests for bovine tuberculosis in the southern part of Germany: A latent class analysis. *PLoS ONE*, 12(6), e0179847. doi:10.1371/journal.pone.0179847

Radomski, N., Kreitmann, L., McIntosh, F., & Behr, M. A. (2013). The critical role of DNA extraction for detection of mycobacteria in tissues. *PLoS ONE*, 8(10), e78749. doi:10.1371/journal.pone.0078749

Ramos, D. F., Silva, P. E. A., & Dellagostin, O. A. (2015). Diagnosis of bovine tuberculosis: review of main techniques. *Brazilian Journal of Biology*, 75(4), 830–837. doi:10.1590/1519-6984.23613

Sánchez-Carvajal, JM, Galán-Relaño Á, Ruedas-Torres I, Jurado-Martos F, Larenas-Muñoz et al. Real-Time PCR validation for Mycobacterium tuberculosis complex detection targeting IS 6110 directly from bovine lymph nodes. *Front in Vet Sci*. (2021) 8:643111. doi: 10.3389/fvets.2021.64 3111

Sackett, D.L., Straus, S.E., Richardson, W.S., Rosenberg, W., Haynes, R.B., 2001. Diagnóstico y cribado. In: Sackett, D.L., Straus, S.E., Richardson, W.S., Rosenberg, W., Haynes, R.B. (Eds.), *Medicina Basada en la Evidencia. Cómo Practicar y Enseñar la MBE*, Second Ed. Harcourt, Madrid, Spain, pp. 62–68

Sevilla, I. A., Molina, E., Elguezabal, N., Pérez, V., Garrido, J. M., & Juste, R. A. (2015). Detection of mycobacteria, *Mycobacterium avium* subspecies, and *Mycobacterium tuberculosis* complex by a novel tetraplex real-time PCR assay. *Journal of Clinical Microbiology*, 53(3), 930–940. doi:10.1128/JCM.03168-14

Steensels, D., Fauville-Dufaux, M., Boie, J., & de Beenhouwera, H. (2013). Failure of PCR-based IS6110 analysis to detect vertebral spondylodiscitis caused by *Mycobacterium bovis*. *Journal of Clinical Microbiology*, 51(1), 366–368. doi:10.1128/JCM.02524-12

Tabet, S. R., Goldbaum, G. M., Hooton, T. M., Eisenach, K. D., Cave, M. D., & Nolan, C. M. (1994). Restriction fragment length polymorphism analysis detecting a community-based tuberculosis outbreak among persons infected with human immunodeficiency virus. *The Journal of Infectious Diseases*, 169(1), 189-192. doi: 10.1093/infdis/169.1.189.

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. doi:10.1186/1746-6148-3-12

Thacker, T. C., Harris, B., Palmer, M. v., & Waters, W. R. (2011). Improved specificity for detection of *Mycobacterium bovis* in fresh tissues using IS6110 real-time PCR. *BMC Veterinary Research*, 7, 50. <https://doi.org/10.1186/1746-6148-7-50>



Thierry, D., Brisson-noël, A., Vincent-lévy-frébault, V., Nguyen, S., Guesdon, J., & Gicquel, B. (1990). Characterization of a *Mycobacterium tuberculosis* insertion sequence, IS6110, and its application in diagnosis. *Journal of Clinical Microbiology*, 28(12), 2668-2673. doi: 10.1128/jcm.28.12.2668-2673.1990.

Toft, N., Jørgensen, E., & Højsgaard, S. (2005). Diagnosing diagnostic tests: Evaluating the assumptions underlying the estimation of sensitivity and specificity in the absence of a gold standard. *Preventive Veterinary Medicine*, 68(1), 19–33. doi:10.1016/j.prevetmed.2005.01.006

Trajman, A., & Luiz, R. R. (2008). McNemar  $\chi^2$  test revisited: Comparing sensitivity and specificity of diagnostic examinations. *Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation*, 68(1), 77–80. doi:10.1080/00365510701666031

Wang, H. Y., Lu, J. J., Chang, C. Y., Chou, W. P., Hsieh, J. C. H., Lin, C. R., & Wu, M. H. (2019). Development of a high sensitivity TaqMan-based PCR assay for the specific detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex in both pulmonary and extrapulmonary specimens. *Scientific Reports*, 9(1), 113. doi:10.1038/s41598-018-33804-1

WOAH (2018a). Mammalian tuberculosis (Infection with *Mycobacterium tuberculosis* complex). *Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals*, 1-22.

WOAH (2018b). Principles and methods of validation of diagnostic assays for infectious diseases. *Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals*, 72–86.

Zhou, L., Ma, C., Xiao, T., Li, M., Liu, H., Zhao, X., Wan, K., & Wang, R. (2019). A new single gene differential biomarker for *Mycobacterium tuberculosis* complex and non-tuberculosis mycobacteria. *Frontiers in Microbiology*, 10, 1887. doi:10.3389/fmicb.2019.01887



### **Estudio III.**

## **Assessment of the diagnostic performance of intradermal tuberculin test and macroscopic inspection for the diagnosis of bovine tuberculosis according to WOAH guidelines.**

Eduardo Vera-Salmoral, José María Sánchez-Carvajal, Lidia Gómez-Gascón, Fernanda Larenas-Muñoz, Carmen Tarradas, Jaime Gómez-Laguna and Belén Huerta

En revisión en *Research in Veterinary Science*

**Objetivo 3.** Estimar la utilidad diagnóstica de la PCR a tiempo real en función de la prevalencia de la enfermedad en la población de estudio y los resultados obtenidos previamente en la intradermotuberculinización y la inspección macroscópica (probabilidad pre-test).

**Subobjetivo 3.1.** Determinar la probabilidad pre-test asociada a la validez y los resultados de la intradermotuberculinización cervical con interpretación severa y la inspección macroscópica.



**Assessment of the diagnostic performance of intradermal tuberculin test and macroscopic inspection for the diagnosis of bovine tuberculosis according to WOAAH guidelines.**

Eduardo Vera-Salmoral<sup>a,b</sup>, José María Sánchez-Carvajal<sup>b,\*</sup>, Lidia Gómez-Gascón<sup>a</sup>, Fernanda Larenas-Muñoz<sup>b</sup>, Carmen Tarradas<sup>a</sup>, Jaime Gómez-Laguna<sup>b</sup> and Belén Huerta<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Department of Animal Health, UIC Zoonosis y Enfermedades Emergentes ENZOEM, University of Córdoba, International Excellence Agrifood Campus 'Ceia3', University of Córdoba, 14014, Córdoba, Spain

<sup>b</sup> Department of Anatomy and Comparative Pathology and Toxicology, Pathology and Immunology Group (UCO-PIG), UIC Zoonosis y Enfermedades Emergentes ENZOEM, University of Córdoba, International Excellence Agrifood Campus 'Ceia3', 14014 Córdoba, Spain

\*Corresponding author at:

E-mail address: v42sancj@uco.es (José María Sánchez-Carvajal)

**Abstract**

Bovine tuberculosis (bTB) constitutes a global challenge for public and animal health. This study aimed to estimate the accuracy of the single intradermal tuberculin test (SIT) and macroscopic post-mortem inspection for different diagnostic objectives following WOAAH guidelines. Tissue samples from 59 microbiological culture/PCR-positive cattle and 58 microbiological culture/PCR-negative were evaluated. The diagnostic sensitivity and specificity, the positive and negative probability indices, the positive and negative predictive values (PPV and NPV) of each technique were estimated for different pretest probabilities. The SIT with strict interpretation demonstrated moderate precision in confirming the absence of infection in populations historically free of bTB, with a 12.1% rate of false positives, but also detecting positive animals in the early stages of the eradication programs, with a 13.6% rate of false negatives. The diagnostic performance for ruling out bTB was notably high (NPV > 90%) in animals with a pre-test probability below 42%. Macroscopic inspection may constitute an interesting alternative tool to confirm suspected and positive cases for SIT, particularly in areas with bTB prevalence exceeding 19%, where implementing SIT and eradication measures may be impractical. In these areas, the likelihood that animals with TBL are affected by the disease surpasses 90%. Similarly, in herds with a pre-test probability below 25%, the absence of bTB could be confidently ruled out with over 90% certainty. These findings highlight the effectiveness

of SIT and macroscopic inspection as valuable techniques for current eradication programs and controlling bTB in high-prevalence areas where molecular techniques may not be feasible.

**Keywords:** Likelihood ratio, Predictive Values, bovine tuberculosis, single intradermal tuberculin test, macroscopic inspection

## 1. Introduction

Bovine tuberculosis (bTB) is a zoonotic disease that affects both animals and humans causing a detrimental socioeconomical impact on public and animal health. bTB, currently known as animal tuberculosis, is caused by *Mycobacterium bovis* and other pathogens belonging to *Mycobacterium tuberculosis* complex (MTC) (WOAH, 2018). In developed countries, bTB is subjected to rigorous surveillance and control programs, resulting in a herd prevalence rate of less than 2% and individual animal prevalence rate of 1%. Nevertheless, in many developing countries, such as those in Africa, where up to 85% of cattle and 82% of the human population live in areas where bTB is endemic, MTC infection remains a neglected problem (Ayele et al., 2004).

The diagnosis of bTB is a multifaceted task due to the constraints of the diagnostic tests approved by the World Organization for Animal Health (WOAH) which have limitations in sensitivity and/or specificity, as highlighted in previous studies (de la Rúa-Domenech et al., 2006; Bezos et al., 2014; Costa et al., 2014; Larenas-Muñoz et al., 2022). Currently, microbiological culture followed by molecular identification is considered as the reference standard for MTC diagnostic (WOAH, 2018a). Nonetheless, this method is labour-intensive, slow, necessitates biosafety level facilities, and presents significant constraints in terms of sensitivity (Se 78.1% [72.9-82.8%]) (Costa et al., 2014; Courcoul et al., 2014; Sánchez-Carvajal et al., 2021). It has been reported that molecular diagnostic techniques based on the identification of bacterial DNA from fresh tissue sample by using real-time PCR have demonstrated several advantages compared to microbiological culture (Prabhakar et al., 2004; Lorente-Leal et al., 2019; Sánchez-Carvajal et al., 2021; Vera-Salmoral et al., 2023). These include increased accuracy and shortening the turnaround time to confirm bTB infection, as well as the ability to diagnose the specific bacterial species. However, these diagnostic tests require specialized infrastructure and preparation for their execution. As a result, real-time PCR is not widely accessible to developing countries, which often perform abattoir inspection and single intradermal tuberculin test (SIT) for disease control without confirming positive cases (Arnot & Michel, 2020).

The SIT is the most widely recognized and utilized official technique worldwide for the antemortem diagnosis of bTB. Reactor animals, identified by positive test results for bTB, are typically removed from the herd until they are slaughtered. However, several factors related to the immunological response (early infection, anergy or concurrent immunosuppression), to the PPDs (expired product, product stored under inappropriate conditions, manufacturing errors, low potency) or to the methodology (doses, site of injection, inexperience) might cause false negative results (de la Rúa-Domenech et al., 2006; Álvarez et al., 2012; Casal et al., 2014; O'Hagan et al., 2019). On the other hand, co-infection or pre-exposure to other related non-tuberculous mycobacteria have been reported as a potential cause of a false positive result (de la Rúa-Domenech et al., 2006; Álvarez et al., 2012; Casal et al., 2014; O'Hagan et al., 2019).

The abattoir inspection enables early detection of tuberculosis-like lesions (TBL), rapid intervention, and effective prevention of disease transmission to other animals and humans favouring the control of bTB. In countries with official bTB control programs, abattoir inspection plays an important role in the detection and monitoring of bTB (Domingo et al., 2014; Garcia-Saenz et al., 2015). Post-mortem examination of animals allows identifying gross TBL, basically, in regional lymph nodes (retropharyngeal, tracheobronchial and mediastinal lymph nodes) and the lungs. The size, location, and extent of these lesions can vary depending on the type of mycobacteria, route of infection, and disease stage (Borham et al., 2022; Palmer et al., 2022; Pozo et al., 2021; Wangoo et al., 2005). Moreover, because of the progress of control programs, it is increasingly common to find lesions limited to a single lymph node, or even not to find lesions in animals infected by MTC (Varello et al., 2008; Sánchez-Carvajal et al., 2021).

The present study aimed to estimate the diagnostic accuracy of SIT and macroscopic inspection for the most common diagnostic purposes listed in the WOAHTerrestrial Manual: 1) contribute to the demonstration of freedom from infection in a defined population (country/zone/compartiment/herd) (prevalence apparently zero), 2) certify freedom from infection or presence of the agent in individual animals or products for trade/movement purposes, 3) contribute to the eradication of disease or elimination of infection from defined populations and 4) confirm diagnosis of suspect or clinical cases (includes confirmation of positive screening test), and to assess the costs associated with eliminating positive animals in different scenarios of bTB.

## **2. Material and methods**

### **2.1 Characterization of the population under study and sampling**

Slaughterhouse sampling was carried out in the framework of the bTB Spanish national eradication program. In accordance with European regulations, retropharyngeal, tracheobronchial and mesenteric lymph nodes (LN) were collected from 227 randomly selected carcasses for bacteriological culture and confirmation by real-time PCR-IS6110 (reference standard). No lesions were observed in lung or other organs. In parallel, comprehensive information regarding the bTB status of the farms (infected: T1 and T2 status, and officially free in the last three years: T3H status) was obtained from the official Veterinary Services, delimiting farms as infected (T1 and T2 status) or officially free in the last three years (T3H status).

According with this dataset, 59 bTB-positive animals (coming from T1-T2 farms and culture/PCR-positive in at least one of the three selected LN) and 58 bTB-negative animals (coming from T3H farms and culture/PCR- in all samples) were included as reference in the study.

#### **2.1 Microbiological culture**

An individual selective culture of each LN was performed in liquid medium according to the protocol described by Corner & Trajstman (1988). Thus, LN tissue samples were homogenized individually and then, each homogenate was decontaminated using 0.75 % hexadecylpyridinium chloride solution and kept in agitation for 30 minutes. The pellet was cultured by a swab in MGITTM 960 Becton Dickinson (Madrid, Spain) liquid medium in the BD BACTER TM MGITTM Automated System (Becton Dickinson). Subsequently, those cultures in which growth was detected were subjected to real-time PCR for discriminating MTC (Thierry et al., 1990).

#### **2.2 Single intradermal tuberculin (SIT) test**

The results of the last SIT were recorded according to the strict interpretation, positive animals were those that showed an increase in the thickness of the skin fold of more than 2 mm.

#### **2.3. Post-mortem inspection**

In order to disclose gross TBL, the carcasses and tissues were subjected to visual inspection, including incision and examination of the retropharyngeal, tracheobronchial and mediastinal LNs and the palpation of the lungs during routine post-mortem inspection of animals at the abattoir (Commission implementing Regulation 627/2019).



## 2.4 Statistical analysis

According to guideline for validation diagnostic assays for infectious diseases of terrestrial animals (WOAH, 2023), the statistical program Epidat 3.1 (Galician Health Service, Spain) was used to determine the diagnostic performance of the tests according to the defined purposes by calculating diagnostic sensitivity (Se), diagnostic specificity (Sp), positive likelihood ratio [PLR =  $Se/(1-Sp)$ ] and negative likelihood ratio [NLR =  $(1-Se)/Sp$ ]. Using this dataset, we proceeded to estimate the diagnostic utility of the tests across varying pre-test probabilities of bTB by calculating predictive values (Reid et al., 2022). Each calculation was accompanied by a corresponding 95% confidence interval (CI).

According to the criteria of Sackett (2001), a PLR > 10 or NLR < 0.1 indicates that the test is able to effectively distinguish between healthy and infected animals and accurately confirm or rule out the disease in almost all cases. If  $5 \leq PLR \leq 10$  or  $0.1 \leq NLR \leq 0.2$ , the ability of the test to confirm or rule out the disease would be moderate, and its usefulness will depend on the prevalence of the disease. A PLR between 2 and 5 or a NLR between 0.2 and 0.5 indicates that the test has low diagnostic value, and its usefulness will be strongly affected by disease prevalence. Finally, a PLR < 2 or NLR > 0.5 indicates that the test has difficulty in distinguishing between healthy and diseased animals and has little or no diagnostic value.

The PPV and NPV of diagnostic tests were determined from the LRs, which allowed the calculation of post-test probabilities of positive and negative results for a range of prevalence from 0% to 100% (pre-test probability). The equations used were  $PPV = \text{Odds post "diseased"} / (1 + \text{Odds post "diseased"})$  and  $NPV = \text{Odds post "not diseased"} / (1 + \text{Odds post "not diseased"})$ , where  $\text{Odds post} = LR * \text{Odds pre}$  and  $\text{Odds pre} = \text{Pre-test probability} / (1 - \text{Pre-test probability})$ . The resulting data was visualized using GraphPad Prism 9 software (La Jolla, CA, USA).

For the SIT test, the inverse of the PPV was calculated to estimate the cost of culling true and false positives for every truly diseased animal identified, according to WOAH recommendations.

## 3. Results

### 3.1 Microbiological culture of positive-reference animals

A total of 59 bTB-positive animals were included in the study, based on isolation and identified of MTC in at least one of the three selected LNs (Table 15). Taking into consideration the topographical distribution of positive samples, 39 (17.2%) positive samples were disclosed

in the tracheobronchial LN, 21 (9.7%) in the retropharyngeal LN and 10 (4.4%) in the mesenteric LN. Fifty out of the 59 positive animals (84.7%) were positive in only one LN, 8 (13.6%) were positive in two LNs and 1 animal (1.7%) was culture positive in all 3 LNs.

**Table 15.** Diagnostic sensitivity, specificity and likelihood ratios estimates for the single intradermal tuberculin test (SIT), with severe interpretation, and the macroscopic inspection.

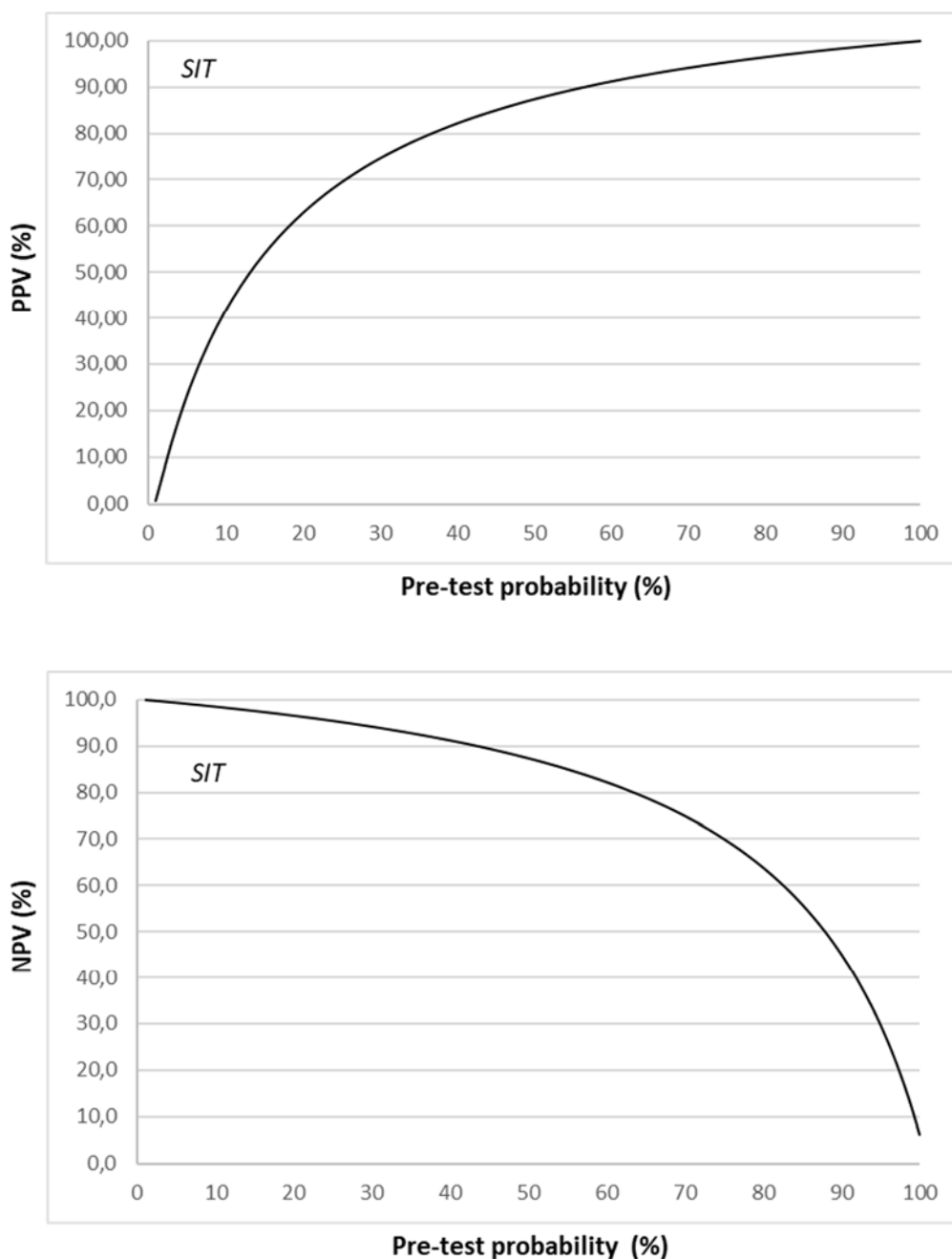
Microbiological culture/ real time PCR-IS6110						
	bTB- positive animals	bTB-negative animals	DSe (CI <sub>95</sub> )	DSp (CI <sub>95</sub> )	PLR (CI <sub>95</sub> )	NLR (CI <sub>95</sub> )
SIT +	48	7	86.4%	87.9%	7.16	0.15
SIT -	4	51	(76.8%-96%)	(78.7%- 97.2%)	(3.5-14.5)	(0.08-0.3)
MI +	38	1	67.8%	98.3%	39.3	0.33
MI -	14	57	(55%-80.6%)	(94.1%- 100%)	(5.6-276)	(0.23-0.48)

*SIT: Single Intradermal tuberculin; DSe: Diagnostic sensitivity; DSp: Diagnostic specificity; PLR: positive likelihood ratio; NLR: negative likelihood ratio; MI: Macroscopic inspection*

### 3.2 Diagnostic accuracy of SIT

Regarding SIT results, 58 out of the 117 animals tested (49.6%) yielded a positive result and 59 (50.4%) were negative. Comparing with microbiological culture, 51 out of 58 bTB-positive animals were classified as SIT positive (DSe 86.4%; 95% CI: 76.8%-96.0%) and 51 of the 58 bTB-negative animals (DSp 87.9%; 95% CI: 78.7%-97.2%), resulting in a false positive rate (FPR) of 12.1% (95% CI: 2.8% - 21.3%) and a false negative rate (FNR) of 13.6% (95% CI: 4.0%-23.1%) (Table 15). Based on the obtained LR values (PLR = 7.16 and NLR = 0.15), the interpretation of severe SIT would have a moderate value to effectively distinguish between healthy and infected animals.

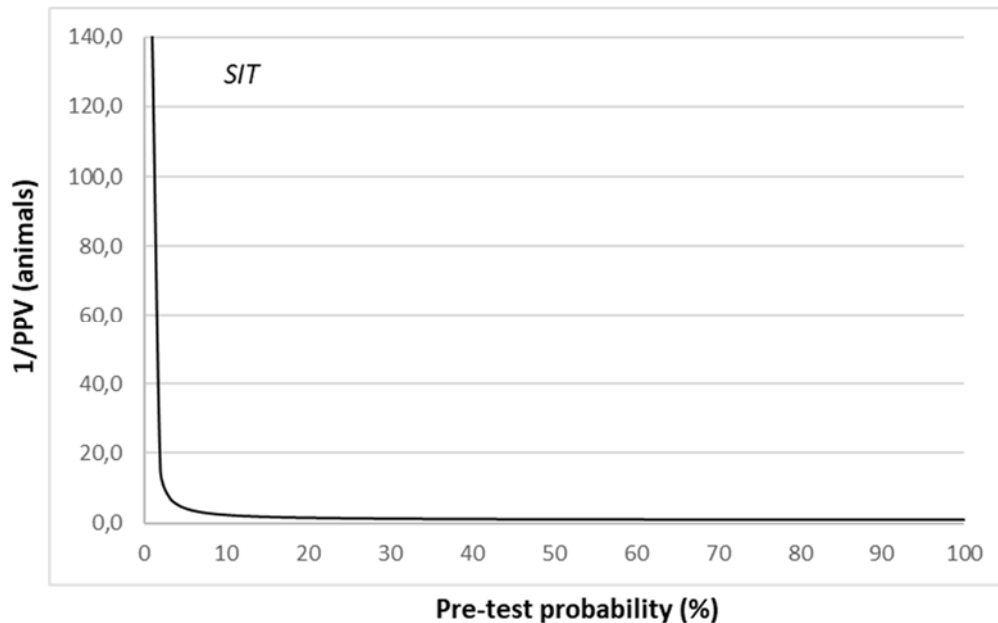
The utility of the test is highly dependent on the pre-test probability. As depicted in Figure 16, the reliability of results (SIT+ / SIT-) would be high ( $\geq 90\%$ ) for animals with a pre-test probability (determined by the prevalence of bTB in the area, SIT+ animal rate, associated risks of infection in the herd and presence of clinical signs) higher than 56% (PPV) and lower than 42% (NPV), respectively.



**Figure 16:** Positive predictive values (PPV) of the single intradermal tuberculin Test (SIT) with severe interpretation estimated according to the pre-test probability of bovine tuberculosis (bTB).

Moreover, the inverse of PPV was calculated and graphically presented in Figure 17. The results show that in farms or areas with a very low pre-test probability of bTB (Ppre 0%-2%), between 141 (Ppre 0.1%) and 8 (Pt 2%) SIT+ animals would be slaughtered for each truly infected animal detected. Conversely, in areas with moderate to high pre-test probability (Ppre 6%-30%),

the number of animals slaughtered would be significantly lower, ranging from 4 to 2 per truly infected animal detected.



