

MACIAS, ANALIA FLORE

Tuberculosis bovina

73935

2015

73935



DOCTORADO EN CIENCIA TECNOLOGÍA E INNOVACIÓN AGROPECUARIA

**Tuberculosis bovina: caracterización molecular
de aislamientos de *Mycobacterium bovis* en
bovinos de la provincia de Córdoba y su relación
con las lesiones macroscópicas**

Aspirante: M.V. Analía Florencia Macías

Director: PhD Martín José Zumárraga

Asesor: PhD Gabriel Gustavo Magnano

*Departamento de Patología Animal
Facultad de Agronomía y Veterinaria
Universidad Nacional de Río Cuarto*

Río Cuarto, Agosto del 2015

7.0935

MFI:
Clasif:
T.902

ÍNDICE

GLOSARIO	4
RESUMEN	6
INTRODUCCIÓN	14
Generalidades de la Tuberculosis bovina	14
Etiología	17
Taxonomía: Género <i>Mycobacterium</i>	17
Clasificación de las micobacterias	17
Características del género <i>Mycobacterium</i>	19
Características estructurales	19
Características especiales	21
Cultivo y aislamiento	24
Transmisión en los bovinos	28
Inmunopatogenia	31
Patología de la Tuberculosis	40
Patología microscópica	40
Patología macroscópica	42
La Tuberculosis bovina como zoonosis	46
Situación de la Tuberculosis bovina en Argentina	49
Legislación actual	54
Diagnóstico	57
Técnicas de tipificación molecular	60
Estudios de tipificación por spoligotyping	61
Diversidad genética de cepas de <i>Mycobacterium</i>	64
HIPÓTESIS	68
OBJETIVO GENERAL	68
Objetivos Particulares	68
MATERIALES Y MÉTODOS	69

Elaboración de la planilla de datos	69
Descripción de los datos incluidos en la planilla	71
Toma de muestras en frigorífico	73
Cultivo de micobacterias	76
Tipificación molecular por spoligotyping	78
Procesamiento de las muestras para histopatología	81
Análisis de datos	82
Anexo	84
RESULTADOS	87
Análisis observacional a partir de la planilla de datos	87
Procedencia de los animales muestreados	87
Categorías de animales muestreados	89
Análisis macroscópico de las LCT	89
Análisis bacteriológico	97
Análisis histopatológico	98
Tipificación molecular	99
Distribución geográfica de los spoligotipos	100
Análisis de las LCT según spoligotipo	104
Análisis exploratorio	104
Distribución anatómica de las LCT por spoligotipo	111
Análisis del <i>score</i> de virulencia según spoligotipo	113
Test de Kruskal-Wallis	114
DISCUSIÓN	116
CONCLUSIONES	130
BIBLIOGRAFÍA	131

GLOSARIO

BAAR: bacilos ácido alcohol resistentes

CICVyA-INTA: Centro de Investigación en Ciencias Veterinarias y Agronómicas-

Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria

CMT: complejo *Mycobacterium tuberculosis*

DPP: derivado proteico purificado

DR: repeticiones directas

FAO: Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura

FCM: factor quimiotáctico de macrófagos

GL: ganglios linfáticos

H-E: hematoxilina-eosina

HPC: cloruro de hexadecilpiridinio

IDR: intradermoreacción

IFN γ : Interferón gamma

IMC: inmunidad mediada por células

INNPAZ: Instituto Panamericano de Protección de Alimentos y Zoonosis

iNOS: óxido nítrico sintetasa inducible

INPPAZ: Instituto Panamericano de Protección de Alimentos y Zoonosis

LAM: lipoarabinomanano

LCT: lesiones compatibles con tuberculosis

LJ: Löwestein-Jensen

M. bovis: *Mycobacterium bovis*

M. tuberculosis: *Mycobacterium tuberculosis*

MIRUs: unidades intercaladas repetitivas en micobacterias



MNT: micobacterias no tuberculosas

NaOH: hidróxido de sodio

NO: novillo

NT: novillito

OIE: Organización Internacional de Epizootias

OMS: Organización Mundial de la Salud

RENSPA: registro nacional sanitario de productores agropecuarios

RFPLs: polimorfismo en longitud de los fragmentos de restricción.

SAGPyA: Secretaría de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentación

SENASA: Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria

ST: Stonebrink

TB: tuberculosis

TBB: tuberculosis bovina

TE: ternero

TFN: Factor de Necrosis Tumoral

TLR: receptores tipo toll

TO: toro

UNRC: Universidad Nacional de Río Cuarto

VC: vaca

VIG: visualizador de información georreferenciada

VNTR: repeticiones en tándem de número variable

VQ: vaquillona

Z-N: Ziehl Neelsen

RESUMEN

La tuberculosis bovina (TBB) es una enfermedad infecciosa crónica que afecta a los bovinos y otras especies de animales domésticos, silvestres libres o en cautiverio y también al hombre.

Su presencia en la población bovina limita la potencialidad del sector ganadero, con consecuencias negativas sobre la rentabilidad, el comercio interno y externo, la calidad de las proteínas producidas, el consumo de subproductos y la salud humana.

Argentina cuenta desde el año 1999 con un Plan Nacional de Control y Erradicación de la TBB, el mismo, ha sido recientemente modificado (Resolución SENASA N°128/12). Entre otros cambios se han incorporado al control las especies caprina y ovina y se ha implementado obligatoriamente el Sistema de Vigilancia Epidemiológica en faena, tomando como base los nuevos procedimientos de actualización electrónica de la información provistos por el Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria (SENASA). El objetivo del registro informático del SENASA es conocer en qué situaciones epidemiológicas se encuentran los rodeos y la trazabilidad de los mismos para poder realizar la caracterización epidemiológica de la TBB a nivel país, realizando un análisis geográfico de la distribución de la enfermedad y su posterior regionalización. Sobre la base de ese diagnóstico inicial de la enfermedad se deben establecer programas de control y erradicación regionales adecuados a cada necesidad.

En nuestro país, la intradermorreacción (IDR) es la única técnica aprobada para la detección de la enfermedad en ganado en pie y la comercialización de bovinos. En los últimos años la biología molecular ha contribuido a la identificación y caracterización

molecular de micobacterias. La genotipificación por diversos métodos moleculares resulta de suma importancia para comprender la patogenia y la epidemiología de la enfermedad y para tomar medidas de control adecuadas ya que diversos estudios han demostrado que el curso de la infección y sus consecuencias epidemiológicas dependen en gran parte de la diversidad genética de las cepas actuantes.

El presente trabajo propone avanzar, profundizar y contribuir en el conocimiento de la TBB en la provincia de Córdoba, enfermedad de alto impacto en la salud animal y humana, ya que es un tema cuyo desarrollo, a diferencia de lo que ocurre con el agente de la tuberculosis humana, no ha sido profundamente investigado en esta provincia.

HIPÓTESIS

En la provincia de Córdoba, Argentina, existen distintos genotipos de *M. bovis* que provocan lesiones macroscópicas de diferente grado en bovinos. El predominio del genotipo actuante depende del origen geográfico de los animales.

OBJETIVO GENERAL

Clasificar los diferentes genotipos de *M. bovis* hallados en bovinos faenados en la provincia de Córdoba, Argentina, relacionarlos con las características macroscópicas de las lesiones y analizar su distribución espacial.

OBJETIVOS PARTICULARES

- 1- Desarrollar un sistema de registro para recolectar la información que genera el frigorífico con el fin de analizar, interpretar y evaluar los datos de origen de los animales y de tipo y distribución de lesiones obtenidas en la inspección.

- 2- Confirmar, mediante diagnóstico bacteriológico e histopatológico, la etiología de las LCT detectadas por los Servicios de Inspección Veterinaria.
- 3- Identificar y tipificar molecularmente los aislamientos obtenidos mediante la técnica de spoligotyping.
- 4- Relacionar los aislamientos de *M. bovis* genotificados, con la ubicación anatómica de las lesiones y con las características macroscópicas de las mismas.
- 5- Estudiar si existen diferencias en la virulencia de diferentes cepas de *M. bovis*.
- 6- Georreferenciar los diferentes genotipos de *M. bovis* hallados en la provincia de Córdoba, Argentina.

MATERIALES Y MÉTODOS

En la primera etapa del trabajo se confeccionó una planilla de datos para ser utilizada en el muestreo de cada bovino y poder sistematizar y analizar la información obtenida. Se registró, por un lado, el número de Registro Nacional Sanitario del productor Agropecuario (RENSPA) para poder acceder a los sistemas de georreferenciación de los establecimientos provistos por el SENASA y, por otro lado, se describieron las características particulares de las lesiones compatibles con tuberculosis (LCT) observadas en cada animal obteniéndose finalmente un *score* de virulencia para cada uno.

Las faenas se realizaron en un frigorífico de tránsito federal de la provincia de Córdoba, Argentina, en el que se recolectaron 311 muestras de tejidos pertenecientes a 150 bovinos con LCT. Se realizó el diagnóstico bacteriológico e histopatológico de las muestras obtenidas y los aislamientos fueron tipificados por la técnica de spoligotyping.

La georreferenciación de los aislamientos obtenidos se realizó mediante el programa visualizador de información georreferenciada (VIG) provisto por el SENASA y las aplicaciones de google maps.

Para analizar las LCT y establecer la existencia o no de asociación entre la virulencia y el spoligotipo actuante se realizó el test no paramétrico Kruskal Wallis. Para esto sólo se tuvieron en cuenta las muestras con aislamiento bacteriológico positivo y tipificación molecular (n=134).

RESULTADOS

De los 150 bovinos muestreados, 134 fueron positivos al aislamiento bacteriológico.

El 49,25% (n=66) de los bovinos procedían de establecimientos particulares, mientras que el 50,75% (n=68) de remates ferias. En el primer caso, se pudo establecer la georreferenciación de los mismos, pero en el segundo caso, en donde los animales provenían de remates feria, el reemplazo del nombre del propietario por el de la firma consignataria imposibilitó determinar el origen de la hacienda.

Todas las cepas aisladas fueron genotipificadas como *M. bovis* encontrando 19 patrones diferentes de spoligotipos: 9 agrupados, 8 únicos y 2 únicos y exclusivos.

El spoligotipo más frecuente fue el SB0140, que se encontró en el 49,25% de los aislamientos (n=66), seguido por el SB0153 y SB0145 que se observaron en el 11,20% (n=15) y 9% (n=12) de los aislamientos respectivamente. El SB0120 (mismo spoligotipo de la cepa vacunal *M. bovis* BCG) y el SB0130 se identificaron en 6,71% (n=9) y 6% (n=8) de las muestras. El resto se distribuyó en 14 spoligotipos diferentes. El 3,7% (n=5) pertenecieron al SB0273, 3% (n=4) al SB0484, 2,23% (n=3) al SB0520,

y 1,49% (n=2) al SB0131. Los 8 aislamientos con spoligotipos únicos fueron los SB1043, SB0980, SB0267, SB0996, SB1068, SB1016, SB1788 y SB0269. Los SB0820 y SBNN fueron únicos y exclusivos al no haber sido descritos con anterioridad, no habérselos detectado nuevamente y no estar registrados en la base de datos internacional.

Teniendo en cuenta la gran diversidad de spoligotipos hallada en este estudio, en el análisis estadístico se trabajó con los 8 que presentaban mayor frecuencia: SB0153, SB0145, SB0120, SB0130, SB0484, SB0140, SB0273 y SB052 y que agruparon al 91% del total de los aislamientos obtenidos. Al evaluar el *score* de virulencia por spoligotipo se encontraron diferencias estadísticamente significativas que indican que algunos patrones fueron más virulentos que otros. El spoligotipo SB0273 resultó el más virulento y fue significativamente diferente de los spoligotipos SB0484, SB0140 y SB0130. Los spoligotipos SB0120 y SB0153 se ubicaron en segundo y tercer lugar y fueron estadísticamente diferentes del SB0130.

No se observaron diferencias estadísticamente significativas en el resto de los spoligotipos detectados en este estudio.

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

De acuerdo a la hipótesis planteada se pudo demostrar que en la provincia de Córdoba existe una considerable diversidad de genotipos de cepas de *M. bovis* que han sido caracterizadas y se encuentran disponibles para futuros estudios. Los diferentes genotipos provocan lesiones macroscópicas de distintos grados en bovinos existiendo diferencias que nos permiten inferir que algunos son más virulentos que otros.

En cuanto al predominio del genotipo actuante según el origen geográfico de los animales, no se pudo realizar en la totalidad de las muestras debido a que no fue posible identificar la procedencia de los bovinos en la mitad de los casos. La georreferenciación del foco de origen del animal tuberculoso a partir de lesiones detectadas en faena es dificultosa en algunos casos bajo las condiciones actuales de trazabilidad de nuestro país.

DEDICATORIA

A César, mi compañero de vida, que siempre me acompaña a volar...

A mi mamá, papá y hermanos por su esfuerzo y dedicación para que hoy pueda estar en este lugar...

A mis amigas de toda la vida, Jesi, Ivi, Mery, Lú, por su apoyo incondicional siempre...

AGRADECIMIENTOS

A mis compañeros de trabajo, José Giraudó, Gabriel Magnano, Manuel Schneider, Enrique Bérghamo, Erika Sticotti, Mauro Mació, Daniela Zubeldía, Hernán Lovera y Laura Zapata por el apoyo en esta etapa

A los docentes y no docentes del departamento de Patología Animal.

A Martín Zumárraga y Gabriel Magnano, mis directores, por el tiempo y el esfuerzo que me han dedicado durante toda la carrera de doctorado

A los alumnos y ayudantes de investigación que colaboraron con este trabajo de tesis.

A los directivos del doctorado, de la Facultad de Agronomía y Veterinaria y de nuestra Universidad por permitirnos seguir avanzando en nuestra formación.

INTRODUCCIÓN

Generalidades de la tuberculosis bovina

La tuberculosis bovina (TBB) es una enfermedad infecciosa crónica que afecta a los bovinos y otras especies de animales domésticos, silvestres libres o en cautiverio y también al hombre (Thoen y Blood, 1995).

Su presencia en la población bovina limita la potencialidad del sector ganadero, con consecuencias negativas sobre la rentabilidad, el comercio interno y externo, la calidad de las proteínas producidas, el consumo de subproductos y la salud humana.

Mycobacterium tuberculosis (*M. tuberculosis*) es el principal agente etiológico de la tuberculosis en humanos pero se estima que *Mycobacterium bovis* (*M. bovis*), principal agente causal de la tuberculosis en bovinos, es responsable de aproximadamente un 0,3% de los casos de tuberculosis humana en el mundo (Müller y col., 2013).

Actualmente, la tuberculosis (TB) en humanos continúa siendo la causa más frecuente de muerte en adultos por un único agente infeccioso en los países en vías de desarrollo. Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), en Argentina aproximadamente unas 10.000 personas por año se enferman de TB (WHO, 2012), y un porcentaje de ellas es debido al contagio de la enfermedad desde los animales.

La TB en humanos producida por *M. bovis* ha sido considerada desde años como una de las principales zoonosis, más aún cuando actualmente se ha comprobado la transmisión humano-humano en pacientes HIV positivos (Aguirre y col., 2007). Esto ha generado mayor preocupación y cautela sobre posibles fuentes de infección a través de



los alimentos de origen animal, provenientes de áreas donde aún existe la tuberculosis bovina (Aguirre y col., 2007).

Aunque el factor determinante en el inicio de los programas de control y erradicación de la TBB en los países desarrollados fue el impacto de la enfermedad sobre la salud pública, su importancia económica también es un factor relevante. Se estima que las pérdidas debidas a TBB en la Argentina, alcanzan los 63 millones de dólares al año, siendo el principal componente la pérdida de peso en los bovinos (36% del total), las pérdidas en producción de leche (13%) y el decomiso en frigoríficos y mataderos (10%) (SENASA, 2012).

Argentina cuenta desde el año 1999 con un Plan Nacional de Control y Erradicación de la TBB; el mismo, ha sido recientemente modificado (SENASA Resolución N°128/2012) y entre otros cambios se han incorporado al control las especies caprina y ovina y se ha implementado obligatoriamente el Sistema de Vigilancia Epidemiológica en faena, tomando como base los nuevos procedimientos de actualización electrónica de la información provistos por el SENASA.

La prevalencia de TBB en la Argentina se puede estimar fundamentalmente a través de la información de decomisos en frigoríficos o por resultados de las tuberculinizaciones en diferentes regiones.

En nuestro país, la intradermoreacción (IDR) es la única técnica aprobada oficialmente para la detección de la enfermedad en ganado en pie y la comercialización de bovinos. Otras técnicas utilizadas son el dosaje de gamma interferón (IFN γ) y pruebas serológicas (OIE, Terrestrial manual, 2012). El diagnóstico *post mortem* de la enfermedad puede realizarse al encontrar lesiones típicas durante la necropsia o por

medio de la histopatología pero la confirmación definitiva depende del aislamiento del *M. bovis* (Corner, 1994).

En los últimos años la biología molecular ha contribuido a la identificación y caracterización molecular de micobacterias. La genotipificación por diversos métodos moleculares resulta de suma importancia para comprender la patogenia y la epidemiología de la enfermedad y para tomar medidas de control adecuadas (Barnes y col., 2003) ya que diversos estudios han demostrado que el curso de la infección y sus consecuencias epidemiológicas dependen en gran parte de la diversidad genética de las cepas actuantes (Collins y col., 1994; Dunn y col., 1995, Aguilar y col. 2009, Meikle y col., 2011, Wright y col., 2013).

Dentro de los diferentes métodos de tipificación molecular se destaca la técnica de spoligotyping. Esta es una técnica de hibridación reversa cuyo principio se basa en la detección del polimorfismo de una región específica del genoma de las micobacterias que forman parte del complejo *Mycobacterium tuberculosis* (CMT), llamada región de las repeticiones directas (DR) (Kamerbeek y col., 1997). La diversidad genética de cepas indicaría que, además de factores estrictamente epidemiológicos, la variación en la frecuencia de detección de cada spoligotipo podría estar correlacionada con la existencia de genotipos más virulentos que otros. Los spoligotipos comunes a bovinos y humanos denotan el riesgo de la transmisión zoonótica de la TBB (Cicuta y col., 2001; Aguilar y col., 2009; Zumárraga y col., 2010; Garbaccio y col., 2014).