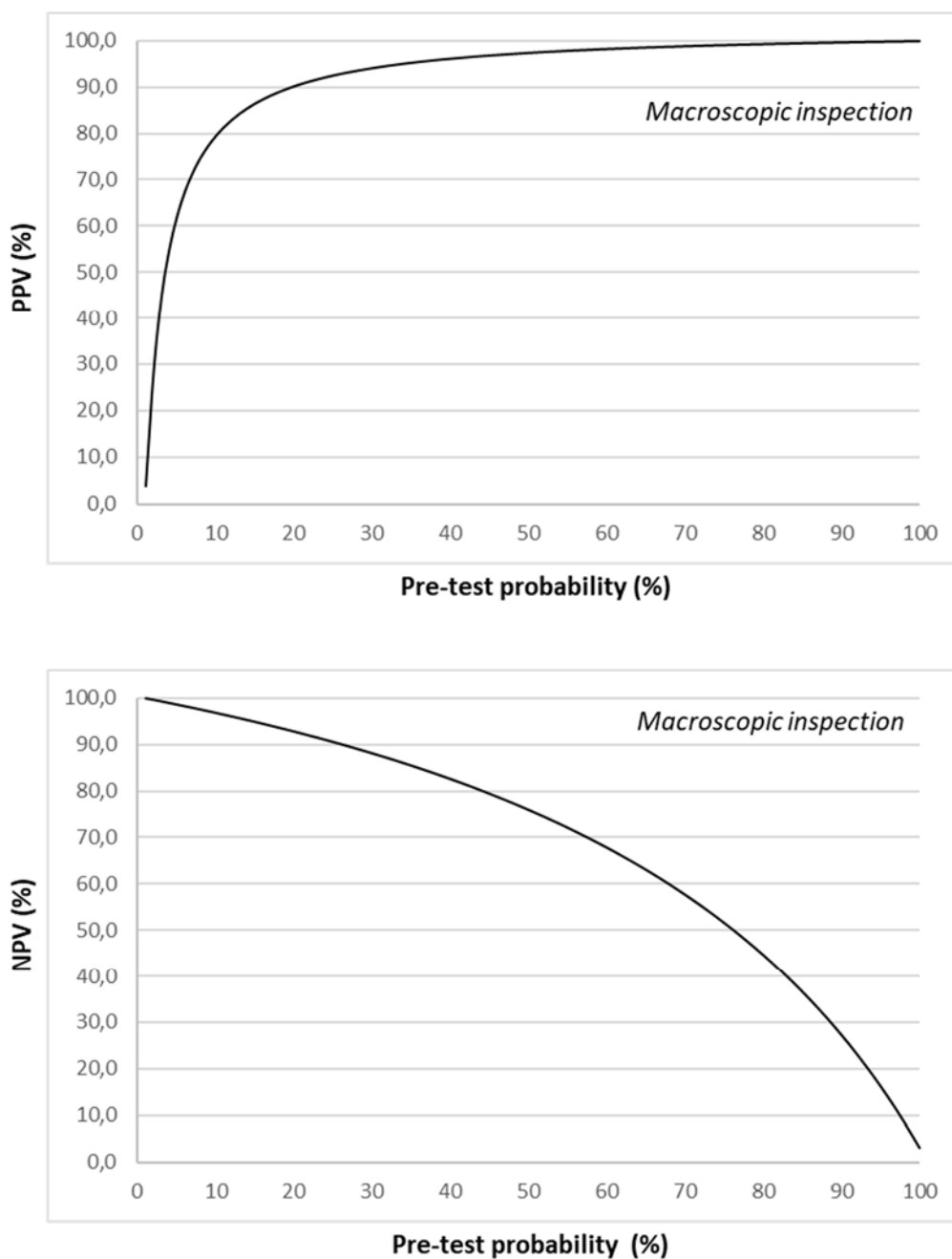
**Figure 17:** Inverse of the positive predictive values (1/PPV) of the single intradermal tuberculin Test (SIT) with severe interpretation estimated according to the pre-test probability of bovine tuberculosis (bTB).

### 3.3 Diagnostic accuracy of postmortem macroscopic inspection

Only 40 out of the 117 animals selected for the study (34.2%) presented macroscopic TBL in any of the examined LNs (Table 15). We did not identify any case with lesions detected in internal organs beyond LNs.

Comparing with microbiological culture, DSe and DSp of macroscopic inspection were 67.8% (95% CI: 55%-80.6%) and 98.3% (95% CI: 94.1%-100%), respectively. The false negative rate (FNR) was estimated at 32.2% (95% CI: 19.4% - 45%), and the false positive rate (FPR) was 1.7% (95% CI: 0%-5.9%). Based on LRs, the macroscopic analysis had high ability to confirm the disease (PLR = 39.3), but poor ability to rule bTB out (NLR = 0.33).

As illustrated in Figure 18, the positive macroscopic examination has high credibility (PPV  $\geq$  90%) if the pre-test probability is greater than or equal to 19%. When using the macroscopic examination after SIT, SIT+ animals from herds with a prevalence of 4% or higher would have a pre-test probability of having bTB higher than 19% (as indicated by the PPV of SIT, depicted in Fig. 1). Finally, considering the credibility of negative results, it was observed that the NPV would be very high ( $\geq$  90%) in animals where the pretest-probability of bTB ranges from 0% to 25% (Fig. 18).



**Figure 18:** Positive (PPV) and negative (NPV) predictive values of macroscopic inspection, as a function of the pre-test probability of bovine tuberculosis.

#### 4. Discussion

The bTB is a zoonotic disease that has been largely neglected in developing countries but remains a matter of global concern (Inlamea et al., 2020; Bernitz et al., 2021). Data retrieved from WAHIS reveals that, in 2021, bTB was officially confirmed in cattle populations across 40 out of the 183 countries that routinely report their bTB status. It is important to mention that up-to-date data are not available for many nations. While numerous countries have made

considerable strides in controlling bTB at the herd level, completely eradicating the disease remains a formidable challenge. This is primarily due to the persistent infection reservoirs in wild animals (Gortázar et al., 2012; WOA, 2018a) and the ongoing complexities associated with diagnosing this disease.

In developed countries, efforts for the control and eradication of bTB are mainly based on screening methods such as SIT or IFN- $\gamma$ . These screenings are followed by culling of reactor animals and confirmation by histopathological analysis (in the case of numerous reactor animals in the herd) and/or microbiological culture (de la Rúa-Domenech et al., 2006). These programmes have been remarkably effective, leading to a substantial reduction of bTB prevalence in cattle herds, reaching as low as 0.001% in countries such as the USA and several European nations (APHIS UDA, 2009; EFSA & ECDC, 2018; Refaya et al., 2020; MAPA, 2022).

In contrast, bTB remains a significant concern for both human and animal health in many developing countries. Reports indicate that in numerous African countries, bTB prevalence ranges from 11% to as high as 28% in cattle populations, with many areas lacking any recorded data (Malama et al., 2013; Okeke et al., 2016; Diallo et al., 2016; Dibaba et al., 2019; Refaya et al., 2020; Kasir et al., 2023). Various factors contribute to this situation, including a notable shortage of economic and human resources that hinders the development of effective bTB surveillance and control programs, which are characterized by substantial economic costs (Dibaba et al., 2019; Kemal et al., 2019).

Consequently, bTB diagnosis is primarily conducted during post-mortem inspections at abattoirs. This is due to the combined use of bacteriology and SIT, which is expensive, time-consuming, and unsafe in poorly equipped laboratories (Dibaba et al., 2019). On the other hand, some regions have implemented bTB control programs involving SIT and abattoir surveillance, or strategies that combine post-mortem inspection with SIT testing in herds where TB lesions were found (Arnot and Michel, 2020; Elsohaby et al., 2021; Woldemariam et al., 2021). However, implementing such strategies may not be practical or feasible in communal farming systems of developing countries, and it may even raise ethical concerns, especially in the context of wildlife (Arnot and Michel, 2020). This is primarily due to the diagnostic limitations of SIT at the individual level, which can result in the unnecessary culling of healthy animals (de la Rúa-Domenech et al., 2006; Álvarez et al., 2012; Casal et al., 2014; O'Hagan et al., 2019).

Therefore, this study aimed to assess the accuracy of SIT and post-mortem inspection for the most common diagnostic purposes outlined in the WOA Terrestrial Manual. Additionally,

the study aimed to evaluate the costs associated with eliminating positive animals under different scenarios of bTB.

The SIT is the most commonly used official diagnostic technique for bTB (Bezoz et al., 2014; de la Rúa-Domenech et al., 2006). Nonetheless, both the simple SIT and the comparative SIT (SCIT) can exhibit considerable variations in accuracy in comparison to microbiological culture, the reference standard method (Monaghan et al., 1994; de la Rúa-Domenech et al., 2006). Several studies have reported a broad range of DSe for SIT, ranging from 80.2% to 100%, and DS<sub>p</sub> between 75.5% and 96.8%. In contrast, SCIT demonstrates a DSe that varies from 68.6% to 100% and a DS<sub>p</sub> ranging from 88.8% to 100%. SCIT is generally regarded as a more specific technique than SIT but is less sensitive (de la Rúa-Domenech et al., 2006). Furthermore, strict result interpretation may categorize doubtful animals as positive, potentially enhancing DSe at the expense of DS<sub>p</sub> (Anonymous, 2006; de la Rúa-Domenech et al., 2006)

Our findings revealed that the DSe for cervical SIT, when strictly interpreted, was 86.4% (95% CI: 76.8% - 96%), while the DS<sub>p</sub> was 87.9% (95% CI: 78.7% - 97.2%). These values may be attributed to possible cross-reactions with nontuberculous and/or environmental mycobacteria (Álvarez et al., 2009). In contrast, Bayesian approximation models based on literature reported substantial differences in DSe, with values ranging from 53% to 69.4% (Álvarez et al., 2012). Regarding SCIT, the DSe has been reported to range from 40.5% to 57.7%, and the DS<sub>p</sub> from 96.3% to 99.7%, with a slight improvement observed when employing a strict interpretation criterion (Lahuerta-Marin et al., 2018).

It is important to note that relying solely on DSe and DS<sub>p</sub> values for test evaluation is insufficient because these values do not provide a comprehensive understanding of the test utility in specific contexts and health conditions. To assess the accuracy of a test depending on diagnostic purpose, several researchers recommend the use of the likelihood ratios and the predictive values (Dujardin et al., 1994; Grimes et al., 2005; Caraguel & Colling, 2021); Reid et al., 2022).

The LRs enable a comparison of the likelihood of success and failure of a diagnostic test using a single parameter and facilitates the estimation of the predictive values (PV), based on the pre-test probability (Caraguel and Colling, 2021). As control measures are implemented during the execution of a control program, disease prevalence and, consequently, the pre-test probability, undergoes continuous changes. In order to assess the costs associated with test performance and the need to change to a test with higher DSe and/or DS<sub>p</sub> to mitigate these costs, WOAHA recommends monitoring the inverse of PPV (WOAHA, 2018b).

Considering the DSp and LR+ estimated in this study, SIT with strict interpretation prove to be a remarkably accurate technique for demonstrating the absence of bTB in a historically TB-free population (zero or almost zero prevalence). However, it is noteworthy that the technique does exhibit a 12.1% rate of false positive results (Reid et al., 2022; WOA, 2023).

On the other hand, the accuracy (DSe and LR-) of the SIT would be significant for confirming the absence of bTB in individual animals or products for trade/movement purposes, but also during the early stages of a proof-of-freedom testing programme when the prevalence of the disease remains at non-negligible levels, since SIT presents 13.6% of false negative results and allows the detection of 86.4% of positive animals (Reid et al., 2022; WOA, 2023). The diagnostic performance of SIT would be notably high (NPV > 90%) in herds or animals with a pre-test probability of less than 42%. This scenario is frequently found in many developing countries where the prevalence of bTB is in the range of 20%-30% (Ayele et al., 2004). Nevertheless, a comprehensive evaluation of the potential costs linked to culling SIT+ animals is essential, considering the specific conditions of the farm or region. As mentioned above, in many parts of Africa, unnecessary culling of healthy animals may be not feasible in communal farming systems (Ayele et al., 2004). In this context, the graphical tools (Fig. 1 and 2) presented in this article can offer valuable insights, as long as they are accompanied by studies to determine the prevalence of bTB in herds.

In such scenarios, the utilization of SCIT variant may have more suitable alternative. This variation provides increased specificity (94,4%-100%), resulting in a reduced number of false positive animals to be culled. Nonetheless, this choice may potentially allow a greater number of infected animals to remain on the farm (up to 44.9% of FNR with standard interpretation and 31.4% with strict interpretation) (de la Rúa-Domenech et al., 2006).

Similarly, WOA (2023) recommends that when culling infected animals in the context of an eradication programme reduces the disease prevalence to very low levels, a implementing a more specific test is advisable to minimize the culling of false positive animals as much as possible. However, there are no other ante-mortem techniques that offer the combination of advantages that SIT offers: good diagnostic sensitivity, simple execution, cost-effectiveness, and early diagnosis capacity. Although IFN- $\gamma$  shows similar diagnostic validity to SIT, it presents logistical challenges and higher costs, making it unsuitable for all settings (de la Rúa-Domenech et al., 2006; Schiller et al., 2010). On the other hand, serological tests detect humoral immunity and, in fact, would not be suitable for the early diagnosis of bTB (Pollock and Neill, 2002).



Regarding post-mortem macroscopic inspection, our results showed a DSe of 67.8% (95% CI: 55%-80.6%) and a DSp of 98.3% (95% CI: 94.1%-100%), with a PLR of 39.3 and an NLR of 0.33. According to DSp and LR- estimated, macroscopic inspection emerges as highly useful technique for confirming diagnosis of suspect or clinical cases, including the confirmation of positive-animals to screening test. This aligns with the current practices in eradication and control programmes implemented in developed countries (Reid et al., 2022; WOA, 2023).

Furthermore, in developing countries with a significant prevalence of bTB, where eradication is not feasible, and the cost-effectiveness of SIT is prohibitive, the macroscopic inspection at the slaughterhouse could be a valid alternative as a primary diagnostic method. In this scenario, the technique could help to reduce bTB in areas/herds with a pre-test probability  $\geq 19\%$ , as the probability of animals having the disease when TBL is detected is at least 90% (Figure 3) and one animal that tests positive upon macroscopic inspection would be culled for every truly infected animal identified. However, given the DSe and LR- estimated, only in areas/herds with a pre-test probability  $< 25\%$ , the absence of TBL would allow ruling out the disease with more than 90% certainty (NPV).

## **5. Conclusions**

The assessment conducted in this study highlights the utility of SIT and macroscopic inspection, based on the updated WOA guidelines. These techniques are applicable not only within the framework of eradication programs but also for the control bTB in high-prevalence areas where the implementation of microbiological and molecular techniques may not be feasible. The incorporation of predictive values in result interpretation highlights the imperative to promote prevalence studies in these regions, enabling precise assessments of the efficacy of these techniques.

### **Declarations of interest**

None.

### **Acknowledgements**

This work was supported by the investigation project “New measures and techniques to control Bovine Tuberculosis in Andalusia” (Financial support for Operational Groups of the European Innovation Partnership for Agricultural productivity and Sustainability, EIP-AGRI; GOP2I-CO-16-0010).

## References

Álvarez, J., de Juan, L., Bezos, J., Romero, B., Sáez, J.L., Marqués, S., Domínguez, C., Mínguez, O., Fernández-Mardomingo, B., Mateos, A., Domínguez, L., Aranaz, A., 2009. Effect of paratuberculosis on the diagnosis of bovine tuberculosis in a cattle herd with a mixed infection using interferon-gamma detection assay. *Veterinary Microbiology* 135, 389–393. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2008.09.060>

Álvarez, J., Perez, A., Bezos, J., Marqués, S., Grau, A., Saez, J.L., Mínguez, O., De Juan, L., Domínguez, L., 2012. Evaluation of the sensitivity and specificity of bovine tuberculosis diagnostic tests in naturally infected cattle herds using a Bayesian approach. *Veterinary Microbiology* 155, 38–43. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2011.07.034>

Anonymous, 2006. Working Document on Eradication of Bovine Tuberculosis in the EU.

APHIS USDA, 2009. Bovine tuberculosis, infected cattle detected at slaughter and number of affected cattle herds, United States, 2003-2009.

Annot, L.F., Michel, A., 2020. Challenges for controlling bovine tuberculosis in South Africa. *Journal of Veterinary Research*. <https://doi.org/10.4102/ojvr.v87i1.1690>

Ayele, W.Y., Neill, S.D., Zinsstag, J., Weiss, M.G., Pavlik, I., 2004. Bovine tuberculosis: an old disease but a new threat to Africa, *The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease* 8 (8), 924-937.

Aylate, A., Shah, S.N., Aleme, H., Gizaw, T.T., 2013. Bovine tuberculosis: Prevalence and diagnostic efficacy of routine meat inspection procedure in Woldiya municipality abattoir north Wollo zone, Ethiopia. *Tropical Animal Health and Production* 45, 855–864. <https://doi.org/10.1007/s11250-012-0298-7>

Bernitz, N., Kerr, T.J., Goosen, W.J., Chileshe, J., Higgitt, R.L., Roos, E.O., Meiring, C., Gumbo, R., de Waal, C., Clarke, C., Smith, K., Goldswain, S., Sylvester, T.T., Kleynhans, L., Dippenaar, A., Buss, P.E., Cooper, D. V., Lyashchenko, K.P., Warren, R.M., van Helden, P.D., Parsons, S.D.C., Miller, M.A., 2021. Review of Diagnostic Tests for Detection of *Mycobacterium bovis* Infection in South African Wildlife. *Frontiers in Veterinary Science*. <https://doi.org/10.3389/fvets.2021.588697>

Bezos, J., Casal, C., Romero, B., Schroeder, B., Hardegger, R., Raeber, A.J., López, L., Rueda, P., Domínguez, L., 2014. Current ante-mortem techniques for diagnosis of bovine tuberculosis. *Research in Veterinary Science*. Oct;97 Suppl:S44-52 <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2014.04.002>

Borham, M., Oreiby, A., El-Gedawy, A., Hegazy, Y., Khalifa, H.O., Al-Gaabary, M., Matsumoto, T., 2022. Review on Bovine Tuberculosis: An Emerging Disease Associated with Multidrug-Resistant Mycobacterium Species. *Pathogens* 2022, 11, 715 <https://doi.org/10.3390/pathogens11070715>

Caraguel, C.G.B., Colling, A., 2021. Diagnostic likelihood ratio – the next generation of diagnostic test accuracy measurement. *OIE Revue Scientifique et Technique* 40, 299–309. <https://doi.org/10.20506/rst.40.1.3226>

Casal, C., Díez-Guerrier, A., Álvarez, J., Rodríguez-Campos, S., Mateos, A., Linscott, R., Martel, E., Lawrence, J.C., Whelan, C., Clarke, J., O'Brien, A., Domínguez, L., Aranaz, A., 2014. Strategic use of serology for the diagnosis of bovine tuberculosis after intradermal skin testing. *Veterinary Microbiology* 170, 342–351. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2014.02.036>

Commision, 2019. Commission implementing Regulation 627/2019 of 15 March 2019 laying down uniform practical arrangements for the performance of official controls on products of animal origin intended for human consumption in accordance with Regulation (EU) 2017/625 of the European Parliament and of the Council and amending Commission Regulation (EC) No 2074/2005 as regards official controls.

Corner, A., Trajstman, A.C., 1988. Mycobacterium boris from Bovine Lesions, *Veterinary Microbiology*.

Corner, L.A.L., Gormley, E., Pfeiffer, D.U., 2012. Primary isolation of Mycobacterium bovis from bovine tissues: Conditions for maximising the number of positive cultures. *Veterinary Microbiology* 156, 162–171. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2011.10.016>

Costa, P., Amaro, A., Ferreira, A.S., Machado, D., Albuquerque, T., Couto, I., Botelho, A., Viveiros, M., Inácio, J., 2014. Rapid identification of veterinary-relevant Mycobacterium tuberculosis complex species using 16S rDNA, IS6110 and Regions of Difference-targeted dual-labelled hydrolysis probes. *Journal of Microbiological Methods* 107, 13–22 <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2014.08.017>

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. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0090334>

de la Rua-Domenech, R., Goodchild, A.T., Vordermeier, H.M., Hewinson, R.G., Christiansen, K.H., Clifton-Hadley, R.S., 2006. Ante mortem diagnosis of tuberculosis in cattle: A review of the

tuberculin tests,  $\gamma$ -interferon assay and other ancillary diagnostic techniques. *Research in Veterinary Science*. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2005.11.005>

Diallo, M., Diarra, B., Sanogo, M., Togo, A.C.G., Somboro, A.M., Diallo, M.H., Traoré, B., Maiga, M., Koné, Y., Tounkara, K., Sarro, Y. dit S., Baya, B., Goita, D., Kassambara, H., Dembélé, B.P.P., Siddiqui, S., Murphy, R.L., Dao, S., Diallo, S., Tounkara, A., Niang, M., 2016. Molecular identification of *Mycobacterium bovis* from cattle and human host in Mali: Expanded genetic diversity. *BMC Veterinary Research* (2016) 12, 145. <https://doi.org/10.1186/s12917-016-0768-7>

Dibaba, A.B., Kriek, N.P.J., Thoen Editors, C.O., 2019. *Tuberculosis in Animals: An African Perspective*.

Domingo, M., Vidal, E., Marco, A., 2014. Pathology of bovine tuberculosis. *Research in Veterinary Science* 97, S20–S29. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2014.03.017>

Dujardin, B., Van Den Ende, J., Van Gompel, A., Unger, J.-P., Van Der Stuyft, P., 1994. Likelihood ratios: A real improvement for clinical decision making?, *European Journal of Epidemiology* 10, 29-36.

EFSA ECDC, 2018. The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2017. *EFSA Journal* 16. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2018.5500>

Elsohaby, I., Alahadeb, J.I., Mahmmod, Y.S., Mweu, M.M., Ahmed, H.A., El-Diasty, M.M., Elgedawy, A.A., Mahrous, E., El Hofy, F.I., 2021. Bayesian estimation of diagnostic accuracy of three diagnostic tests for bovine tuberculosis in egyptian dairy cattle using latent class models. *Veterinary Science* 8. <https://doi.org/10.3390/vetsci8110246>

Garcia-Saenz, A., Napp, S., Lopez, S., Casal, J., Allepuz, A., 2015. Estimation of the individual slaughterhouse surveillance sensitivity for bovine tuberculosis in Catalonia (North-Eastern Spain). *Preventive Veterinary Medicine*, 121, 332–337. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2015.08.008>

Gortázar, C., Delahay, R.J., Mcdonald, R.A., Boadella, M., Wilson, G.J., Gavier-Widen, D., Acevedo, P., 2012. The status of tuberculosis in European wild mammals. *Mammal Review*. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2907.2011.00191.x>

Gov UK, 2023. TB in cattle in Great Britain - headline statistical dataset.

Grimes, D A, Schulz, F., Grimes, David A, Schulz, K.F., 2005. Epidemiology 3 Refining clinical diagnosis with likelihood ratios. *Lancet*. 2005 Apr 23-29;365(9469):1500-5. doi: 10.1016/S0140-6736(05)66422-7..

Inlamea, O.F., Soares, P., Ikuta, C.Y., Heinemann, M.B., Achá, S.J., Machado, A., Neto, J.S.F., Correia-Neves, M., Rito, T., 2020. Evolutionary analysis of *Mycobacterium bovis* genotypes across Africa suggests co-evolution with livestock and humans. *PLoS Neglected Tropical Diseases* 14 (3), e0008081. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0008081>

Kasir, D., Osman, N., Awik, A., El Ratel, I., Rafei, R., Al Kassaa, I., El Safadi, D., Salma, R., El Omari, K., Cummings, K.J., Kassem, I.I., Osman, M., 2023. Zoonotic Tuberculosis: A Neglected Disease in the Middle East and North Africa (MENA) Region. *Diseases* 1023, 11 (1), 39. <https://doi.org/10.3390/diseases11010039>

Kemal, J., Sibhat, B., Abraham, A., Terefe, Y., Tulu, K.T., Welay, K., Getahun, N., 2019. Bovine tuberculosis in eastern Ethiopia: Prevalence, risk factors and its public health importance. *BMC Infectious Diseases* 19, 39. <https://doi.org/10.1186/s12879-018-3628-1>

Lahuerta-Marin, A., Milne, M.G., McNair, J., Skuce, R.A., McBride, S.H., Menzies, F.D., McDowell, S.J.W., Byrne, A.W., Handel, I.G., de, B.M., 2018. Bayesian latent class estimation of sensitivity and specificity parameters of diagnostic tests for bovine tuberculosis in chronically infected herds in Northern Ireland. *Veterinary Journal* 238, 15–21. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2018.04.019>

Larenas-Muñoz, F., Sánchez-Carvajal, J.M., Galán-Relaño, Á., Ruedas-Torres, I., Vera-Salmoral, E., Gómez-Gascón, L., Maldonado, A., Carrasco, L., Tarradas, C., Luque, I., Rodríguez-Gómez, I.M., Gómez-Laguna, J., 2022. The Role of Histopathology as a Complementary Diagnostic Tool in the Monitoring of Bovine Tuberculosis. *Frontiers Veterinary Science* 9.. <https://doi.org/10.3389/fvets.2022.816190>

Lorente-Leal, V., Liandris, E., Castellanos, E., Bezos, J., Domínguez, 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. *Frontiers Veterinary Science* 6. <https://doi.org/10.3389/fvets.2019.00061>

Malama, S., Muma, J.B., Godfroid, J., 2013. A review of tuberculosis at the wildlife-livestock-human interface in Zambia. *Infectious Diseases of Poverty*. <https://doi.org/10.1186/2049-9957-2-13>

MAPA, 2023. Programa nacional de erradicación de tuberculosis bovina 2023 (Infección por el complejo *Mycobacterium tuberculosis*).

MAPA, 2022. Programa nacional de erradicación de tuberculosis bovina 2022 (Infección por el complejo *Mycobacterium tuberculosis*).

Monaghan A', M.L., Doherty, M.L., Collins, J.D., Kazda, J.F., Quinn, P.J., 1994. The tuberculin test, *Veterinary Microbiology*.

Nuru, A., Zewude, A., Mohammed, T., Wondale, B., Teshome, L., Getahun, M., Mamo, G., Medhin, G., Pieper, R., Ameni, G., 2017. Nontuberculosis mycobacteria are the major causes of tuberculosis like lesions in cattle slaughtered at Bahir Dar Abattoir, northwestern Ethiopia. *BMC Veterinary Research* 13. <https://doi.org/10.1186/s12917-017-1168-3>

O'Hagan, M.J.H., Ni, H., Menzies, F.D., Pascual-Linaza, A. V., Georgaki, A., Stegeman, J.A., 2019. Test characteristics of the tuberculin skin test and post-mortem examination for bovine tuberculosis diagnosis in cattle in Northern Ireland estimated by Bayesian latent class analysis with adjustments for covariates. *Epidemiology and Infection* 147, 1–8.. <https://doi.org/10.1017/S0950268819000888>

Okeke, L.A., Fawole, O., Muhammad, M., Okeke, I.O., Nguku, P., Wasswa, P., Dairo, D., Cadmus, S., 2016. Bovine tuberculosis: a retrospective study at Jos abattoir, Plateau State, Nigeria. *Pan African Medical Journal* 25, 202 <https://doi.org/10.11604/pamj.2016.25.202.5669>

Olea-Popelka, F., Freeman, Z., White, P., Costello, E., O'Keeffe, J., Frankena, K., Martin, W., More, S., 2012. Relative effectiveness of Irish factories in the surveillance of slaughtered cattle for visible lesions of tuberculosis, 2005-2007. *Irish Veterinary Journal* 65. <https://doi.org/10.1186/2046-0481-65-2>

Palmer, M. V., Kanipe, C., Boggiatto, P.M., 2022. The Bovine Tuberculoid Granuloma. *Pathogens*. <https://doi.org/10.3390/pathogens11010061>

Pollock, J.M., Neill, S.D., 2002. *Mycobacterium bovis* infection and tuberculosis in cattle. *Veterinary Journal*. <https://doi.org/10.1053/tvj.2001.0655>

Pozo, P., Cardenas, N.C., Bezos, J., Romero, B., Grau, A., Nacar, J., Saez, J.L., Minguez, O., Alvarez, J., 2021. Evaluation of the performance of slaughterhouse surveillance for bovine tuberculosis detection in Castilla y Leon, Spain. *Preventive Veterinary Medicine* 189. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2021.105307>

Prabhakar, S., Mishra, A., Singhal, A., Katoch, V.M., Thakral, S.S., Tyagi, J.S., Prasad, H.K., 2004. Use of the hupB gene encoding a histone-like protein of *Mycobacterium tuberculosis* as a target for detection and differentiation of *M. tuberculosis* and *M. bovis*. *Journal of Clinical Microbiology* 42, 2724–2732 <https://doi.org/10.1128/JCM.42.6.2724-2732.2004>

Pucken, V.B., Knubben-Schweizer, G., Döpfer, D., Groll, A., Hafner-Marx, A., Hörmansdorfer, S., Sauter-Louis, C., Straubinger, R.K., Zimmermann, P., Hartnack, S., 2017. Evaluating diagnostic

tests for bovine tuberculosis in the southern part of Germany: A latent class analysis. PLoS One 12. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0179847>

Ramos, D.F., Silva, P.E.A., Dellagostin, O.A., 2015. Diagnosis of bovine tuberculosis: review of main techniques. Brazilian Journal of Biology 75, 830–837. <https://doi.org/10.1590/1519-6984.23613>

Refaya, A.K., Bhargavi, G., Mathew, N.C., Rajendran, A., Krishnamoorthy, R., Swaminathan, S., Palaniyandi, K., 2020. A review on bovine tuberculosis in India. Tuberculosis. <https://doi.org/10.1016/j.tube.2020.101923>

Reid, T., Singanallur, N.B., Newberry, K., Waugh, C., Bowden, T., Colling, A. 2021. Validation of diagnostic tests for infectious diseases: challenges and opportunities. International Symposium on Sustainable Animal Production and Health Current Status and Way Forward. 28 June–2 July 2021, Joint FAO/IAEA Centre.

Sackett D, 2001. Diagnóstico y cribado. Medicina Basada en la Evidencia. Cómo practicar y enseñar la MBE 62–68.

Sánchez-Carvajal, J.M., Galán-Relaño, Á., Ruedas-Torres, I., Jurado-Martos, F., Larenas-Muñoz, F., Vera, E., Gómez-Gascón, L., Cardoso-Toset, F., Rodríguez-Gómez, I.M., Maldonado, A., Carrasco, L., Tarradas, C., Gómez-Laguna, J., Luque, I., 2021. Real-Time PCR Validation for Mycobacterium tuberculosis Complex Detection Targeting IS6110 Directly From Bovine Lymph Nodes. Frontiers in Veterinary Science 8. <https://doi.org/10.3389/fvets.2021.643111>

Schiller, I., Oesch, B., Vordermeier, H.M., Palmer, M. V., Harris, B.N., Orloski, K.A., Buddle, B.M., Thacker, T.C., Lyashchenko, K.P., Waters, W.R., 2010. Bovine tuberculosis: A review of current and emerging diagnostic techniques in view of their relevance for disease control and eradication. Transboundary and Emerging Diseases. <https://doi.org/10.1111/j.1865-1682.2010.01148.x>

Thierry, D., Brisson-noël, A., Vincent-lévy-frébault, V., Nguyen, S., Guesdon, J., Gicquel, B., 1990. Characterization of a Mycobacterium tuberculosis Insertion Sequence, IS6110, and Its Application in Diagnosis, Journal of Clinical Microbiology.

Varello, K., Pezzolato, M., Mascarino, D., Ingravalle, F., Caramelli, M., Bozzetta, E., 2008. Comparison of histologic techniques for the diagnosis of bovine tuberculosis in the framework of eradication programs. Journal of Veterinary Diagnostic Investigation. 2008 Mar;20(2):164-9

Vera-Salmoral, E., Gómez-Laguna, J., Galán-Relaño, Á., Ruedas-Torres, I., Carrasco, L., Luque, I., Huerta, B., Sánchez-Carvajal, J.M., 2023. Optimization of real-time PCR protocols from lymph

node bovine tissue for direct detection of Mycobacterium tuberculosis complex. Microbiology Spectrum <https://doi.org/10.1128/spectrum.00348-23>

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

WOAH, 2018a. Mammalian tuberculosis (Infection with Mycobacterium tuberculosis complex). Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals.

WOAH, 2018b. Principles and methods of validation of diagnostic assays for infectious diseases. Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals 72–86.

Woldemariam, F.T., Markos, T., Shegu, D., Abdi, K.D., Paeshuyse, J., 2021. Evaluation of postmortem inspection procedures to diagnose bovine tuberculosis at debre birhan municipal abattoir. Animals 2021 Sep 7;11(9):2620. <https://doi.org/10.3390/ani11092620>





## **Estudio IV.**

### **Droplet digital PCR (ddPCR) as alternative to microbiological culture for *Mycobacterium tuberculosis* complex detection in bovine lymph node tissue samples**

José María Sánchez-Carvajal, Eduardo Vera-Salmoral, Belén Huerta Lorenzo, Ángela Galán-Relaño, Inés Ruedas-Torres, Fernanda Larenas Muñoz, Inmaculada Luque Librado Carrasco  
Jaime Gómez-Laguna

En revisión en *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*

**Objetivo 4:** Optimización y validación analítica y diagnóstica de la PCR digital para la detección del complejo *Mycobacterium tuberculosis* en muestras de tejido fresco de bovino con la sonda IS6110.



**Droplet digital PCR (ddPCR) as alternative to microbiological culture for *Mycobacterium tuberculosis* complex detection in bovine lymph node tissue samples**

José María Sánchez-Carvajal<sup>a,\*</sup>, Eduardo Vera-Salmoral<sup>a,b</sup>, Belén Huerta Lorenzo<sup>b,\*</sup>, Ángela Galán-Relaño<sup>b</sup>, Inés Ruedas-Torres<sup>a,c</sup>, Fernanda Larenas Muñoz<sup>a</sup>, Inmaculada Luque<sup>b</sup>, Librado Carrasco<sup>a</sup>, Jaime Gómez-Laguna<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Department of Anatomy and Comparative Pathology and Toxicology, Pathology and Immunology Group (UCO-PIG), UIC Zoonosis y Enfermedades Emergentes ENZOEM, University of Córdoba, International Excellence Agrifood Campus 'Ceia3', 14014 Córdoba, Spain

<sup>b</sup> Department of Animal Health, UIC Zoonosis y Enfermedades Emergentes ENZOEM, University of Córdoba, International Excellence Agrifood Campus 'Ceia3', University of Córdoba, 14014, Córdoba, Spain

<sup>c</sup> UK Health Security Agency (UKHSA), Porton Down, Salisbury SP4 0JG, United Kingdom

\*Corresponding author at:

E-mail address: v42sancj@uco.es (José María Sánchez-Carvajal)

sa2hulob@uco.es (Belén Huerta Lorenzo)

**Abstract**

Bovine tuberculosis (bTB) caused by *Mycobacterium tuberculosis* complex (MTC) remains a significant concern for public health. Direct real-time PCR and droplet digital PCR (ddPCR) are proposed as alternative tools to enhance diagnostic precision and efficiency. This study aims to assess the diagnostic performance of a ddPCR assay targeting IS6110 for the detection of MTC DNA in both microbiological culture and fresh lymph node (LN) tissue samples obtained from cattle, in comparison with the established reference standard, the microbiological culture followed by real-time PCR. The fresh LNs (N=100) were collected each from a different cattle carcass at the slaughterhouse. The limit of detection of ddPCR-IS6110 was set to 10<sup>1</sup> copies per 20 µl reaction. DdPCR-IS6110 detected 44 out of 49 reference-standard positive samples and yielded negative results in 47 out of 51 reference-standard negative samples, resulting in adjusted sensitivity (SE) and specificity (SP) of 90.76% [95% confidence interval (CI): 82.58 - 98.96%], and 100% (95% CI: 100%) respectively. The estimated adjusted false negative rate (FNR) was 9.23% (95% CI: 1.04 - 17.42%) and the false positive rate (FPR) was 0% (95% CI: 0%). When directly applied from fresh bovine LN tissues, ddPCR-IS6110 identified 47 out of 49 reference-standard positive samples as ddPCR-IS6110-positive and 42 out of 51 reference-

standard negative samples as ddPCR-IS6110-negative, resulting in adjusted SE and SP values of 94.80% [95% (CI): 88.52 - 100%] and 100% (95% CI: 100%), respectively. The adjusted FNR was 5.20% (95% CI: 0 - 11.50%) and the FPR was 0% (95% CI: 0%). Noteworthy, ddPCR-IS6110 disclosed as positive 9 samples negative to reference-standard. DdPCR-IS6110 proved to be a rapid, highly sensitive, and specific diagnostic tool as an alternative to reference-standard method.

**Keywords:** droplet digital PCR, bovine tuberculosis, *Mycobacterium tuberculosis* complex, molecular diagnosis, IS6110, lymph node

## 1. Introduction

Bovine tuberculosis (bTB) is caused by bacteria belonging to *Mycobacterium tuberculosis* complex (MTC), mainly *M. bovis* and *M. caprae* (Aranaz et al., 2004; Domingo et al., 2014). bTB is still a zoonoses of major concern for public health, especially in developing countries (Dean et al. 2018). In the European Union (UE), even though the eradication is the main goal, this disease is still present in dairy and beef herds (MAPA, 2022). Current European approved surveillance systems are based on detection of a specific cellular immune reaction by single or comparative intradermal tuberculin testing (SIT or SCIT) and interferon gamma release assays (IFN- $\gamma$ ), followed by compulsory slaughter of reactor animals as well as post-mortem confirmation. Furthermore, this program includes abattoir surveillance for undetected bTB-infected animals, regular retesting and culling of infected animals and restrictions on the movement of livestock to prevent introduction of infected animals (UE, 2020).

These approaches have simplified the diagnosis of MTC-infected cattle at the early stage of the disease (de la Rua-Domenech et al., 2005), therefore, animals with clinical signs or gross tuberculosis-like lesions (TBL) are lack or rarely found at the slaughterhouse (de la Rua-Domenech et al., 2005; Ramos et al., 2015; Pozo et al., 2021). This success of surveillance systems has challenged the traditional examination of atypical or enlarged lymph nodes (LNs) or parenchymatous organs with gross TBLs, and/or culture of MTC in primary isolation medium followed by real-time PCR. In this scenario, several factors could play a role in hindering the eradication of bTB. One of the most relevant drawbacks is the poor diagnostic performance reported for the current diagnostic tools. As a consequence, truly infected animals are misclassified as bTB-free, which contribute to maintaining the chain of infection on the farm, but also in sharing pasture areas.

In order to make the diagnostic and confirmation procedure for bTB more reliable and swifter, several diagnostic tools have been proposed as alternatives to the reference standard

(microbiological culture followed by confirmation by real-time PCR), which is considered an imperfect reference technique taking up to three months to obtain a confirmatory result (Courcoul et al., 2014; Lorente-Leal et al., 2021; Sánchez-Carvajal et al., 2021). Direct real-time PCR from tissue samples has been reported to be a potential first-line technique for the detection of MTC species in animal tissues worldwide (Courcoul et al., 2014; Wang et al., 2019; Lorente-Leal et al., 2019; Lorente-Leal et al., 2021; Sánchez-Carvajal et al., 2021). Nevertheless, although direct real-time PCR seems to be a simple, rapid and robust alternative to microbiological culture, PCR results could be affected mainly by the characteristics of the lesion (necrosis, calcification or fibrosis), a low mycobacterial load, the DNA isolation procedure and the presence of inhibitors (Lorente-Leal et al., 2019; Sánchez-Carvajal et al., 2021).

These limiting factors could be overcome by other molecular tools such as droplet digital PCR (ddPCR). The ddPCR is an emerging PCR assay, based on water–oil emulsion droplet technology, which have been described in several medical fields in recent years, including diagnosis of several infectious pathogens, DNA methylation determination, gene expression, and gene mutation analysis (Strain et al., 2013; Larsson & Helenius, 2017). Each sample is partitioned into approximately 20,000 droplets before being subjected to the PCR and, therefore, each droplet could contain one target molecule or none. This is a substantial advantage compared to real-time PCR, since ddPCR has been reported to be less sensitive to inhibitors due to sample partitioning (Dingle et al. 2013; Yang et al. 2014). Another key argument to bear in mind is that ddPCR is more sensitive and accurate than real-time PCR, especially in the case of low-copy acid nucleic (Devonshier et al., 2015; Yang et al., 2017; Nyaruaba et al., 2020). This technology has been already reported for the detection of *Mycobacterium tuberculosis* in human samples (Devonshier et al., 2015; Cao et al., 2020; Nyaruaba et al., 2020) or recently, for the detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* DNA in whole-blood and faecal samples from cattle (Badia-Bringué et al., 2022). However, ddPCR capability to detect MTC in fresh bovine tissue samples has not been yet evaluated. Thus, the primary aim of this research was to assess the diagnostic performance of a ddPCR assay targeting IS6110 for the rapid and sensitive detection of MTC DNA in both microbiological culture and fresh LN tissue samples obtained from cattle, in comparison with the established reference standard.

## 2. Materials and methods

### 2.1 Samples selection and processing

This study was part of a larger project focused on developing rapid and accurate diagnostic tools in the current framework of bTB surveillance and control programs. LN tissue samples (N=100) were collected each from a different cattle carcass at the slaughterhouse from 2018 to 2019 in the context of Spanish bTB eradication program. All samples were collected during routine post-mortem veterinary examination within an official context and according with national and European regulations. No purpose killing of animals was performed for this study, so no ethical or farmer's consent approval was required.

LNs were independently sliced to confirm the presence of visible TBLs (N=19) or no visible lesions (NVLs) (N=81) and fixed in 10% neutral-buffered formalin for the histopathological analysis. Each LN was then individually homogenized using a tissue homogenizer (Fisherbrand, Fisher Scientific, Madrid, Spain) to obtain a uniform mixture. Tissue homogenate was divided into paired samples that were used for DNA isolation and selective microbiological culture.

For histopathological evaluation, formalin fixed LNs were processed and embedded in paraffin following standard procedures. Four-micron sections were stained with haematoxylin-eosin (H&E) and Ziehl-Neelsen (ZN). Histopathological findings were classified as TBLs for those samples with a tuberculous granuloma, pyogranuloma, or scattered Langhans-type multinucleated giant cells (MNGCs), or as no histopathological lesion (NHLs), for the tissue with normal histological characteristics and no lesion compatible with TBL (Larenas-Muñoz et al., 2022). In addition, Ziehl-Neelsen (ZN) technique was performed to detect acid-fast bacilli. A sample was considered positive for ZN when one or more AFB were found in at least one high-power field magnification (HPF, 100x).

For the reference standard (microbiological culture followed by real-time PCR-IS6110), tissue homogenates were decontaminated with an equal volume of 0.75% (w/v: 1/1) hexadecyl pyridinium chloride solution in agitation for 30 min. Samples were centrifuged for 30 min at  $1,500 \times g$ . The pellets were collected with swabs and cultured in liquid media (MGIT™ 960, Becton Dickinson, Madrid, Spain) using an automatized BD Bacter™ MGIT™ System (Becton Dickinson) (Corner et al., 1988). DNA extraction was performed using the MagMAX Total Nucleic Acid Isolation Kit according to the manufacturer's instructions (Thermo Fisher Scientific, Lissieu, France). DNA was eluted in 50 µl. Then, cultures were considered positive when isolates were confirmed as MTC using real-time PCR (Thierry et al., 1990). The cut-off value of real-time PCR-IS6110 assay was set at 10 to 100 genomic equivalents, and the

cut-off set at  $Ct \leq 38$  (10 to 100 genomic equivalents /15  $\mu$ L reaction mixture) (Sánchez-Carvajal et al., 2021).

## 2.2 DNA isolation from microbiological culture and LNs

Genomic DNA isolation was conducted from tissue homogenate according to Lorente-Leal et al., 2019 with several modifications using NucleoSpin Tissue Kit® (Macherey-Nagel, Düren, Germany). In brief, 1 mL of homogenized tissue was centrifuged during 5 min at 9,000  $g$ . The supernatant was discarded, and the resulting tissue pellet was added in a tube together with 250  $\mu$ l of Sample Buffer T1, 150 mg of 0.5-mm glass beads and 50 mg of 0.1-mm glass beads. Then, samples were subjected to mechanical disruption (SI™ Disruptor Genie™, Scientific Industries, New York, USA) (2,850 rpm/50 Hz/20 min). After an overnight enzymatic digestion at 56 °C with 30  $\mu$ l proteinase K in a thermo-shaker (600 rpm/12 h), a new mechanical disruption step was conducted. Samples were centrifuged 2 min at 9,000  $g$ , and pellets were again subjected to the steps described above. Then, samples were mixed with 200  $\mu$ l of buffer T3, incubating the mixture for 10 min at 70 °C. The lysate was transferred to a silica-based nucleic acid purification column and managed according to manufacturer's instructions. Isolated DNA samples were stored at -20 °C until used in downstream PCR assays. Positive and negative extraction controls were included.

## 2.3 Primers and probe targeting IS6110

Specific primers and probe were based on the homology region of the partial insertion sequence 6110 (IS6110), a repetitive mobile element specific for all the pathogens belonging to MTC widely used to diagnose and genotype this pathogen. The fluorogenic IS6110-probe was labelled with a fluorescent reporter dye [6-carboxyfluorescein (FAM)] at the 5'-end and a 3'-Black Hole Quencher 1 (BHQ1). Primers and probe used for real-time PCR and ddPCR are listed in Table 16 (Lorente-Leal et al., 2021; Sánchez-Carvajal et al., 2021).

**Table 16.** Sequences of MTC specific primers and TaqMan probe targeting IS6110 for real-time PCR and droplet digital PCR (ddPCR) assays.

Target	Forward primer (5'-3')	Reverse primer (5'-3')	Probe (5'-3')	Amplicon (bps)
IS6110	GGTAGCAGACCTCACCTATGTGT	AGGCGTCGGTGACAAAGG	5'-6FAM-ACGTAGGCGAACCC-BHQ1-3'	68



#### **2.4 Real-time PCR targeting IS6110**

QuantiFast® Pathogen PCR + IC Kit (QIAGEN, Hilden, Germany) was used to conduct the real-time PCR-IS6110 evaluating each sample in duplicate in the MyiQ™2 Two-Color real-time PCR Detection System (Bio-Rad, Hercules, Ca, USA) under the following cycling conditions: 95 °C for 5 min to activate the DNA polymerase followed by 42 amplification cycles that consisted of a denaturation step at 95 °C for 15 s, an annealing-extension step at 60 °C for 30 s. Following manufacturer's guidelines, an exogenous inhibition heterologous control (internal amplification control, IAC) supplied with the kit was included. An inter-run calibrator with a known quantification cycle (Ct) value of 32 was introduced in each assay to self-control intra-assay. Complete inhibition of amplification was considered when IAC did not amplify and partial inhibition when it showed a Ct > 33. The analytical sensitivity or limit of detection (LOD) was estimated for the proposed primers and probes. LOD is defined as the lowest concentration in which 95% of replicates were positive, according to the Clinical and Laboratory Standard Institute guidelines. A serial 10-fold dilution series of *M. bovis* genomic DNA with known quantities ranging from 10<sup>6</sup> to 10<sup>0</sup> were used. The reactions were performed in triplicate for each dilution in three different assays. Thus, the LOD was determined to be ranging from 10 to 100 genomic equivalents, and the cut-off was established at Ct < 38 (Sánchez-Carvajal et al., 2019).

#### **2.5 ddPCR targeting IS6110 for MTC detection in microbiological culture and LNs**

For ddPCR assay targeting IS6110, QX200™ ddPCR™ Supermix for probe (No dUTP) (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) was used according to Bio-Rad ddPCR system guidelines. Each sample was evaluated in duplicate in a reaction mix with a final volume of 21 µl as follows: 10.5 µl of 1x ddPCR Supermix for probe (No dUTP), 1.7 µl of IS6110-forward (900 nM), 0.85 µl of IS6110-reverse (600 nM), 0.65 µl of IS6110-probe (FAM-labelled, 200 mM), 3 µl of template, and 4.3 µl of nuclease-free water. It is important to mention that several protocols for ddPCR recommend performing a restriction digestion of DNA samples outside the amplicon in order to make the template more accessible reducing sample viscosity. Nevertheless, we decided to not use restriction enzymes due to the extraction protocol herein reported got an efficient reduction of host DNA ranging from 50 – 100 ng/µl. Afterwards, the droplets were generated on the QX200 Droplet Generator (Bio-Rad, USA) using 70 µl of droplet generation oil for Probes® (Bio-Rad, USA) dispatched into the bottom of the oil wells of the DG8™ Cartridge droplet generator (Bio-rad, USA) according to the manufacturer's instructions. The droplets were carefully transferred to a specific 96-well ddPCR reaction plate (Bio-Rad, USA) using a RAININ Pipet-Lite Multi Pipette (Mettler Toledo, Columbus, Ohio, USA). After heat sealing by PX1™ PCR Plate Sealer (Bio-Rad, USA) at 180 °C for 5 s, amplifications were run in the C1000 Touch thermal cycler (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) under the

following cycling conditions: 95 °C for 10 min, followed by 40 cycles of 94 °C for 30 s and 60 °C (annealing/extension) for 1 min, and finally 98 °C for 10 min. The temperature ramping rate was set at 2 °C/s. Thereafter, the droplets were stored in darkness at 4 °C for 12 h.

### **2.6 Limit of detection and limit of blank of ddPCR targeting IS6110 assay**

The limit of detection (LOD) was determined to be the lowest concentration of IS6110 copies at which detection is possible (Armbruster, 2008). LOD for ddPCR-IS6110 was determined by measuring three concentrations around LOD. Reactions were run in triplicates for each concentration (*M. bovis* genomic DNA with known quantities ranging from  $10^4$  to  $10^0$ ), and LOD was defined as the lowest concentration in which 95% of replicates were positive according to the Clinical and Laboratory Standards Institute guidelines. The limit of blank (LOB) was defined as the highest number of IS6110 copies found in 12 blank samples (Armbruster, 2008).

### **2.7 ddPCR targeting IS6110 data analysis**

The QX200 Droplet Reader (Bio-Rad, USA) was used to read and count the fluorescent positive and negative droplets. Then, the data were analysed using the QuantaSoft™ Analysis Pro software (version 1.0.596) (Bio-Rad, USA). Data from samples with 12,000 – 16,000 droplets were used for concentration calculations. Samples with a low number of droplets (< 10,000) were excluded from the analysis. According with the results for LOB, those samples with fewer than two positive droplets were considered “MTC-negative”, in contrast, samples were considered as “MTC-positive” when more than two droplets were found (Whale et al., 2020). Thus, the cut-off value of ddPCR-IS6110 assay was set at 3 positive droplets in 20 µL reaction mixture.

### **2.8 Statistical analysis**

The diagnostic performance of ddPCR targeting IS6110 was evaluated for the detection of MTC in microbiological culture and fresh LN tissue samples. The diagnostic accuracy was compared with microbiological culture as the reference standard, considered as an imperfect reference technique for bTB diagnosis (Corner et al., 1988; Courcoul et al., 2014; Pucken et al., 2017). The adjusted sensitivity and specificity, false positive rate, false negative rate, positive likelihood ratio (PLR), and negative likelihood ratio (NLR) were calculated using Epidat 3.1 software. The PLR and NLR were interpreted according to the criteria published by Sackett et al. (2001), where a  $PLR > 10$  or  $NLR < 0.1$  indicates a technique of high diagnostic value that can discriminate between healthy and diseased animals,  $5 < PLR \leq 10$  or  $NLR = 0.1-0.2$  indicates a technique involving moderate changes in probability,  $2 < PLR \leq 5$  or  $0.2 < NLR \leq 0.5$  indicates a technique involving small changes in probability, and  $PLR \leq 2$  and  $NLR > 0.5$  indicates rarely discernible changes. Finally, agreement between microbiological culture and ddPCR from

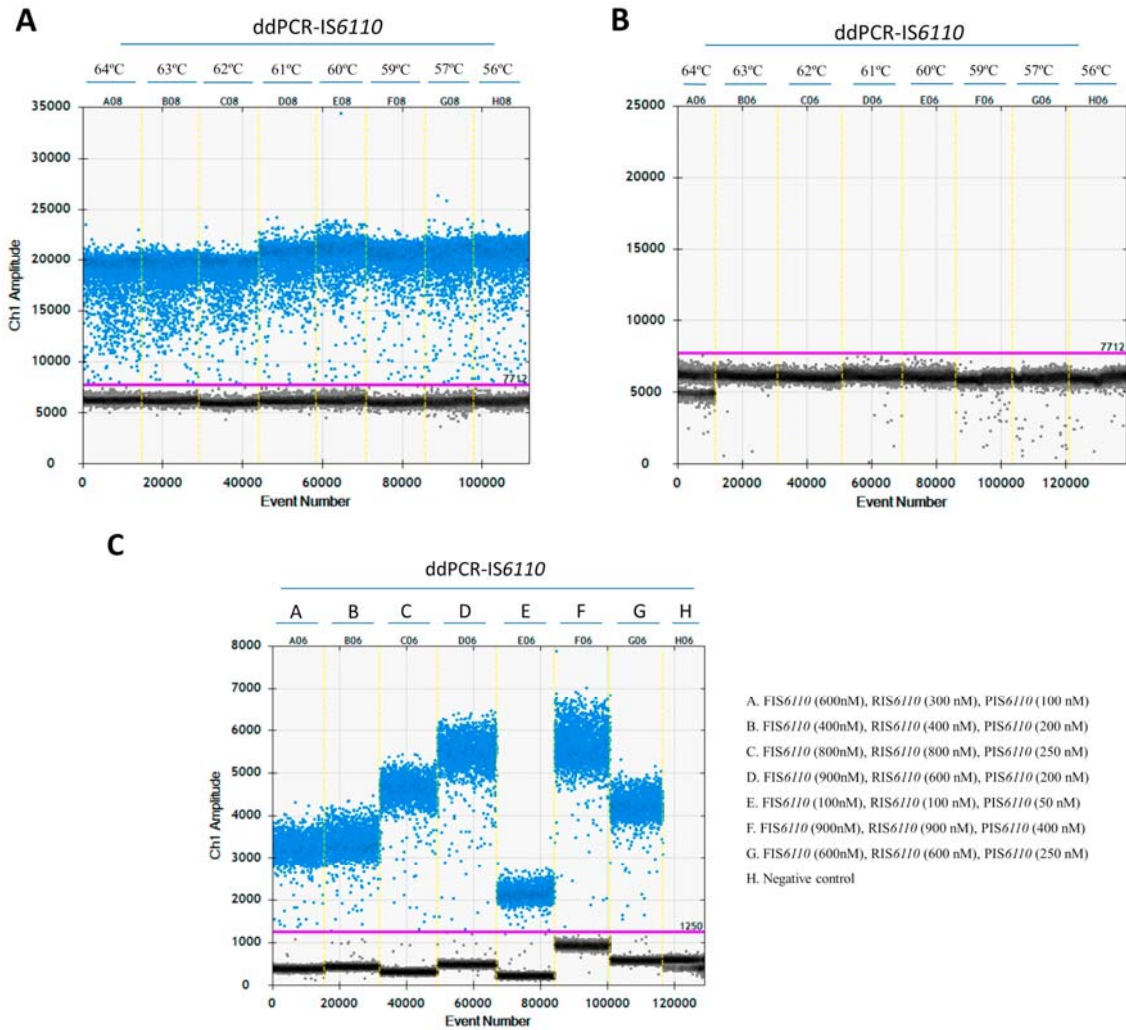
culture, microbiological culture and ddPCR from fresh tissue, and real-time PCR and ddPCR both from fresh tissue was assessed using Cohen's kappa coefficient ( $\kappa$ ):  $\kappa = 0$  indicated no agreement;  $0.01 \leq \kappa \leq 0.20$ , slight agreement;  $0.21 \leq \kappa \leq 0.40$ , fair agreement;  $0.41 \leq \kappa \leq 0.60$ , moderate agreement;  $0.61 \leq \kappa \leq 0.80$ , substantial agreement; and,  $0.81 \leq \kappa \leq 1.00$ , almost perfect agreement (McHugh, 2012) (WinEpi software 2.0, Faculty of Veterinary Medicine, University of Zaragoza, Spain).