El presente trabajo propone avanzar, profundizar y contribuir en el conocimiento de la TBB en la provincia de Córdoba, enfermedad de alto impacto en la salud animal y

humana, ya que es un tema cuyo desarrollo, a diferencia de lo que ocurre con el agente de la tuberculosis humana, no ha sido profundamente investigado en esta provincia.

Etiología

➤ **Taxonomía: Género *Mycobacterium***

Dentro del orden de los *Actinomycetales* se incluye a la familia *Mycobacteriaceae*, *Actinomycetaceae*, *Streptomyetaceae* y *Nocardiaceae*. La familia *Mycobacteriaceae* contiene un solo género, el género *Mycobacterium*, del que antiguamente sólo se conocían dos especies: el bacilo de la lepra (*Mycobacterium leprae*) y el bacilo tuberculoso (*Mycobacterium tuberculosis*). Dentro del género *Mycobacterium* se han descrito más de 120 especies diferentes de micobacterias (Dorronsoro y Torroba, 2007).

El término *Mycobacterium* significa hongo-bacteria y esta denominación se debe al aspecto de los cultivos, que se asemejan al de los hongos.

El género *Mycobacterium* comprende bacilos aerobios, Gram+, no móviles ni esporulados, de 0,2 a 0,6 x 1 a 10 µm de tamaño dependiendo la especie. La pared celular es rica en lípidos, que en algunos casos alcanza hasta el 60% del peso seco de la misma, lo que convierte a la superficie en hidrofóbica y a la micobacteria en resistente a muchos desinfectantes y tinciones de rutina (Murray y col., 1999; Angala y col., 2014).

➤ **Clasificación de las micobacterias**

El género *Mycobacterium* se divide en dos grandes grupos: el Complejo *Mycobacterium tuberculosis* (CMT) y las micobacterias atípicas o no tuberculosas (MNT).

• **Complejo *Mycobacterium tuberculosis* (CMT)**: agrupa a micobacterias que presentan >95% de homología en su ADN. Está compuesto, por *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*), *Mycobacterium bovis* (*M. bovis*), *Mycobacterium caprae* (*M. caprae*) (Aranaz y col., 1999; Kent y col., 1995), *M. bovis* BCG (bacilo Calmette y Guerin; la cepa vacunal), *Mycobacterium africanum*, (*M. africanum*) causante de enfermedad en humanos el África Occidental (Frothingham y col., 1999), *Mycobacterium microti* (*M. microti*) caracterizada por poseer la menor virulencia entre las especies incluídas en este complejo; causa enfermedad en roedores (ratas silvestres) y con escasa frecuencia TB en el hombre, principalmente en pacientes inmunodeprimidos (Kremer y col., 1998; Horstkotte y col., 2001; Xavier y col., 2007), *Mycobacterium canettii* (*M. canetti*) descrita excepcionalmente en humanos (van Soolingen y col., 1997) y *Mycobacterium pinnipedi* (*M. pinnipedi*) (Cousins y col., 2003), causante de TB en lobos, elefantes y leones marinos entre otros. Recientemente se han agregado al grupo *Mycobacterium mungi* (*M. mungi*) que afecta principalmente a mangostas rayadas, una especie de mamíferos carnívoros que habitan en la región central y oriente de África (Kathleen y col., 2010) y *Mycobacterium orygis* (*M. orygis*) aislado de la familia de *Bovidae* (van Ingen y col., 2012).

Si bien el aislamiento de cualquiera de las micobacterias del CMT a partir de muestras clínicas en humanos establece, por sí mismo, el diagnóstico de TB en el paciente, su diferenciación es importante porque existen características epidemiológicas diferenciales para el manejo de los mismos; por ejemplo, *M. bovis* posee una resistencia natural a la pirazinamida, droga utilizada frecuentemente en los regímenes terapéuticos de rutina en los pacientes tuberculosos (Dorransoro y Torroba, 2007).

• **Micobacterias atípicas o no tuberculosas (MNT)**: aproximadamente entre el 5 y el 30% de las micobacterias aisladas en laboratorios clínicos de humanos corresponden al grupo de las micobacterias no pertenecientes al CMT. Constituyen un grupo muy numeroso, heterogéneo y difícil de sistematizar (Imperiale y col., 2012).

Algunas especies son muy ubicuas y poco patógenas; otras son menos ubicuas y su aislamiento tiene un alto valor predictivo de enfermedad; otras no tienen significado clínico conocido y cada vez es más frecuente la descripción de nuevas especies no conocidas previamente.

Para clasificarlas y agruparlas, Runyon, (1959) propuso una división de las MNT aisladas más frecuentemente basada en caracteres sencillos de observar: el tiempo de crecimiento y la pigmentación de las colonias. Esa primera clasificación sigue siendo una guía de gran utilidad, especialmente para el bacteriólogo clínico y el médico. Consta de cuatro grupos y no incluye las especies típicas incluidas en el CMT y las no cultivables. Puesto que el objetivo del trabajo del bacteriólogo clínico es identificar el aislamiento, debe saber caracterizar las especies patógenas o potencialmente patógenas y diferenciarlas del resto. Actualmente, los métodos moleculares, principalmente los basados en la reacción en cadena de la polimerasa, permiten identificarlas y caracterizarlas rápida y eficazmente.

Características del Género *Mycobacterium*

➤ **Características estructurales**

Las micobacterias poseen múltiples características intrínsecas que las diferencian del resto de las bacterias. Poseen una pared celular compleja. El fundamento estructural consiste en un esqueleto de peptidoglicanos con moléculas de arabinogalactano-

micolato unidas por fuerzas covalentes y está cubierto por una capa de lípidos libres y polipéptidos. El esqueleto peptidoglicano es relativamente uniforme en todas las especies micobacterianas, y representa el componente principal de la pared celular. Al igual que en otras bacterias, los puentes peptídicos entre las cadenas de peptidoglicano transforman el esqueleto en una estructura rígida. Los ácidos micólicos son los lípidos principales en la pared celular micobacteriana (Murray y col., 1999).

Los glucolípidos superficiales, entre los que se incluyen micósidos específicos de especie (peptiglucolípidos, oligopolisacáridos) y glucolípidos fenólicos, son altamente antigénicos. Las cadenas peptídicas de la capa externa son antígenos importantes desde el punto de vista biológico que estimulan la respuesta de inmunidad celular frente a la infección. Las preparaciones extraídas y parcialmente purificadas de estos derivados proteínicos se emplean como reactivos en las pruebas intradérmicas para determinar la exposición previa a *Mycobacterium* (Murray y col., 1999).

La pared celular le otorga a las micobacterias las siguientes características:

- Acido-alcohol resistencia a la tinción con fucsina fenicada, con forma de bacilo, o bastón curvado.
- Superficie hidrofóbica.
- Carencia de toxicidad primaria, no produce endotoxina, ni exotoxina.
- Resistencia a las agresiones externas, al frío, la congelación y la desecación.

También está incluida su resistencia natural a la gran mayoría de los antimicrobianos y antisépticos. Sin embargo, es muy sensible al calor, la luz solar y la radiación ultravioleta, que matan rápidamente al bacilo.

- Respuesta inmune celular y reacciones de hipersensibilidad retardada por parte de los peptidoglicanos, componentes proteicos de la pared, que representan aproximadamente un 15% de su peso en seco. (Clemens, 1997; Asselineau y Lanèelle, 1998; Angala y col., 2014).
- Propiedades inmunosupresoras de los componentes polisacáridos, como los arabinogalactanos (arabinosa-galactosa) aunque también son capaces de inducir una respuesta humoral (Caminero, 2003). Los glucolípidos, localizados en la periferia de la pared celular, funcionan como evasinas, facilitan que la bacteria escape de la acción de los macrófagos, inhibiendo la fusión del fagosoma con el lisosoma. Estas estructuras químicas juegan un papel importante en la patogénesis de las infecciones por micobacterias, a través de la interacción con las células efectoras del sistema inmune del hospedero (Clemens, 1997; Asselineau y Lanèelle, 1998, Angala y col., 2014).

➤ **Características especiales**

El género *Mycobacterium* posee algunas características especiales que lo diferencian del resto de las bacterias, que se describen a continuación:

- **Capacidad de división lenta:** en condiciones de laboratorio *M. tuberculosis* y *M. bovis* se duplican cada 16-24 horas, a diferencia de la mayoría de las bacterias que lo hacen en 20-60 minutos. Las colonias se hacen visibles en 3 a 8 semanas en los medios a base de huevo Löwenstein-Jensen (LJ) y Stonebrink (ST).
- **Aerobio estricto:** lo que determina que su capacidad de metabolización y crecimiento esté subordinada a la presencia de oxígeno y al valor del pH circundante. Las condiciones ideales de multiplicación del bacilo son pH 7,4 y

una presión de oxígeno entre 100 y 140 mm de Hg. Por lo tanto se observa una interdependencia entre la disposición anatómica de la enfermedad y la tensión de oxígeno disponible en la zona.

- ***Polivalente según el medio:*** sobre la base de las distintas características del medio, se admiten que existen cuatro posibilidades de crecimiento del bacilo a describir: (Caminero, 2006).

*Metabólicamente activas y en crecimiento continuo (están situadas principalmente en las lesiones cavernosas pulmonares, donde las condiciones de pH y presión de oxígeno son óptimas).

*Gérmenes en fase de inhibición ácida (su crecimiento es inhibido por el medio ácido de los fagolisosomas de los macrófagos o por el pH ácido existente en zonas inflamatorias de la pared cavitaria).

*Gérmenes en fase de multiplicación esporádica (localizados preferentemente en el *caseum* sólido, donde el pH es neutro; presentan largos períodos de dormancia, con ocasionales y cortos períodos metabólicos, generalmente horas).

*Población persistente o en estado de latencia (este estado del bacilo aparece cuando no encuentra a su alrededor una situación favorable como tensión de oxígeno y pH adecuado, pudiendo demorar su multiplicación desde varios días hasta muchos años e incluso nunca hacerlo).

- ***Parásito intracelular:*** puede sobrevivir intracelularmente e inclusive multiplicarse dentro de fagocitos, ya que actúa interfiriendo con la actividad bactericida de la célula (macrófago) del huésped. Tiene como estrategia evitar la

fusión de los lisosomas fagocíticos con el fagosoma, previniendo la descarga del contenido lisosomal dentro del fagosoma. Sobrevive dentro del fagolisosoma ya fusionado, debido a que producen enzimas como la catalasa, peroxidasa, que les permiten resistir la acción de moléculas tóxicas (inhibe la producción de superóxidos que se producen durante el proceso de fagocitosis).

- **Virulencia variable:** este aspecto se encuentra ampliamente estudiado en humanos, donde es conocido desde hace años que no todas las cepas de *M. tuberculosis* tienen la misma virulencia. López y col., (2003) demostraron mediante infecciones experimentales con diferentes genotipos de *M. tuberculosis*, que cepas genéticamente distintas provocan diferencias significativas en la patología, respuesta inmune y mortalidad en un modelo murino bien caracterizado de patología pulmonar progresiva. La variedad Beijing fue la más agresiva induciendo una acelerada multiplicación bacteriana en pulmón, neumonía temprana masiva y muerte de los ratones. Por su parte, el genotipo Canetti provocó enfermedad más progresiva con multiplicación bacteriana lenta, neumonía limitada con granulomas en constante aumento y sin mortalidad. Los genotipos de las familias Harlem y Somali demostraron tener una virulencia intermedia entre los dos anteriormente citados y con resultados menos homogéneos.

Poco se conoce acerca de este aspecto de *M. bovis*. Aguilar y col., (2009) basados en la hipótesis de que la variabilidad genética de *M. bovis* podría influir en la virulencia e inmunopatología de la enfermedad, realizaron un estudio en donde seleccionaron cinco cepas de *M. bovis* aisladas en Argentina de diferentes

hospedadores y con diferentes genotipos. Se determinó la virulencia y la inmunopatología de las mismas en un modelo murino concluyendo que existe diferencia en ambas variables estudiadas de acuerdo a la cepa actuante lo cual podría atribuirse a la variabilidad genética de las mismas. La cepa aislada a partir de un jabalí fue la que resultó más virulenta. Luego, en otro trabajo se estudió la patogénesis de la misma cepa de *M. bovis* aislada del jabalí y una cepa bovina control NTC10772 en bovinos y cobayos. La presencia de lesiones más severas, con granulomas y extensas áreas de neumonía en bovinos y cobayos demostraron en coincidencia con el trabajo realizado por Aguilar y col., (2009) que la cepa de *M. bovis* aislada del jabalí fue más virulenta que la cepa control (Meikle y col., 2011).

➤ **Cultivo y aislamiento**

Debido a las características del género *Mycobacterium* antes mencionadas, el cultivo y aislamiento difiere al de las bacterias más comúnmente estudiadas.

La toma de muestra, su conservación, el proceso de descontaminación y los medios de cultivo utilizados son puntos claves en el aislamiento e identificación de las micobacterias.

***Toma y conservación de la muestra:** en este aspecto, Corner, (1994) evaluó la viabilidad de las micobacterias en una muestra clínica cuando su procesamiento no puede realizarse inmediatamente. Comparando la conservación del material a -20°C respecto de la refrigeración a 4-6°C con tetraborato de sodio (bórax), observó que la congelación es la mejor forma de preservar *M. bovis*. En 25 muestras congeladas a -20°C el número de bacterias viables, medido en ufc por gramo de tejido, disminuyó en

un 32% en el curso de un año. En 10 muestras conservadas a 6°C se comprobó una pérdida de viabilidad del 80% en los primeros tres días de conservación en las que contenían bórax y un 20% en las que no contenían. En este trabajo Corner (1994) concluye que lo ideal es conservar las muestras a 4-6°C por 24-48 hs y luego procesarlas, y en caso de no ser posible, la mejor opción es congelarlas inmediatamente a -20°C hasta su procesamiento.

***Proceso de decontaminación:** los homogeneizantes y decontaminantes ideales son aquellos que destruyen los gérmenes asociados, sin condicionar la viabilidad de las micobacterias. Corner, (1994) también evaluó la toxicidad de 4 decontaminantes: cloruro de hexadecilpiridinio (HPC) a 0,075% y 0,75%; cloruro de benzalconio (Zephiran) al 0,25%; ácido oxálico al 5% e hidróxido de sodio al 2% (NaOH) durante 30 minutos en suspensiones conocidas de ufc de micobacterias. El HPC al 0,075% resultó ser el menos agresivo en la viabilidad de las micobacterias y el NaOH al 2% el más tóxico, a pesar de ser este el decontaminante tradicional y más frecuentemente utilizado en micobacteriología. Los dos fueron eficientes en el control de la contaminación. El INNPAZ, (1993) recomienda la decontaminación mediante el método de Petroff con NaOH al 4%, porque existe una amplia experiencia en su empleo y porque los reactivos que se requieren, son de fácil obtención en los países en vías de desarrollo.

***Medios de cultivo:** las micobacterias requieren nutrientes especiales para su crecimiento por lo que no desarrollan en medios de cultivo estándares. Las necesidades básicas son en general sencillas: glicerol o glucosa como fuente de carbono y una sal de amonio como fuente de nitrógeno. Para el caso de *M. bovis*, se utiliza piruvato de sodio

como fuente de carbono en la preparación del medio ST ya que el desarrollo es disgónico cuando el medio de cultivo contiene glicerol como el de LJ (Jorge y col., 2005).

En un estudio en donde se sembraron 492 muestras de tejido de bovinos con lesiones tuberculosas, los medios de cultivo en base a huevo de ST y LJ demostraron ser más eficientes en el aislamiento de micobacterias que los medios sintéticos en base a suero o sangre, como son el Middlebrook 7H11 (Gibco) y el B83 (Cousins y col., 1989). También se demostró que en estos últimos, las colonias de micobacterias fueron visibles a los 28 días *post* siembra en comparación con los de base a huevo en donde recién se apreciaron a los 42 días. No obstante, el inconveniente que opacó esta ventaja fue que el porcentaje de contaminación de los medios en base a suero o sangre resultó diez veces mayor (3,9%) que el de los medios en base a huevo (0,3%) en la siembra posterior a la decontaminación utilizando hidróxido de sodio al 2% (Corner, 1994).

En otro estudio, se cultivaron 7.806 muestras clínicas provenientes de pacientes con sospecha de tuberculosis en los medios de ST y LJ. De ellas, 294 resultaron positivas al cultivo. El 70,4% de las micobacterias fueron aisladas en ambos medios, un 16,7% solo en el medio de LJ (todos *M. tuberculosis*) y un 12,9% en el de ST (8 de las cuales eran *M. bovis*, 23 *M. tuberculosis*, 5 *M. avium*, 11 *M. fortuitum* y 1 *M. gordonae*). El tiempo requerido por *M. bovis* para crecer en medio de LJ fue significativamente mayor que en el medio de ST. Los autores aconsejan la utilización de ambos medios de cultivo para lograr el desarrollo de *M. bovis* que crece escasamente en LJ y para aumentar la recuperación en muestras de cepas disgónicas de *M. tuberculosis* para lo cual resulta más eficiente el medio de ST (Sepúlveda y col., 2001). Como otro

ejemplo de ello, Soldá y col., (2005) observaron, el beneficio de sembrar muestras clínicas de pacientes con sospecha de TB en el medio de ST para una mayor recuperación de *M. bovis*, en un hospital de la provincia de Córdoba, Argentina. El estudio se realizó sobre la base de 790 casos de TB, de los cuales 9 fueron causados por *M. bovis*; todos desarrollaron en el medio de ST y solamente uno también lo hizo en el medio de LJ.

Robbe-Austerman y col., (2013) compararon los medios de cultivo de MGIT 960, BACTEC 460 y cuatro medios sólidos para el aislamiento de micobacterias a partir de especímenes de origen veterinario, obteniéndose los siguientes resultados: el medio BACTEC 460 permitió el aislamiento del 93,1 % de las muestras positivas y el MGIT 960 el 81,9%. El medio 7H11 suplementado con suero bovino, sangre hemolizada, verde de malaquita y piruvato de sodio recuperó un 80,6% de *M. bovis* con la menor tasa de contaminación observada respecto a los demás medios. Por otro lado, los porcentajes de contaminación fueron mucho mayores en el medio MGIT 960 (24%) que en el BACTEC (7%). En el mismo estudio, el tiempo de evidencia de cultivo positivo fue menor en los medios de BACTEC 460 y de MGIT 960 que en los medios sólidos.