### 3. Results

#### 3.1 Optimization of the ddPCR assay targeting IS6110 for DNA isolated from microbiological culture and homogenized fresh tissue LNs

In order to optimize the ddPCR-IS6110 assay, the first step was to determine an optimal annealing temperature, considered as one of the most critical parameters. Thus, we tested a range of annealing temperatures ranging from 56 °C to 64 °C. A total of 50 ng of MTC DNA isolated from a selective microbiological bacterial culture, 900 nM of forward and reverse primers together with 500 nM of probe were used in the assay. No restriction digestion of the DNA samples was performed. A negative template control (NTC) containing sterile water instead of DNA was included. We were able to detect the IS6110 specific region in all the assessed temperatures (Figure 19A), however, the annealing temperature of 60 °C (E08) showed a higher amplitude between positive and negative droplets compared with other temperatures and resulted in less non-specific amplification (rain). No positive droplets were observed in NTC for any of the temperatures (Figure 19B). Therefore, an annealing temperature of 60 °C (E08) (Figure 19A) was selected as ideal temperature for further experiments.

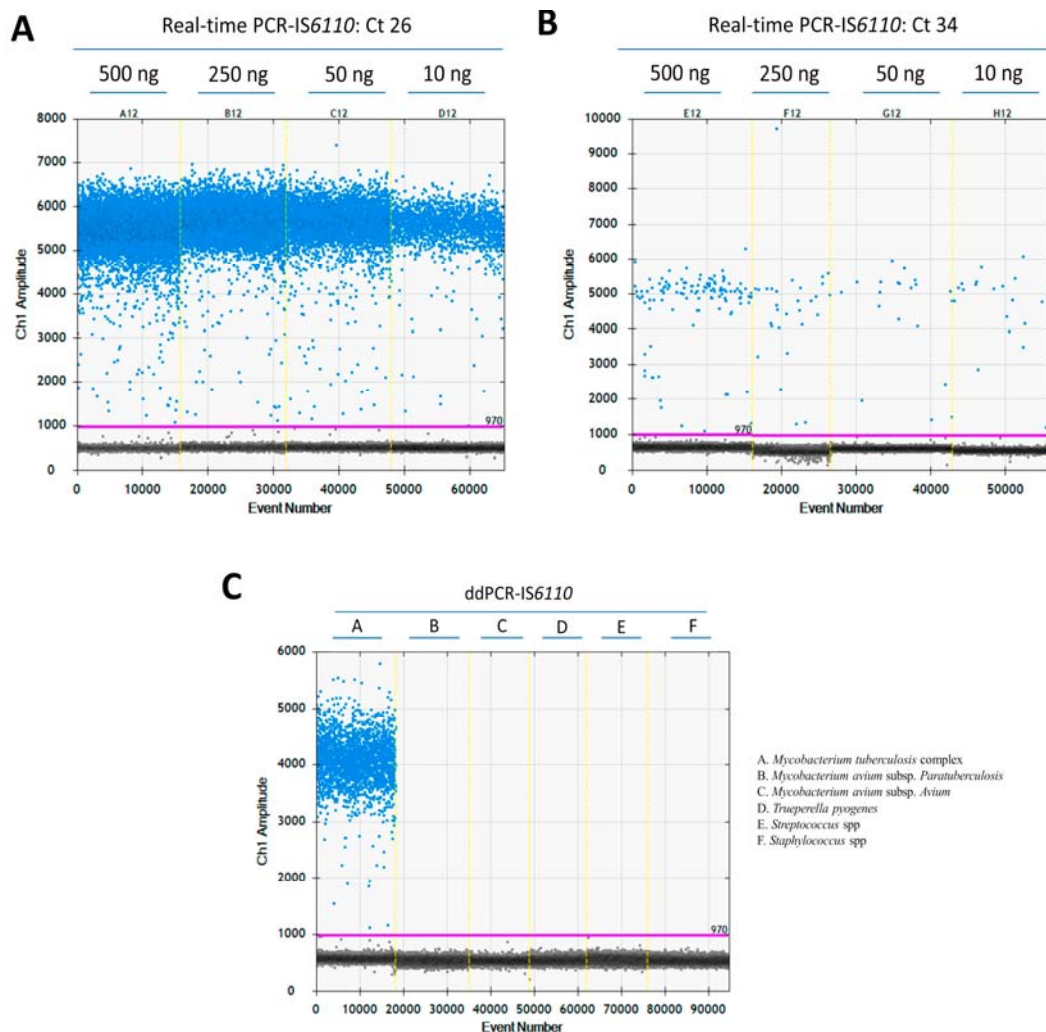
Next step was to determine the optimal primer and probe concentrations for ddPCR-IS6110 assay. Thus, five different concentrations of forward primer (100, 400, 600, 800 and 900 nM), reverse primer (100, 300, 400, 600, 800 and 900 nM) and probe (50, 100, 200, 250 and 400 nM) were tested (Figure 19C). Similarly, as above mentioned, a total of 50 ng of MTC DNA isolated from a selective bacterial culture were used in the assay, with no restriction digestion of DNA samples and inclusion of a NTC with sterile water instead of DNA. Figure 19C showed that the overall fluorescence amplitude of positive droplets increased with primers and probe concentrations. On the other hand, a much better amplitude between positive and negative droplets was observed when we used a concentration of 900 nM for forward, 600 nM for reverse and 200 nM for probe (Figure 19C, D06). This set up of primers and probes were used for further experiments. In the case of microbiological culture, we decided to use a sample concentration of 50 ng of DNA according to the concentration and volume available after DNA extraction.



**Figure 19.** Optimization of the ddPCR-IS6110 assay using *Mycobacterium tuberculosis* complex (MTC) DNA isolated from LN tissue samples. The gradient of annealing temperatures (ranging from 64 °C to 56 °C) for a positive sample (A) and non-template control (NTC) (B) were plotted with positive (blue) and negative (grey) droplets. E08 plotted the optimal temperature of annealing and extension (60 °C). (C) Descending concentrations of primers and probe. D06 plotted the optimal primers and probe concentration assay (F-IS6110 (900nM), R-IS6110 (600 nM), P-IS6110 (200 nM).

In the case of DNA isolated from fresh LN tissue, we were able to test the effect of sample quantity. A ddPCR assay was run using different concentrations of DNA from two different LNs that were IS6110-positive by real-time PCR with different Ct values (500 ng, 250ng, 50 ng and 10 ng) (Figure 20A, Ct = 26; and 2B, Ct = 34). As illustrated in Figure 20A, a good separation between positive and negative droplets was observed at the four DNA concentrations (500 ng, 250ng, 50 ng and 10 ng) for DNA isolated from LN tissue samples. Because Poisson statistics test required enough negative droplets to be applied and calculate DNA concentration, we decided to

use 50 ng (C12) of DNA isolated from tissue samples in further ddPCR assays. Also, this concentration could be a good fit to avoid cross-contamination in the case of samples with a high concentration of bacterial DNA.



**Figure 20.** Optimization of the ddPCR-IS6110 assay using *Mycobacterium tuberculosis* complex (MTC) DNA isolated from LN tissue samples. Descending concentrations of DNA isolated from MTC-positive samples with a Ct value of 26 (A) or 34 (500 ng, 250 ng, 50 ng, and 10 ng) in duplicate (B). Analytical specificity of ddPCR-targeting IS6110 evaluating the most common bacterial agents found in tuberculosis like lesion (*Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*, *Mycobacterium avium* subsp. *avium*, *Trueperella pyogenes*, *Streptococcus suis* and *Staphylococcus* spp.) (C).

### 3.2 Analytical specificity

The analytical specificity of ddPCR-targeting IS6110 was tested against some of the most common microorganisms identified in TBL, such as *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*, *Mycobacterium avium* subsp. *avium*, *Trueperella pyogenes*, *Streptococcus suis*, and

*Staphylococcus* spp. (Cardoso-Toset et al., 2015). All these tests yielded negative results by ddPCR-IS6110, demonstrating the specificity of the primers and probe included in the study (Figure 20C).

### 3.3 Limit of blank and limit of detection (LOD)

No positive droplets were found in 10 out of 12 blank samples (ddH<sub>2</sub>O instead of DNA sample), but one positive droplet per 20 µl reaction mix was detected in two of these blank samples. Accordingly, the limit of blank was set at 1 drop/20 µl reaction, and therefore, a sample was considered as “negative” when no more than two positive droplets were obtained.

To determine the LOD, 10-fold serial dilutions of *M. bovis* genomic DNA with known quantities ranging from 10<sup>4</sup> to 10<sup>0</sup> were used. The reactions were performed in triplicate for each dilution in three different assays. MTC IS6110 sequences were detected in 100% of 10<sup>1</sup> dilutions assayed; however, only 50% positivity was obtained at the level of 10<sup>0</sup>. Thus, LOD of this ddPCR targeting IS6110 was set to 10<sup>1</sup> copies per 20 µl reaction.

### 3.4 Comparison of confirmatory IS6110 real time PCR and ddPCR from microbiological culture

As previously mentioned, microbiological culture positive samples need to be confirmed as MTC using real-time PCR (Thierry et al., 1990). Therefore, this part of the study compared both real-time PCR and ddPCR for the confirmation of culture positive samples.

**Table 17.** Evaluation of confirmatory real-time PCR and ddPCR targeting IS6110 from microbiological culture DNA isolation according to the presence of gross tuberculosis-like lesions (TBL), histopathological TBL or no histopathological lesion (NHL).

	Real-time PCR-IS6110 from microbiological culture		ddPCR-IS6110 from microbiological culture	
	(+)	(-)	(+)	(-)
<b>Gross TBL (n=19)*</b>	17	2	19	0
<b>Histopathological TBL (n=57)</b>	34	23	37	20
<b>NHL (n=43)</b>	15	28	11	32

Key: (+), positive; (-), negative. \*: All the animals with gross TBL also presented histopathological TBL.

DNA was isolated from selective microbiological culture from 100 samples with gross TBL (N=19) or NVLs (N=81). Forty-nine out of 100 samples were tested as MTC-positive by real-time PCR (17 out of 19 with gross TBL) whereas 51 samples yielded a negative result and were classified as MTC-negative (Table 17). The Ct values for the real-time PCR targeting IS6110

ranged from 20.00 to 36.25 (average = 29.35). No partial or complete inhibition were found in DNA isolated from microbiological culture. In the case of ddPCR targeting *IS6110*, forty-eight samples were found to be MTC-positive (19 out of 19 with gross TBL) and 52 MTC-negative (Table 17). There was an association between real time-PCR and ddPCR, with the higher number of positive droplets, which ranged from 13,402 to 4 droplets, coinciding with those samples with a lower Ct value.

Analysing the histopathological evaluation, 34 out of 49 samples positive to the microbiological culture by real-time PCR-*IS6110* were classified as TBL whereas 15 as NHL (Table 17). For the ddPCR-*IS6110*, histopathological TBL were found in 37 out of 48 ddPCR-*IS6110*-positive samples whereas 11 were classified as NHL (Table 17).

### 3.5 Comparison of *IS6110* real time PCR and ddPCR from fresh LN tissue samples

DNA was isolated from homogenized fresh LN tissue samples (N=100) with gross TBL (N=19) or NVL (N=81) and subjected to both real-time PCR and ddPCR. All the samples with gross TBL were found to be MTC-positive by both real-time PCR or ddPCR targeting *IS6110* (Table 18). For real-time PCR-*IS6110*, 53 out of 100 tested samples were detected as MTC-positive and 47 as negative. The Ct values ranged from 22.96 to 38.10 (average = 32.06). A partial inhibition of IAC was found in 6 out of 100 samples, with 2 out of 5 samples revealing a positive result after dilution 1:2 and re-evaluation. In the case of ddPCR, 55 samples were tested as MTC-positive and 45 as MTC-negative (Table 18). The number of positive droplets ranged from 12,618 to 3 droplets, with the highest number of positive droplets corresponding to those animals with pluribacillary lesions. As described before, an association was observed between real-time PCR and ddPCR, whereby a higher number of positive droplets corresponded to samples with higher Ct values.

**Table 18.** Evaluation of real-time PCR and ddPCR targeting *IS6110* from LNs DNA isolation according to the presence of gross tuberculosis-like lesions (TBL), histopathological TBL or no histopathological lesion (NHL).

	Real-time PCR- <i>IS6110</i> from LNs		ddPCR- <i>IS6110</i> from LNs	
	(+)	(-)	(+)	(-)
<b>Gross TBL (n=19)*</b>	19	0	19	0
<b>Histopathological TBL (n=57)</b>	40	17	41	16
<b>NHL (n=43)</b>	13	30	14	29

Key: (+), positive; (-), negative. \*: All the animals with gross TBL also presented histopathological TBL.

According to histopathological evaluation, 40 out of 53 positive samples to real-time PCR presented histopathological TBL whereas 13 did not present microscopic lesion (Table 18). Regarding ddPCR, 41 out of 55 positive samples were disclosed as positive to histopathology with 14 samples presenting NHL (Table 18).

### **3.6 Diagnostic performance of ddPCR-IS6110 for the detection of MTC from microbiological culture and fresh LN tissue samples**

In order to validate the ddPCR-IS6110 from microbiological culture and fresh LN tissue samples, these assays were compared with the reference standard assay (selective microbiological culture confirmed by real-time PCR-IS6110). Assuming that this reference assay is considered an imperfect assay for performing MTC diagnosis (Corner et al., 2012; Courcoull et al., 2014; Pucken et al., 2017) validation was carried out using EPIDAT 3.1 software. The ddPCR-IS6110 from microbiological culture detected 44 out of 49 reference standard positive samples [SE adjusted 90.76% (95% CI: 82.58-98.96%)], and 47 out of 51 reference standard negative samples resulted to be negative for ddPCR-IS6110 [SP adjusted = 100% (95% CI: 100%)]. Thus, an adjusted FNR of 9.23% (95% CI: 1.04-17.42%) and FPR of 0% (95% CI: 0%) were estimated (Table 19). The PLR value ( $PLR = \infty$ ) implies a high diagnostic value for the positive results discriminating between MTC-infected and non-infected animals. In addition, the NLR value was 0.07 meaning that it is a technique of a high diagnostic value to discriminate between healthy and diseased animals (Table 19). Of note, all reference standard-negative but ddPCR-positive samples were also classified as MTC positive by histopathological evaluation or real-time-IS6110 from fresh LNs tissue (Table 20 summaries the discordant results between different diagnostic techniques).

In the case of ddPCR-IS6110 carried out from fresh LN tissue samples, 47 out of 49 samples positive to the reference standard were found to be positive for ddPCR-IS6110 [adjusted SE 94.80% (95% CI: 88.52-100%)], and 42 out of 51 reference standard-negative samples were tested as ddPCR-IS6110-negative [adjusted SP = 100% (95% CI: 100%)] (Table 19). According to these results, ddPCR-IS6110 from fresh tissue presented an adjusted FNR of 5.20% (95% CI: 0-11.50%) and FPR of 0% (95% CI: 0%) (Table 19). Regardless of the true prevalence, ddPCR-IS6110 had a high diagnostic utility to confirm and discard MTC infection ( $PLR = \infty$  and  $NLR = 0.05$ ) (Table 19). Noteworthy, 9 reference standard-negative but ddPCR-IS6110-positive samples were found also as positive by histopathological evaluation (8 out of 9) or real-time PCR-IS6110 from fresh LN tissue (8 out of 9) (Table 20 summaries the discordant results between different diagnostic techniques).



**Table 19.** Diagnostic performance of droplet digital PCR (ddPCR) targeting *IS6110* from microbiological culture (A) and fresh lymph node (LN) tissue samples (B) in comparison with the established reference standard (selective microbiological culture confirmed by real-time PCR-*IS6110*) (N=100).

ddPCR- <i>IS6110</i> diagnostic accuracy (95% CI)						
DNA source	Sensitivity	Specificity	FPR	FNR	PLR	NLR
(A) Microbiological culture	90.76% (82.58-98.96%)	100% (100%)	0% (0%)	9.23% (1.04-17.23%)	∞	0.07
(B) Fresh LNs tissue samples	94.80% (88.52-100%)	100% (100%)	0% (0%)	5.20% (0-11.50%)	∞	0.05

FPR, False positive ratio; FNR, False negative ratio; PLR, Positive likelihood ratio; NLR, Negative likelihood ratio; 95% CI, 95% confidence interval.

Finally, Cohen's kappa coefficient ( $\kappa$ ) showed an almost perfect agreement between the ddPCR-*IS6110* from culture and the reference standard ( $\kappa = 0.82$ ) and a substantial agreement between the ddPCR-*IS6110* from fresh LN tissue samples and the reference standard ( $\kappa = 0.76$ ).

**Table 20.** Summary of discordant results between different diagnostic techniques

ID	Histopathological lesion	Ziehl-Neelsen	Reference standard protocol	Real-time PCR- <i>IS6110</i>	ddPCR- <i>IS6110</i> from microbiological culture	ddPCR- <i>IS6110</i> from tissue
11	No lesion	-	-	+	+	+
40	TB Granuloma	+/Paucibacillary	-	+	+	+
49	TB Granuloma	+/Paucibacillary	-	+	+	+
70	TB Granuloma	+/Pluribacillary	-	+	-	+
73	MNGC	+/Paucibacillary	-	-	-	+
77	TB Granuloma	-	-	+	-	+
101	TB Granuloma	-	-	+	-	+
110	MNGC	+/Pluribacillary	-	+	-	+
161	TB Granuloma	+/Paucibacillary	-	+	+	+

ID, identification; MNGC, Langhan's type multinucleated giant cell; TB Granuloma, tuberculous granuloma; +, positive; -, negative.

#### 4. Discussion

Selective microbiological culture followed by a confirmatory real-time PCR, despite being an imperfect assay with some limitations, is still considered the gold standard technique to

confirm bTB infection (Taylor et al., 2007; Liebana et al., 2008; Courcoul et al., 2014). Hence, performing an accurate and sensitive MTC diagnosis remains a challenge. In this context, ddPCR, a third-generation PCR technology reported for its ability to detect small amounts of nucleic acids with high precision and sensitivity, represents a promising alternative to other molecular diagnostic methods for instance real-time PCR (Baker et al., 2012; Pinheiro et al., 2012; Kuypers et al., 2017). Therefore, in the present study we developed and validated a ddPCR assay targeting *IS6110* to detect MTC in microbiological culture and fresh tissue samples with distinct TBL.

There are several performance parameters considered as key players in ddPCR including the concentration of primers and probe, the annealing temperature, or the quantity of the template (Whale et al., 2020). Optimization of these parameters is important to ensure the separation of positive and negative droplets and maximize the accuracy and sensitivity of the assay. Our results showed that the overall fluorescence amplitude of positive droplets increased with primers and probe concentrations. Thus, although we were able to detect the *IS6110* specific region in all the assessed setups, the annealing temperature of 60 °C together with the primers and probe concentrations of 900 nM for forward, 600 nM for reverse and 200 nM for probe yielded a higher fluorescence amplitude between positive and negative droplets compared with other setups and resulted in less non-specific amplification. In the case of template concentration, no pre-digestion DNA steps were performed as the extraction protocol used in this study effectively reduced host DNA without compromising assay performance. Since the Poisson statistics test requires a sufficient number of negative droplets for accurate calculation of DNA concentration (Whale et al., 2020), we decided to proceed with a template DNA concentration of 50 ng from tissue sample. This concentration was chosen to ensure a suitable number of negative droplets for statistical analysis and to minimize the risk of cross-contamination in samples with high concentration of bacterial DNA.

Considering the multi-etiological nature of TBL (Cardoso-Toset et al., 2015), we proceeded to assess the analytical specificity of ddPCR targeting *IS6110*. We tested several common microorganisms associated with TBL and observed that the primers and probe exhibited high specificity for MTC *IS6110*. The selection of an appropriate genetic target plays a key role for the accurate detection of MTC (Sevilla et al., 2015). Among the various targets available (Lorente-Leal et al., 2019; Wang et al., 2019), the insertion sequence *IS6110* is reported as one of the primary choices for diagnosing MTC (Sevilla et al., 2015). This genetic target not only enables differentiation between MTC and other bacteria, including non-tuberculous mycobacteria (NTM), but also offers the advantage of being a multicopy gene, ensuring

sensitive and reliable detection of MTC (Charles et al., 2022). However, recent studies have identified the presence of an *IS6110*-like element in the genomes of certain NTM species, reporting a potential cross-reactivity between NTM and specific *IS6110* primer pairs or probes (Coros et al., 2008; Thacker et al., 2011; Michelet et al., 2018; Lorente-Leal et al., 2021). Nevertheless, the impact of these findings on the specificity of PCR-*IS6110* is expected to be minimal, as demonstrated in the following analysis.

ddPCR-*IS6110* demonstrated an adjusted SE of 90.77% (95% CI: 82.58 - 98.96%) and a SP of 100% (95% CI: 100%) for the confirmation of MTC in selective bacterial culture when compared with the reference standard. The application of ddPCR in microbiological culture not only detected all samples with gross TBL but also increased the number of positive samples detected with NHL compared to real-time PCR-*IS6110*. However, it is noteworthy that five positive samples to the reference standard were classified as ddPCR-negative. It is possible that these cases represent false-negative results to ddPCR. One potential explanation could be the inhibition of the PCR reaction. Although the probability of this issue is low because ddPCR is known to be highly resistant to PCR inhibitors (Baker, 2012; Pinheiro et al., 2012; Kuypers et al. 2017), ddPCR may remain to be susceptible to some inhibitors. To address the issue of uncertain results, including an IAC into the ddPCR assay can provide added reliability. By designing a duplex reaction, the IAC can be labelled in a separate channel during analysis using the Bio-Rad QX100/QX200™ Droplet Digital™ PCR system, which is capable of detecting duplex targets in two separate channels (FAM and VIC/HEX) when TaqMan hydrolysis probes are utilized. This approach allows for simultaneous detection of the target of interest, *IS6110*, and the IAC, providing an internal reference for assay performance and identifying any potential inhibition or technical issues during the analysis.

In the case of DNA isolated directly from fresh bovine LN tissue samples, ddPCR targeting *IS6110* proved to be a rapid and effective diagnostic assay when compared to traditional selective microbiological culture confirmed by real-time PCR. This ddPCR assay allowed us to detect all samples with gross TBL but also identified additional positive samples with microscopic lesions that were missed at the postmortem visual inspection. The ddPCR-*IS6110* assay showed an adjusted SE of 94.80% (95% CI: 88.52 - 100%) and a SP of 100% (95% CI: 100%) demonstrating a significantly improved diagnostic performance and accuracy compared to the reference standard. Particularly, the ddPCR-*IS6110* assay disclosed as positive 9 samples negative to reference standard. Among these samples, 8 exhibited positive results in Ziehl-Neelsen staining and/or presented characteristic microscopic lesion. The remaining sample disclosed to be positive for both real-time and ddPCR-*IS6110* but negative to histopathology.

These findings indicate the superior SE and SP of ddPCR-IS6110 directly from fresh tissue sample in detecting MTC compared to the reference standard. Furthermore, our findings reveal that ddPCR-IS6110 exhibits significantly enhanced sensitivity and specificity when contrasted with real-time PCR-IS6110 (Sánchez-Carvajal et al., 2021).

Although there have been no previous studies evaluating the diagnostic performance of ddPCR for MTC in animal samples, our research group conducted a preliminary approach using formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE) tissue samples (Larenas-Muñoz et al., 2022). Our findings are consistent when compared to other studies conducted on human clinical samples (Costa et al., 2013; Cho et al., 2020), reporting the rapid detection of MTC DNA. Furthermore, ddPCR offers advantages for MTC diagnostics across several sample types, including whole blood from patients with pulmonary and extrapulmonary TB lesion (Yang et al. 2017), culture isolates (Nyaruaba et al., 2020) or FFPE samples (Larenas-Muñoz et al., 2022). Additionally, our results demonstrated higher adjusted SE and SP considering previous real-time PCR studies (Costa et al., 2013; Courcoul et al., 2014; Cardoso-Toset et al., 2015; Lorente-Leal et al., 2019; Wang et al., 2019).

ddPCR technology offers several advantages over real-time PCR, making it an ideal technique for the detection of MTC, particularly in cases with a low-copy-number of the target (Kuypers et al., 2017). Pathogens belonging to MTC are characterized by a paucibacillar pattern, which together the early detection of infected animals with NVL and low mycobacterial load would be beyond the LOD of traditional assays (Lorente-Leal et al., 2019; Sánchez-Carvajal et al., 2021). Due to sample partitioning, one notable advantage is the ddPCR ability to overcome the limitations caused by sample inhibitors which are commonly challenged in MTC samples (Dingle et al., 2013; Yang et al., 2014; Kuypers et al., 2017). Additionally, ddPCR is less affected by poor amplification efficiency, further contributing to its robust performance in MTC detection (Kuypers et al., 2017). Overall, these findings highlight the potential of ddPCR-IS6110 as a valuable tool for accurate and sensitive MTC diagnosis which would be susceptible to be included in bTB routine confirmation procedure.

Nonetheless, this study has some limitations that also need to be addressed. Firstly, the number of samples might have been larger in order to increase the robustness of the results providing a more comprehensive evaluation. Also, the absence of a ring trial, which would involve multiple laboratories and diverse epidemiological scenarios, limits the external validation and applicability of the findings to broader contexts. Moreover, it is important to highlight some drawbacks of ddPCR system over other molecular techniques. In general, ddPCR is more time-consuming than real-time PCR. The chances of contamination are higher,

the implementation of this assay also demands a higher level of technical expertise and specialized training for personnel involved in the procedure. In contrast, the cost per reaction in ddPCR is more cost-effective than other standard molecular methods, excluding the initial investment required to acquire the necessary equipment. Therefore, further work on the re-validation of the present protocol should be performed in the future.

The present study describes a complete protocol including sample pre-processing, DNA purification and ddPCR analysis. According to our results, ddPCR-IS6110 demonstrated to be a rapid, highly sensitive and specific diagnostic tool as alternative to microbiological culture shortening turnaround time for decision makers to be promptly informed. Comparing with real-time PCR, ddPCR has proved to be a potential first-choice molecular assay to detect MTC directly in fresh bovine tissue samples with increased SE and SP. Therefore, ddPCR-IS6110 approach has the potential to be included in bTB surveillance and control programs.

#### **Author Contributions**

EVS and JMSC performed all experiments in this study and Animal Health and Production Laboratory of Córdoba supported with microbiological culture and technical assistance. FLM performed the histopathological evaluation. EVS, JGL, JMSC, FLM, AGR and IRT were involved in obtaining and processing tissue samples. IL, LC, JGL, and BH designed the study. JMSC and JGL wrote the manuscript down with the invaluable insights of IL, LC, FLM, IRT and AGR. JGL and JMSC directed and supervised the whole study. All authors contributed to the article and approved the submitted version.

#### **Conflict of Interest**

The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

#### **Acknowledgments**

We appreciate the technical support offered by the Animal Health and Production Laboratory of Córdoba (Spain) and Alberto Alcántara and Marta Ordóñez-Martínez for their technical assistance. This work was supported by the investigation project New measures and techniques to control Bovine Tuberculosis in Andalusia (Financial support for Operational Groups of the European Innovation Partnership for Agricultural Productivity and Sustainability, EIP-AGRI; GOP2I-CO-16-0010). AGR, IRT and JMSC was supported by a Margarita Salas contract of the Spanish Ministry of Universities.

## References

1. Domingo M, Vidal E, Marco A. 2014. Pathology of bovine tuberculosis. *Res Vet Sci* 97:S20-29.
2. Aranaz A, De Juan L, Montero N, Sánchez C, Galka M, Delso C, Alvarez J, Romero B, Bezos J, Vela AI, Briones V, Mateos A, Domínguez L. 2004. Bovine tuberculosis (*Mycobacterium bovis*) in wildlife in Spain. *J Clin Microbiol* 42:2602–2608.
3. Dean AS, Forcella S, Olea-Popelka F, Idrissi A El, Glaziou P, Benyahia A, Mumford E, Erlacher-Vindel E, Gifford G, Lubroth J, Raviglione M, Fujiwara P. 2018. A roadmap for zoonotic tuberculosis: a One Health approach to ending tuberculosis. *Lancet Infect Dis* 18:137–138.
4. EU. EUR-Lex - 32020R0689 - EN - EUR-Lex. [https://eur-lex.europa.eu/eli/reg\\_del/2020/689/oj](https://eur-lex.europa.eu/eli/reg_del/2020/689/oj). Retrieved 13 September 2023.
5. de la Rúa-Domenech R, Goodchild AT, Vordermeier HM, Hewinson RG, Christiansen KH, Clifton-Hadley RS. 2006. Ante mortem diagnosis of tuberculosis in cattle: A review of the tuberculin tests,  $\gamma$ -interferon assay and other ancillary diagnostic techniques. *Res Vet Sci. Res Vet Sci* <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2005.11.005>.
6. Ramos DF, Silva PEA, Dellagostin OA. 2015. Diagnosis of bovine tuberculosis: review of main techniques. *Brazilian J Biol* 75:830–837.
7. Pozo P, Cardenas NC, Bezos J, Romero B, Grau A, Nacar J, Saez JL, Minguez O, Alvarez J. 2021. Evaluation of the performance of slaughterhouse surveillance for bovine tuberculosis detection in Castilla y Leon, Spain. *Prev Vet Med* 189:105307.
8. Lorente-Leal V, Liandris E, Pacciarini M, Botelho A, Kenny K, Loyo B, Fernández R, Bezos J, Domínguez L, de Juan L, Romero B. 2021. Direct PCR on tissue samples to detect mycobacterium tuberculosis complex: An alternative to the bacteriological culture. *J Clin Microbiol* 59.
9. Sánchez-Carvajal JM, Galán-Relaño Á, Ruedas-Torres I, Jurado-Martos F, Larenas-Muñoz F, Vera E, Gómez-Gascón L, Cardoso-Toset F, Rodríguez-Gómez IM, Maldonado A, Carrasco L, Tarradas C, Gómez-Laguna J, Luque I. 2021. Real-Time PCR Validation for *Mycobacterium tuberculosis* Complex Detection Targeting IS6110 Directly From Bovine Lymph Nodes. *Front Vet Sci* 8:643111.
10. 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:e90334.

11. Wang HY, Lu JJ, Chang CY, Chou WP, Hsieh JCH, Lin CR, Wu MH. 2019. Development of a high sensitivity TaqMan-based PCR assay for the specific detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex in both pulmonary and extrapulmonary specimens. *Sci Rep* 9:1–12.
12. Lorente-Leal V, Liandris E, Castellanos E, Bezos J, Domínguez 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.
13. Strain MC, Lada SM, Luong T, Rought SE, Gianella S, Terry VH, Spina CA, Woelk CH, Richman DD. 2013. Highly Precise Measurement of HIV DNA by Droplet Digital PCR. *PLoS One* 8:e55943.
14. Lillsunde Larsson G, Helenius G. 2017. Digital droplet PCR (ddPCR) for the detection and quantification of HPV 16, 18, 33 and 45 - a short report. *Cell Oncol* 40:521–527.
15. Guil-Luna S, Sánchez-Céspedes R, Rivas Crespo A, Dolores Fernández M, Fernández Sarmiento JA, Rodríguez-Ariza A, Millán Y. 2023. Analysis of cell-free DNA concentration, fragmentation patterns and TP53 gene expression in mammary tumor-bearing dogs: A pilot study. *Front Vet Sci* 10:1157878.
16. Dingle TC, Sedlak RH, Cook L, Jerome KR. 2013. Tolerance of Droplet-Digital PCR vs Real-Time Quantitative PCR to Inhibitory Substances. *Clin Chem* 59:1670–1672.
17. Yang, Paparini A, Monis P, Ryan U, Yang R, Paparini A, Monis P, Ryan U. 2014. Comparison of next-generation droplet digital PCR (ddPCR) with quantitative PCR (qPCR) for enumeration of *Cryptosporidium* oocysts in faecal samples. *Int J Parasitol* 44:1105–1113.
18. Devonshire AS, Honeyborne I, Gutteridge A, Whale AS, Nixon G, Wilson P, Jones G, Mchugh TD, Foy CA, Huggett JF. 2015. Highly Reproducible Absolute Quantification of *Mycobacterium tuberculosis* Complex by Digital PCR <https://doi.org/10.1021/ac5041617>.
19. Nyaruaba R, Xiong J, Mwaliko C, Wang N, Kibii BJ, Yu J, Wei H. 2020. Development and Evaluation of a Single Dye Duplex Droplet Digital PCR Assay for the Rapid Detection and Quantification of *Mycobacterium tuberculosis*. *Microorg* 2020, Vol 8, Page 701 8:701.
20. Yang, Han X, Liu A, Bai X, Xu C, Bao F, Feng S, Tao L, Ma M, Peng Y. 2017. Use of Digital Droplet PCR to Detect *Mycobacterium tuberculosis* DNA in Whole Blood-Derived DNA Samples from Patients with Pulmonary and Extrapulmonary Tuberculosis. *Front Cell Infect Microbiol* 7:369.
21. Cao Z, Wu W, Wei H, Gao C, Zhang L, Wu C, Hou L. 2020. Using droplet digital PCR in the detection of *Mycobacterium tuberculosis* DNA in FFPE samples. *Int J Infect Dis* 99:77–83.

22. Badia-Bringué G, Canive M, Casais R, Blanco-Vázquez C, Amado J, Iglesias N, González A, Bascones M, Juste RA, Alonso-Hearn M. 2022. Evaluation of a droplet digital PCR assay for quantification of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* DNA in whole-blood and fecal samples from MAP-infected Holstein cattle. *Front Vet Sci* 9:944189.

23. Larenas-Muñoz F, Sánchez-Carvajal JM, Galán-Relaño Á, Ruedas-Torres I, Vera-Salmoral E, Gómez-Gascón L, Maldonado A, Carrasco L, Tarradas C, Luque I, Rodríguez-Gómez IM, Gómez-Laguna J. 2022. The Role of Histopathology as a Complementary Diagnostic Tool in the Monitoring of Bovine Tuberculosis. *Front Vet Sci* 9:816190.

24. Corner LA, Trajstman AC. 1988. An evaluation of 1-hexadecylpyridinium chloride as a decontaminant in the primary isolation of *Mycobacterium bovis* from bovine lesions. *Vet Microbiol* 18:127–134.

25. Thierry D, Brisson-Noel A, Vincent-Levy-Frebault V, Nguyen S, Guesdon JL, Gicquel B. 1990. Characterization of a *Mycobacterium tuberculosis* insertion sequence, IS6110, and its application in diagnosis. *J Clin Microbiol* 28:2668–2673.

26. Armbruster DA, Pry T. 2008. Limit of Blank, Limit of Detection and Limit of Quantitation. *Clin Biochem Rev* 29:S49.

27. Whale AS, De Spiegelaere W, Trypsteen W, Nour AA, Bae YK, Benes V, Burke D, Cleveland M, Corbisier P, Devonshire AS, Dong L, Drandi D, Foy CA, Garson JA, He HJ, Hellemans J, Kubista M, Lievens A, Makrigiorgos MG, Milavec M, Mueller RD, Nolan T, O'Sullivan DM, Pfaffl MW, Rödiger S, Romsos EL, Shipley GL, Taly V, Untergasser A, Wittwer CT, Bustin SA, Vandesompele J, Huggett JF. 2020. The Digital MIQE Guidelines Update: Minimum Information for Publication of Quantitative Digital PCR Experiments for 2020. *Clin Chem* 66:1012–1029.

28. Pucken V-B, Knubben-Schweizer G, Döpfer D, Groll A, Hafner-Marx A, Hörmansdorfer S, Sauter-Louis C, Straubinger RK, Zimmermann P, Hartnack S. 2017. Evaluating diagnostic tests for bovine tuberculosis in the southern part of Germany: A latent class analysis. *PLoS One* 12:e0179847.

29. McHugh ML. 2012. Interrater reliability: the kappa statistic. *Biochem Medica* 22:276.

30. Cardoso-Toset F, Gómez-Laguna J, Amarilla SP, Vela AI, Carrasco L, Fernández-Garayzábal JF, Astorga RJ, Luque I. 2015. Multi-Etiological Nature of Tuberculosis-Like Lesions in Condemned Pigs at the Slaughterhouse. *PLoS One* 10:e0139130.

31. Corner, Gormley E, Pfeiffer DU. 2012. Primary isolation of *Mycobacterium bovis* from



bovine tissues: Conditions for maximising the number of positive cultures. *Vet Microbiol* 156:162–171.

32. Liebana E, Johnson L, Gough J, Durr P, Jahans K, Clifton-Hadley R, Spencer Y, Hewinson RG, Downs SH. 2008. Pathology of naturally occurring bovine tuberculosis in England and Wales. *Vet J* 176:354–360.

33. Taylor GM, Worth DR, Palmer S, Jahans K, Hewinson RG. 2007. Rapid detection of *Mycobacterium bovis* DNA in cattle lymph nodes with visible lesions using PCR. *BMC Vet Res* 3:12.

34. Pinheiro LB, Coleman VA, Hindson CM, Herrmann J, Hindson BJ, Bhat S, Emslie KR. 2012. Evaluation of a droplet digital polymerase chain reaction format for DNA copy number quantification. *Anal Chem* 84:1003–1011.

35. Baker M. 2012. Digital PCR hits its stride. *Nat Methods* 2012 9:541–544.

36. Kuypers J, Jerome KR. 2017. Applications of digital PCR for clinical microbiology. *J Clin Microbiol* 55:1621–1628.

37. Sevilla IA, Molina E, Elguezal N, Pérez V, Garrido JM, Juste RA. 2015. Detection of mycobacteria, *Mycobacterium avium* subspecies, and *Mycobacterium tuberculosis* complex by a novel tetraplex real-time PCR assay. *J Clin Microbiol* 53:930–940.

38. Charles C, Conde C, Biet F, Boschioli ML, Michelet L. 2022. IS6110 Copy Number in Multi-Host *Mycobacterium bovis* Strains Circulating in Bovine Tuberculosis Endemic French Regions. *Front Microbiol* 13.

39. Coros A, DeConno E, Derbyshire KM. 2008. IS6110, a *Mycobacterium tuberculosis* Complex-Specific Insertion Sequence, Is Also Present in the Genome of *Mycobacterium smegmatis*, Suggestive of Lateral Gene Transfer among Mycobacterial Species. *J Bacteriol* 190:3408.

40. Michelet L, de Cruz K, Karoui C, Tambosco J, Moyen JL, Hénault S, Boschioli ML. 2018. Second line molecular diagnosis for bovine tuberculosis to improve diagnostic schemes. *PLoS One* 13:e0207614.

41. Thacker TC, Harris B, Palmer M V., Waters WR. 2011. Improved specificity for detection of *Mycobacterium bovis* in fresh tissues using IS6110 real-time PCR. *BMC Vet Res* 7:50.

42. Song N, Tan Y, Zhang L, Luo W, Guan Q, Yan MZ, Zuo R, Liu W, Luo FL, Zhang XL. 2018. Detection of circulating *Mycobacterium tuberculosis*-specific DNA by droplet digital PCR for

vaccine evaluation in challenged monkeys and TB diagnosis. *Emerg Microbes Infect* 7.

43. Cho SM, Shin S, Kim Y, Song W, Hong SG, Jeong SH, Kang MS, Lee KA. 2020. A novel approach for tuberculosis diagnosis using exosomal DNA and droplet digital PCR. *Clin Microbiol Infect* 26:942.e1-942.e5.

44. Costa P, Ferreira AS, Amaro A, Albuquerque T, Botelho A, Couto I, Cunha M V., Viveiros M, Inácio J. 2013. Enhanced Detection of Tuberculous Mycobacteria in Animal Tissues Using a Semi-Nested Probe-Based Real-Time PCR. *PLoS One* 8:e81337.

45. Cardoso-Toset F, Luque I, Amarilla SP, Gómez-Gascón L, Fernández L, Huerta B, Carrasco L, Ruiz P, Gómez-Laguna J. 2015. Evaluation of rapid methods for diagnosis of tuberculosis in slaughtered free-range pigs. *Vet J* 204:232–234.





## CAPÍTULO IV: DISCUSIÓN GENERAL





## DISCUSIÓN

La tuberculosis de los mamíferos, tradicionalmente denominada TBb, es una enfermedad infectocontagiosa de desarrollo crónico que provoca un importante impacto a distintos niveles (Rodríguez-Campos et al., 2014; Algammal et al., 2019; Larenas-Muñoz et al., 2022), destacando especialmente su relevancia en salud pública, ya que se estima que un cuarto de la población mundial podría encontrarse afectada por esta enfermedad (Houben & Dodd, 2016).

Actualmente, la situación de la TBb a nivel mundial responde a dos grandes escenarios bien diferenciados, los cuales vienen determinados por la situación económica, el desarrollo de la ganadería, la calidad de los servicios veterinarios y la implantación de programas de control y vigilancia. En este contexto, la presente tesis ha estimado el rendimiento diagnóstico de diversas técnicas habitualmente utilizadas para el diagnóstico de la TBb en función de su situación epidemiológica.

En los países en vías de desarrollo, la TBb es un problema endémico tanto para los animales, en los que alcanza elevadas prevalencias a nivel de rebaño, como para el ser humano, concentrándose en estos países la mayoría de los nuevos casos de TBb zoonótica a nivel mundial (Ayele et al., 2004; Olea-Popelka et al., 2017). Debido a la falta de información y al coste económico de las campañas de erradicación, el control de la enfermedad suele ser insuficiente, limitándose a la detección de LTb en matadero o a la realización de la IDTB (Ayele et al., 2004; Dibaba et al., 2019; Kemal et al., 2019). La IDTB es, por su sencillez, bajo coste y facilidad de interpretación, la técnica más utilizada mundialmente para el diagnóstico de la TBb (de la Rúa-Domenech et al., 2006; Bezos et al., 2014). Sin embargo, en países donde la rentabilidad y los ingresos de los ganaderos son extremadamente bajos, su utilización supone un problema añadido para los ganaderos, ya que puede conllevar el sacrificio de animales falsos positivos sin que exista indemnización por parte del gobierno, como ocurre en los países de UE (de la Rúa-Domenech et al., 2006; Álvarez et al., 2012; Arnot & Michel, 2020). En este sentido, la OMSA recomienda el seguimiento del VP+ de la técnica utilizada para el diagnóstico, como una forma de evaluar los costes asociados al programa de vigilancia (OMSA, 2018).

De acuerdo con los resultados obtenidos en esta tesis, en países con una prevalencia de TBb elevada ( $\geq 30\%$ ), la prueba más recomendable sería la IDTBs con interpretación severa, ya que detectaría el 86,4% de los animales afectados y sólo se sacrificaría 1,3 animales falsos positivos por cada animal enfermo diagnosticado. El rendimiento de la IDTBs para descartar la infección en rebaños o animales con una probabilidad previa a la prueba de hasta el 42% sería muy elevado (VP-  $>90\%$ ). Sin embargo, en regiones con una prevalencia moderada-baja (3-10%), la IDTBs

conllevaría el sacrificio de 3 a 6 animales sanos por cada animal enfermo detectado, por lo que sería más conveniente utilizar la IDTBs estándar, la IDTBc (pruebas más específicas, aunque menos sensibles) o el examen macroscópico post-mortem.

En los países desarrollados, donde la prevalencia de la TBb es baja (< 2%), la aplicación continuada de programas de control de la enfermedad tiene como objetivo principal la erradicación de la TBb (Refaya et al., 2020). En este contexto, las técnicas habitualmente aplicadas son la IDTBs, la IDTBc y la IFN- $\gamma$ . Estas pruebas se complementan con la vigilancia en matadero y la utilización del cultivo microbiológico como prueba de referencia para confirmar la presencia del CMT (Reglamento delegado (UE) 2020/689). Por otro lado, en regiones de nuestro país donde la prevalencia es superior al 1% (como Andalucía, PR 6%), se aplica una interpretación severa de la técnica para evitar la persistencia de animales infectados en la explotación, lo que podría favorecer el mantenimiento y difusión del CMT (de la Rúa-Domenech et al., 2006). De acuerdo con esta normativa, un resultado positivo a la IDTB supone que tanto el animal como el rebaño sean considerados positivos, conduciendo al sacrificio del animal y pudiendo conllevar el sacrificio de todo el rebaño si se trata de en un rebaño calificado como libre, estableciéndose finalmente la restricción de los movimientos de todos los animales de la explotación (MAPA, 2023).

Aunque la medida tiene probada eficacia, los resultados de nuestro estudio indican que, dada su E (87,9%), la utilización de la IDTB como prueba de cribado en zonas con una prevalencia inferior al 2% supondría el sacrificio de al menos 8 animales sanos por cada animal infectado detectado. Esto implica un significativo coste económico para los programas de control y erradicación de la TBb. Además, la aplicación rutinaria de esta técnica, centrada en la detección temprana de la respuesta inmune celular, ha llevado a que la mayoría de los animales positivos a IDTB lleguen al matadero en etapas muy tempranas de la enfermedad, sin la presencia de LTBs, desafiando así la eficacia de la vigilancia activa en matadero mediante inspección macroscópica (Varello et al., 2008).

A pesar de que el cultivo es considerado la prueba de referencia para confirmar la infección por el CMT, está lejos de ser una técnica perfecta, ya que posee una tasa de recuperación muy variable (30-95%) y una SE relativamente baja (78,1%) que puede verse afectada por el grado de encapsulación de los granulomas y el proceso de descontaminación (Corner et al., 2012; Courcoul et al., 2014). A este factor se suma el período que la bacteria necesita para su crecimiento, que puede extenderse hasta 3 meses. Esta demora representa un obstáculo



significativo para la toma de decisiones en la explotación, ya que esta puede mantenerse con su calificación suspendida hasta que transcurra dicho período (OMSA, 2022).

Como consecuencia de estas limitaciones, diversos trabajos han señalado la necesidad de desarrollar técnicas moleculares, más sensibles y específicas, que permitan reducir el tiempo empleado para alcanzar un diagnóstico asertivo (Araújo et al., 2014; Courcoul et al., 2014; Lorente-Leal et al., 2019). Con el propósito de alcanzar este objetivo, realizamos un primer estudio para evaluar la validez diagnóstica de la PCR a tiempo real a partir de muestras de tejido fresco, utilizando como diana genética la secuencia de inserción *IS6110*. Coincidiendo con estudios previos, la PCR a tiempo real presentó, comparada con el cultivo, importantes ventajas: buenos valores de SE y E diagnósticas (SE: 77,1% y E: 99,4%), reducción del tiempo de confirmación hasta las 24 horas, y la capacidad de detectar animales positivos entre aquellos que resultaban negativos en el cultivo, permitiendo detectar el ADN del CMT de forma directa en muestras de nódulo linfáticos (Courcoul et al., 2014; Cardoso-Toset et al., 2015; Lorente-Leal et al., 2019). No obstante, la eficacia de esta técnica puede verse comprometida por factores como el protocolo de extracción y la diana empleada, el carácter paucibacilar del CMT, el grado de mineralización y la fibrosis asociada normalmente a las LTBs, la presencia de sustancias inhibitoras de la reacción, o la posible contaminación cruzada (Liebana et al., 1995; Taylor et al., 2007; Liebana et al., 2008).

A partir de estos resultados preliminares y de las limitaciones observadas, se plantearon en esta tesis dos nuevos objetivos destinados a mejorar el rendimiento diagnóstico de la PCR a tiempo real: 1) comparar diferentes métodos de extracción desde tejido fresco de bovino para seleccionar aquel con mayor validez diagnóstica y, 2) a partir del protocolo seleccionado, comparar la validez de distintas dianas genéticas para la detección del CMT.

Con el objetivo de mejorar la eficiencia de detección del CMT, se llevó a cabo una comparación entre el protocolo de extracción empleado en el estudio inicial y un nuevo procedimiento optimizado basado en la lisis mecánica y la digestión con proteinasa K. Este protocolo optimizado fue diseñado con la intención de aumentar las tasas de detección de ADN del CMT, lo que resultó en una mejora significativa en la SE de la PCR a tiempo real frente a la diana *IS6110*.

En comparación con el protocolo original, que tenía una SE ajustada del 78%, la modificación implementada logró elevar la SE de la PCR en tiempo real frente a *IS6110* hasta un 95,9%. Cabe destacar que la E se mantuvo en un 100% en ambos casos. Este ajuste en el procedimiento de

extracción demostró una mejora significativa en la eficiencia general de la PCR a tiempo real para detectar el CMT de forma directa en muestras de nódulo linfático.

A continuación, se comparó el rendimiento diagnóstico de la PCR a tiempo real utilizando 3 dianas genéticas diferentes, *IS6110*, *IS4* y *mpb70* (Lorente-Leal et al., 2019; Wang et al., 2019). Así, de acuerdo con los resultados obtenidos, las tres sondas mejoraron la validez diagnóstica del cultivo microbiológico, permitiendo la detección de animales infectados negativos al cultivo, aunque, ninguna de ellas fue capaz de detectar la totalidad de animales positivos a este. *IS4* y *mpb70* presentaron una SE del 90,87% y 83,3%, respectivamente, y un E de 100% en ambos casos, muy similares a los previamente observados para la *IS6110*.

En cuanto a la utilidad diagnóstica de la PCR a tiempo real, nuestro estudio sugiere que en zonas con una prevalencia de TBb de hasta el 60%, lo cual abarca prácticamente cualquier situación real, la realización de la prueba con el protocolo 2 y la sonda *IS6110* permitiría confirmar el diagnóstico (en caso de resultado positivo) con una seguridad del 100% y descartarlo (en caso de resultado negativo) con una seguridad  $\geq 90\%$ , lo que confirma el potencial y las ventajas de esta técnica para confirmar los resultados de la IDTB y como prueba de referencia en la vigilancia post-mortem.

Por otro lado, es importante mencionar que la reactividad cruzada de las sondas con otras bacterias constituye una limitación de la PCR en tiempo real. En este sentido, aunque *IS6110* se utiliza habitualmente para el diagnóstico de la TBb, puede presentar reactividad cruzada con MNT. Diversos estudios han detectado una secuencia similar a la *IS6110* en cepas bacterianas de MNT (Coros et al., 2008; Lorente-Leal et al., 2020). Aunque esto daría lugar a falsos positivos, la presencia de estas cepas MNT es poco frecuente y no tendría un impacto destacable en las campañas de erradicación de la TBb.

Para abordar esta cuestión, se utilizaron otras dianas genéticas como la *IS4* y *mpb70*, las cuales son específicas del CMT, no encontrándose reacciones cruzadas entre los animales negativos para cultivo, pero positivos para PCR en tiempo real con *IS6110*. Este enfoque proporciona una mayor especificidad en la detección, minimizando así la posibilidad de resultados falsos positivos. Por tanto, de acuerdo con las directrices marcadas por la OMSA (2018), la utilización de la PCR-*IS6110* a tiempo real en el desarrollo de programas de erradicación y control de la TBb sería adecuada tanto para certificar el estatus de libre de infección como para contribuir a su eliminación (Reid et al., 2021).

Finalmente, visto el potencial y la utilidad de la PCR a tiempo real se valoró, por primera vez en ganado bovino, el rendimiento de la ddPCR para el diagnóstico de la TBb, utilizando la diana

genética IS6110 y muestras de tejido extraídas con el protocolo optimizado. Los resultados obtenidos mostraron una SE del 94,79% y una E del 100%, mejorando los resultados descritos para el cultivo microbiológico y la PCR a tiempo real. Además, la ddPCR-IS6110 fue capaz de detectar el CMT en 9 muestras negativas al cultivo, pero positivas a la PCR a tiempo real y/o la histopatología demostrando la presencia del CMT mediante ZN.

Entre las ventajas que presenta la ddPCR destacan su elevada sensibilidad analítica y reproducibilidad, una mayor tolerancia a inhibidores exógenos y a cambios en las condiciones de la reacción y una mayor resistencia a inhibidores que darían lugar a falsos negativos (Dingle et al., 2013; Huggett & Whale, 2013; Quan et al., 2018; Badia-Bringué et al., 2022; Fan et al., 2022). Además, su utilidad con otro tipo de sustrato como la sangre, abre la puerta a una futura utilización de esta técnica para detectar la enfermedad en los animales vivos, algo que ya se hace en humana para la detección precoz de cáncer de mama y que se conoce como biopsia líquida. No obstante, la técnica no está exenta de inconvenientes, siendo el principal de ellos la gran inversión económica que requiere la adquisición del equipamiento limitando su uso en veterinaria incluso dentro de los países desarrollados (Badia-Bringué et al., 2022).