El medio de cultivo sólido de LJ fue eficaz en la recuperación de micobacterias atípicas, sin embargo falló en la recuperación primaria de *M. bovis*.

Actualmente, el empleo de métodos automatizados con medios de cultivo líquidos se ha generalizado en la práctica de laboratorio de microbiología por su rapidez y mayor índice de recuperación de micobacterias pero debido a ciertos inconvenientes que presentan, principalmente en cuanto a la contaminación, no se aconseja prescindir aún de los medios sólidos (Sapúlveda y col., 2001; Robbe-Austerman y col., 2013).

Transmisión en bovinos

La principal ruta de transmisión de *M. bovis* en los bovinos es la exposición a aerosoles de animales infectados. La eliminación del bacilo por esta vía fue estudiada por diversos autores. Magnano y col., (2011) realizaron cultivos de hisopados nasales seriados a 20 bovinos intradermorreacción (IDR) positivos, obteniéndose aislamientos positivos en el 40% de los casos. Los hisopados se realizaron en 5 repeticiones a cada animal con intervalo de 15 días entre cada una. Luego de la faena, se confirmó por cultivo la infección por *M. bovis* en la totalidad de los animales, lo cual reafirma la importancia y magnitud de esta vía de transmisión.

También el contagio puede ocurrir por vía digestiva a través de agua o alimentos contaminados o por la leche de madres infectadas con *M. bovis* pero es menos frecuente que la vía respiratoria (Menzies y Neill, 2000; Magnano y col., 2008a). La transmisión transmamaria cobra mayor importancia en terneros con sistema de crianza en guacheras (Schneider y col., 2007; SENASA, 2012). Otras posibles rutas de infección pero menos probables son las vías cutánea, congénita y genital (Thoem y Blood, 1995; Murray y col., 1999; Michel y col., 2010).

Los factores de riesgo que contribuyen a la transmisión de la enfermedad son principalmente independientes del hospedador. Entre los más importantes se destaca el tipo de producción, las prácticas de manejo, el movimiento de animales, la densidad de bovinos en un área determinada, la existencia de reservorios silvestres (Elias y col., 2008; Green y col., 2008; Porphyre y col., 2008) y posiblemente las diferencias en la cepa actuante (Andreevskaja y col., 2007). Diversos autores coinciden en que el movimiento de animales es uno de los factores de riesgo crítico. Esto fue demostrado en

Gran Bretaña e Inglaterra al determinar, mediante tipificación molecular, que el movimiento de animales fue el responsable de la mayoría de los brotes de tuberculosis ocurridos entre 1985 y 2003 y entre 2002 y 2004 respectivamente (Gilbert y col., 2005; Gopal y col., 2006).

El tipo de manejo en las diferentes producciones y la mayor densidad de bovinos en un área determinada son factores que sin duda aumentan las posibilidades de transmisión del bacilo (Ameni y col., 2006). Sin embargo, Garro y col., (2011) realizaron un estudio de casos y controles donde evaluaron la asociación entre el manejo de rodeos lecheros y la ocurrencia de TBB. Concluyeron que la alimentación con leche cruda a las terneras, la carga animal, el agrupamiento de las vacas en un único rodeo, los rodeos mixtos y el ingreso de vacas y de toros no estuvieron asociados con la TBB. Se observó un mayor riesgo de ocurrencia de TBB asociado al realizar el desmadre a una edad superior a los cuatro días y al ingresar al establecimiento más de 19 vaquillonas en un período de tres años.

La existencia de reservorios silvestres cobra mayor importancia en países en donde la tuberculosis ha sido erradicada del ganado bovino o en donde las prevalencias de la enfermedad son muy bajas. En países en vías de desarrollo, como la Argentina, en donde existen áreas con elevadas prevalencias de la enfermedad en los bovinos, este es un factor de riesgo de menor importancia. Sin embargo, existe escaso conocimiento sobre la implicancia de la fauna local y el comportamiento de la enfermedad. Abdala y col., (2006) seleccionaron 6 rodeos lecheros (3 de Córdoba y 3 de Santa Fe), cuyas prevalencias de infección por *M. bovis* variaban entre el 7 % y el 67 % a la prueba de IDR. En estos establecimientos capturaron 38 mamíferos del orden Rodentia,

Didelphimorphia, Xenarthra y Carnívora y 11 aves. Aislaron tres cepas de *M. bovis* a partir de una rata, un zorro y una comadreja. Estos aislamientos abren una serie de interrogantes respecto a la cadena epidemiológica de la enfermedad y del sistema productivo en que fueron hallados. Para contestarlos, resta determinar si las cepas obtenidas de la fauna, son las mismas que afectan a los bovinos de los predios donde fueron cazados. Otros autores, también en nuestro país han demostrado la existencia de cepas altamente virulentas para los bovinos aisladas a partir de jabalíes salvajes, reforzando el concepto de investigar la enfermedad en diferentes reservorios y contemplar el diagnóstico en otras especies animales para controlar y erradicar eficientemente la TB (Aguilar y col., 2009; Meikle y col., 2011).

En menor medida, la edad del animal, el comportamiento de los mismos en el rodeo, el medio ambiente y el clima son factores que tienen cierta influencia (Pollock y Neill, 2002; Humblet y col., 2009; Ramírez Villaescusa y col., 2010).

Se ha demostrado que las deficiencias nutricionales en términos de proteína-energía afectan la capacidad de defensa de la inmunidad mediada por células reduciendo significativamente la cantidad de subpoblaciones de linfocitos circulantes (Pollock y col., 1994; Doherty y col., 1996; Humblet y col., 2009). En un estudio de casos y controles realizado por Griffin y col., (1993) encontraron asociación entre brotes recurrentes de TBB y la presencia de alimentación con forraje nutricionalmente pobre, lo cual refuerza la influencia de una adecuada nutrición en la resistencia de la TBB.

Por otra parte, el *stress* asociado a eventos como la gestación y el parto también produce efectos adversos en la inmunidad mediada por células. Si bien hay poca

información acerca de la influencia de estos factores, resultan de suma importancia en la progresión de la TB en el ganado vacuno (Doherty y col., 1996; Pollock y Neill, 2002).

Diversos estudios indican que la susceptibilidad a la infección por *M. bovis* aumenta en animales con infecciones asociadas a virus como el de la diarrea viral bovina que produce efectos inmunosupresores (Welsh, 1995). Se ha reportado que la infección con este virus tiene una asociación positiva con una rápida progresión de la tuberculosis en terneros (Monies y Head, 1999).

Cada factor de riesgo mencionado cobra más o menos importancia dependiendo la región a la que hagamos referencia. Los países desarrollados poseen una realidad y un control de la enfermedad muy diferente a la de los países en vías de desarrollo. De este modo el manejo de los animales y el tipo de producción varía ampliamente dependiendo de la región en estudio modificando la prioridad de cada factor de riesgo analizado.

En regiones de América Latina y del Caribe ha habido un gran avance en el control de la TBB y se han reportado prevalencias menores al 1% en el 30% de ellas; sin embargo, el 70% del ganado todavía se encuentra en áreas en donde los rangos de infección son amplios, alcanzando en algunos casos prevalencias mayores al 56% (Kantor y Ritacco, 2006; Kantor y col., 2008).

Inmunopatogenia

La patogenicidad de *M. bovis* está en relación con su capacidad para escapar a la destrucción inducida por los macrófagos y para provocar hipersensibilidad de tipo retardado. La fase primaria de infección se inicia con la inhalación de micobacterias y termina con la aparición de una respuesta inmunitaria mediada por células T que induce una hipersensibilidad frente a los microorganismos (Cotran y col., 2000).

Cuando la infección se inicia por inhalación de micobacterias, éstas llegan a las vías aéreas terminales donde son fagocitadas por los macrófagos alveolares y transportadas hasta los ganglios linfáticos. Estos macrófagos no sensibilizados son incapaces de destruir las micobacterias por lo que dentro de ellos se replican con libertad debido a que escapan de la destrucción fagocítica mediante la inhibición de la fusión fagolisosoma. Este proceso da paso a nuevos ciclos de fagocitosis, replicación de micobacterias y lisis celular con la posible diseminación de las mismas hacia otras partes del pulmón y en algunas ocasiones hacia otros tejidos (Thoen y Bloom, 1995; Cotran y col., 2000). La interacción entre la micobacteria y las células fagocíticas conlleva a su activación y a la producción de diversas citoquinas mediante complejos procesos de regulación.

Si el microorganismo se multiplica y destruye al macrófago, otros macrófagos de la zona fagocitan las bacterias libres y se repite el proceso. Esta agrupación de los macrófagos forma el llamado granuloma que, si continúa aumentando de tamaño, se puede observar a simple vista y constituir lo que se conoce como tubérculo (Thoen y Bloom, 1995). La respuesta inmune se inicia cuando se produce el encuentro del agente con el macrófago. La fagocitosis y la presentación del antígeno junto al complejo mayor de histocompatibilidad clase I y II son funciones del estímulo y proliferación de clones de linfocitos Th1 CD4+ y CD8+. La emergencia de CD4+ y la secreción de citoquinas, especialmente IFN γ e IL2, coinciden con el inicio de la inmunidad (Hines y col., 1995). Estas linfoquinas están encargadas de atraer, inmovilizar y activar células mononucleares sanguíneas hacia los lugares en los cuales están presentes las micobacterias o sus productos, produciéndose un efecto de cascada.

En el reconocimiento inmune cobran protagonismo los receptores tipo *tool* o *tool like receptors* (TLR), un grupo de receptores filogenéticamente conservados e importantes mediadores de la inmunidad innata. El TLR-2 y el TLR-4 en conjunción con la proteína de membrana CD14 interactúan con componentes de la pared celular de la bacteria como lipoproteínas y lipoarabinomano (LAM). Otros, como el TLR-9 interviene en el reconocimiento del ADN bacteriano. Los TLR no sólo están presentes en la superficie de las células presentadoras de antígenos sino que también se encuentran en los fagosomas por lo que el reconocimiento inmune se lleva a cabo con o sin fagocitosis previa. La micobacteria previamente opsonizada puede fijarse a las células presentadoras de antígenos a través de receptores del complemento. Cuando la bacteria no está opsonizada, como ocurre en el primer contacto con el patógeno, el proceso se da mediante receptores de la manosa que reconocen manosa y fructuosa en la superficie de la micobacteria o por los *scavenger receptors*, encargados de reconocer lipoproteínas de baja densidad (Bezoz y col., 2012).

Por su parte, las micobacterias, a través del LAM, un heteropolisacárido principal con estructura similar a la endotoxina de las bacterias gram negativas inhibe la activación de los macrófagos por el $IFN\gamma$. El LAM también hace que los macrófagos secreten factor de necrosis tumoral ($TNF-\alpha$) que causa lesión tisular e IL-10 que suprime la proliferación de células T inducida por las micobacterias. Por otra parte, el complemento activado en la superficie de las micobacterias puede dar lugar a la opsonización del microorganismo y facilita su captación por el receptor CR3 del complemento existente en los macrófagos sin necesidad de desencadenar el estallido respiratorio necesario para destruir el agente patógeno.

Dos a cuatro semanas después de iniciado el proceso, las citocinas procedentes de las células T CD4⁺, activan a los macrófagos circulantes para producir la destrucción intracelular de las micobacterias (Murray y col., 1999; Tizard, 2000).

Las células T activadas por las micobacterias interactúan con los macrófagos de tres formas:

- * Las células T colaboradoras CD4⁺ secretan IFN γ que activa a los macrófagos para producir una destrucción intracelular de las micobacterias a través de intermedios reactivos nitrogenados como NO, NO₂ y HNO₃.

- * Las células T supresoras CD8⁺ destruyen los macrófagos infectados por micobacterias y también a las micobacterias.

- * Las células T doblemente negativas CD4⁻ y CD8⁻ lisan los macrófagos sin destruir a las micobacterias. La destrucción de los macrófagos da lugar a la formación de granulomas caseificantes. Las micobacterias no son capaces de crecer en ese medio extracelular ácido carente de oxígeno con lo que la infección queda controlada. El residuo final de la infección primaria es una cicatriz calcificada en el parénquima pulmonar y en el ganglio linfático satélite, conjunto denominado complejo primario o de Ghon. Siempre está presente en la primera infección pero a veces no se observan los dos componentes, faltando la lesión en la puerta de entrada. Esto último se puede encontrar cuando la mucosa afectada es la faríngea o la intestinal, aunque la lesión en el ganglio siempre está presente (Murray y col., 1999; Jubb y col., 2007).

Si la carga antigénica es pequeña, se produce la destrucción de los bacilos con daño tisular mínimo. Sin embargo, si el número de bacilos es grande, la cepa es particularmente virulenta o el hospedador especialmente sensible, la respuesta inmune

celular conduce a necrosis tisular y a la formación de granulomas donde los bacilos pueden permanecer latentes y reactivarse ante una inmunodepresión del hospedador (Murray y col., 1999; Cotran y col., 2000).

El crecimiento del tubérculo es en forma centrífuga, al igual que el desarrollo en los ganglios linfáticos satélites infectados por la difusión de los bacilos desde el foco primario. Si los animales no están sensibilizados previamente la diseminación ocurre en forma rápida, y los bacilos, ya sea que estén libres o dentro de los macrófagos infectados, llegan a los distintos tejidos provocando nuevas lesiones que serán múltiples y pequeñas (tuberculosis miliar) o escasas y de mayor volumen (Jubb y col., 2007).

Los granulomas que no consiguen contener la expansión de la infección micobacteriana, son la causa principal de la lesión tisular en la tuberculosis y reflejan una hipersensibilidad de tipo retardado. Las citoquinas más importantes en esta reacción y sus funciones son las siguientes:

- ❖ IL-12: es producida por los macrófagos y es esencial para la inducción de la respuesta Th1, y por lo tanto para la hipersensibilidad retardada. También es un potente inductor de la secreción de IFN γ por las células T y NK.
- ❖ IFN γ : es un potente activador de los macrófagos en los que estimula una mayor secreción de IL-12.
- ❖ IL-2: estimula la producción de células T por mecanismos autócrino y parácrino.

- ❖ El TNF α y la linfotoxina ejercen importantes efectos en las células endoteliales facilitando la extravasación de linfocitos y monocitos hacia el lugar de la reacción de hipersensibilidad de tipo retardada.
- ❖ IL10: esta citoquina antagoniza la respuesta pro-inflamatoria mediante la disminución de la producción de IFN γ , TNF α e IL-12.
- ❖ IL-4. Suprime la producción de IFN γ y evita la activación de los macrófagos. Se la relaciona con la progresión de la enfermedad, reactivación de infecciones e intensificación del daño tisular.

Se generan así células T de memoria que son capaces de responder ante una nueva entrada del antígeno micobacteriano por diversas vías. Esto determina que la hipersensibilidad retardada puede observarse aún varios años después de la exposición ya que las células de memoria tienen una larga vida (Tizard, 2000; Blanco y col., 2011).

La hipersensibilidad que se desarrolla contribuye a la muerte celular y a la destrucción del tejido (necrosis caseosa). Posteriormente hay desarrollo de tejido conectivo fibroso que es el encargado de rodear y focalizar la lesión; son pocas las lesiones que pueden regresar y encapsularse quedando en su interior micobacterias viables. El desarrollo de la enfermedad depende de la habilidad de los bacilos para multiplicarse dentro de las células y de la inducción de una respuesta inmune (Thoen y Bloom, 1995).

El mecanismo de la inmunidad mediada por células incluye dos estadios: sensibilización y desafío. La sensibilización aparece entre una o dos semanas posteriores al ingreso del agente y ésta es la primera etapa en la cual las células presentadoras de antígenos procesan y presentan los antígenos a los linfocitos T que se

activan atrayendo los macrófagos. El desafío se produce cuando ocurre una segunda exposición al Ag y se desarrolla la inmunidad mediada por células (IMC); ese Ag se presenta a los linfocitos Th1 con la consecuente liberación de citocinas: IL2, factor quimiotáctico de macrófagos (FCM), IFN γ y FNT- β . La IL2 atrae y activa células T al área infectada, el FCM atrae monocitos, el IFN γ y el FNT- β son citotóxicos. Todo este proceso tiene como finalidad la ingestión de microorganismos por parte de los macrófagos y la degradación mediante las enzimas lisosomales que alteran la actividad respiratoria como son los radicales peróxidos y superóxidos, también la acción sobre los tejidos extraños, las células tumorales y los Ag solubles o conjugados. Ante situaciones en las cuales el Ag es difícil de destruir, la respuesta inflamatoria se prolonga y aparecen las células epitelioides y las células gigantes formando un granuloma. Esta lesión puede ser extensa, afectar tejido normal y resultar en una necrosis caseosa (Benjamini y col., 1996).

Blanco y col., (2011) estudiaron la respuesta inmune en terneros experimentalmente infectados con diferentes dosis de *M. bovis*. Sus resultados revelaron que se desarrolló una activación de linfocitos CD4⁺ y CD8⁺ luego de la estimulación con el antígeno específico derivado proteico purificado (DPP) bovino. Observaron un predominio de células CD4⁺ activadas en respuesta al estímulo, independientemente de la dosis de micobacterias inoculadas. Los terneros inoculados con bajas cargas de bacterias mostraron niveles muy pobres de activación de linfocitos CD8⁺, indicando, que a diferencia de lo que sucedió con la activación de los linfocitos CD4⁺, la respuesta de tipo CD8⁺ dependió de la carga bacteriana inicial. En cuanto a la liberación de IFN γ , recién a los 90 días post infección la totalidad de los animales del ensayo fueron

positivos, por lo que, al igual que lo que ocurre con los linfocitos CD4⁺, la carga bacteriana inicial no parece tener efecto sobre la liberación del mismo.

En otro estudio llevado a cabo por Welsh y col., (2005) se estudió la influencia de la progresión de la patología en el balance entre la inmunidad celular y humoral en la TBB. Para esto inocularon por vía intranasal terneros de 6 meses de vida en los cuales determinaron la tendencia de la respuesta inmune Th0/Th1 e inmunoglobulina G1 en el desarrollo de la respuesta antimicobacteriana y su correlación con la evolución de la patología. Todos los animales desarrollaron una fuerte respuesta inmune celular pero la misma disminuyó a medida que la enfermedad progresaba, evidenciado esto en una falta de resultados positivos al realizar la medición de IFN γ en los estadios tardíos de la enfermedad. Se observó una fuerte tendencia Th0 (IL-4⁺, IFN γ ⁺), elevados niveles de expresión de IL-10 y mayor respuesta de tipo humoral asociada a una patología más agresiva. En contraparte, una fuerte tendencia inmune hacia Th1 (IFN γ ⁺) fue mantenida sin el desarrollo de una respuesta inmune humoral antimicobacteriana en patologías menos severas. Los niveles de IgG1 se correlacionaron con la severidad de la patología, mientras que la respuesta inmune celular no tuvo una fuerte asociación con la severidad de la patología. El desarrollo y mantenimiento de una respuesta inmune de tipo Th1 se asoció a un mayor control de la infección por *M. bovis*. Los animales que progresaban de una respuesta Th1 a una Th0 desarrollaron una patología más extensa y una menor performance en las técnicas diagnósticas que miden inmunidad de tipo celular pero desarrollan una fuerte respuesta inmune humoral (Welsh, y col., 2005).

Por su parte, Palmer y col., (2007) estudiaron la evolución de la lesión y los cambios inmunohistoquímicos en granulomas de terneros infectados experimentalmente

con *M. bovis*. Observaron que el número relativo de células $CD4^+$ y $CD68^+$ se mantuvo constante durante el estudio. Sin embargo, a más de 60 días post inoculación los niveles de células $CD8^+$ y células $T\gamma/\delta$ disminuyeron. Concluyen que los granulomas son lesiones dinámicas que siguen una progresión ordenada a través de los diferentes estadios de la enfermedad. La disminución de la expresión de óxido nítrico sintetasa inducible (iNOS) y los reducidos números de células $CD8^+$ y $T\gamma/\delta^+$ en la progresión de los granulomas tuberculosos indican una falla en el control de la infección por parte del hospedador.

Se observa en la Figura 1 un breve esquema de la inmunopatogenia de la TB.

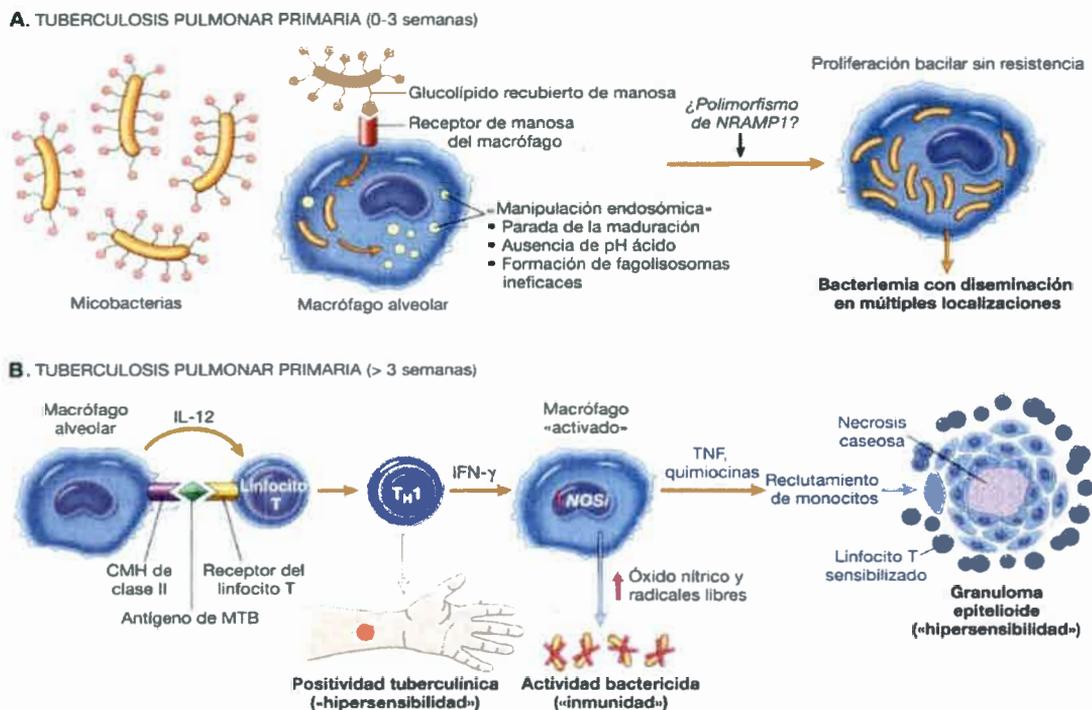


Figura 1: inmunopatogenia de la tuberculosis, secuencia de acontecimientos que ocurren en la tuberculosis primaria.

Patología de la TB

La TB es el arquetipo de las enfermedades granulomatosas. La inflamación granulomatosa es un patrón característico de reacción inflamatoria crónica en el que el tipo celular predominante es el macrófago activado, cuyo aspecto es de tipo epitelial modificado (epitelioide) (Cotran y col., 2000).

- **Patología microscópica**

Histológicamente, la inflamación granulomatosa puede contener todos los tipos de células inflamatorias, aunque suelen predominar linfocitos y macrófagos. Algunas definiciones sugieren que es granulomatoso cualquier exudado en el que predominen los macrófagos, aunque la mayoría incluyen macrófagos, células epiteloides y células gigantes con una formación algo difusa de tejido conjuntivo. La presencia de abundantes macrófagos parece ser el pre requisito fundamental. Generalmente coinciden tres reacciones en la misma lesión:

- * Inflamatoria, según indica la presencia de células mononucleares.
- * Reparativa, se manifiesta por una producción lenta y persistente de tejido conjuntivo.
- * Degenerativa, apreciada por la degeneración y necrosis en los componentes de la reacción.

La lesión inicial puede ser de tipo productiva, constituida por células epiteloides, macrófagos y en menor número células gigantes de Langhans, circunscripta por linfocitos y plasmocitos; o exudativa donde predomina un exudado fibrinoso junto con abundantes neutrófilos además de los otros tipos celulares. Esta última lesión se observa generalmente en casos muy agudos con amplia difusión de *M. bovis*. Con el transcurso

del tiempo, ambos tipos de lesiones tienden a sufrir necrosis caseosa central y pueden llegar a calcificarse. En la medida en que el organismo desarrolla resistencia se forma en mayor o menor grado una cápsula de tejido fibroso alrededor del granuloma. (Thoen y Bloom, 1995; Murray y col., 1999; Jorge y col., 2005).

Wangoo y col., (2005) con el objetivo de clasificar en diferentes estadios histopatológicos los granulomas tuberculosos, inocularon por vía intratraqueal 18 novillitos de 5 meses de vida con 70 a 62.000 ufc de *M. bovis*. A la necropsia todos los animales presentaron lesiones compatibles con tuberculosis (LCT) en ganglios de la cabeza, torácicos o en los pulmones. Para la examinación histológica, 55 granulomas de ganglios linfáticos fueron teñidos con Hematoxilina-Eosina (H-E) y Ziehl Neelsen (Z-N). De acuerdo a las características observadas realizaron una clasificación que se detalla a continuación y que podría servir de guía para encasillar los diferentes estadios de los granulomas tuberculosos.

Estadio I INICIAL: agrupaciones de macrófagos epiteloideas incluidas células gigantes con algunos linfocitos intercalados rodeándolos principalmente linfocitos T CD3+ y pocas células B y células T $\delta\gamma$. No se observa fibrosis periférica, ni necrosis.

Estadio II SÓLIDO: predominan los macrófagos epiteloideos y las células gigantes extensamente interpuestas con linfocitos T CD3+ principalmente, y siempre en la periferia escasas células T $\delta\gamma$ y ocasionalmente neutrófilos. Se observa el comienzo de la formación de una cápsula incompleta, no se observa mineralización pero sí una mínima necrosis.

Estadio III MÍNIMA NECROSIS: macrófagos epiteloideos y células gigantes rodeando el área de necrosis. Linfocitos T CD3+, células T $\delta\gamma$ y linfocitos B presentes



principalmente en la periferia. Intenso agrupamiento de linfocitos b en la cápsula fibrosa. Algunos neutrófilos. Completa encapsulación, necrosis caseosa central con mínima mineralización.

Estadio IV NECROSIS Y MINERALIZACIÓN: macrófagos epiteloideos y células gigantes rodeando el área de necrosis, linfocitos T CD3+ y, más prominentes, células T $\delta\gamma$ en la periferia del granuloma. Agrupamiento multifocales de células B fuera de la cápsula y en los márgenes del granuloma. Cápsula fibrosa gruesa, necrosis caseosa extensa y mineralización.

Observaron también que el tamaño de los granulomas aumentó con el avance de la lesión, el doble entre los estadios I y II; y II y III; y más del doble entre el III y IV. El número de bacilos dentro del granuloma también se incrementó con el avance de cada estadio (Wangoo y col., 2005).

Si bien los granulomas producidos por micobacterias son dinámicos y las poblaciones de células cambian con el curso de la infección, esta clasificación es descriptiva y provee un contexto espacial del desarrollo de la lesión e infiere un grado de cronicidad de la misma. Este esquema facilita el reconocimiento de la progresión normal del granuloma de aquella resultante de la inmunosupresión o variación de la cepa de micobacteria actuante.

- **Patología macroscópica**

La reacción granulomatosa suele provocar la formación de una protuberancia en el tejido que se denomina granuloma. Existen dos tipos de granulomas que difieren en su patogenia. Los granulomas por cuerpo extraño que están causados por cuerpos relativamente inertes, y los granulomas inmunitarios que están producidos por partículas

insolubles que son capaces de inducir una respuesta inmunitaria mediada por células. En esta última, los macrófagos fagocitan el material extraño, lo procesan y lo presentan a los linfocitos T apropiados activándolos. El prototipo del granuloma inmunitario es el producido por el bacilo de la tuberculosis (Cotran y col., 2000).

Macroscópicamente, el granuloma se observa como una formación nodular, bien delimitada, más o menos saliente y de tamaño variable. Puede estar constituido por muchos granulomas menores aunque algo confluentes y puede ser una masa discreta o algo difusa. Las características macroscópicas varían con el paso del tiempo. Cuando el granuloma es joven presenta un color gris amarillento, es firme y no enucleable; a medida que pasan los días se transforma en un granuloma amarillo con necrosis caseosa central que le da el aspecto de ricota. Posteriormente puede ocurrir reblandecimiento del contenido caseoso, encapsulamiento con formación de una cápsula fibrosa blanca y firme que rodea al tejido caseoso, calcificación o fibrosis completa (Jorge y col., 2005; Jubb y col., 2007).

La necrosis es el resultado de la hipersensibilidad mediada por células y es de tipo caseoso; el material necrótico suele estar condensado en una masa blanco-amarillenta que puede licuarse o caseificarse. La calcificación es un hallazgo frecuente pero no se presenta comúnmente en todas las especies animales como por ejemplo en caninos y felinos. La fibrosis que forma la cápsula es observada en los animales con mayor poder de resistencia y puede sobrepasar y dominar las lesiones como tejido de granulación tuberculoso (Hines y col., 1995; Jubb y col., 2007).

La vía de ingreso del agente y la ubicación de las lesiones están estrechamente relacionadas en esta enfermedad. Al ser la vía aerógena la principal, la mayor cantidad

de lesiones suele encontrarse en los pulmones y ganglios mediastínicos. La presencia de lesiones en el aparato digestivo (ganglios mesentéricos, hígado, bazo, etc) reconoce como ingreso de *M. bovis* al consumo de pastos y alimentos contaminados, o bien a la deglución por parte del animal de sus secreciones bronquiales cuando sus pulmones presentan lesiones tuberculosas. Los ganglios retrofaríngeos también suelen estar afectados debido a que la forma aerógena y digestiva comparten porciones anatómicas como la faringe (Menzies y Neill, 2000; Pollock y Neill, 2002; Humblet y col., 2009; Michel y col., 2010).

Diversos autores demostraron que las lesiones tuberculosas en animales naturalmente infectados se asientan principalmente en pulmones y ganglios bronquiales y mediastínicos y que la ubicación sólo digestiva se da en una pequeña proporción de animales (Abdala y col., 1999; Abdala y col., 2002b; Magnano y col., 2010).

Corner, (1990) con el objetivo de optimizar la inspección *post mortem* y determinar, en orden de importancia, cuáles son los sitios donde asientan principalmente las lesiones tuberculosas, analizó la distribución de las mismas en 374 animales. El 29,4% de los animales tuvo lesiones en ganglios retrofríngeos, el 46,2% en ganglios mediastínicos y bronquiales, el 9,8% en pulmón, 2,9% en ganglios mesentéricos, 2,4% en ganglios parotídeos, la misma proporción en cervicales caudales y 1,2% en inguinales superficiales. Se concluye el trabajo afirmando que el 86% de los animales tuberculosos se puede identificar inspeccionando en faena tres ubicaciones; ganglios retrofaríngeos, mediastínicos y pulmón. Examinando además los ganglios parotídeos, inguinales y mesentéricos se pueden detectar el 95% de los animales con tuberculosis.

Si bien la inspección en frigorífico es menos minuciosa por cuestiones de tiempo, perdiendo así sensibilidad en la detección de lesiones, y depende en gran medida del operador, es un método efectivo para monitorear la tuberculosis en áreas extensas donde convergen grandes cantidades de animales constituyendo la última barrera sanitaria de protección al consumidor (Corner, 1994; SENASA, 2012).

Whipple y col., (1996) realizaron un estudio en donde se examinaron *post mortem* 15 animales positivos a la IDR provenientes de un rodeo lechero. Las lesiones macroscópicas tuberculosas fueron encontradas en el 60% de los casos en los linfonódulos mediastínicos y traqueobronquiales. Cuatro animales (26,7%) tuvieron lesiones en ganglios de la cabeza y dos en otras ubicaciones (subilíacos). No se observaron lesiones en ganglios u órganos del sistema digestivo. El 46,7% de los animales tuvo lesiones en un solo sitio. En 14 de los 15 animales se encontró evidencia de tuberculosis en ganglios mediastínicos, traqueobronquiales y de la cabeza.

Por otra parte, Abdala y col., (1999) al analizar la ubicación de las lesiones tuberculosas en 172 bovinos naturalmente infectados encontraron que la ubicación más frecuente fue en ganglios de la cabeza, pulmón y mesenterio. Por otra parte, del total de vacas con lesiones, 43 (25%) presentaron TB generalizada.

En otro estudio donde se analizaron mediante necropsia 247 bovinos naturalmente infectados positivos a la IDR se encontraron lesiones compatibles con TB en 217 (87,85%) de ellos. Las mismas fueron corroboradas por cultivo, histopatología, PCR u observación directa de los bacilos a partir de una tinción de Z-N. Más del 70% de las lesiones se encontraron en pulmón y ganglios satélites. Además se observó una

correlación positiva entre la mayor diseminación anatómica de las lesiones y la severidad de la patología (Menin y col., 2013).

La Tuberculosis bovina como zoonosis

Actualmente, en humanos, la TB continúa siendo la causa más frecuente de muerte en adultos por un único agente infeccioso en los países en vías de desarrollo. Si bien *M. tuberculosis* es el principal agente etiológico, *M. bovis* contribuye con la TB en humanos y por tanto es de importancia en países que presentan alta prevalencia de TB animal, debido al escaso control sanitario, y en aquellos lugares donde se consume leche cruda, sin pasteurizar ni hervir. Se ha informado una relación directa entre la infección por *M. bovis* en el ganado y el desarrollo de la enfermedad en la población humana (Kantor y col., 2008).

En nuestro país, la infección es endémica en el ganado bovino. A su vez, este rumiante es fuente de infección para el cerdo, el hombre y otras especies (Cosivi y col., 1998).

La TBB se transmite directamente al humano por vía aerógena o indirectamente por el consumo de leche sin pasteurizar. Los casos de tuberculosis producidos por *M. bovis* en humanos son muy raros en los países en donde la enfermedad ha sido erradicada de los bovinos. Es por esto que es necesario que médicos humanos y médicos veterinarios trabajen en conjunto en la investigación y control de esta zoonosis de gran importancia principalmente en los países en vías de desarrollo, habiéndose incorporado el concepto de “Una sola salud” (Bulletin of the World Health Organization, 1994). Este surge de la consideración de las grandes oportunidades ligadas a la protección de la salud pública por medio de las políticas de prevención y control de patógenos en las

poblaciones animales en la interfaz entre el hombre, el animal y el medio ambiente. La puesta en marcha de estas políticas, facilitada por una alianza formal concretada entre la Organización Mundial de la Salud (OMS), la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO) y la Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE), pone en primera línea de acción a los veterinarios y a los propietarios de los animales principalmente (OIE, 2013).

El principal hospedador de *M. bovis* es el ganado bovino. De acuerdo con la reactividad de los bovinos a la IDR existen en Latinoamérica regiones con muy baja o nula prevalencia de TBB (menor al 0,1%), tales como algunas islas del Caribe; países de prevalencia intermedia (0,1-1%), como México y varios integrantes de Centroamérica y países con una prevalencia alta (mayor al 1%) como Argentina o Brasil. Los países que concentran el 70% del ganado en toda la región son los de mayor prevalencia, ocasionándose elevadas pérdidas económicas y representando además un riesgo de infección para humanos que no puede ser desconsiderado (OIE, 2004; Kantor y Ritacco, 2006).

Según un estudio realizado por Kantor y col., (2008) el porcentaje de casos de TB humana causados por *M. bovis* en 10 países de América Latina varió de 0 al 2,5%.

Probablemente, estos datos subestimen la verdadera tasa de infección ya que no siempre se utilizan los medios de cultivos adecuados para favorecer el desarrollo de *M. bovis* o se prescribe el tratamiento a partir de la baciloscopía sin realizar el cultivo bacteriológico.

En la Argentina la infección por *M. bovis* fluctúa entre 0,5% y 2% de todos los casos de TB diagnosticados mediante cultivo, siendo más frecuente en las cuencas

lecheras, particularmente sur de las provincias Santa Fe y Córdoba, y norte de la provincia de Buenos Aires (Barrera y Kantor, 1987; Torres, 2013).

En la provincia de Córdoba, Argentina, se determinó la frecuencia de casos de tuberculosis en pacientes que asistieron al Hospital Tránsito Cáceres de Allende en un período de trece años (1991-2003). De los 790 casos de tuberculosis diagnosticados, 9 fueron causados por *M. bovis*. Sorprendentemente, solamente dos de los pacientes vivían en zona rural mientras que los restantes lo hacían en zonas urbanas (Soldá y col., 2005).