En base a todo lo expuesto, consideramos que en los países desarrollados la ddPCR-IS6110 sería una técnica ideal para la confirmación post-mortem de la TBb, mientras que, en los países en desarrollo, sería más recomendable la utilización de la PCR a tiempo real, dada la gran inversión que requiere esta técnica.



## CAPÍTULO V: CONCLUSIONES

---





**Primera conclusión:** La optimización del protocolo de extracción de ADN supuso un notable aumento en la sensibilidad diagnóstica de la PCR a tiempo real con respecto al protocolo de extracción simple (78,34% versus 95,4%), por lo que se recomienda su utilización para el diagnóstico directo del Complejo *Mycobacterium tuberculosis* desde muestras de tejido.

**Segunda conclusión:** La PCR a tiempo real, utilizando el protocolo de extracción optimizado, demostró una elevada validez para confirmar la infección por el Complejo *Mycobacterium tuberculosis*, con las tres dianas evaluadas (IS6110, IS4 o mpb70), logrando una especificidad del 100%. En cuanto a su capacidad para descartar la enfermedad, se observó la mayor sensibilidad (95,9%) y cociente de probabilidad de los resultados negativos con la sonda IS6110. Por lo tanto, consideramos que este protocolo sería el indicado para el diagnóstico directo de la TBb a partir de muestras de tejido.

**Tercera conclusión:** La utilidad de la PCR a tiempo real utilizando la sonda IS6110 para confirmar la TBb sería máxima (VPP = 100%) en cualquier escenario epidemiológico, mientras que su capacidad para descartar la enfermedad superaría el 90% en áreas con una prevalencia de hasta el 60%. En consecuencia, la PCR a tiempo real podría constituir una alternativa rápida y eficaz al cultivo microbiológico, posicionándose como una prueba de referencia para confirmar el diagnóstico de la TBb.

**Cuarta conclusión:** Dada la validez estimada para la intradermotuberculinización cervical con interpretación severa (SE 86,4% y SP 87.9%), la capacidad de la técnica para diferenciar entre animales sanos e infectados sería moderada. Sin embargo, su utilización previa a la PCR permitiría descartar la TBb con una alta seguridad en los animales negativos a ambas pruebas, incluso en zonas con prevalencias de hasta el 80%.

**Quinta conclusión:** En base a la sensibilidad y especificidad mostradas por la inspección macroscópica (67,8% y 98.3%, respectivamente), esta técnica tendría una elevada capacidad para detectar la enfermedad, si bien recomendamos la confirmación posterior con PCR en base a la importancia de esta enfermedad en salud pública. En cuanto a su validez para descartarla, es baja.

**Sexta conclusión:** La ddPCR-IS6110 a partir de muestras de tejido mostró un rendimiento analítico y diagnóstico muy elevado (SE 90,76% y SP 100%). Esta herramienta posibilitó la detección de animales infectados, tanto con lesiones compatibles con TBb como sin ellas, incluso en casos no identificados mediante el cultivo microbiológico ni la PCR-IS6110 a tiempo real. En consecuencia, la ddPCR-IS6110 podría considerarse una herramienta diagnóstica altamente eficaz, especialmente en regiones con baja prevalencia de TBb.





## CAPÍTULO VI: APORTACIONES CIENTÍFICAS





### **Aportaciones a congresos relacionadas con los resultados de esta Tesis Doctoral**

#### **III Congreso de Veterinaria y Ciencia y tecnología de los Alimentos**

**Título de la aportación:** Comparación de dos protocolos de extracción de ADN para la validación del diagnóstico directo de MTC desde tejido fresco mediante qPCR.

**Autores:** Eduardo Vera, José María Sánchez-Carvajal, Ángela Galán-Relaño, Inés Ruedas-Torres, Carmen Tarradas, Librado Carrasco, Inmaculada Luque, Jaime Gómez-Laguna

**Tipo de evento:** Comunicación en Congreso

**Ámbito:** Nacional

**Fecha:** 22/06/21

**Lugar:** Córdoba (España)

#### **III Congreso de Veterinaria y Ciencia y tecnología de los Alimentos**

**Título de la aportación:** Validación de una PCR a tiempo real frente a la IS6110 para la detección del Complejo *Mycobacterium tuberculosis* en nódulos linfáticos de ganado bovino.

**Autores:** Sánchez-Carvajal, José María; Galán-Relaño, Ángela; Ruedas-Torres, Inés; Jurado-Martos, Francisco; Larenas-Muñoz, Fernanda; Vera-Salmoral, Eduardo; Gómez-Gascón, Lidia; Gómez-Laguna, Jaime

**Tipo de evento:** Póster en Congreso

**Ámbito:** Nacional

**Fecha:** 22/06/21

**Lugar:** Córdoba (España)

#### **EAVLD virtual meeting**

**Título de la aportación:** Evaluation of two different DNA extraction protocols to validate *Mycobacterium tuberculosis* complex direct diagnosis from fresh tissue samples by IS6110-qPCR.

**Autores:** Eduardo Vera-Salmoral, José María Sánchez-Carvajal, Ángela Galán-Relaño, Inés Ruedas-Torres, Jaime Gómez-Laguna, Carmen Tarradas, Librado Carrasco, Inmaculada Luque, Belén Huerta

**Tipo de evento:** Póster en Congreso

**Ámbito:** Internacional

**Fecha:** 17/11/21

**Lugar:** Córdoba (España)

#### **EAVLD virtual meeting**

**Título de la aportación:** Evaluation of droplet digital PCR targeting IS6110 to detect *Mycobacterium tuberculosis* complex DNA in microbiological culture and fresh tissue samples.

**Autores:** Sánchez-Carvajal, Jose María; Vera-Salmoral, Eduardo; Cuéllar-Gómez, Raquel; Galán-Relaño, Ángela; Carrasco, Librado; Ruedas-Torres, Inés; Larenas-Muñoz, Fernanda; Luque, Inmaculada; Gómez-Laguna, Jaime.

**Tipo de evento:** Comunicación en Congreso

**Ámbito:** Internacional

**Fecha:** 17/11/21

**Lugar:** Córdoba (España)

#### **VI Congreso EAVLD Sevilla**

**Título de la aportación:** DNA specific target comparison for the validation of *Mycobacterium tuberculosis* complex direct diagnosis by Real-time PCR from fresh tissue.

**Autores:** Inmaculada Luque, Dr. José María Sánchez-Carvajal, Dr. Ángela Galán-Relaño, **Eduardo Vera-Salmoral**, Dr. Jaime Gómez-Laguna, Dr. Belén Huerta.

**Tipo de evento:** Póster en Congreso

**Ámbito:** Internacional

**Fecha:** 24/10/22-26/10/22

**Lugar:** Sevilla (España)

#### **VI Congreso EAVLD**

**Título de la aportación:** Evaluación del rendimiento diagnóstico de la intradermotuberculinización y de la inspección macroscópica para el diagnóstico de la tuberculosis bovina en distintos escenarios epidemiológicos

**Autores:** Eduardo Vera Salmoral

**Tipo de evento:** Comunicación en Congreso

**Ámbito:** Nacional

**Fecha:** 04/05/23

**Lugar:** Córdoba (España)

#### **Otras aportaciones relacionadas con la formación investigadora**

---

##### **Publicaciones científicas indexadas**

Fernanda Larenas-Muñoz, José M. Sánchez-Carvajal, Ángela Galán-Relaño, Inés Ruedas-Torres, Eduardo Vera-Salmoral, Lidia Gómez-Gascón, Alfonso Maldonado, Librado Carrasco, Carmen Tarradas, Inmaculada Luque, Irene M. Rodríguez-Gómez and Jaime Gómez-Laguna. The Role of Histopathology as a Complementary Diagnostic Tool in the Monitoring of Bovine Tuberculosis. *Front Vet Sci.* 2022; 9: 816190. doi: 10.3389/fvets.2022.816190. PMID: 35647097

Á. Galán-Relaño, J.M. Sánchez-Carvajal, L. Gómez-Gascón, E. Vera, B. Huerta, F. Cardoso-Toset, J. Gómez-Laguna, R.J. Astorga. Phenotypic and genotypic antibiotic resistance patterns in *Salmonella typhimurium* and its monophasic variant from pigs in southern Spain. *Research in Veterinary Science*, Volume 152, 2022 Doi: <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2022.09.028>

Jurado-Martos F, Cardoso-Toset F, Tarradas C, Galán-Relaño Á, Sánchez-Carvajal JM, Ruedas-Torres I, Vera E, Larenas-Muñoz F, Gómez-Gascón L, Rodríguez-Gómez IM, Carrasco L, Gómez-Laguna J, Lorenzo BH, Luque I. Diagnostic performance of faecal and tissue multiplex qPCR IS900/F57 for the detection of *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis in cattle. *Res Vet Sci.* 2023 Aug; 161:156-162. doi: 10.1016/j.rvsc.2023.06.007. Epub 2023 Jun 10. PMID: 37406574.

Jurado-Martos F, Cardoso-Toset F, Tarradas C, Galán-Relaño Á, Sánchez-Carvajal JM, Ruedas-Torres I, Vera-Salmoral E, Larenas-Muñoz F, Carrasco L, Gómez-Laguna J, Lorenzo BH, Luque I. Evaluation of the diagnostic accuracy of the serological test for paratuberculosis in cattle according to tuberculosis status. *Vet Rec.* 2023 Nov 4;193(9):e3313. doi: 10.1002/vetr.3313. Epub 2023 Sep 17. PMID: 37718548.

##### **Aportaciones a congresos**

#### **X Foro ANVEPI**

**Título de la aportación:** Brote de mortalidad aguda en jabalíes: un riesgo potencial para el cerdo ibérico

**Autores:** Sánchez-Carvajal, JM; Galán-Relaño, Á; Barrero-Domínguez, B; Ruedas-Torres, I; **Vera-Salmoral, E**; De Marco-Viott, A y Rodríguez-Gómez, I.M

**Tipo de evento:** Póster en Congreso

**Ámbito:** Nacional

**Fecha:** 14/03/18-15/03/18

**Lugar:** Badajoz (España)

#### **XXIII Simposio Anual de AVEDILA**

**Título de la aportación:** Seroprevalencia de paratuberculosis en ganado caprino lechero en Andalucía. **Autores:** Barrero-Domínguez B., Huerta B., Gómez-Laguna J., de Aguiar F., **Vera-Salmoral, E.S.**, Gómez-Gascón L. y Astorga R.J.

**Tipo de evento:** Póster en Congreso

**Ámbito:** Nacional

**Fecha:** 15/11/18-16/11/18

**Lugar:** Granada (España)

#### **XXIII Simposio Anual de AVEDILA**

**Título de la aportación:** Valoración del perfil de sensibilidad de cepas *Trueperella Pyogenes* aisladas de rumiantes a diferentes antimicrobianos.

**Autores:** Galán-Relaño A., **Vera-Salmoral E.S.**, Sanz-Tejero C. Cardoso-Toset F., Jurado-Martos F., Vela A.I., Tarradas C.

**Tipo de evento:** Póster en Congreso

**Ámbito:** Nacional

**Fecha:** 15/11/18-16/11/18

**Lugar:** Granada (España)

#### **XXIII Simposio Anual de AVEDILA**

**Título de la aportación:** Valor diagnóstico de signos clínicos asociados a la leishmaniosis canina.

**Autores:** Galán-Relaño A., Barrero-Domínguez B., Gómez-Gascón L., de Aguiar F., **Vera-Salmoral E.S.**, Maldonado A., Huerta B.

**Tipo de evento:** Póster en Congreso

**Ámbito:** Nacional

**Fecha:** 15/11/18-16/11/18

**Lugar:** Granada (España)

#### **XXIV Simposio Anual AVEDILA**

**Título de la aportación:** Resistencia antimicrobiana de cepas de *salmonella typhimurium* variante monofásica (mst) aisladas a partir de la cadena alimentaria del cerdo ibérico

**Autores:** Galán-Relaño A., Barrero-Domínguez B., Gómez-Gascón L., de Aguiar F., **Vera-Salmoral E.S.**, Maldonado A., Huerta B.

**Tipo de evento:** Póster en Congreso

**Ámbito:** Nacional

**Fecha:** 07/11/19-08/11/19

**Lugar:** Pamplona (España)

#### **International Symposium Salmonella and Salmonellosis Genetic**

**Título de la aportación:** Determinants of *Salmonella* Typhimurium and mST multi-drug resistant isolates belonging to pigs reared in extensive systems in the South of Spain.

**Autores:** Galán-Relaño, Ángela; Sánchez-Carvajal, José María; Gómez-Gascón, Lidia; Huerta Lorenzo, Belén; **Vera Salmoral, Eduardo**; Astorga Márquez, Rafael Jesús.

**Tipo de evento:** Póster en Congreso

**Ámbito:** Internacional

**Fecha:** 20/06/22-22/06/22

**Lugar:** Saint Malo (France)

### XIII Scientific Agriculture Symposium Agrosym

**Título de la aportación:** Application of control measures in a free-ranged pig farm with a backgrounds of porcine lymphadenitis.

**Autores:** Eduardo Vera-Salmoral, José María Sánchez-Carvajal, M<sup>a</sup> Ángeles Mena-Rodríguez, Lidia Gómez-Gascón, Inmaculada Luque, Carmen Tarradas, Alfonso Maldonado, Belén Huerta.

**Tipo de evento:** Póster en Congreso

**Ámbito:** Internacional

**Fecha:** 06/10/22-09/10/22

**Lugar:** Jahorina mountain (Bosnia and Herzegovina).

### VI Congreso EAVLD

**Título de la aportación:** Prevalence, antimicrobial resistance, and biofilm formation of methicillin-resistant staphylococci isolated in veterinary students of Cordoba university (Spain).

**Autores:** Lidia Gómez Gascón, Isabel Rodríguez-Fernández, M<sup>a</sup> Ángeles Mena-Rodríguez, Ángela Galán-Relaño, Eduardo Vera-Salmoral, Inmaculada Luque, Carmen Tarradas, Belén Huerta.

**Tipo de evento:** Póster en Congreso

**Ámbito:** Nacional

**Fecha:** 24/10/22-26/10/22

**Lugar:** Sevilla (España)

### VI Congreso EAVLD

**Título de la aportación:** Antimicrobial activity of oregano essential oil and carvacrol against *Streptococcus suis* isolates from human and porcine origin

**Autores:** Rafael Jesús Astorga Márquez, Antonio Coca, Lidia Gómez Gascón, Belén Huerta Lorenzo, Inmaculada Luque, Moreno, María Martínez Padilla, M<sup>a</sup> Ángeles Mena Rodríguez, Carmen Tarradas, Eduardo Vera Salmoral

**Tipo de evento:** Póster en Congreso

**Ámbito:** Nacional

**Fecha:** 24/10/22-26/10/22

**Lugar:** Sevilla (España)

### XI Congreso de Investigadores en formación

**Título de la aportación:** Antimicrobial resistance determinants in *Salmonella typhimurium* and mst multi-drug resistant strains isolated from pigs reared in extensive systems in southern Spain

**Autores:** Inmaculada Luque Moreno, Lidia Gómez Gascón, José María Sánchez Carvajal, Belén Huerta Lorenzo, Eduardo Vera Salmoral, M<sup>a</sup> Ángeles Mena Rodríguez, Rafael Jesús Astorga Márquez.

**Tipo de evento:** Póster en Congreso

**Ámbito:** Nacional

**Fecha:** 24/10/22-26/10/22

**Lugar:** Sevilla (España)

### Participación en proyectos

- 1) GOP2I-CO-16-0010GOP2I-CO-16-0010-SUBP. **Innotuber: Nuevas medidas y técnicas de control de la tuberculosis bovina en Andalucía.** Consejería de Agricultura, Pesca, Ganadería y Desarrollo Sostenible de la Junta de Andalucía. 2018-2020. 161.688,64 EUR. Investigador.

- 2) **Proyecto AgroMIS: ceiA3 instrumento estratégico hacia un tejido productivo Agroalimentario Moderno, Innovador y Sostenible: motor del territorio rural andaluz.**  
Sublínea: SL2421. Consejería de Conocimiento, Investigación y Universidad de la Junta de Andalucía. 2020-2022. Proyectos de interés colaborativo en el ámbito de los Ecosistemas de Innovación de los Centros de Excelencia Internacional. Investigador.





## CAPÍTULO VII: BIBLIOGRAFÍA

---





A. Gázquez, & M. A. Sierra. (2012). *Anatomía Patológica Sistémica Veterinaria*. ISBN 978-84-614-3082-6

Aagaard, C., Govaerts, M., Meikle, V., Vallecillo, A. J., Gutierrez-Pabello, J. A., Suarez-Güemes, F., McNair, J., Cataldi, A., Espitia, C., Andersen, P., & Pollock, J. M. (2006). Optimizing antigen cocktails for detection of *Mycobacterium bovis* in herds with different prevalences of bovine tuberculosis: ESAT6-CFP10 mixture shows optimal sensitivity and specificity. *Journal of Clinical Microbiology*, *44*(12), 4326–4335. <https://doi.org/10.1128/JCM.01184-06>

Abernethy, D. A., Upton, P., Higgins, I. M., McGrath, G., Goodchild, A. V., Rolfe, S. J., Broughan, J. M., Downs, S. H., Clifton-Hadley, R., Menzies, F. D., De La Rúa-Domenech, R., Blissitt, M. J., Duignan, A., & More, S. J. (2013). Bovine tuberculosis trends in the UK and the Republic of Ireland, 1995-2010. *Veterinary Record*, *172*(12), 312. <https://doi.org/10.1136/vr.100969>

Acevedo, P., Prieto, M., Quirós, P., Merediz, I., de Juan, L., Infantes-Lorenzo, J. A., Triguero-Ocaña, R., & Balseiro, A. (2019). Tuberculosis epidemiology and badger (*Meles meles*) spatial ecology in a hot-spot area in atlantic spain. *Pathogens*, *8*(4). <https://doi.org/10.3390/pathogens8040292>

Algammal, A. M., Wahdan, A., & Elhaig, M. M. (2019). Potential efficiency of conventional and advanced approaches used to detect *Mycobacterium bovis* in cattle. *Microbial Pathogenesis*, *134*. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2019.103574>

Allen, A. R., Ford, T., & Skuce, R. A. (2021). Does *Mycobacterium tuberculosis* var. *bovis* Survival in the Environment Confound Bovine Tuberculosis Control and Eradication? A Literature Review. In *Veterinary Medicine International* (Vol. 2021). Hindawi Limited. <https://doi.org/10.1155/2021/8812898>

Alvarez, A. H., Gutiérrez-Ortega, A., Gómez-Entzin, V., Pérez-Mayorga, G., Naranjo-Bastián, J., González-Martínez, V., Milián-Suazo, F., Martínez-Velázquez, M., Herrera-Rodríguez, S., & Hinojoza-Loza, E. (2017). Assessment of antigenic supplementation of bovine purified protein derivative for diagnosis of subclinical infection with *Mycobacterium bovis* in cattle. *Microbial Pathogenesis*, *108*, 114–121. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2017.05.012>

Álvarez, J., Perez, A., Bezos, J., Marqués, S., Grau, A., Saez, J. L., Mínguez, O., De Juan, L., & Domínguez, L. (2012). Evaluation of the sensitivity and specificity of bovine tuberculosis diagnostic tests in naturally infected cattle herds using a Bayesian approach. *Veterinary Microbiology*, *155*(1), 38–43. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2011.07.034>

Álvarez, J., Perez, A., Marqués, S., Bezos, J., Grau, A., De La Cruz, M. L., Romero, B., Luis Saez, J., Del, M., Esquivel, R., Del Carmen Martínez, M., Mínguez, O., De Juan, L., & Domínguez, L. (2014). *Risk factors associated with negative in-vivo diagnostic results in bovine tuberculosis-infected cattle in Spain*. <http://www.biomedcentral.com/1746-6148/10/14>

Aranaz, A., Bana, E. L., Mateos, A., Dominguez, L., Vidal, D., Domingo, M., Gonzolez, O., Rodriguez-Ferri, E. F., Bunschoten, A. E., Van Embden, J. D. A., & Cousins, D. (1996). Spacer Oligonucleotide Typing of *Mycobacterium bovis* Strains from Cattle and Other Animals: a Tool for Studying Epidemiology of Tuberculosis. In *JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY* (Vol. 34, Issue 11).

Aranaz, A., Liébana, E., Mateos, A., Domínguez, L., & Cousins, D. (1998). Restriction fragment length polymorphism and spacer oligonucleotide typing: A comparative analysis of fingerprinting strategies for *Mycobacterium bovis*. *Veterinary Microbiology*, *61*(4), 311–324. [https://doi.org/10.1016/S0378-1135\(98\)00192-8](https://doi.org/10.1016/S0378-1135(98)00192-8)

Araújo, C. P., Luiza, A., Osório, A. R., Jorge, K. S. G., Ramos, C. A. N., Souza Filho, A. F., Vidal, C. E. S., Vargas, A. P. C., Roxo, E., Rocha, A. S., Suffys, P. N., Fonseca Júnior, A. A., Silva, M. R., Barbosa Neto, J. D., Cerqueira, V. D., & Araújo, F. R. (2014). Direct detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex in bovine and bubaline tissues through nested-PCR. *Brazilian Journal of Microbiology*, *45*, 633–640. [www.sbmicrobiologia.org.br](http://www.sbmicrobiologia.org.br)

Araújo, C. P., Osório, A. L. A. R., Jorge, K. S. G., Ramos, C. A. N., Filho, A. F. S., Vidal, C. E. S., Roxo, E., Nishibe, C., Almeida, N. F., Júnior, A. A. F., Silva, M. R., Neto, J. D. B., Cerqueira, V. D., Zumárraga, M. J., & Araújo, F. R. (2014). Detection of *Mycobacterium bovis* in bovine and bubaline tissues using nested-PCR for TbD1. *PLoS ONE*, *9*(3). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0091023>

Arentz, M., & Hawn, T. R. (2007). *Tuberculosis Infection: Insight from Immunogenomics*.

Arias, M. M., & Molina, M. (2013). Características de las pruebas diagnósticas. *Revista Pediátrica de Atención Primaria*, 169–173.

Badia-Bringué, G., Canive, M., Casais, R., Blanco-Vázquez, C., Amado, J., Iglesias, N., González, A., Bascones, M., Juste, R. A., & Alonso-Hearn, M. (2022). Evaluation of a droplet digital PCR assay for quantification of *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis DNA in whole-blood and fecal samples from MAP-infected Holstein cattle. *Frontiers in Veterinary Science*, *9*. <https://doi.org/10.3389/fvets.2022.944189>

Baker, M. (2012). Digital PCR hits its stride. *Nature Methods*, *9*(6), 541–544. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2027>

Balseiro, A., González-Quirós, P., Rodríguez, Ó., Francisca Copano, M., Merediz, I., de Juan, L., Chambers, M. A., Delahay, R. J., Marreros, N., Royo, L. J., Bezos, J., Prieto, J. M., & Gortázar, C. (2013). Spatial relationships between Eurasian badgers (*Meles meles*) and cattle infected with *Mycobacterium bovis* in Northern Spain. *Veterinary Journal*, *197*(3), 739–745. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2013.03.017>

Balseiro, A., Gortázar, C., & Sáez, J. L. (2020). *Tuberculosis animal: una aproximación desde la perspectiva de la ciencia y la administración* (P. y A. Ministerio de Agricultura, Ed.).

Barandiaran, S., Aguirreburualde, M. S. P., Marfil, M. J., Vivot, M. M., Aznar, N., Zumárraga, M., & Perez, A. M. (2019). Bayesian assessment of the accuracy of a PCR-based rapid diagnostic test for bovine tuberculosis in swine. *Frontiers in Veterinary Science*, *6*(JUN). <https://doi.org/10.3389/fvets.2019.00204>

Barasona, J. A., Latham, M. C., Acevedo, P., Armenteros, J. A., Latham, A. D. M., Gortazar, C., Carro, F., Soriguer, R. C., & Vicente, J. (2014). Spatiotemporal interactions between wild boar and cattle: Implications for cross-species disease transmission. *Veterinary Research*, *45*(1). <https://doi.org/10.1186/s13567-014-0122-7>

Barasona, J. A., VerCauteren, K. C., Saklou, N., Gortazar, C., & Vicente, J. (2013). Effectiveness of cattle operated bump gates and exclusion fences in preventing ungulate multi-

host sanitary interaction. *Preventive Veterinary Medicine*, 111(1–2), 42–50. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2013.03.009>

Barasona, J. A., Vicente, J., Díez-Delgado, I., Aznar, J., Gortázar, C., & Torres, M. J. (2017). Environmental Presence of Mycobacterium tuberculosis Complex in Aggregation Points at the Wildlife/Livestock Interface. *Transboundary and Emerging Diseases*, 64(4), 1148–1158. <https://doi.org/10.1111/tbed.12480>

Bezós, J., Casal, C., Romero, B., Schroeder, B., Hardegger, R., Raeber, A. J., López, L., Rueda, P., & Domínguez, L. (2014). Current ante-mortem techniques for diagnosis of bovine tuberculosis. In *Research in Veterinary Science* (Vol. 97, Issue S, pp. S44–S52). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2014.04.002>

Borham, M., Oreiby, A., El-Gedawy, A., Hegazy, Y., Khalifa, H. O., Al-Gaabary, M., & Matsumoto, T. (2022). Review on Bovine Tuberculosis: An Emerging Disease Associated with Multidrug-Resistant Mycobacterium Species. In *Pathogens* (Vol. 11, Issue 7). MDPI. <https://doi.org/10.3390/pathogens11070715>

Brener, D., Staley, J., & Krieg, N. (2005). *Classification of procaryotic organisms and the concept of bacterial speciation. Bergey's manual of systematic bacteriology.*

Brosch, R., Gordon, S. V., Marmiesse, M., Brodin, P., Buchrieser, C., Eiglmeier, K., Garnier, T., Gutierrez, C., Hewinson, G., Kremer, K., Parsons, L. M., Pym, A. S., Samper, S., van Soolingen, D., & Cole, S. T. (2002). A new evolutionary scenario for the Mycobacterium tuberculosis complex. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(6), 3684–3689. <https://doi.org/10.1073/pnas.052548299>

Broughan, J. M., Judge, J., Ely, E., Delahay, R. J., Wilson, G., Clifton-Hadley, R. S., Goodchild, A. V., Bishop, H., Parry, J. E., & Downs, S. H. (2016). Review article a review of risk factors for bovine tuberculosis infection in cattle in the UK and Ireland. In *Epidemiology and Infection* (Vol. 144, Issue 14, pp. 2899–2926). Cambridge University Press. <https://doi.org/10.1017/S095026881600131X>

Buddle, B. M., McCarthy, A. R., Ryan, T. J., Pollock, J. M., Vordermeier, H. M., Hewinson, R. G., Andersen, P., De Lisle, G. W., McCarthy, A. R., de Lisle, G. W., & Health Board, A. (2003). Use of mycobacterial peptides and recombinant proteins for the diagnosis of bovine tuberculosis in skin test-positive cattle. In *PAPERS & ARTICLES*. <http://veterinaryrecord.bmj.com/>

Buddle, B. M., Ryan, T. J., Pollock, J. M., Andersen, P., & De Lisle, G. W. (2001). *Use of ESAT-6 in the interferon-g test for diagnosis of bovine tuberculosis following skin testing.*

Cano-Terriza, D., Risalde, M. A., Rodríguez-Hernández, P., Napp, S., Fernández-Morente, M., Moreno, I., Bezós, J., Fernández-Molera, V., Sáez, J. L., & García-Bocanegra, I. (2018). Epidemiological surveillance of Mycobacterium tuberculosis complex in extensively raised pigs in the south of Spain. *Preventive Veterinary Medicine*, 159, 87–91. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2018.08.015>

Cao, Z., Wu, W., Wei, H., Gao, C., Zhang, L., Wu, C., & Hou, L. (2020). Using droplet digital PCR in the detection of Mycobacterium tuberculosis DNA in FFPE samples. *International Journal of Infectious Diseases*, 99, 77–83. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2020.07.045>

Caraguel, C. G. B., & Colling, A. (2021). Diagnostic likelihood ratio – the next generation of diagnostic test accuracy measurement. *OIE Revue Scientifique et Technique*, 40(1), 299–309. <https://doi.org/10.20506/rst.40.1.3226>

Cardoso-Toset, F., Luque, I., Amarilla, S. P., Gómez-Gascón, L., Fernández, L., Huerta, B., Carrasco, L., Ruiz, P., & Gómez-Laguna, J. (2015). Evaluation of rapid methods for diagnosis of tuberculosis in slaughtered free-range pigs. *Veterinary Journal*, 204(2), 232–234. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2015.01.022>

Casal, C., Díez-Guerrier, A., Álvarez, J., Rodríguez-Campos, S., Mateos, A., Linscott, R., Martel, E., Lawrence, J. C., Whelan, C., Clarke, J., O'Brien, A., Domínguez, L., & Aranaz, A. (2014). Strategic use of serology for the diagnosis of bovine tuberculosis after intradermal skin testing. *Veterinary Microbiology*, 170(3–4), 342–351. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2014.02.036>

Chen, B., Jiang, Y., Cao, X., Liu, C., Zhang, N., & Shi, D. (2021). Droplet digital PCR as an emerging tool in detecting pathogens nucleic acids in infectious diseases. *Clinica Chimica Acta*, 517, 156–161. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2021.02.008>

Clegg, T. A., Doyle, M., Ryan, E., More, S. J., & Gormley, E. (2019). Characteristics of Mycobacterium bovis infected herds tested with the interferon-gamma assay. *Preventive Veterinary Medicine*, 168, 52–59. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2019.04.004>

Gardner IA, Colling A, Caraguel C, Crowther JR, Jones G, Firestone SM, Heuer C. Introduction - Validation of tests for OIE-listed diseases as fit-for-purpose in a world of evolving diagnostic technologies. *Rev Sci Tech*. 2021 Jun;40(1):19-28. English, French, Spanish. doi: 10.20506/rst.40.1.3207. PMID: 34140741.