En Uruguay, no se habían registrado casos de humanos con aislamiento de *M. bovis* hasta el año 2012 cuando se diagnosticaron los primeros tres casos de TB pulmonar por *M. bovis*. En el análisis epidemiológico se constató que uno de los enfermos poseía antecedentes de contacto con animales en un zoológico; el otro, portador del virus de inmunodeficiencia humana (VIH), estaba en contacto cotidiano con derivados cárnicos de ganado vacuno; el tercero poseía antecedentes de ingestión de leche no pasteurizada (Rivas y col., 2012).

Resulta de suma importancia destacar que en nuestro país, Etchechoury y col., (2010) confirmaron mediante tipificación molecular la transmisión humano-humano de una cepa de *M. bovis* resistente a múltiples drogas. Este hecho marca la magnitud que puede alcanzar la tuberculosis por *M. bovis* en humanos requiriéndose intensificar los esfuerzos por controlar la enfermedad en el ganado, su hospedador principal.

Situación de la Tuberculosis bovina en Argentina

La situación actual de la TBB tanto en Argentina, como en otros países, obliga a desarrollar por parte de los organismos oficiales programas de control y erradicación de la enfermedad. Estos programas tienen como base de sustentación sistemas de vigilancia que sirven como eje conductor a las medidas a tomar con el fin de mejorar la comercialización de los alimentos en el mercado nacional e internacional, aumentar la producción de carne y leche, reducir las pérdidas económicas directas e indirectas ocasionadas y evitar el riesgo de diseminación de la tuberculosis bovina a la población humana.

La prevalencia de la enfermedad en Argentina se puede estimar a partir de los resultados de las pruebas de IDR en terreno o por la detección de animales con LCT en los frigoríficos con inspección federal y en los mataderos provinciales y municipales. En cuanto a la primera, el SENASA, llevó a cabo estudios de prevalencia en distintas regiones. El primer relevamiento diagnóstico se realizó en el Valle Central de la provincia de Catamarca en 1983-1984. Se examinaron 81 establecimientos de producción lechera y se tuberculinizaron 1.083 bovinos. Se detectó que el 2,99% de los bovinos eran reaccionantes correspondiendo al 22,2% de los establecimientos relevados. Posteriormente, en 1992, se efectuó el segundo relevamiento, donde se examinaron 40 establecimientos tamberos con 2.278 bovinos tuberculinizados, resultando reaccionantes el 9.57% de bovinos (87,5% de los establecimientos) (Torres, 2011).

Durante el año 1984, en Jujuy, se examinaron 19 tambos con 659 bovinos tuberculinizados, resultando reaccionantes el 4% de los bovinos del 37% de los establecimientos. Posteriormente, durante el período 1990-1991, el relevamiento se

efectuó en los establecimientos ganaderos del valle inferior del río Chubut. Se examinaron un total de 55 establecimientos con 927 bovinos tuberculinizados, encontrándose reaccionante el 9,7% de bovinos del 35% de los establecimientos (Torres, 2011).

Otras fuentes de datos que se incorporaron al diagnóstico de situación entre 1994-1996 fueron las exportaciones de ganado en pie, tuberculinizando, a países del Mercosur; las mismas provenían de Chaco, Formosa y Santa Fe. Se detectó un porcentaje promedio de reaccionantes de 1,6% (rango: 1,5-1,7) en Chaco y Formosa y de 6,1 (rango: 5,2-7,0) en Santa Fe (Torres, 2011).

Magnano y col., (2013) con el objetivo de evaluar la presencia TBB en establecimientos de cría y tambo de la región central del país, analizaron mediante la prueba tuberculínica 1.671 animales pertenecientes a 71 establecimientos. El 6,8% de los animales y el 29% de los establecimientos fueron positivos.

Generar este tipo de información es importante y fundamental para diseñar o mejorar políticas provinciales y nacionales que apunten a controlar y erradicar la enfermedad en un territorio. En este aspecto cabe citar el plan provincial desarrollado en la provincia de Santa Fe basado en este tipo de análisis (Anexo resol 949/12 Ministerio de la Producción de Santa Fe).

En cuanto al análisis de la prevalencia de la enfermedad obtenida a partir de los decomisos en faena, el SENASA, informa que sobre un promedio de faena anual que oscila entre 9.000.000 y 13.000.000 de bovinos, las tasas de prevalencia de lesiones de TBB detectada en 1969-2012 fluctuó entre 6.7 % y 0.4% respectivamente (Torres, 2013).

A partir de la información de los decomisos en frigoríficos, nuestro país cuenta con datos actualizados. En el año 1996, durante el período de marzo 1995 a febrero de 1997, el programa de TB del SENASA elaboró en forma conjunta con el INPPAZ, un estudio de prevalencia de TBB evaluada por la inspección macroscópica de los animales faenados en los frigoríficos con inspección federal en la República Argentina. Sobre un total de 160 frigoríficos con inspección federal en el país, 126 enviaron la información requerida (listado de las tropas con animales con lesiones tuberculosas a la observación macroscópica, detallando localización geográfica, identificación de origen del establecimiento, número de animales que componían la tropa y número de animales con LCT) en al menos una oportunidad. El volumen de faena examinado durante el lapso de dos años en estudio correspondió a un total de 9.472.396 animales, representando un 47,36% de la faena total del país y 19% del stock ganadero durante el mismo período respectivamente. Fueron hallados 128.038 bovinos con LCT, representando una prevalencia del 1,35% de la muestra. En el 21,9% de los animales positivos no fue posible identificar el origen real, debido a que fueron comercializados a través del Mercado Nacional de Haciendas de Liniers, en el que las tropas procedentes de diferentes lugares del país son reorganizadas. Hecha esta salvedad, fue notorio que el 81% (80.998) de los 99.997 restantes procedían de las provincias de Buenos Aires (35%), Santa Fe (26%) y Córdoba (19%), región en la que se encuentra el 62,87% de los bovinos del país. A su vez, fue identificado ganado con lesiones TB, procedente de 278 de los 493 (56,4%) departamentos/partidos de la Argentina demostrando así una importante expansión geográfica de la enfermedad.

Si bien no fue posible estimar la prevalencia de la enfermedad discriminada por provincia debido al sesgo que representa el no estudiar también tropas en las que no se encontraron animales con lesiones compatibles con la enfermedad, resulta evidente que al menos cuantitativamente la enfermedad presenta una marcada distribución regional, lo que permite establecer estrategias diferenciadas para cada región del país (Torres y col., 1998).

A partir de los datos correspondientes al proyecto de vigilancia epidemiológica SENASA/INPPAZ en los frigoríficos con inspección federal durante los años 1995-1997, se realizó otro estudio en el país con el objeto de describir la distribución espacial de la TBB e identificar posibles agrupamientos de áreas de altas prevalencias (Perez y col., 2002). Como era de esperar, los agrupamientos primarios de TBB coincidieron con las regiones de mayor producción lechera de la Provincia de Córdoba y Santa Fe, en donde se encuentran el 21% de los rodeos lecheros nacionales y producen el 34% de la producción láctea en Argentina (SAGPyA, 1996). Los agrupamientos secundarios están localizados, de igual manera en las cuencas lecheras, tales como Abasto norte y sur, Mar y Sierras de la provincia de Buenos Aires.

Estos resultados demuestran, que pueden ser utilizados para investigar la evolución de los agrupamientos espaciales de la enfermedad, como un método económicamente viable, para realizar una caracterización epidemiológica de la TBB de los animales con destino a faena en la Argentina (Torres, 2011).

Abdala y Tarabla, (2002a) realizaron una estimación de la prevalencia de TBB en el departamento de San Justo, provincia de Córdoba, Argentina, a partir de la información obtenida en dos frigoríficos. Sobre un ingreso a faena de 3.695 animales en

un período de tres meses, se detectaron LCT en 126 (3,4%). La categoría con mayores envíos fue la de vacas con 2.716 cabezas faenadas, siguiendo los novillos con 416, los cuales presentaron también los mayores índices de decomisos. Las pedanías de Libertad, Concepción y Juárez Celman aportaron los mayores envíos de bovinos. El principal problema surgido en el trabajo fue el faltante de datos del origen de los animales cuando se reemplaza el nombre del propietario por el de la firma consignataria.

En el departamento Castellanos, provincia de Santa Fe, Argentina, se desarrolló un esquema de identificación de los rodeos de origen a partir de las vacas lecheras de descarte faenadas en un frigorífico de la zona a lo largo de un año. Se faenaron 2.224 vacas provenientes de 340 rodeos lecheros. Se observaron LCT en el 7,7% (172) de los animales y en el 30% (102) de los rodeos (Abdala y col., 1999).

Por otra parte, en el departamento Las Colonias, Santa Fe, se estimó la presencia de TB sobre la base de la observación de LCT durante la faena. Se utilizó un sistema de identificación de animales que permitió mantener la individualidad de cada vaca enviada a un frigorífico local. Se inspeccionaron 1976 vacas provenientes de 406 rodeos. Se individualizaron 606 tropas de las cuales sólo tres fueron compradas en forma directa a los productores y el resto en remates feria. El 4,1% de los animales y el 15,6% de los rodeos presentaron LCT (Abdala y col., 2002).

Para confirmar la etiología de las LCT se requiere completar y profundizar el estudio mediante histopatología y bacteriología (Corner, 1994). La caracterización molecular de las cepas aisladas junto con la información epidemiológica clásica

conduce a establecer relaciones epidemiológicas entre zonas geográficas, y entre establecimientos (Perez y col., 2002).

La fuente de información que pueden aportar los frigoríficos a los sistemas de vigilancia epidemiológica en faena posee un valor indiscutible. El procedimiento de monitoreo en frigoríficos demostró en países como Australia, E.E.U.U., Canadá y Cuba, ser fundamental en la erradicación de la enfermedad, debido al éxito en la identificación de los animales procedentes de áreas de cuarentena y al seguimiento con trazabilidad en origen de los animales con LCT detectados en faena.

En nuestro país se realizó un plan piloto de vigilancia epidemiológica de la TB por medio de la faena en las provincias de Santa Fe y Entre Ríos el cual aportó importantes elementos para definir estrategias de control que podrían ser implementadas a nivel nacional (Torres, 2011).

➤ **Legislación actual**

Aunque el factor determinante del inicio de los programas de control y erradicación de la TBB en los países desarrollados fue el impacto de la enfermedad sobre la Salud Pública, su importancia económica también es un factor relevante. Se estima que las pérdidas debidas a TBB en la Argentina, alcanzan los 63 millones de dólares al año, siendo el principal componente la pérdida de peso en los bovinos (36% del total), las pérdidas en producción de leche (13%) y el decomiso en frigoríficos y mataderos (10%) (SENASA, 2012).

Nuestro país cuenta desde 1999 con un plan Nacional de Control y erradicación de la tuberculosis bovina (Resolución N°115 SENASA/SAGPyA, 1999) que recientemente ha sido modificado y ampliado mediante la Resolución SENASA N°128/2012. A partir

del mismo, la totalidad de los establecimientos lecheros (tambos), cabañas de producción de leche y carne del país ya sea de bovinos, de caprinos y de ovinos de cabañas y leche, deben ingresar obligatoriamente al Plan Nacional de Control y Erradicación de la Tuberculosis Bovina.

Para el resto del sistema productivo (cría, invernada y engorde) se deben establecer programas regionales, que se inician de acuerdo con las características de las zonas y explotaciones a sanear, basados en un diagnóstico de situación inicial que se obtiene por medio de la información que nos provee el sistema de vigilancia epidemiológica en faena de los frigoríficos con inspección federal y provincial, procediendo a la caracterización de la situación sanitaria de la TBB en las distintas regiones del país. Los tipos de Programas Regionales que se pueden establecer, están de acuerdo a la prevalencia de la enfermedad a nivel de establecimientos.

Actualmente es obligatorio implementar el Sistema de Vigilancia Epidemiológica en faena, tomando como base los nuevos procedimientos de actualización electrónica de la información que la Dirección de Tecnología de la Información, dependiente de la Dirección Nacional Técnica y Administrativa implementa en forma paulatina en los frigoríficos que interactúan con este organismo, según Resolución N° 87/09 del SENASA. El objetivo del registro informático del SENASA es conocer en qué situaciones epidemiológicas se encuentran los rodeos y la trazabilidad de los mismos para poder realizar la caracterización epidemiológica de la TBB a nivel país, realizando un análisis geográfico de la distribución de la enfermedad y su posterior regionalización. Si bien el sistema viene implementándose paulatinamente desde el año 2009, recién a finales de 2011 estuvo esta información totalmente disponible en los

frigoríficos habilitados y en las oficinas de SENASA de la provincia de Córdoba (SENASA, 2012).

El registro tanto de los animales y establecimientos afectados como no afectados permitiría conocer en qué situaciones epidemiológicas se encuentran los rodeos, determinar las estrategias regionales aplicables a la certificación de áreas libres y efectuar el análisis permanente de la sensibilidad y especificidad de las pruebas tuberculínicas en uso y de las demás técnicas diagnósticas en estudio.

La República Argentina lleva un registro actualizado de los establecimientos ganaderos: el Registro Nacional Sanitario de Productores Agropecuarios (RENSPA), que es de inscripción obligatoria. La trazabilidad es posible gracias a un sistema de identificación individual de los animales: caravana, tatuaje, *chip* u otros, que sirven también para garantizar la procedencia y calidad del producto cárnico, la leche o subproductos de un animal. La trazabilidad permite identificar el rodeo de procedencia y en caso de detectarse durante la inspección algún animal afectado de TBC, ejercer las acciones adecuadas para mejorar la situación sanitaria.

En lo que se refiere al diagnóstico *post mortem* de la enfermedad, el actual plan contempla que los servicios de laboratorios de referencia de la red autorizados deben poseer la capacidad de diagnóstico histopatológico y/o bacteriológico y/o eventualmente de biología molecular cuando se necesite la confirmación del resultado de las pruebas tuberculínicas de campo, de muestras de material tomado en necropsias o de lesiones sospechosas y/o compatibles de tuberculosis en el frigorífico. Dichas lesiones pueden deberse a *M. bovis* u otras micobacterias, y provenir de ganglios de un animal reaccionante o de muestras de monitoreo de zonas en control.

Diagnóstico

El diagnóstico de la TBB *in vivo* se realiza por la IDR que utiliza como antígeno al derivado proteico purificado (DPP) obtenido a partir de la cepa de referencia *M. bovis* AN₅. Ésta es la única técnica aprobada para la detección de la enfermedad y la comercialización de bovinos en Argentina y en la mayoría de los países (OIE Terrestrial Manual, 2012; SENASA, 2012). Estudios sobre esta técnica han demostrado una sensibilidad que varía del 68 al 95% mientras que la especificidad alcanza el 96-99% (Monaghan y col., 1994; De la Rúa-Domenech y col., 2006).

No existe actualmente ninguna prueba tuberculínica absolutamente sensible, capaz de detectar el 100% de los animales infectados; habiendo un cierto porcentaje de “falsos negativos”. Tampoco existe la prueba absolutamente específica; todas las micobacterias poseen ciertos antígenos comunes y los animales sensibilizados por el complejo *M. avium*, o por una variedad muy grande de MNT, pueden dar también reacción positiva a la IDR; ellos son los denominados “reactores falsos positivos” (Torres, 2013).

Otra técnica que mide la respuesta celular pero *in vitro*, es el dosaje de IFN γ luego de la exposición de la sangre a distintos antígenos, sin embargo esta técnica no ha sido aprobada en Argentina (Jorge y col., 2005; de la Rúa-Domenech y col., 2006). Estimaciones de la sensibilidad del test varían del 73 al 100% con una media de 87,6% y una especificidad de 85-99,6% con una media de 96,6% (De la Rúa-Domenech y col., 2006). Estudios llevados a cabo en Australia demostraron mayor sensibilidad de esta técnica (93,6%) comparada con la intradermorreacción (65,5%) (Wood y col., 1991). Sin embargo, en otros estudios la sensibilidad varió del 55 al 97% y la especificidad fue mayor al 97% (Gormley y col., 2006). El principal inconveniente en la aplicación de la

técnica del IFN γ está dado por cuestiones operativas, ya que el tiempo entre la toma de muestra y el procesamiento de la misma es de un máximo de 24 hs. Por otra parte el costo es mucho más elevado que el de la IDR (Buddle y col., 2009; Schiller y col., 2010).

Las pruebas de ELISA se utilizan para medir la inmunidad humoral mediante la detección de anticuerpos séricos específicos. Si bien su uso es importante en casos de enfermos crónicos donde decae la inmunidad celular (animales anérgicos por agotamiento inmunitario) diversos estudios han registrado diferencias en la sensibilidad de la técnica. Tal como lo recomiendan numerosos autores, su aplicación debe ser complementaria a las pruebas basadas en inmunidad celular con el fin de detectar aquellos animales deficientes o incapaces de generar adecuadamente este tipo de inmunidad. Magnano y col., (2013) compararon dos test serológicos obteniendo un porcentaje de sensibilidad del 27,8% para el kit comercial ELISA (*M. bovis* antibody test kit) de IDEXX (EEUU) y 19,9% para el ELISA (Ani Gen BTB Ab) de BIONOTE (Corea).

Trabajos realizados por Waters y col., (2011) comunicaron resultados similares utilizando el kit ELISA (*M. bovis* antibody test kit) de IDEXX (EEUU) en un estudio realizado en EE.UU donde obtuvieron un 30% de sensibilidad. No obstante, en otros trabajos presentados por el mismo autor sobre este kit en varios países (Gran Bretaña, Irlanda, Nueva Zelanda y EEUU), los resultados de sensibilidad fueron más altos, con valores que tuvieron un promedio del 63% y un rango de entre 30% y 96,7% sobre un total de 478 animales infectados. Por otro lado, Casal y col., (2012) utilizando el ELISA

(*M. bovis* antibody test kit) de IDEXX (EEUU) obtuvieron una sensibilidad de entre 59,3% y 66,7% en tres rodeos infectados con tuberculosis.

En el proceso de Registro del Kit diagnóstico ELISA (*M. bovis* antibody test kit) realizado por el laboratorio IDEXX (EEUU) ante la OIE, comunicaron resultados de sensibilidad del 64,6% con un Intervalo de Confianza entre 59,7% - 69,5%.

En cuanto al diagnóstico clínico en la TBB, éste es de valor limitado ya que el animal enfermo, salvo escasas excepciones, no presenta signos clínicos característicos (Jubb y col., 2007).