Corner', A., & Trajstman, A. C. (1988). Mycobacterium boris from Bovine Lesions. In *Vctcrinary Microbiology* (Vol. 18).

Corner, L. A. (1994). Post mortem diagnosis of Mycobacterium bovis infection in cattle. *Veterinary Microbiology*, 40(1–2), 53–63. [https://doi.org/10.1016/0378-1135\(94\)90046-9](https://doi.org/10.1016/0378-1135(94)90046-9)

Corner, L. A. L. (2006). The role of wild animal populations in the epidemiology of tuberculosis in domestic animals: How to assess the risk. *Veterinary Microbiology*, 112(2-4 SPEC. ISS.), 303–312. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2005.11.015>

Corner, L. A. L., Gormley, E., & Pfeiffer, D. U. (2012). Primary isolation of Mycobacterium bovis from bovine tissues: Conditions for maximising the number of positive cultures. *Veterinary Microbiology*, 156(1–2), 162–171. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2011.10.016>

Coros, A., DeConno, E., & Derbyshire, K. M. (2008). IS6110, a Mycobacterium tuberculosis complex-specific insertion sequence, is also present in the genome of Mycobacterium smegmatis, suggestive of lateral gene transfer among mycobacterial species. *Journal of Bacteriology*, 190(9), 3408–3410. <https://doi.org/10.1128/JB.00009-08>

Costa, J. (2004). Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) a tiempo real. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 22(5), 299–305. [https://doi.org/10.1016/s0213-005x\(04\)73092-x](https://doi.org/10.1016/s0213-005x(04)73092-x)

Costa, P., Ferreira, A. S., Amaro, A., Albuquerque, T., Botelho, A., Couto, I., Cunha, M. V., Viveiros, M., & Inácio, J. (2013). Enhanced detection of tuberculous mycobacteria in animal

tissues using a semi-nested probe-based real-time PCR. *PLoS ONE*, 8(11). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0081337>

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(3). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0090334>

de Dios, T. L. (2013). *Tecnología en salud* (Vol. 2). [www.medigraphic.org.mx](http://www.medigraphic.org.mx)  
<http://www.medigraphic.com/rid>  
[www.medigraphic.org.mx](http://www.medigraphic.org.mx)

De La Rúa-Domenech, R. (2006). Human Mycobacterium bovis infection in the United Kingdom: Incidence, risks, control measures and review of the zoonotic aspects of bovine tuberculosis. In *Tuberculosis* (Vol. 86, Issue 2, pp. 77–109). <https://doi.org/10.1016/j.tube.2005.05.002>

de la Rúa-Domenech, R., Goodchild, A. T., Vordermeier, H. M., Hewinson, R. G., Christiansen, K. H., & Clifton-Hadley, R. S. (2006). Ante mortem diagnosis of tuberculosis in cattle: A review of the tuberculin tests,  $\gamma$ -interferon assay and other ancillary diagnostic techniques. In *Research in Veterinary Science* (Vol. 81, Issue 2, pp. 190–210). <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2005.11.005>

De Lisle, G. W., Mackintosh, C. G., & Schlundt, J. (2001). Mycobacterium bovis in a free-living and captive wildlife, including farmed deer. *Revue Scientifique et Technique de l'OIE*, 20(1), 86–111. <https://doi.org/10.20506/rst.20.1.1262>

Dean, A. S., Forcella, S., Olea-Popelka, F., Idrissi, A. El, Glaziou, P., Benyahia, A., Mumford, E., Erlacher-Vindel, E., Gifford, G., Lubroth, J., Raviglione, M., & Fujiwara, P. (2018). A roadmap for zoonotic tuberculosis: a One Health approach to ending tuberculosis. In *The Lancet Infectious Diseases* (Vol. 18, Issue 2, pp. 137–138). Lancet Publishing Group. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(18\)30013-6](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(18)30013-6)

Di Marco, V., Mazzone, P., Capucchio, M. T., Boniotti, M. B., Aronica, V., Russo, M., Fiasconaro, M., Cifani, N., Corneli, S., Biasibetti, E., Biagetti, M., Pacciarini, M. L., Cagiola, M., Pasquali, P., & Marianelli, C. (2012). Epidemiological Significance of the Domestic Black Pig (*Sus scrofa*) in Maintenance of Bovine Tuberculosis in Sicily. *Journal of Clinical Microbiology*, 50(4), 1209–1218. <https://doi.org/10.1128/JCM.06544-11>

Dibaba, A. B., Kriek, N. P. J., & Thoen Editors, C. O. (2019). *Tuberculosis in Animals: An African Perspective*.

Dingle, T. C., Sedlak, R. H., Cook, L., & Jerome, K. R. (2013). Tolerance of Droplet-Digital PCR vs Real-Time Quantitative PCR to Inhibitory Substances. *Clinical Chemistry*, 59(11), 1670–1672. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2013.211045>

Domingo, M., Vidal, E., & Marco, A. (2014). Pathology of bovine tuberculosis. *Research in Veterinary Science*, 97(S), S20–S29. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2014.03.017>

Donnelly, C. A., & Nouvellet, P. (2013). The contribution of badgers to confirmed tuberculosis in cattle in high-incidence areas in England. *PLoS Currents*, 5. <https://doi.org/10.1371/currents.outbreaks.097a904d3f3619db2fe78d24bc776098>

Durr, P. A., Hewinson, R. G., & Clifton-Hadley, R. S. (2000). Molecular epidemiology of bovine tuberculosis I. Mycobacterium bovis genotyping. In *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz* (Vol. 19, Issue 3).

EFSA. (2013). Modelling the impact of a change in Meat Inspection sensitivity on the surveillance of bovine tuberculosis (bTB) at the country level. *EFSA Supporting Publications*, 10(6). <https://doi.org/10.2903/sp.efs.2013.EN-450>

Fan, Y., Chen, J., Liu, M., Xu, X., Zhang, Y., Yue, P., Cao, W., Ji, Z., Su, X., Wen, S., Kong, J., Zhou, G., Li, B., Dong, Y., Liu, A., & Bao, F. (2022). Application of Droplet Digital PCR to Detection of Mycobacterium tuberculosis and Mycobacterium leprae Infections: A Narrative Review. In *Infection and Drug Resistance* (Vol. 15, pp. 1067–1076). Dove Medical Press Ltd. <https://doi.org/10.2147/IDR.S349607>

FAO. (2023). *FAOSTAT*. <https://www.fao.org/faostat/es/#data/TCL/visualize>.

Fell, S., Bröckl, S., Büttner, M., Rettinger, A., Zimmermann, P., & Straubinger, R. K. (2016). Two alternative DNA extraction methods to improve the detection of Mycobacterium-tuberculosis-complex members in cattle and red deer tissue samples. *BMC Microbiology*, 16(1). <https://doi.org/10.1186/s12866-016-0816-2>

Francis, J. (1971). Susceptibility to tuberculosis and the route of infection. *Australian Veterinary Journal*, 47(9), 414–414. <https://doi.org/10.1111/j.1751-0813.1971.tb02165.x>

Frothingham, R., & Meeker-O'Connell, W. A. (1998). Genetic diversity in the Mycobacterium tuberculosis complex based on variable numbers of tandem DNA repeats. *Microbiology*, 144(5), 1189–1196. <https://doi.org/10.1099/00221287-144-5-1189>

Garbaccio, S. G., Garro, C. J., Delgado, F. O., Tejada, G. A., Eirin, M. E., Huertas, P. S., Leon, L. A., & Zumárraga, M. J. (2019). Enzyme-linked immunosorbent assay as complement of intradermal skin test for the detection of mycobacterium bovis infection in cattle. *Tuberculosis*, 117, 56–61. <https://doi.org/10.1016/j.tube.2019.05.006>

García-Fernández, S., Vergara-Gómez, A., María Sánchez-Díaz, A., & Vicent, E. A. (2022). *Estudios de evaluación del rendimiento analítico y clínico de productos sanitarios para diagnóstico in vitro* (Cercenado Mansilla E. & Cantón Moreno R., Eds.). Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC). [www.seimc.org](http://www.seimc.org)

García-Jiménez, W. L., Salguero, F. J., Fernández-Llario, P., Martínez, R., Risco, D., Gough, J., Ortiz-Peláez, A., Hermoso-de-Mendoza, J., & Gómez, L. (2013). Immunopathology of granulomas produced by Mycobacterium bovis in naturally infected wild boar. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 156(1–2), 54–63. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2013.09.008>

García-Saenz, A., Napp, S., Lopez, S., Casal, J., & Allepuz, A. (2015). Estimation of the individual slaughterhouse surveillance sensitivity for bovine tuberculosis in Catalonia (North-Eastern Spain). *Preventive Veterinary Medicine*, 121(3–4), 332–337. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2015.08.008>

Gavier-Widén, D., Cooke, M. M., Gallagher, J., Chambers, M. A., & Gortázar, C. (2009). A review of infection of wildlife hosts with mycobacterium bovis and the diagnostic difficulties of the 'no visible lesion' presentation. In *New Zealand Veterinary Journal* (Vol. 57, Issue 3, pp. 122–131). <https://doi.org/10.1080/00480169.2009.36891>



Goel MM, & Budhwar P. (2007). Immunohistochemical localization of mycobacterium tuberculosis complex antigen with antibody to 38 kDa antigen versus Ziehl Neelsen staining in tissue granulomas of extrapulmonary tuberculosis. *The Indian Journal of Tuberculosis*.

Good, M., & Duignan, A. (2011). Perspectives on the history of bovine TB and the role of tuberculin in bovine TB eradication. In *Veterinary Medicine International* (Vol. 2011). <https://doi.org/10.4061/2011/410470>

Goodfellow, M., & J.G. Magee. (1998). Taxonomy of mycobacteria. In Gangadharam & Jenkins (Eds.), *Mycobacteria: I Basic Aspects* (pp. 1–71).

Gormley, E., Corner, L. A. L., Costello, E., & Rodriguez-Campos, S. (2014). Bacteriological diagnosis and molecular strain typing of *Mycobacterium bovis* and *Mycobacterium caprae*. *Research in Veterinary Science*, 97(S), S30–S43. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2014.04.010>

Gormley, E., Doyle, M. B., Fitzsimons, T., McGill, K., & Collins, J. D. (2006). Diagnosis of *Mycobacterium bovis* infection in cattle by use of the gamma-interferon (Bovigam®) assay. *Veterinary Microbiology*, 112(2-4 SPEC. ISS.), 171–179. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2005.11.029>

Gormley, E., Doyle, M., Duignan, A., Good, M., More, S. J., & Clegg, T. A. (2013). Identification of risk factors associated with disclosure of false positive bovine tuberculosis reactors using the gamma-interferon (IFN $\gamma$ ) assay. <http://www.veterinaryresearch.org/content/44/1/117>

Gortazar, C., Vicente, J., Boadella, M., Ballesteros, C., Galindo, R. C., Garrido, J., Aranaz, A., & de la Fuente, J. (2011). Progress in the control of bovine tuberculosis in Spanish wildlife. *Veterinary Microbiology*, 151(1–2), 170–178. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2011.02.041>

Green, M. R., & Sambrook, J. (2019). Nested polymerase chain reaction (PCR). *Cold Spring Harbor Protocols*, 2019(2). <https://doi.org/10.1101/pdb.prot095182>

Grilli M. (2020). Eficacia de una prueba diagnóstica. *Revista Fasgo*, 19, 114–124.

Guimaraes, A. M. S., & Zimpel, C. K. (2020). *Mycobacterium bovis*: From genotyping to genome sequencing. In *Microorganisms* (Vol. 8, Issue 5). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8050667>

Gupta, R. S., Lo, B., & Son, J. (2018). Phylogenomics and comparative genomic studies robustly support division of the genus *Mycobacterium* into an emended genus *Mycobacterium* and four novel genera. *Frontiers in Microbiology*, 9(FEB). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00067>

Guta, S., Casal, J., Garcia-Saenz, A., Saez, J. L., Pacios, A., Garcia, P., Napp, S., & Allepuz, A. (2014). Risk factors for bovine tuberculosis persistence in beef herds of Southern and Central Spain. *Preventive Veterinary Medicine*, 115(3–4), 173–180. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2014.04.007>

Gutiérrez Cancela, M. M., & García Marín, J. F. (1993). Comparison of Ziehl-Neelsen staining and immunohistochemistry for the detection of *Mycobacterium bovis* in bovine and caprine tuberculous lesions. *Journal of Comparative Pathology*, 109(4), 361–370. [https://doi.org/10.1016/S0021-9975\(08\)80299-X](https://doi.org/10.1016/S0021-9975(08)80299-X)

Hallur, V., Sharma, M., Sethi, S., Sharma, K., Mewara, A., Dhatwalia, S., Yadav, R., Bhasin, D., Sinha, S. K., Rana, S., & Joshi, K. (2013). Development and evaluation of multiplex PCR in rapid diagnosis of abdominal tuberculosis. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 76(1), 51–55. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2013.02.022>

Harboe, M., Wiker, H. G., Duncan, J. R., Garcia, M. M., Dukes, T. W., Brooks, B. W., Turcotte, C., & Nagai, S. (1990). Protein G-Based Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for Anti-MPB70 Antibodies in Bovine Tuberculosis. In *JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY*.

Hauer, A., Michelet, L., de Cruz, K., Cochard, T., Branger, M., Karoui, C., Henault, S., Biet, F., Laura Boschioli, M., & De Cruz, K. (2016). MIRU-VNTR allelic variability depends on Mycobacterium bovis clonal group identity MIRU-VNTR allelic variability depends on Mycobacterium bovis clonal group identity MIRU-VNTR allelic variability depends on Mycobacterium bovis clonal group identity. *Infection, Genetics and Evolution*, 45, 165–169. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2016.08.038>

Hines, N., Payeur, J. B., & Hoffman, L. J. (n.d.). *Comparison of the recovery of Mycobacterium bovis isolates using the BACTEC MGIT 960 system, BACTEC 460 system, and Middlebrook 7H10 and 7H11 solid media.*

Houben, R. M. G. J., & Dodd, P. J. (2016). The Global Burden of Latent Tuberculosis Infection: A Re-estimation Using Mathematical Modelling. *PLOS Medicine*, 13(10), e1002152. <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.1002152>

Huggett, J. F., & Whale, A. (2013). Digital PCR as a Novel Technology and Its Potential Implications for Molecular Diagnostics. *Clinical Chemistry*, 59(12), 1691–1693. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2013.214742>

Humblet, M. F., Boschioli, M. L., & Saegerman, C. (2009). Classification of worldwide bovine tuberculosis risk factors in cattle: A stratified approach. In *Veterinary Research* (Vol. 40, Issue 5). <https://doi.org/10.1051/vetres/2009033>

Jaime, G.-L., Carrasco, L., Ramis, G., Quereda, J. J., Gómez, S., & J. Pallarés, F. (2010). Use of Real-Time and Classic Polymerase Chain Reaction Assays for the Diagnosis of Porcine Tuberculosis in Formalin-Fixed, Paraffin-Embedded Tissues. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 22(1), 123–127. <https://doi.org/10.1177/104063871002200126>

Jessica Salinas, L. (2012). Immune mediated damage. *Revista Medica Clinica Las Condes*, 23(4), 458–463. [https://doi.org/10.1016/S0716-8640\(12\)70336-X](https://doi.org/10.1016/S0716-8640(12)70336-X)

Johnson, L. K., Liebana, E., Nunez, A., Spencer, Y., Clifton-Hadley, R., Jahans, K., Ward, A., Barlow, A., & Delahay, R. (2008). Histological observations of bovine tuberculosis in lung and lymph node tissues from British deer. *Veterinary Journal*, 175(3), 409–412. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2007.04.021>

Jones, G. J., Whelan, A., Clifford, D., Coad, M., & Vordermeier, H. M. (2012). Improved skin test for differential diagnosis of bovine tuberculosis by the addition of Rv3020c-derived peptides. *Clinical and Vaccine Immunology*, 19(4), 620–622. <https://doi.org/10.1128/CVI.00024-12>

Kapalamula, T. F., Thapa, J., Akapelwa, M. L., Hayashida, K., Gordon, S. V., Hang'ombe, B. M., Munyeme, M., Solo, E. S., Bwalya, P., Nyenje, M. E., Tamaru, A., Suzuki, Y., & Nakajima, C.

(2021). Development of a loop-mediated isothermal amplification (LAMP) method for specific detection of *Mycobacterium bovis*. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, *15*(1), e0008996. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0008996>

Karimi, S., Shamaei, M., Pourabdollah, M., Sadr, M., Karbasi, M., Kiani, A., & Bahadori, M. (2014). Histopathological Findings in Immunohistological Staining of the Granulomatous Tissue Reaction Associated with Tuberculosis. *Tuberculosis Research and Treatment*, *2014*, 1–6. <https://doi.org/10.1155/2014/858396>

Karolemeas, K., de la Rua-Domenech, R., Cooper, R., Goodchild, A. V., Clifton-Hadley, R. S., Conlan, A. J. K., Mitchell, A. P., Hewinson, R. G., Donnelly, C. A., Wood, J. L. N., & McKinley, T. J. (2012). Estimation of the relative sensitivity of the comparative tuberculin skin test in tuberculous cattle herds subjected to depopulation. *PLoS ONE*, *7*(8). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0043217>

K.N. Kuria, J. (2019). Diseases Caused by Bacteria in Cattle: Tuberculosis. In *Bacterial Cattle Diseases*. IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/intechopen.82051>

Krajewska-Wędzina, M., Weiner, M., Anusz, K., Augustynowicz-Kopeć, E., Lipiec, M., & Szulowski, K. (2019). Human as a potential vector of bovine tuberculosis in cattle. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine*, *26*(3), 396–399. <https://doi.org/10.26444/aaem/102814>

Kundu, R., Mohan, H., Kohli, R., Punia, R., & Kaushik, R. (2014). Relative value of immunohistochemistry in detection of mycobacterial antigen in suspected cases of tuberculosis in tissue sections. *Indian Journal of Pathology and Microbiology*, *57*(4), 574. <https://doi.org/10.4103/0377-4929.142667>

Kuypers, J., & Jerome, K. R. (2017). Applications of Digital PCR for Clinical Microbiology. *Journal of Clinical Microbiology*, *55*(6), 1621–1628. <https://doi.org/10.1128/JCM.00211-17>

Kwok, S., & Higuchi, R. (1989). Avoiding false positives with PCR. *Nature*, *339*(6221), 237–238. <https://doi.org/10.1038/339237a0>

Larenas-Muñoz, F., Sánchez-Carvajal, J. M., Galán-Relaño, Á., Ruedas-Torres, I., Vera-Salmoral, E., Gómez-Gascón, L., Maldonado, A., Carrasco, L., Tarradas, C., Luque, I., Rodríguez-Gómez, I. M., & Gómez-Laguna, J. (2022). The Role of Histopathology as a Complementary Diagnostic Tool in the Monitoring of Bovine Tuberculosis. *Frontiers in Veterinary Science*, *9*. <https://doi.org/10.3389/fvets.2022.816190>

Liébana, E. L., Aranaz, A., Mateos, A., Vilafranca, M., Gomez-Mampaso, E., Tercero, J. C., Alemany, J., Suarez, G., Domingo, M., & Dominguez, L. (1995). Simple and Rapid Detection of *Mycobacterium tuberculosis* Complex Organisms in Bovine Tissue Samples by PCR. In *JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY* (Vol. 33, Issue 1).

Lilenbaum, W., Schettini, J. C., Souza, G. N., Ribeiro, E. R., Moreira, E. C., & Fonseca, L. S. (1999). Comparison Between a  $\gamma$ -IFN Assay and Intradermal Tuberculin Test for the Diagnosis of Bovine Tuberculosis in Field Trials in Brazil. *Journal of Veterinary Medicine, Series B*, *46*(5), 353–358. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0450.1999.tb01240.x>

Lombard, J. E., Patton, E. A., Gibbons-Burgener, S. N., Klos, R. F., Tans-Kersten, J. L., Carlson, B. W., Keller, S. J., Pritschet, D. J., Rollo, S., Dutcher, T. V., Young, C. A., Hench, W. C., Thacker, T.

C., Perea, C., Lehmkuhl, A. D., & Robbe-Austerman, S. (2021). Human-to-Cattle Mycobacterium tuberculosis Complex Transmission in the United States. *Frontiers in Veterinary Science*, 8. <https://doi.org/10.3389/fvets.2021.691192>

Lorente-Leal, V., Liandris, E., Castellanos, E., Bezos, J., Domínguez, 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. *Frontiers in Veterinary Science*, 6(MAR). <https://doi.org/10.3389/fvets.2019.00061>

Lorente-Leal, V., Liandris, E., Pacciarini, M., Botelho, A., Kenny, K., Loyo, B., Fernández, R., Bezos, J., Domínguez, L., De Juan, L., & Romero, B. (2021). *Direct PCR on Tissue Samples To Detect Mycobacterium tuberculosis Complex: an Alternative to the Bacteriological Culture*. <https://doi.org/10>

Lyu, L., Li, Z., Pan, L., Jia, H., Sun, Q., Liu, Q., & Zhang, Z. (2020). Evaluation of digital PCR assay in detection of M.tuberculosis IS6110 and IS1081 in tuberculosis patients plasma. *BMC Infectious Diseases*, 20(1), 657. <https://doi.org/10.1186/s12879-020-05375-y>

Mackay, I. M. (2004). Real-time PCR in the microbiology laboratory. In *Clinical Microbiology and Infection* (Vol. 10, Issue 3, pp. 190–212). Blackwell Publishing Ltd. <https://doi.org/10.1111/j.1198-743X.2004.00722.x>

Magdalena, J., Vaché, A., Supply, P., & Locht, C. (1998). Identification of a New DNA Region Specific for Members of Mycobacterium tuberculosis Complex. In *JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY* (Vol. 36, Issue 4).

Magee, J. G., & Ward, A. C. (2015). Mycobacterium. In *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria* (pp. 1–84). Wiley. <https://doi.org/10.1002/9781118960608.gbm00029>

MAPA. (2021). *Indicadores anuales vacuno de carne*.

MAPA. (2023). *Programa nacional de erradicación de tuberculosis bovina 2023 (Infección por el complejo Mycobacterium tuberculosis)*.

MAPA, & AECOSAN. (2017). *Plan de actuación sobre tuberculosis en especies silvestres*.