El diagnóstico *post mortem* de la enfermedad puede realizarse al encontrar lesiones típicas durante la necropsia o faena o por medio de la histopatología pero la confirmación definitiva depende del aislamiento de *M. bovis* (Corner, 1994).

La histopatología ha demostrado ser una técnica sencilla y rápida con la cual se pueden obtener buenos resultados. Se ha reportado una sensibilidad del 93,4% y una especificidad del 92,3% al compararla con el cultivo bacteriano (Varello y col., 2008).

El cultivo es el método bacteriológico más sensible y específico para detectar la presencia de micobacterias (Barrera, 2008). Sin embargo, se requiere de instalaciones adecuadas, personal capacitado y el diagnóstico se obtiene en un tiempo más prolongado.

En los últimos años la biología molecular ha contribuido a la detección y tipificación molecular del CMT, principalmente *M. tuberculosis* y *M. bovis*, por su potencial uso en estudios diagnósticos y epidemiológicos de la enfermedad. El método de identificación por excelencia es la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) (Collins y col., 1994; López y col., 2003; Chavez y col., 2004; Morales y col., 2005).

Esta técnica tiene la ventaja de no requerir de la viabilidad del bacilo y de ser aplicada a distintas muestras clínicas.

Recientemente se ha desarrollado una estrategia para la detección de rodeos lecheros infectados con *M. bovis* mediante el análisis por PCR de la leche del tanque del tambo (Zumárraga y col., 2012). El Ministerio de la Producción de la Provincia de Santa Fe ha resuelto aprobar e implementar este método para complementar y apoyar a la vigilancia epidemiológica de establecimientos lecheros (anexo de la resolución 949/12) según el Plan Regional de Control y Erradicación de la tuberculosis bovina, bubalina, ovina y porcina de la provincia de Santa Fe.

Técnicas de tipificación molecular

La técnica que fue considerada de referencia para la tipificación molecular de *M. tuberculosis* fue el Polimorfismo en Longitud de los Fragmentos de Restricción (RFLPs, *Restriction Fragment Length Polymorphism*), utilizando como sonda a la secuencia de inserción IS6110 (van Soolingen, 1994). Sin embargo, la utilidad de esta técnica es menor en aquellas cepas que en su genoma poseen una o muy pocas copias de IS6110, como los aislamientos de *M. bovis* (Kamerbeek y col., 1997). Debido a la necesidad de suplir las dificultades principales del RFLP, se desarrollaron otros métodos de tipificación basados en la PCR. Dentro de ellos se destacan las Repeticiones en Tándem de Número Variable (VNTRs, *Variable Number of Tandem Repeat*) y el spoligotyping que permiten la diferenciación del complejo *M. tuberculosis* tanto interespecie como intraespecie (Barnes y Cave, 2003; Supply y col., 2006).

Los VNTRs, constituyen fragmentos de ADN repetitivos dispuestos en tándem. La utilización de estas secuencias en estudios de tipificación molecular se basa en la

variabilidad en el número de las unidades repetitivas, siendo los eventos combinatorios del ADN una de las causas de su variabilidad. Cada locus VNTR, representa una porción diferente del genoma independiente entre sí, proporcionando múltiples caracteres independientes, de utilidad tanto en investigaciones epidemiológicas como en análisis filogenéticos (Supply y col., 2006). El polimorfismo entre las diferentes cepas se evidencia por la diferencia en el tamaño del fragmento analizado, el cual es inherente al número de unidades repetitivas por loci. Existen distintos tipos de VNTR, entre éstos las Unidades Intercaladas Repetitivas en Micobacterias (MIRUs, *mycobacterial interspersed repetitive units*) (Supply y col., 2006) y los ETRs (Exact Tandem Repeats) QUBs (Queen University of Belfast) (Frothingham y col., 1998; Kremer y col., 2005).

El spoligotyping es una técnica de hibridación reversa cuyo principio se basa en la detección del polimorfismo de una región específica del genoma de las micobacterias que forman parte del complejo *M. tuberculosis*, llamada región de las repeticiones directas (DR) (Kamerbeek y col., 1997). La misma está constituida por secuencias repetitivas directas, múltiples y bien conservadas de 36 pares de bases, entre las que se hallan intercaladas secuencias únicas con un alto grado de polimorfismo denominadas espaciadores. La presencia o ausencia de espaciadores de secuencia conocida, definen patrones de hibridación o spoligotipos (Dale y col., 2001; Barnes y Cave, 2003).

➤ **Estudios de Tipificación por spoligotyping**

En Argentina, sobre 816 aislamientos de bovinos tipificados mediante spoligotyping en el Instituto de Biotecnología de INTA Castelar, se obtuvieron 79 spoligotipos diferentes (Zumárraga y col., 2013). El genotipo SB0140 predomina ampliamente, agrupando al 45% de los aislamientos estudiados. Este hecho es altamente

significativo y diversos autores coinciden en que podría estar asociado a que el SB0140 y/o su antecesor ha sido introducido en el país más antiguamente y por lo tanto se ha transmitido entre los bovinos por un tiempo más prolongado (Fisanotti y col., 1998; Cataldi y col., 2002; Smith y col., 2011; Shimizu y col.; 2014). Este patrón, también es el más frecuente en Reino Unido y en los países con los cuales éste mantuvo estrechas relaciones comerciales a principios del siglo pasado, como Irlanda, Nueva Zelanda y Australia, además de Argentina (Cataldi y col., 2002). Esto explicaría la presencia mayoritaria de este genotipo en nuestro país. Sumado a esto, recientemente ha sido demostrado que las Américas, con excepción de Brasil, son dominadas por el complejo clonal Eu1. Este complejo, está marcado por la delección de la región cromosomal RDEu1 asociada a la pérdida del espaciador 11 en el spoligotipo. El patrón de spoligotipo más común asociado a este complejo clonal fue el SB0140. El spoligotipo SB0130 representa el spoligotipo de la cepa progenitora de este complejo clonal. Posiblemente, el antecesor más común del complejo clonal Eu1 tenía la delección de la región RDEu1 pero presente el espaciador 11. La pérdida de este espaciador pudo haber aparecido después convirtiéndose en el mayor sub clon del complejo clonal Eu1. Este complejo clonal se encontró en el 99% de las cepas de *M. bovis* aisladas de ganado vacuno de la República de Irlanda y el Reino Unido. También se encontró con elevada frecuencia en sus antiguos socios comerciales, Estados Unidos, Nueva Zelanda, Australia y Canadá. Fue infrecuente en otros países del continente europeo, con excepción de Francia, Portugal y España, y en Irán. También fue infrecuente o ausente en países de Sudáfrica. En ese trabajo se realizó la primera identificación de un complejo clonal de *M. bovis* diseminado a nivel global e indica que gran parte de la

distribución actual del mismo ha resultado del comercio internacional relativamente reciente de ganado bovino (Smith y col., 2011).

En nuestro país, en un estudio realizado en el noreste, se tipificaron 211 cepas de *M. bovis* obtenidas de cultivos de LCT en bovinos mediante la técnica de spoligotyping. Los animales provenían de las provincias de Chaco (n=116), Corrientes (n=57), Misiones (n=7), Formosa (n=9), norte de Santa Fe (n=19) y Entre Ríos (n=3). Veinte diferentes spoligotipos fueron identificados. Los mayoritarios fueron el SB0140 y el SB0130 observados en 115 y en 40 aislamientos respectivamente (Cicuta y col., 2001).

Entre los años 2008 y 2010, Zumárraga y col., (2010) analizaron 209 aislamientos de *M. bovis* obtenidos a partir de LCT halladas durante la inspección de bovinos en frigoríficos de las provincias de Buenos Aires, Córdoba y Santa Fe. Los aislamientos obtenidos fueron confirmados como *M. bovis* mediante cultivo y PCR, utilizando como blanco a la secuencia de inserción IS6110 y spoligotyping. Se obtuvieron un total de 28 spoligotipos diferentes: 16 (94%) agrupados y 12 (6%) exclusivos, o sea, descriptos por primera vez (3 agrupados y 9 con un único aislamiento). El spoligotipo predominante fue el SB0140 que agrupó al 45% (n=93) de los aislamientos estudiados. En orden de frecuencia le siguió el SB0120. Las provincias en las que se observaron los mayores agrupamientos fueron Córdoba y Santa Fe, con 93% y 91% de los aislamientos respectivamente, a diferencia de Buenos Aires que agrupó al 84% de los mismos. Por otra parte seis (21%) spoligotipos fueron previamente encontrados en humanos.

La diversidad genética de cepas obtenidas en nuestro país, indica que la variación en la frecuencia de detección de cada spoligotipo podría estar correlacionada con la

existencia de genotipos más virulentos que otros (Aguilar y col., 2009; Macías y col., 2010; Zumárraga y col., 2010).

Diversidad genética de cepas de *Mycobacterium*

A partir del desarrollo de la biología molecular y el estudio de las diferentes cepas de micobacterias involucradas en la tuberculosis tanto humana como animal, diversos trabajos han demostrado que el curso de la infección y sus consecuencias epidemiológicas dependen en gran parte de la diversidad genética de las cepas actuantes (Collins y col., 1994; Dunn y col., 1995; Meikle y col., 2007; Aguilar y col., 2009; Meikle y col., 2011). Diferentes aislamientos poseen dispar grado de virulencia cuando son inoculados en células, en animales de laboratorio o a través de observaciones clínicas en sus hospedadores principales (López y col., 2003; Manabe y col., 2003).

En el caso de las cepas de *M. tuberculosis* se destaca como la más virulenta la variedad Beijing, denominada así porque el 80-90% de los casos de TB encontrados en esta ciudad estaban producidos por la misma cepa. Estas cepas altamente virulentas matan más rápidamente al cobayo, tienen una mayor capacidad de desarrollar la enfermedad en los infectados y de producir recaídas en los enfermos ya curados, además de una mayor probabilidad de seleccionar mutantes resistentes ante fallas en el tratamiento (Hesseling y col., 2010).

La familia de cepas Beijing ha demostrado ser más virulenta que cepas de la familia Canetti en un modelo murino y se asocian a cuadros clínicos en pacientes jóvenes, con una infección reciente y una transmisión activa lo cual indica su importancia en el diagnóstico y en la epidemiología de la enfermedad en los países en donde predomina esta variedad genética (López y col., 2003).

A diferencia de lo que ocurre con *M. tuberculosis*, de *M. bovis* poco se conoce acerca de la relación entre el genotipo aislado y las características de las lesiones que provoca o la virulencia de diferentes cepas.

En un estudio realizado en modelo murino, se comparó la virulencia de dos cepas de *M. bovis* y tres cepas de *M. tuberculosis* de acuerdo con su capacidad de multiplicarse en pulmones, inducir patología pulmonar y causar mortalidad. Se demostró que *M. bovis* Ravenel fue el genotipo más virulento, seguido de *M. bovis* Branch, *M. tuberculosis* H37Rv, *M. tuberculosis* Erdman y *M. tuberculosis* NYM-27 (Dunn y col., 1995).

Aguilar y col., (2009) seleccionaron cinco cepas de *M. bovis* con diferentes genotipos aisladas en Argentina de diferentes hospedadores (humanos, bovinos y jabalíes). Determinaron la virulencia y la inmunopatología en un modelo murino de infección pulmonar progresiva concluyendo que existe diferencia en ambas variables estudiadas de acuerdo a la cepa actuante al considerar la menor sobrevivencia de los ratones inoculados y el mayor número de bacterias recuperadas de bazo y de los pulmones de cada uno. Esto, podría atribuirse a la variabilidad genética de las cepas y a la inducción de diferentes patrones de respuesta inmune.

En bovinos, en nuestro país, algunos autores han estudiado las características diferenciales de la enfermedad de acuerdo a la cepa actuante. Meikle y col., (2007) llevaron a cabo un estudio sobre 14 bovinos IDR positivos. A cada animal se le realizaron 3 test diagnósticos *ante mortem*: IFN γ a partir de sangre entera, PCR y cultivo bacteriológico a partir de hisopados nasales. *Post mortem* se realizó la inspección de los animales, encontrando lesiones macro y microscópicas y cultivo

bacteriológico positivo en todos ellos. Los aislamientos obtenidos mostraron todos el mismo patrón de spoligotyping. Los resultados indicaron que animales infectados con el mismo spoligotipo mostraron variaciones significativas en los parámetros bacteriológicos, histopatológicos e inmunológicos.

En otro estudio se inocularon por vía intratraqueal 4 bovinos de tres meses de edad con una cepa de *M. bovis* aislada a partir de un jabalí y 4 bovinos con la cepa bovina control NCTC10772. Se tomaron muestras seriadas de sangre entera e hisopados nasales para realizar el test de IFN γ y cultivo bacteriológico respectivamente. También se realizó la IDR a todos los animales. Finalmente se procedió a la necropsia y análisis de las lesiones observadas. La respuesta más temprana al test de IFN γ en los animales inoculados con la cepa de jabalí, sumado a una respuesta mucho más fuerte en la IDR y a lesiones más severas en los animales necropsiados, demostraron que esta resultó más virulenta que la cepa control NCTC10772 aislada a partir del bovino, su hospedador natural (Meikle y col., 2011).

Recientemente fue secuenciado el genoma de esta cepa que resultó de mayor virulencia en los distintos modelos de infección utilizados, para explicar las bases genéticas de su comportamiento (Nishibe y col., 2013).

Sobre la base de los antecedentes de TB antes citados, en el presente trabajo se inspeccionaron animales en faena y se tomaron los datos necesarios y muestras de los que presentaban LCT para su posterior estudio.

Se analizó, por un lado la diversidad genética de aislamientos en nuestra provincia y su relación con las características macroscópicas que podrían indicar diferencias en la virulencia de las diferentes cepas. Por otro lado, se identificaron los establecimientos de

origen de los animales muestreados para realizar un primer análisis geográfico y epidemiológico de las cepas en estudio en nuestra provincia.

La finalidad del presente trabajo se centra en obtener una experiencia práctica en la región mediante un registro y procesamiento de información de la TBB detectada por medio de la faena, abarcando un área extensa e importante en cuanto a la actividad ganadera. Esto permitirá una evaluación y confirmación continua de la enfermedad, brindando una experiencia certera para aplicar a futuro en toda la provincia contribuyendo con las acciones propuestas por el Plan Nacional de Control y erradicación de la Tuberculosis Bovina en la República Argentina.

HIPÓTESIS

En la provincia de Córdoba, Argentina, existen distintos genotipos de *M. bovis* que provocan lesiones macroscópicas de diferente grado en bovinos. El predominio del genotipo actuante depende del origen geográfico de los animales.

OBJETIVO GENERAL

Clasificar los diferentes genotipos de *M. bovis* hallados en bovinos faenados en la provincia de Córdoba, Argentina, relacionarlos con las características macroscópicas de las lesiones y analizar su distribución espacial.

OBJETIVOS PARTICULARES

- 1- Desarrollar un sistema de registro para recolectar la información que genera el frigorífico con el fin de analizar, interpretar y evaluar los datos de origen de los animales y de tipo y distribución de lesiones obtenidas en la inspección.
- 2- Confirmar, mediante diagnóstico bacteriológico e histopatológico, la etiología de las LCT detectadas por los Servicios de Inspección Veterinaria.
- 3- Identificar y tipificar molecularmente los aislamientos obtenidos mediante la técnica de Spoligotyping.
- 4- Relacionar los aislamientos de *M. bovis* genotipificados, con la ubicación anatómica de las lesiones y con las características macroscópicas de las mismas.
- 5- Estudiar si existen diferencias en la virulencia de diferentes cepas de *M. bovis*.
- 6- Georreferenciar los diferentes genotipos de *M. bovis* hallados en la provincia de Córdoba, Argentina.

MATERIALES Y MÉTODOS

Elaboración de la planilla de datos

En una primera etapa del trabajo se confeccionó una planilla de datos para ser utilizada en el muestreo de cada bovino con LCT detectadas en frigorífico y poder sistematizar y analizar la información obtenida. En la misma se tuvo en cuenta el RENSPA, la categoría de animal y la ubicación y características de las LCT halladas en cada bovino como se describe a continuación.

Para poder asociar los hallazgos patológicos con los diferentes spoligotipos, fue necesario diseñar un sistema objetivo de cuantificación de la magnitud de la TB teniendo en cuenta las características macroscópicas de las lesiones observadas. Se relevaron las características macroscópicas que se consideran de mayor importancia en cada una de las LCT observadas (Corner, 1994; Vordermeier y col., 2002; Menin y col., 2013). Cada característica fue identificada con un número que permitió establecer cuantitativamente el grado de avance de la enfermedad en el animal. A partir de ello se generó una nueva variable, el *score* total de cada animal, el cual se calculó sobre la base de la sumatoria del *score* individual de cada una de las LCT observadas. Para la elaboración del *score* total se tuvo en cuenta el tamaño, presentación (que incluye el número y distribución) y características de las lesiones (halo rojo, cápsula y calcificación). Todos los órganos afectados de cada animal fueron considerados en el *score* total. La planilla de datos utilizada se diseñó sobre la base de diversos estudios previos realizados por diferentes autores (Vordermeier y col., 2002; Palmer y col., 2007; Buddle y col., 2008; Menin y col., 2013). En el análisis realizado y de acuerdo a la cuantificación de las lesiones, a mayor *score* se infiere una mayor virulencia de la

cepa actuante debido a que esos animales son los que presentan mayor cantidad de lesiones, de mayor tamaño, con ausencia de cápsula limitando la diseminación del bacilo, con halo rojo inflamatorio y ausencia de calcificación y distribuidas en más órganos.

Mediante esta metodología se pudo por un lado analizar en forma general las características y distribución de las lesiones y por otro, cuantificar el avance de la enfermedad mediante un *score* de virulencia para posteriormente relacionarlo con el spoligotipo actuante.

Se detalla a continuación el esquema de los datos relevados en este estudio.

Cuadro 1: planilla de relevamiento de datos diseñada para obtener la localización de los establecimientos, categoría de animal y cuantificación de las LCT.

Fecha	N° Tropa		RENSPA				
			Categoría	VC	VQ	TO	NO
ANÁLISIS MACROSCÓPICO EN PLAYA DE FAENA							
	Halo rojo periférico	Cápsula	Calcificación	Presentación	Tamaño	<i>Score</i>	
GL Retrofaríngeos (R)							
GL Bronquiales (B)							
GL Mediastínicos (Md)							
GL Mesentéricos (Ms)							
GL Ileocecal (IC)							
Bazo							
Hígado							
Intestino							
Pulmón							
Pleura							
Otros							
Score total							
SCORE							
	0	1	2	3	4		
Halo Rojo	Ausente	Presente	//	//	//		
Cápsula	Presente	Ausente	//	//	//		
Calcificación	Presente	Ausente	//	//	//		
Presentación	//	Focal (1 granuloma)	Multifocal (más de 1)	//	//		
Tamaño	//	<0,5 cm diám.	0.5 – 1 cm	1 – 5 cm	+ 5 cm		

Descripción de los datos incluidos en la planilla

• **Fecha y número de tropa:** ambos datos se tomaron para control interno del frigorífico.

• **Número de RENSPA:** es el número que se le otorga a cada productor cuando realiza la inscripción obligatoria ante el SENASA para realizar cualquier actividad agropecuaria en la República Argentina. A través de este código, se asocia al productor agropecuario con el campo donde realiza su actividad. Cuenta con datos del establecimiento, del productor y de la actividad/es que desarrolla. Mediante el mismo, es posible también, acceder a la georreferenciación. El acceso a esta información es restringido al personal autorizado del SENASA.

A partir de este número se obtuvo la procedencia de los animales faenados en estudio.

• **Categoría de animal:** los animales en pie para faena se categorizaron por sexo y peso, el cual está relacionado con la edad. De estas variables surge la clasificación en vaquillona (VQ), vaca (VC), ternero (TE), novillito (NT), novillo (NO) y toro (TO). Se describe a continuación (cuadro 2) la categorización de los animales muestreados.

Cuadro 2: Categorización de los animales muestreados para el estudio según el sexo y peso de los mismos.

CATEGORIA	PESO VIVO
Vaca (VC)	A partir de los 421 kg
Vaquillona (VQ)	De 300 a 420 kg
Novillo (NO)	A partir de los 431 kg
Novillito (NT)	De 300 a 430 kg
Ternero (TE)	Hasta 300 kg
Toro (TO)	

• **Análisis macroscópico en la playa de faena:** en cada animal con LCT se inspeccionó y registró la presencia o ausencia de halo rojo periférico, de cápsula y de calcificación; la presentación (focal, 1 granuloma; multifocal más de 1 granuloma) y el tamaño de la lesión (<0,5 cm, 0,5-1 cm, 1-5 cm, >5 cm). Esto fue realizado para cada sitio anatómico de asiento de las lesiones en el animal. Posteriormente las LCT se agruparon según los diferentes sistemas, a saber:

- ***Sistema respiratorio:*** cuando las LCT se ubicaron en pulmón y/o pleura, y/o ganglios linfáticos bronquiales y/o mediastínicos.
- ***Sistema digestivo:*** las encontradas en hígado y/o intestino y/o ganglios linfáticos mesentéricos y/o ganglio linfático ileocecal y/o ganglio linfático gastrohepático.
- ***Ganglios linfáticos retrofaríngeos:*** se los consideraron como una categoría única en los animales que sólo presentaron lesiones en esa ubicación, ya que estos comparten porciones anatómicas con la faringe y la laringe haciendo inadecuada su inclusión en sistema digestivo o respiratorio. Cuando el animal presentaba lesiones en ganglios linfáticos retrofaríngeos y

además en sistema respiratorio, se los consideraron dentro del sistema respiratorio.

- **Generalizada:** cuando se encontraron LCT en más de un sistema en estudio.
- **Otras ubicaciones:** cuando las LCT se presentaron en lugares no contemplados anteriormente como ganglios linfáticos retromamarios, de la carcasa, etc.

Toma de muestras en frigorífico

El muestreo se realizó en un frigorífico de tránsito federal ubicado en la localidad de General Deheza, departamento Juárez Celman, provincia de Córdoba, Argentina, entre los años 2009 y 2011. En el mismo se faenan para consumo interno, bovinos provenientes de aproximadamente 600 establecimientos ubicados en la zona centro, sur y este de la provincia de Córdoba. En el año 2009 se faenaron un promedio de 2.900 animales por mes, con un porcentaje de decomisos por TBB de 0,47%. En el año 2010 el promedio de faena mensual fue de 2.265 bovinos y el porcentaje de decomisos por TBB alcanzó el 0,7%. En el año 2011 la tasa de faena disminuyó y el promedio mensual fue de 1.900 animales con un 0,28% de decomisos por LCT.

Se realizó un muestreo no probabilístico por conveniencia, en el que la elección de la muestra quedó en manos del personal del SENASA perteneciente al frigorífico y del investigador.

Una vez identificado el animal con LCT, se procedió a la clasificación de las características encontradas tal como se detalló anteriormente y a la toma de muestra de tejidos afectados. Si bien para la observación de lesiones macroscópicas la necropsia es

más sensible que la inspección durante la faena, la factibilidad económica hace que esta última sea una buena metodología para el estudio de un gran número de animales (Corner, 1994).

Se recolectaron en total 332 muestras de tejidos pertenecientes a 150 bovinos con LCT. Se utilizaron finalmente para el estudio 311 muestras pertenecientes a 134 bovinos en los que se confirmó la presencia de micobacterias en las LCT.

Para bacteriología, se recolectaron muestras de los diferentes órganos y tejidos afectados, las cuales se colocaron en frascos estériles y se conservaron refrigeradas hasta su traslado al laboratorio de Patología Animal de la Universidad Nacional de Río Cuarto (UNRC), donde se conservaron a -20°C hasta su procesamiento. Cuando el animal tenía LCT en un solo sitio anatómico se tomó una muestra del lugar mientras que, ante la presencia de LCT en más de un sitio anatómico se recolectaron hasta 3 muestras de diferentes órganos. Por otra parte, cuando en la misma tropa se presentaban varios animales con LCT, se tomaron muestras individuales de hasta cuatro animales.

Para histopatología se colocaron en frascos conteniendo formaldehído al 10%. Se respetó un tamaño de 1 cm x 1cm comprendiendo tejido lesionado y sano y una relación muestra formol de 1:10, cuidando que el trozo de tejido quedara totalmente sumergido. En este caso, se recolectó una muestra por cada animal afectado.

Todos los recipientes fueron identificados y transportados a la UNRC con la correspondiente planilla de datos, manteniendo la confidencialidad de la información del frigorífico y de los establecimientos a los que pertenecían los bovinos con LCT. Para esto, cada muestra simplemente fue identificada con un número correlativo con el que se trabajó durante todo el estudio.

En la Figura 2 se presenta el proceso de inspección en búsqueda de LCT, la toma de muestra de estas lesiones y la preparación de los recipientes con su respectiva planilla para ser remitidos al laboratorio.



Figura 2: secuencia de las actividades realizadas en el frigorífico.

A: momento de la inspección de vísceras, B: LCT en pleura parietal, C: toma de muestras para bacteriología, D: acondicionamiento de los recipientes y planillas.

Cultivo de micobacterias

Las muestras fueron procesadas siguiendo las indicaciones de bioseguridad necesarias para este tipo de material recomendadas por la OMS en el Manual de bioseguridad en el laboratorio de Tuberculosis (OMS, 2013). Todos los procedimientos abajo detallados se realizaron en gabinete de seguridad biológica clase II A en el laboratorio de bacteriología del Departamento de Patología Animal de la Facultad de Agronomía y Veterinaria, UNRC.

1. **Selección del material para la siembra:** cuando se contaba con varias muestras de un mismo animal se realizó un *pool* de siembra procesándolas todas juntas.

El material inicialmente se disecó en un mortero de porcelana estéril. Se le agregó cantidad suficiente de arena previamente lavada y esterilizada y se homogeneizó con un pilón hasta obtener una pasta. Posteriormente, se adicionaron aproximadamente 10 mL de agua destilada estéril para formar una suspensión de la que se trasvasaron 5 mL a un tubo cónico plástico estéril de 15 mL de capacidad para su descontaminación.

2. **Descontaminación por el Método de Petroff modificado:** el mismo consiste en mezclar la muestra contenida en el tubo cónico con una solución estéril de NaOH al 4% en una proporción de 1:2. Se utilizaron 5 mL de la suspensión de cada muestra y 10 mL de NaOH. La mezcla se agitó vigorosamente para la correcta penetración del decontaminante y se llevó a estufa a 37°C durante 20 minutos. Transcurrido dicho tiempo, se retiró de la estufa y se llevó a centrifuga durante 10 minutos a 2.000-3.000 rpm. Finalizado este proceso se descartó el sobrenadante. Al sedimento se le adicionaron unas gotas de rojo fenol como indicador de pH y cantidad necesaria de solución de ácido sulfúrico al 10% para neutralizar (viraje del indicador de

rojo a amarillo). Posteriormente se adicionaron 3 mL de agua destilada estéril con el fin de eliminar restos de ácido; nuevamente se centrifugó durante 10 minutos a 2.000-3.000 rpm y finalmente se descartó el sobrenadante.

3. **Siembra en los medios de cultivo:** al *pellet* obtenido se le agregó nuevamente 1 mL de agua destilada estéril y se agitó vigorosamente para homogeneizar el material a sembrar. Se inocularon 0,2 mL en dos tubos con medio de cultivo ST y 0,2 mL en otros dos con medio de LJ. Los medios de cultivo que se utilizaron para la siembra fueron los clásicos a base de huevo desarrollados para el crecimiento de micobacterias. Los mismos fueron preparados en los laboratorios de la UNRC siguiendo las indicaciones del Manual de Instrucciones para el procesamiento y cultivo de muestras para la identificación de *M. tuberculosis* y *M. bovis* del SENASA y la Dirección de Diagnóstico y Control Técnico (Kantor y Bernardelli, 1986) (Anexo ítem 1.1 y 1.2 pág. 80-81). Previo a la siembra los medios de cultivo fueron sometidos a controles de esterilidad y de calidad.

4. **Cultivo de las micobacterias:** una vez realizada la siembra del material en los medios descriptos, se incubaron durante 60 días en estufa a 37°C examinándolos a intervalos de siete días en busca de crecimiento macroscópico. Cuando fueron visibles colonias bacterianas (Figura 3) se prepararon extendidos y se tiñeron mediante la coloración de Z-N para la observación de bacilos ácido alcohol resistentes (BAAR). Éstos se evidencian como bastones delgados y rojos, ligeramente curvos, más o menos granulados, aislados, apareados o en grupos, destacándose sobre el fondo azul (Figura 4).

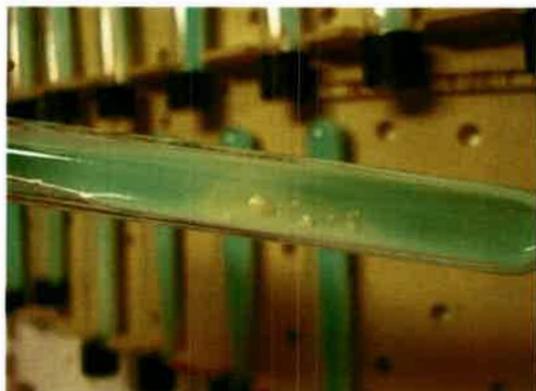


Figura 3: múltiples colonias de *M. bovis* en medio de ST.



Figura 4: BAAR en tinción de ZN.

Tipificación molecular por spoligotyping

Una vez confirmada la presencia de BAAR en las colonias bacterianas aisladas, las mismas fueron tipificadas por la técnica de hibridación reversa de spoligotyping en el Instituto de Biotecnología, CICVyA, INTA, Castelar, según el protocolo descrito por Kamerbeek y col., (1997).

En una primera etapa se realizó la extracción del ADN a partir del cultivo por lisis rápida de micobacterias por calor. Para esto se resuspendió una ansada de micobacterias en 200uL de agua destilada estéril y se incubó a 100°C en bloque seco durante 40 minutos. Además de lograrse la lisis del bacilo se consigue inactivarlo para una manipulación segura de la muestra. Una vez obtenido el ADN micobacteriano se comenzó la tipificación molecular por spoligotyping.

La técnica de spoligotyping se realizó en tres pasos. Para comenzar, la región DR se amplificó por PCR, utilizando uno de los oligonucleótidos iniciadores biotilado. Luego, los productos amplificados se hibridaron transversalmente a los oligonucleótidos espaciadores que se encuentran fijados covalentemente en la membrana de nylon y dispuestos paralelamente entre sí (Ocimum Biosolutions, India, Ltd.). Finalmente, se

detectó la hibridación por quimioluminiscencia y se reveló por autorradiografía. La ausencia de los espaciadores 3, 9, 16 y 39 a 43 definen al patrón característico de *M. bovis*. Se detallan a continuación cada uno de los procedimientos realizados.

➤ **Amplificación:** se llevó a cabo en un volumen final de reacción de 50uL conteniendo Buffer (Tris-HCl 10mM, pH 9,0; KCl 50mM y Tritón X-100 al 0,1%), 2mM de MgCl₂, 0,2mM de cada dNTP, 1,25U de Taq Polimerasa (GoTaqR, Promega Corp., USA), 20 pmoles de los siguientes oligonucleótidos iniciadores DRa GGTTTTGGGTCTGACGAC, biotinilado en el extremo 5' y DRb CCGAGAGGGGACGGAAAC y 5uL de templado. Para la reacción se utilizó un termociclador modelo PTC-100 (Programmable Thermal Controller, M.J. Research, Inc., USA), con el siguiente programa: desnaturalización inicial a 96°C durante 3min, seguido de 30 ciclos de 96°C 1min, 55°C 1min y 72°C 30seg, con una extensión final de 72°C durante 8 min. Como controles se emplearon ADN de las cepas de referencia *M. tuberculosis* H37Rv y *M. bovis* BCG. Como templado se utilizaron 5uL del sobrenadante de los lisados de bacterias por calor.

➤ **Hibridación de los productos de PCR:** la membrana filtro se lavó a 60°C en buffer SSPE 2x/SDS 0,1% con agitación. Posteriormente se la colocó en el *miniblotter* sobre una almohadilla sintética, con los oligonucleótidos ubicados en sentido transversal a la siembra de los productos amplificados. Se diluyeron los productos de PCR con SSPE 2x/SDS 0,1%, se desnaturalizaron por calentamiento a 100°C durante 10min y se colocaron inmediatamente en hielo, se llenaron las ranuras del *miniblotter* y se incubaron a 60°C en horno durante 1 hora sin agitación. Culminada la incubación, se removió la membrana del *miniblotter* y se realizaron

dos lavados con SSPE2x /SDS 0,5% a 60°C con agitación. Luego la membrana se incubó con estreptavidina-peroxidasa (1:4000) en SSPE 2x/SDS 0,5% durante 40-60 min a 42°C con rotación constante. Seguidamente, se realizaron dos lavados con SSPE 2x/ SDS 0,5% a 42°C con agitación, y luego dos más con SSPE 2x, a temperatura ambiente con agitación.

➤ **Detección de la hibridación:** finalmente, la membrana se reveló por incubación con el reactivo de quimioluminiscencia (Pierce ECL, Western Blotting, Substrate, Rockford, USA), se expuso a un film sensible (Amersham Hyperfilm, ECL, General Electric, United Kingdom) durante 5-15min y se reveló con revelador y fijador Kodak BGX (Kodak, USA). La membrana puede volver a utilizarse previa remoción de los productos de PCR hibridados con SDS al 1% a 80°C y conservación en EDTA 0,5mM.

Un patrón de Spoligotyping o spoligotipo se define por la presencia o ausencia de cada uno de los 43 espaciadores y se lo designa arbitrariamente con un número. La nomenclatura utilizada para su identificación fue la utilizada por el *Veterinary Laboratory Agency* (VLA) Reino Unido (www.mbovis.org).

Los spoligotipos se clasificaron considerando los siguientes criterios:

- a) spoligotipos agrupados:** uno o más aislamientos con el mismo patrón.
- b) spoligotipos únicos:** aquellos que fueron detectados en un solo aislamiento durante este estudio pero que han sido detectados previamente.
- c) spoligotipos exclusivos:** aquellos encontrados en uno o más aislamientos pero que no fueron detectados previamente en otros estudios realizados en Argentina ni están descriptos en la base de datos internacional www.mbovis.org.

Procesamiento de las muestras para histopatología

El diagnóstico histopatológico se realizó como complemento y apoyo al diagnóstico bacteriológico. Si bien el cultivo y aislamiento de micobacterias es considerado la prueba de oro, la histopatología pasa a ser una herramienta diagnóstica útil y complementaria a la prueba de oro. La misma requiere de un tiempo diagnóstico mucho menor y la infraestructura necesaria para llevarla a cabo es sencilla. Diversos estudios indican una alta concordancia en los resultados entre ambas técnicas (Chávez y col., 2004; Varelo y col., 2008) por lo que en nuestro trabajo si bien se analizaron sólo las muestras con cultivo positivo, se compararon los resultados obtenidos en ambas técnicas diagnósticas.

Las muestras contenidas en formol al 10% se sometieron, como se describe a continuación, a un proceso de deshidratación, aclaración e inclusión en parafina. Se realizaron los cortes histológicos y luego se colorearon con hematoxilina-eosina (H-E) y Z-N modificado para tejidos. Todos los reactivos a utilizar se atemperaron a 38°C. Se inició el pasaje de la muestra por 3 alcoholes puros (alcohol etílico de 96°) durante 15 minutos y luego por 2 alcoholes absolutos también con una duración de 15 min en cada recipiente. Posteriormente se colocaron en dos recipientes con xileno durante 10 min cada uno. Luego se procedió a la inclusión en parafina a 56-58°C por 3 horas para su disposición en tacos o cubos. A partir de allí se cortaron las muestras con micrótopo en un espesor de 5µm y se colocaron en un portaobjeto. Una vez obtenido el corte se continuó con el desparafinado con xileno por 5 minutos, xileno alcohol absoluto 2 minutos y alcohol etílico 80° 2 minutos.

Finalmente, se realizó el lavado con agua corriente o destilada, se secaron en estufa a 37°C durante 1 a 2 horas y se procedió a la realización de las tinciones mencionadas en el párrafo anterior y descritas en el anexo 1 ítems 2 y 3.

Se consideraron positivas aquellas muestras que a la observación microscópica presentaban lesiones de tipo granulomatosas caracterizadas por la proliferación de linfocitos, macrófagos, células epiteloideas gigantes de Langhans acompañadas o no por necrosis caseosa central y fibroplasia periférica.