Martín-Hernando, M. P., Höfle, U., Vicente, J., Ruiz-Fons, F., Vidal, D., Barral, M., Garrido, J. M., de la Fuente, J., & Gortazar, C. (2007). Lesions associated with Mycobacterium tuberculosis complex infection in the European wild boar. *Tuberculosis*, 87(4), 360–367. <https://doi.org/10.1016/j.tube.2007.02.003>

Meehan, C. J., Barco, R. A., Loh, Y. H. E., Cogneau, S., & Rigouts, L. (2021). Reconstituting the genus mycobacterium. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 71(9). <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.004922>

Mekonnen, G. A., Conlan, A. J. K., Berg, S., Ayele, B. T., Alemu, A., Guta, S., Lakew, M., Tadesse, B., Gebre, S., Wood, J. L. N., & Ameni, G. (2019). Prevalence of bovine tuberculosis and its associated risk factors in the emerging dairy belts of regional cities in Ethiopia. *Preventive Veterinary Medicine*, 168, 81–89. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2019.04.010>

Michel, A. L., Geoghegan, C., Hlokwe, T., Raseleka, K., Getz, W. M., & Marcotty, T. (2015). Longevity of Mycobacterium bovis in raw and traditional souring milk as a function of storage temperature and dose. *PLoS ONE*, 10(6). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0129926>

- Mishra, A., Singhal, A., Chauhan, D. S., Katoch, V. M., Srivastava, K., Thakral, S. S., Bharadwaj, S. S., Sreenivas, V., & Prasad, H. K. (2005). Direct detection and identification of *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium bovis* in bovine samples by a novel nested PCR assay: Correlation with conventional techniques. *Journal of Clinical Microbiology*, *43*(11), 5670–5678. <https://doi.org/10.1128/JCM.43.11.5670-5678.2005>
- Monaghan, M. L., Doherty, M. L., Collins, J. D., Kazda, J. F., & Quinn, P. J. (1994). The tuberculin test. *Veterinary Microbiology*, *40*(1–2), 111–124. [https://doi.org/10.1016/0378-1135\(94\)90050-7](https://doi.org/10.1016/0378-1135(94)90050-7)
- Muñoz-Mendoza, M., Marreros, N., Boadella, M., Gortázar, C., Menéndez, S., de Juan, L., Bezos, J., Romero, B., Copano, M. F., Amado, J., Sáez, J. L., Mourelo, J., & Balseiro, A. (2013). Wild boar tuberculosis in Iberian Atlantic Spain: a different picture from Mediterranean habitats. *BMC Veterinary Research*, *9*(1), 176. <https://doi.org/10.1186/1746-6148-9-176>
- Musoke, J., Hlokwe, T., Marcotty, T., Du Plessis, B. J. A., & Michel, A. L. (2015). Spillover of *Mycobacterium bovis* from wildlife to livestock, south africa. *Emerging Infectious Diseases*, *21*(3), 448–451. <https://doi.org/10.3201/eid2103.131690>
- Naranjo, V., Gortazar, C., Vicente, J., & de la Fuente, J. (2008). Evidence of the role of European wild boar as a reservoir of *Mycobacterium tuberculosis* complex. In *Veterinary Microbiology* (Vol. 127, Issues 1–2, pp. 1–9). <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2007.10.002>
- Neill, S. D., Pollock, J. M., Bryson, D. B., & Hanna, J. (1994). Pathogenesis of *Mycobacterium bovis* infection in cattle. *Veterinary Microbiology*, *40*(1–2), 41–52. [https://doi.org/10.1016/0378-1135\(94\)90045-0](https://doi.org/10.1016/0378-1135(94)90045-0)
- Notomi, T., Okayama, H., Masubuchi, H., Yonekawa, T., Watanabe, K., Amino, N., & Hase, T. (2000). Loop-mediated isothermal amplification of DNA. In *Nucleic Acids Research* (Vol. 28, Issue 12).
- Nugent, G. (2011). Maintenance, spillover and spillback transmission of bovine tuberculosis in multi-host wildlife complexes: A New Zealand case study. *Veterinary Microbiology*, *151*(1–2), 34–42. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2011.02.023>
- Nuru, A., Zewude, A., Mohammed, T., Wondale, B., Teshome, L., Getahun, M., Mamo, G., Medhin, G., Pieper, R., & Ameni, G. (2017). Nontuberculosis mycobacteria are the major causes of tuberculosis like lesions in cattle slaughtered at Bahir Dar Abattoir, northwestern Ethiopia. *BMC Veterinary Research*, *13*(1). <https://doi.org/10.1186/s12917-017-1168-3>
- Nyaruaba, R., Xiong, J., Mwaliko, C., Wang, N., Kibii, B. J., Yu, J., & Wei, H. (2020). Development and Evaluation of a Single Dye Duplex Droplet Digital PCR Assay for the Rapid Detection and Quantification of *Mycobacterium tuberculosis*. *Microorganisms*, *8*(5), 701. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8050701>
- Olea-Popelka, F., Muwonge, A., Perera, A., Dean, A. S., Mumford, E., Erlacher-Vindel, E., Forcella, S., Silk, B. J., Ditiu, L., El Idrissi, A., Raviglione, M., Cosivi, O., LoBue, P., & Fujiwara, P. I. (2017). Zoonotic tuberculosis in human beings caused by *Mycobacterium bovis*—a call for action. In *The Lancet Infectious Diseases* (Vol. 17, Issue 1, pp. e21–e25). Lancet Publishing Group. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(16\)30139-6](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(16)30139-6)

Olsen, I., Boysen, P., Kulberg, S., Hope, J. C., Jungersen, G., & Storset, A. K. (2005). Bovine NK cells can produce gamma interferon in response to the secreted mycobacterial proteins ESAT-6 and MPP14 but not in response to MPB70. *Infection and Immunity*, 73(9), 5628–5635. <https://doi.org/10.1128/IAI.73.9.5628-5635.2005>

OMSA. (2018). *Principios y métodos de validación de las pruebas de diagnóstico de las enfermedades infecciosas*.

OMSA. (2022). *Tuberculosis de los mamíferos (Infección por el Complejo Mycobacterium tuberculosis)*

O'Reilly, L. M., & Daborn, C. J. (1995). The epidemiology of Mycobacterium bovis infections in animals and man: A review. *Tubercle and Lung Disease*, 76, 1–46. [https://doi.org/10.1016/0962-8479\(95\)90591-X](https://doi.org/10.1016/0962-8479(95)90591-X)

Orden de 22 de junio de 2018, por la que se desarrollan las normas de calificación de explotaciones de la especie caprina frente a tuberculosis en Andalucía, se regula la vacunación de paratuberculosis en caprino en Andalucía y por la que se modifica la Orden de 29 de noviembre de 2004 que desarrolla las normas de ejecución de los programas nacionales de vigilancia, prevención, control y erradicación de las enfermedades de los animales en Andalucía. [https://www.juntadeandalucia.es/eboja/2018/123/BOJA18-123-00016-11123-01\\_00138446.pdf](https://www.juntadeandalucia.es/eboja/2018/123/BOJA18-123-00016-11123-01_00138446.pdf)

Orme, I. M., & Cooper, A. M. (1999). Cytokine/chemokine cascades in immunity to tuberculosis. *Immunology Today*, 20(7), 307–312. [https://doi.org/10.1016/S0167-5699\(98\)01438-8](https://doi.org/10.1016/S0167-5699(98)01438-8)

P. R. Murray, K. Rosenthal, & M. A. Pfaller. (2020). *Medical Microbiology*.

Palmer, M. V., Kanipe, C., & Boggiatto, P. M. (2022). The Bovine Tuberculoid Granuloma. In *Pathogens* (Vol. 11, Issue 1). MDPI. <https://doi.org/10.3390/pathogens11010061>

Parra, A., García, N., García, A., Lacombe, A., Moreno, F., Freire, F., Moran, J., & Hermoso de Mendoza, J. (2008). Development of a molecular diagnostic test applied to experimental abattoir surveillance on bovine tuberculosis. *Veterinary Microbiology*, 127(3–4), 315–324. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2007.09.001>

Pérez-Lago, L., Navarro, Y., & García-de-Viedma, D. (2014). Current knowledge and pending challenges in zoonosis caused by Mycobacterium bovis: A review. *Research in Veterinary Science*, 97(S), S94–S100. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2013.11.008>

Pesciaroli, M., Alvarez, J., Boniotti, M. B., Cagiola, M., Di Marco, V., Marianelli, C., Pacciarini, M., & Pasquali, P. (2014). Tuberculosis in domestic animal species. *Research in Veterinary Science*, 97(S), S78–S85. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2014.05.015>

Pollock, J. M., Girvin, R. M., Lightbody, K. A., Clements, R. A., Neill, S. D., Buddle, B. M., Andersen, P., 4dn, B., Hutt, U., & Andersen, Z. P. (2000). *Assessment of defined antigens for the diagnosis of bovine tuberculosis in skin test-reactor cattle*. <http://veterinaryrecord.bmj.com/>

Pollock, J. M., & Neill, S. D. (2002). Mycobacterium bovis infection and tuberculosis in cattle. In *Veterinary Journal* (Vol. 163, Issue 2, pp. 115–127). <https://doi.org/10.1053/tvjl.2001.0655>

Probst, C., Freuling, C., Moser, I., Geue, L., Köhler, H., Conraths, F. J., Hotzel, H., Liebler-Tenorio, E. M., & Kramer, M. (2011). Bovine tuberculosis: Making a case for effective surveillance. *Epidemiology and Infection*, *139*(1), 105–112. <https://doi.org/10.1017/S0950268810000786>

Pucken, V. B., Knubben-Schweizer, G., Döpfer, D., Groll, A., Hafner-Marx, A., Hörmansdorfer, S., Sauter-Louis, C., Straubinger, R. K., Zimmermann, P., & Hartnack, S. (2017). Evaluating diagnostic tests for bovine tuberculosis in the southern part of Germany: A latent class analysis. *PLoS ONE*, *12*(6). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0179847>

Quan, P. L., Sauzade, M., & Brouzes, E. (2018). DPCR: A technology review. In *Sensors (Switzerland)* (Vol. 18, Issue 4). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/s18041271>

Radomski, N., Kreitmann, L., McIntosh, F., & Behr, M. A. (2013). The Critical Role of DNA Extraction for Detection of Mycobacteria in Tissues. *PLoS ONE*, *8*(10). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0078749>

Ramos, D. F., Silva, P. E. A., & Dellagostin, O. A. (2015). Diagnosis of bovine tuberculosis: review of main techniques. *Brazilian Journal of Biology*, *75*(4), 830–837. <https://doi.org/10.1590/1519-6984.23613>

Real Decreto 2611/1996, de 20 de diciembre, por el que se regulan los programas nacionales de erradicación de enfermedades de los animales. Boletín Oficial Del Estado, 307, 1–39. <https://www.boe.es/buscar/doc.php?id=BOE-A-1996-28539>

Reglamento (CE) 2160/2003 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 17 de noviembre de 2003, sobre el control de la salmonela y otros agentes zoonóticos específicos transmitidos por los alimentos. <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/ES/ALL/?uri=CELEX%3A32003R2160>

Reglamento (CE) 852/2004 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 29 de abril de 2004, relativo a la higiene de los productos alimenticios. <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/ES/ALL/?uri=celex%3A32004R0852>

Reglamento (CE) n.º 853/2004 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 29 de abril de 2004, por el que se establecen normas específicas de higiene de los alimentos de origen animal. <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/ES/ALL/?uri=celex%3A32004R0853>

Reglamento (UE) 2016/429 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 9 de marzo de 2016, relativo a las enfermedades transmisibles de los animales y por el que se modifican o derogan algunos actos en materia de sanidad animal («Legislación sobre sanidad animal»). <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/ES/TXT/?uri=celex%3A32016R0429>

Reglamento (UE) 2017/625 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 15 de marzo de 2017, relativo a los controles y otras actividades oficiales realizados para garantizar la aplicación de la legislación sobre alimentos y piensos, y de las normas sobre salud y bienestar de los animales, sanidad vegetal y productos fitosanitarios, y por el que se modifican los Reglamentos (CE) n.º 999/2001, (CE) n.º 396/2005, (CE) n.º 1069/2009, (CE) n.º 1107/2009, (UE) n.º 1151/2012, (UE) n.º 652/2014, (UE) 2016/429 y (UE) 2016/2031 del Parlamento Europeo y del Consejo, los Reglamentos (CE) n.º 1/2005 y (CE) n.º 1099/2009 del Consejo, y las Directivas 98/58/CE, 1999/74/CE, 2007/43/CE, 2008/119/CE y 2008/120/CE del Consejo, y por el que se derogan los Reglamentos (CE) n.º 854/2004 y (CE) n.º 882/2004 del Parlamento Europeo y del Consejo, las

Directivas 89/608/CEE, 89/662/CEE, 90/425/CEE, 91/496/CEE, 96/23/CE, 96/93/CE y 97/78/CE del Consejo y la Decisión 92/438/CEE del Consejo. <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/ES/TXT/?uri=celex%3A32017R0625>.

Reglamento (UE) 2017/746 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 5 de abril de 2017, sobre los productos sanitarios para diagnóstico in vitro y por el que se derogan la Directiva 98/79/CE y la Decisión 2010/227/UE de la Comisión. <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/ES/TXT/?uri=CELEX%3A32017R0746>

Reglamento Delegado (UE) 2018/1629 de la Comisión, de 25 de julio de 2018, que modifica la lista de enfermedades recogidas en el anexo II del Reglamento (UE) 2016/429 del Parlamento Europeo y del Consejo, relativo a las enfermedades transmisibles de los animales y por el que se modifican o derogan algunos actos en materia de sanidad animal («Legislación sobre sanidad animal»). [https://eur-lex.europa.eu/eli/reg\\_del/2018/1629/oj/spa](https://eur-lex.europa.eu/eli/reg_del/2018/1629/oj/spa)

Reglamento de Ejecución (UE) 2018/1882 de la Comisión, de 3 de diciembre de 2018, relativo a la aplicación de determinadas normas de prevención y control a categorías de enfermedades enumeradas en la lista y por el que se establece una lista de especies y grupos de especies que suponen un riesgo considerable para la propagación de dichas enfermedades de la lista. <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/ES/TXT/?uri=CELEX%3A32018R1882>

Reglamento Delegado (UE) 2020/688 de la Comisión, de 17 de diciembre de 2019, por el que se completa el Reglamento (UE) 2016/429 del Parlamento Europeo y del Consejo en lo referente a los requisitos zoonosarios para los desplazamientos dentro de la Unión de animales terrestres y de huevos para incubar. <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/ES/ALL/?uri=CELEX%3A32020R0688>

Reglamento Delegado (UE) 2020/689 de la Comisión, de 17 de diciembre de 2019, por el que se completa el Reglamento (UE) 2016/429 del Parlamento Europeo y del Consejo en lo referente a las normas de vigilancia, los programas de erradicación y el estatus de libre de enfermedad con respecto a determinadas enfermedades de la lista y enfermedades emergentes. <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/es/TXT/?uri=CELEX%3A32020R0689>

Reid, Tristan; Singanallur Balasubramani, Nagendra; Waugh, Caryll; Bowden, Tim; Newberry, Kim; Colling, Axel. Validation of diagnostic tests for infectious diseases: challenges and opportunities. In: International Symposium on Sustainable Animal Production and Health: Current Status and the Way Forward; 28 Jun 2021 to end of 02 Jul 2021; Online - IAEA Vienna, Austria. FAO; 2023. 23. Csiro:EP2021-1791. <https://doi.org/10.4060/cc2530en>

Rodriguez-Campos, S., Smith, N. H., Boniotti, M. B., & Aranaz, A. (2014). Overview and phylogeny of Mycobacterium tuberculosis complex organisms: Implications for diagnostics and legislation of bovine tuberculosis. *Research in Veterinary Science*, 97(S), S5–S19. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2014.02.009>

Romero, B., Rodríguez, S., Bezos, J., Díaz, R., Copano, M. F., Merediz, I., Mínguez, O., Marqués, S., Palacios, J. J., García de Viedma, D., Sáez, J. L., Mateos, A., Aranaz, A., Domínguez, L., & de Juan, L. (2011). Humans as Source of Mycobacterium tuberculosis Infection in Cattle, Spain. *Emerging Infectious Diseases*, 17(12), 2393–2395. <https://doi.org/10.3201/eid1712.101476>



Romha, G., Gebru, G., Asefa, A., & Mamo, G. (2018). Epidemiology of *Mycobacterium bovis* and *Mycobacterium tuberculosis* in animals: Transmission dynamics and control challenges of zoonotic TB in Ethiopia. In *Preventive Veterinary Medicine* (Vol. 158, pp. 1–17). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2018.06.012>

Rothel, J. S., Jones, S. L., Corner, L. A., Cox, J. C., & Wood, P. R. (1992). The gamma-interferon assay for diagnosis of bovine tuberculosis in cattle: conditions affecting the production of gamma-interferon in whole blood culture. *Australian Veterinary Journal*, *69*(1), 1–4. <https://doi.org/10.1111/j.1751-0813.1992.tb09848.x>

Salech, F., Mery, V., Larrondo, F., & Rada, G. (2008). Estudios que evalúan un test diagnóstico: interpretando sus resultados. *Revista Médica de Chile*, *136*(9). <https://doi.org/10.4067/S0034-98872008000900018>

Schiller, I., Oesch, B., Vordermeier, H. M., Palmer, M. V., Harris, B. N., Orloski, K. A., Buddle, B. M., Thacker, T. C., Lyashchenko, K. P., & Waters, W. R. (2010). Bovine tuberculosis: A review of current and emerging diagnostic techniques in view of their relevance for disease control and eradication. In *Transboundary and Emerging Diseases* (Vol. 57, Issue 4, pp. 205–220). <https://doi.org/10.1111/j.1865-1682.2010.01148.x>

Schiller, I., Vordermeier, H. M., Waters, W. R., Palmer, M., Thacker, T., Whelan, A., Hardegger, R., Marg-Haufe, B., Raeber, A., & Oesch, B. (2009). Assessment of *Mycobacterium tuberculosis* OmpATb as a novel antigen for the diagnosis of bovine tuberculosis. *Clinical and Vaccine Immunology*, *16*(9), 1314–1321. <https://doi.org/10.1128/CVI.00151-09>

Serrano, M., Sevilla, I. A., Fuertes, M., Geijo, M., Rivalde, M. Á., Ruiz-Fons, J. F., Gortazar, C., Juste, R. A., Domínguez, L., Elguezabal, N., & Garrido, J. M. (2018). Different lesion distribution in calves orally or intratracheally challenged with *Mycobacterium bovis*: Implications for diagnosis. *Veterinary Research*, *49*(1). <https://doi.org/10.1186/s13567-018-0566-2>

Silva Miranda, M., Breiman, A., Allain, S., Deknuydt, F., & Altare, F. (2012). The Tuberculous Granuloma: An Unsuccessful Host Defence Mechanism Providing a Safety Shelter for the Bacteria? *Clinical and Developmental Immunology*, *2012*, 1–14. <https://doi.org/10.1155/2012/139127>

Singhla, T., Pikulkaew, S., & Boonyayatra, S. (2022). Performance of Loop-Mediated Isothermal Amplification Technique in Milk Samples for the Diagnosis of Bovine Tuberculosis in Dairy Cattle Using a Bayesian Approach. *Pathogens*, *11*(5). <https://doi.org/10.3390/pathogens11050573>

Srinivasan, S., Jones, G., Veerasami, M., Steinbach, S., Holder, T., Zewude, A., Fromsa, A., Ameni, G., Easterling, L., Bakker, D., Juleff, N., Gifford, G., Hewinson, R. G., Martin Vordermeier, H., & Kapur, V. (2019). H E A L T H A N D M E D I C I N E A defined antigen skin test for the diagnosis of bovine tuberculosis. In *Sci. Adv* (Vol. 5).

Staggemeier, R., Bortoluzzi, M., Heck, T. M. da S., Spilki, F. R., & Almeida, S. E. de M. (2015). Quantitative vs. Conventional pcr for detection of human adenoviruses in water and sediment samples. *Revista Do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo*, *57*(4), 299–300. <https://doi.org/10.1590/S0036-46652015000400005>

Stewart, L. D., McNair, J., McCallan, L., Gordon, A., & Grant, I. R. (2013). Improved Detection of Mycobacterium bovis Infection in Bovine Lymph Node Tissue Using Immunomagnetic Separation (IMS)-Based Methods. *PLoS ONE*, 8(3). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0058374>

Supply, P. (2005). *Multilocus Variable Number Tandem Repeat Genotyping of Mycobacterium tuberculosis Technical Guide*.

Supply, P., Allix, C., Lesjean, S., Cardoso-Oelemann, M., Rüsche-Gerdes, S., Willery, E., Savine, E., De Haas, P., Van Deutekom, H., Roring, S., Bifani, P., Kurepina, N., Kreiswirth, B., Sola, C., Rastogi, N., Vatin, V., Gutierrez, M. C., Fauville, M., Niemann, S., ... Van Soolingen, D. (2006). Proposal for standardization of optimized mycobacterial interspersed repetitive unit-variable-number tandem repeat typing of Mycobacterium tuberculosis. *Journal of Clinical Microbiology*, 44(12), 4498–4510. <https://doi.org/10.1128/JCM.01392-06>

Tadmor, A. D., Ottesen, E. A., Leadbetter, J. R., & Phillips, R. (2011). Probing Individual Environmental Bacteria for Viruses by Using Microfluidic Digital PCR. *Science*, 333(6038), 58–62. <https://doi.org/10.1126/science.1200758>

Tao, Y., Yun, J., Wang, J., Xu, P., Li, C., Liu, H., Lan, Y., Pan, J., & Du, W. (2020). High-performance detection of Mycobacterium bovis in milk using digital LAMP. *Food Chemistry*, 327. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.126945>

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. <https://doi.org/10.1186/1746-6148-3-12>

Thacker, T. C., Harris, B., Palmer, M. V., & Waters, W. R. (2011). Improved specificity for detection of Mycobacterium bovis in fresh tissues using IS6110 real-time PCR. *BMC Veterinary Research*, 7. <https://doi.org/10.1186/1746-6148-7-50>

Thoen, C. O., Steele, J. H., & Gilsdorf, M. J. (2006a). *Mycobacterium bovis infection in animals and humans*. Blackwell Pub.

Thoen, C. O., Steele, J. H., & Gilsdorf, M. J. (2006b). *Mycobacterium Bovis Infection in Animals and Humans*. Wiley. <https://doi.org/10.1002/9780470344538>

Thomas, R., & Chambers, M. (2021). Review of methods used for diagnosing tuberculosis in captive and free-ranging non-bovid species (2012–2020). In *Pathogens* (Vol. 10, Issue 5). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/pathogens10050584>

Thorns, C. J., & Morris, J. A. (n.d.). *Shared epitopes between mycobacteria and other microorganisms*.

Trewby, H., Wright, D., Breadon, E. L., Lycett, S. J., Mallon, T. R., McCormick, C., Johnson, P., Orton, R. J., Allen, A. R., Galbraith, J., Herzyk, P., Skuce, R. A., Biek, R., & Kao, R. R. (2016). Use of bacterial whole-genome sequencing to investigate local persistence and spread in bovine tuberculosis. *Epidemics*, 14, 26–35. <https://doi.org/10.1016/j.epidem.2015.08.003>

United States Department of Agriculture. (2021). *Dairy Production and Trade Developments*.

van Ingen, J., Rahim, Z., Mulder, A., Boeree, M. J., Simeone, R., Brosch, R., & van Soolingen, D. (2012). Characterization of *Mycobacterium orygis* as *M. tuberculosis* complex subspecies. *Emerging Infectious Diseases*, *18*(4), 653–655. <https://doi.org/10.3201/eid1804.110888>

Varello, K., Pezzolato, M., Mascarino, D., Ingravalle, F., Caramelli, M., & Bozzetta, E. (2008). *Comparison of histologic techniques for the diagnosis of bovine tuberculosis in the framework of eradication programs.*

Vicente, J., Höfle, U., Garrido, J. M., Fernández-De-Mera, I. G., Juste, R., Barral, M., & Gortazar, C. (2006). Wild boar and red deer display high prevalences of tuberculosis-like lesions in Spain. *Veterinary Research*, *37*(1), 107–119. <https://doi.org/10.1051/vetres:2005044>

Vizcaíno-Salazar, G. J. (2017). Importancia del cálculo de la sensibilidad, la especificidad y otros parámetros estadísticos en el uso de las pruebas de diagnóstico clínico y de laboratorio. *Medicina & Laboratorio*, *23*, 365–386.

Vordermeier, H. M., Cockle, P. C., Whelan, A., Rhodes, S., Palmer, N., Bakker, D., & Hewinson, R. G. (1999). Development of Diagnostic Reagents To Differentiate between *Mycobacterium bovis* BCG Vaccination and *M. bovis* Infection in Cattle. In *CLINICAL AND DIAGNOSTIC LABORATORY IMMUNOLOGY* (Vol. 6, Issue 5).

Wang, H. Y., Lu, J. J., Chang, C. Y., Chou, W. P., Hsieh, J. C. H., Lin, C. R., & Wu, M. H. (2019). Development of a high sensitivity TaqMan-based PCR assay for the specific detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex in both pulmonary and extrapulmonary specimens. *Scientific Reports*, *9*(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-018-33804-1>

Wangoo, A., Johnson, L., Gough, J., Ackbar, R., Inglut, S., Hicks, D., Spencer, Y., Hewinson, G., & Vordermeier, M. (2005). Advanced granulomatous lesions in *Mycobacterium bovis*-infected cattle are associated with increased expression of type I procollagen,  $\gamma\delta$  (WC1+) T cells and CD 68+ cells. *Journal of Comparative Pathology*, *133*(4), 223–234. <https://doi.org/10.1016/j.jcpa.2005.05.001>

Wards, B. (1995). Detection of *Mycobacterium bovis* in tissues by polymerase chain reaction. *Veterinary Microbiology*, *43*(2–3). [https://doi.org/10.1016/0378-1135\(94\)00096-F](https://doi.org/10.1016/0378-1135(94)00096-F)

Waters, W. R., Palmer, M. V., Stafne, M. R., Bass, K. E., Maggioli, M. F., Thacker, T. C., Linscott, R., Lawrence, J. C., Nelson, J. T., Esfandiari, J., Greenwald, R., & Lyashchenko, K. P. (2015). Effects of serial skin testing with purified protein derivative on the level and quality of antibodies to complex and defined antigens in *Mycobacterium bovis*-infected cattle. *Clinical and Vaccine Immunology*, *22*(6), 641–649. <https://doi.org/10.1128/CVI.00119-15>

Watrelet-Virieux, D., Drevon-Gaillot, E., Toussaint, Y., & Belli, P. (2006). Comparison of Three Diagnostic Detection Methods for Tuberculosis in French Cattle. *Journal of Veterinary Medicine, Series B*, *53*(7), 321–325. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0450.2006.00957.x>

Wayne, L. G., & G.P. Kubica. (1986). Genus *Mycobacterium*. . In Sneath, Mair, Sharpe, & Holt (Eds.), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* (Vol. 2, pp. 1436–1457).

Yang, J., Han, X., Liu, A., Bai, X., Xu, C., Bao, F., Feng, S., Tao, L., Ma, M., & Peng, Y. (2017). Use of Digital Droplet PCR to Detect *Mycobacterium tuberculosis* DNA in Whole Blood-Derived DNA Samples from Patients with Pulmonary and Extrapulmonary Tuberculosis. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, *7*. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2017.00369>

Zhang, H., Wang, Z., Cao, X., Wang, Z., Sheng, J., Wang, Y., Zhang, J., Li, Z., Gu, X., & Chen, C. (2016). Loop-mediated isothermal amplification assay targeting the mpb70 gene for rapid differential detection of *Mycobacterium bovis*. *Archives of Microbiology*, *198*(9), 905–911. <https://doi.org/10.1007/s00203-016-1232-6>

Zhou, L., Ma, C., Xiao, T., Li, M., Liu, H., Zhao, X., Wan, K., & Wang, R. (2019). A new single gene differential biomarker for mycobacterium tuberculosis complex and non-tuberculosis mycobacteria. *Frontiers in Microbiology*, *10*(AUG). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01887>

Zhu, X., Yan, Y., Wang, Z., Zhang, K., Chen, Y., Peng, Y., Peng, Q., Guo, A., Robertson, I. D., & Aleri, J. (2021). An abattoir-based study on the prevalence of bovine tuberculosis from culled adult dairy cows in Wuhan, China. *Preventive Veterinary Medicine*, *196*. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2021.105477>