ANÁLISIS DE DATOS

Georreferenciación de los aislamientos obtenidos

Para establecer la localización de los establecimientos de procedencia de los animales muestreados, se utilizó el programa Visualizador de Información Georreferenciada (VIG) del SENASA. En el mismo, a partir del número de RENSPA del productor, identificado durante la toma de muestra en frigorífico, se obtuvo la georreferenciación del establecimiento de origen de los animales y el tipo de actividad desarrollada. De acuerdo a las diferentes regiones de procedencia de los animales en estudio se realizó un mapa de distribución geográfica de los spoligotipos hallados en cada departamento de la provincia de Córdoba que se graficaron mediante la aplicación proporcionada por Google maps.

Análisis de las LCT y los patrones de spoligotipos

Se realizó un análisis descriptivo de las LCT según su distribución anatómica y sus características macroscópicas. En este último caso inicialmente se analizaron la totalidad de las lesiones y luego, se evaluaron por un lado las ubicadas en pulmón y por otro las halladas en todos los ganglios linfáticos en estudio.

Seguidamente se realizó un análisis descriptivo de la técnica bacteriológica, histopatológica y de los patrones de spoligotipos obtenidos.

Luego, se realizó un análisis exploratorio de las características macroscópicas particulares de las LCT según el spoligotipo detectado. Para visualizar la existencia de diferencias en cuanto a la virulencia de los diferentes genotipos se analizaron los *scores* según el patrón de spoligotipo utilizando el test no paramétrico Kruskal Wallis.

Para el examen de los datos, se utilizó el software estadístico **R** (www.r-projet.org).

Anexo

1-Preparación de los medios de cultivo para micobacterias

1.1 Medio Löwestein-Jensen

Fórmula

Fosfato monopotásico anhidro (K H ₂ PO ₄).....	2,4 g
Sulfato de magnesio (MgSO ₄ 7H ₂ O).....	0,24 g
Citrato de magnesio.....	0,6 g
L-asparagina.....	3,6 g
Glicerina bidestilada.....	12,0 mL
Agua destilada c.s.p.....	600,0 mL
Huevos enteros.....	1.000,0 mL
Solución de verde de malaquita al 2% recién preparada.	20,0 mL

Procedimiento

* Disolver las tres primeras sales y la asparagina en 200 mL de agua destilada.

Si es necesario calentar suavemente a baño de María.

* Pasar a un matraz de 2.000 mL de capacidad, agregar la glicerina y el resto del agua destilada hasta completar 600 mL.

* Esterilizar en autoclave durante 15 minutos a 120°C y dejar enfriar.

* Los huevos deben ser frescos, preferentemente de granja. Limpiarlos cuidadosamente con un cepillo, agua y jabón y dejarlos durante algunos minutos en remojo en un recipiente con agua jabonosa. Enjuagarlos cuidadosamente con agua corriente, colocarlos en un canastillo de alambre y limpiarlos con una gasa embebida en alcohol al 70°.

* Quebrar los huevos uno por vez en un pequeño vaso estéril observando la yema de cada uno, que debe ser firme y de forma redonda, sin aplastarse ni romperse. Colocarlos en un vaso de batidora o licuadora hasta completar un litro y mezclarlos a baja velocidad durante algunos segundos. Todo el material debe estar estéril.

* Volcar los huevos homogeneizados en el matraz que contiene la solución de sales, la asparagina y la glicerina.

* Agregar inmediatamente 20 mL de la solución acuosa de verde de malaquita al 2%.

* Mezclar bien agitando manualmente al matraz y dejar reposar para que las burbujas de aire contenidas en el medio asciendan a la superficie y se eliminen.

1.2 Medio Stonebrink

Fórmula

Fosfato monopotásico anhidro (K_2HPO_4).....	3,5 g
Fosfato disódico ($Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$).....	2,0 g
Piruvato de sodio.....	6,25 g
Agua destilada.....	500,0 mL
Huevos enteros.....	1.000,0 mL
Solución de verde de malaquita al 2% (recién preparada).....	20,0 mL

La preparación de este medio es similar al de Löwenstein Jensen; varía solamente la composición de la solución salina en la que en lugar de glicerina se incorpora piruvato de sodio. Es el recomendado para cultivar *M. bovis* tanto de muestras de origen animal como humanas.

2-Coloración de Ziehl-Neelsen a partir de frotis

1- Cubrir con fucsina fenicada, calentando el portaobjetos por debajo mediante calor indirecto hasta desprendimiento de vapores sin prolongar ese efecto. Luego dejar 3 minutos en contacto con la fucsina.

2- Enjuagar con agua destilada.

3- Decolorar con etanol 95° con 3% de ácido clorhídrico hasta que solamente quede una ligera coloración rosada (2 a 3 minutos).

4- Lavar con agua destilada.

5- Cubrir con solución de azul de metileno durante 1 minuto.

6- Lavar con agua corriente y dejar secar a temperatura ambiente.

7- Observar al microscopio bajo objetivo de inmersión.

3-Tinción de Hematoxilina-Eosina a partir del corte histológico

1- Cubrir con hematoxilina de Harris 1 minuto.

2- Lavar con agua.

3- Cubrir con eosina durante 1 minuto.

4- Los preparados se deshidratan pasándolos rápidamente por alcohol y xilol.

5- Montaje: colocar una gota de bálsamo sintético sobre el corte y encima un cubreobjetos evitando la formación de burbujas de aire. Llevar a estufa a 37°C para el secado del bálsamo.

6- Observar al microscopio.

RESULTADOS

Análisis observacional a partir de la planilla de datos

➤ Procedencia de los animales muestreados

De los 150 animales muestreados inicialmente, un total de 134 que resultaron con aislamiento bacteriológico positivo fueron incorporados al presente estudio.

El 49,25% (n=66) de los bovinos procedieron de establecimientos particulares, mientras que el 50,75% (n=68) de remates ferias. Mediante el número de RENSPA y el VIG, en el primer caso, se pudo establecer la georeferenciación de los establecimientos. En el segundo caso, en donde los animales provenían de remates feria, el reemplazo del número de RENSPA del propietario por el de la firma consignataria, imposibilitó determinar el origen inicial de la hacienda, y la actividad desarrollada por el productor. Por lo tanto, en estos casos, solamente se obtuvo la localidad de la feria de procedencia de los bovinos.

- **Ubicación geográfica de los establecimientos particulares por departamento en la provincia de Córdoba**

Al evaluar la ubicación de los establecimientos particulares de los cuales provenían los animales con TBB en la provincia de Córdoba, se observó que el 24,24% (n=16) correspondieron al departamento de Juárez Celman; 33,33% (n=22) a Río Cuarto; 9,1% (n=6) a General Roca; 10,60% (n=7) a Pte. Roque Sáenz Peña; 6,06% (n=4) a General

San Martín; 4,55% (n=3) a Unión; 6,06% (n=4) a Marcos Juárez y 6,06% (n=4) a Tercero Arriba (Figura 5).

• **Ubicación geográfica de los remates feria por departamento en la provincia de Córdoba**

El 30,9% (n=21) de los animales correspondieron a ferias del departamento General San Martín, el mismo porcentaje 30,9% (n=21) a Pte. Roque Sáenz Peña; 11,7% (n=8) a Juárez Celman; 10,3% (n=7) a Unión, 5,9% (n=4) a Marcos Juárez; 5,9% (n=4) a Río Cuarto y 4,4% (n=3) a General Roca (Figura 5).

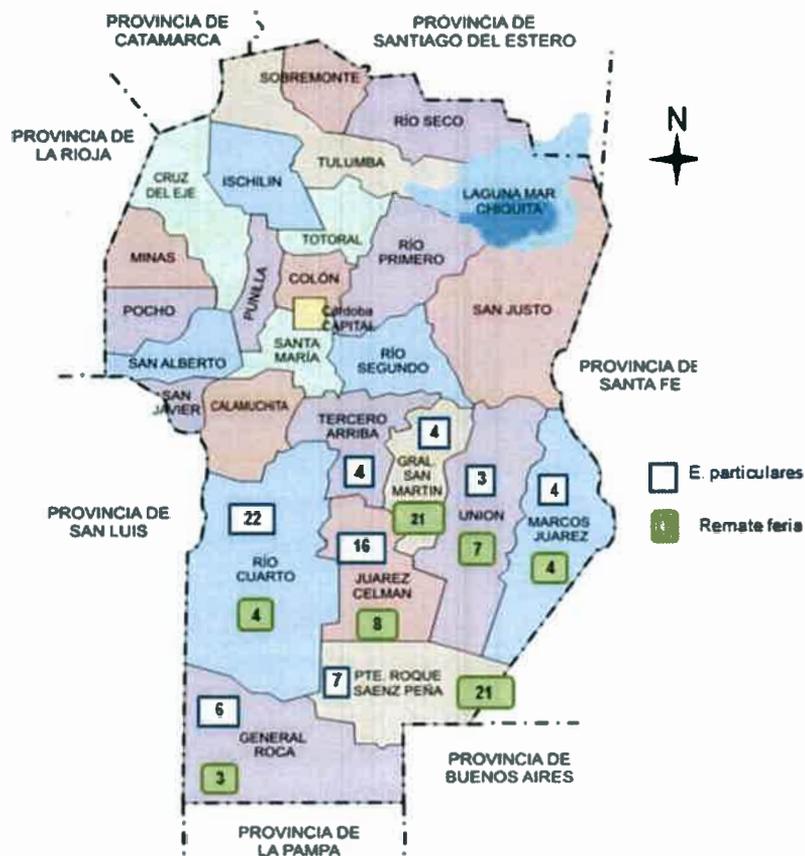


Figura 5: ubicación y cantidad de establecimientos particulares y de remates feria por departamento en la provincia de Córdoba.

➤ Categorías de animales muestreados

En la Tabla 1 se detallan las categorías de animales muestreados.

Tabla 1: categorías, número absoluto y porcentaje de animales muestreados

Categoría	N° de animales	%
Vaca (VC)	66	49,2
Vaquillona(VQ)	21	15,7
Toro (TO)	1	1,3
Novillito (NT)	16	11,5
Novillo (NO)	27	20,1
Ternero (TE)	3	2,2
TOTAL	134	100

Cuando se discriminaron las categorías de animales según la procedencia se observó, que en el caso de los correspondientes a productores particulares se distribuyeron en 37,88% (n=25) VC, 30,30% (n=20) NO, 13,64% (n=9) NT, 12,12% (n=8) VQ, 4,55% (n=3) TE y 1,51% (n=1) TO.

En los procedentes de remates ferias, el 60,3% (n=41) fueron VC, 19,11% (n=13) VQ, 10,30% (n=7) NT y 10,29% (n=7) NO.

➤ Análisis macroscópico de las LCT

Inicialmente se analizó la distribución de las LCT por sistemas y en cada uno de ellos.

• Distribución de las LCT por sistema

El 54,48% (n=73) de los animales tuvieron lesiones únicamente en sistema respiratorio, el 7,46% (n=10) sólo en sistema digestivo, el 32,84% (n=44) generalizada, el 2,23% (n=3) en otras ubicaciones (ganglios linfáticos pre-escapulares y/o retromamarios y/o de la carcasa) y el 2,99% (n=4) sólo en ganglios linfáticos retrofaríngeos (Figura 6).

Cabe destacar, que se consideró como una categoría única a los ganglios retrofaríngeos en los animales que sólo presentaban lesiones en esa ubicación, ya que estos comparten porciones anatómicas con la faringe y la laringe haciendo inadecuada su inclusión en sistema digestivo o respiratorio. Cuando el animal presentaba lesiones en ganglios retrofaríngeos y además en pulmones o ganglios respiratorios se los consideró dentro del sistema respiratorio.

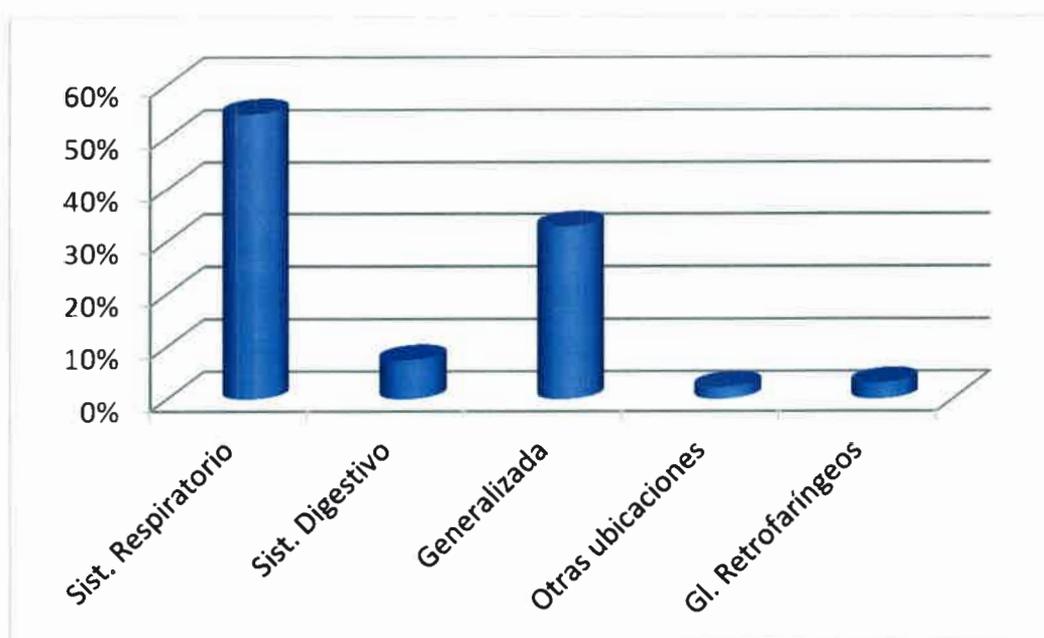


Figura 6: distribución relativa de las LCT según los diferentes sistemas afectados.

- **Distribución de las LCT en sistema respiratorio**

En cuanto a las 73 LCT halladas únicamente en el sistema respiratorio, el 21,92% (n=16) se ubicaron sólo en los ganglios linfáticos (bronquiales y/o mediastínicos), el 9,59% (n=7) sólo en pulmón y el 68,49% (n=50) presentaba lesiones tanto en pulmón como en ganglios linfáticos (bronquiales y/o mediastínicos y/o retrofaríngeos) (Figura 7).

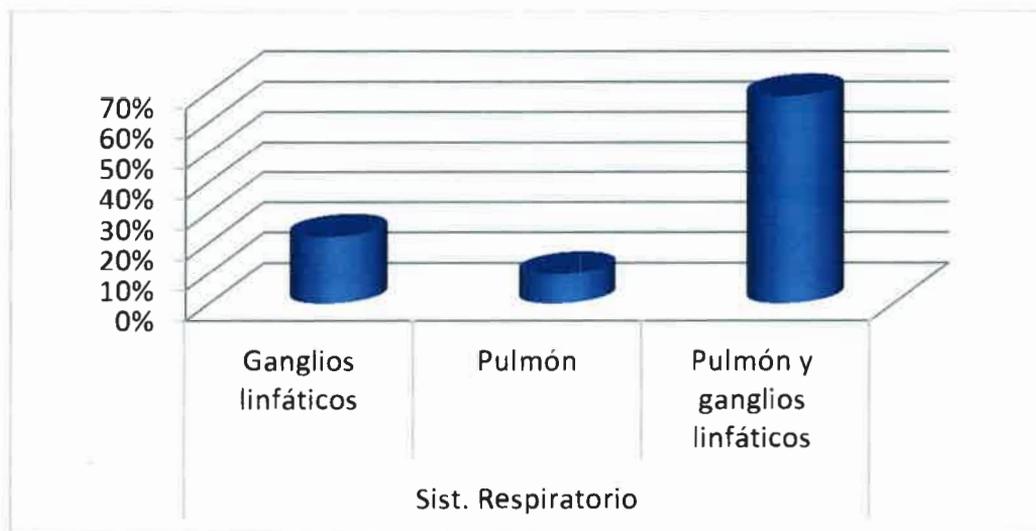


Figura 7: distribución relativa de las LCT observadas en sistema respiratorio

• **Distribución de las LCT en sistema digestivo**

En los 10 animales que presentaron lesiones sólo en sistema digestivo, el 40% se ubicaron sólo en hígado, el 20% sólo en ganglios (mesentéricos y/o gastrohepáticos) y el 40% en tanto en hígado como en ganglios (Figura 8). Uno de los 10 bovinos presentó también lesiones en peritoneo y otro en intestino.

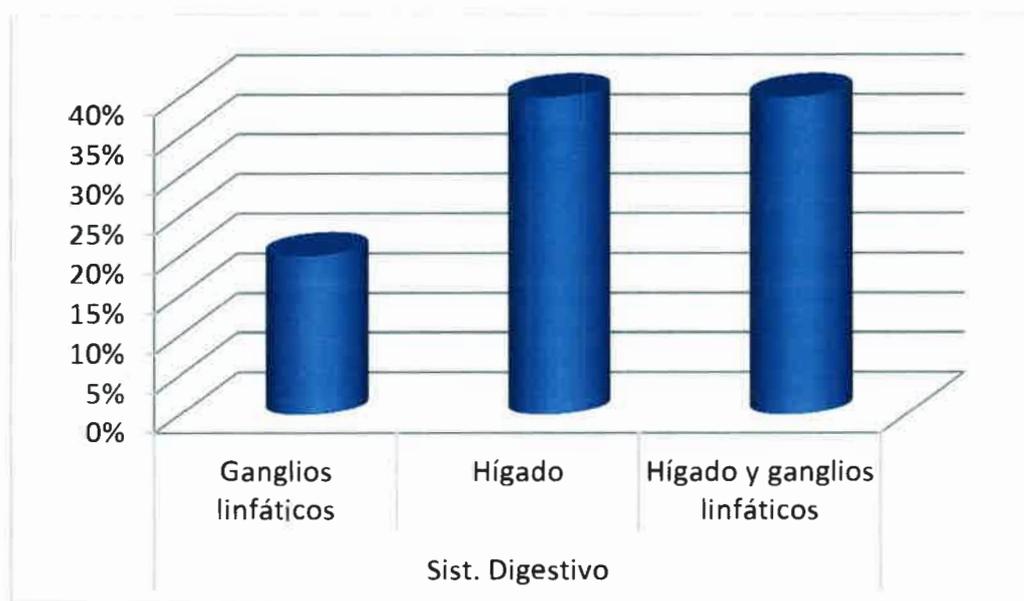


Figura 8: distribución relativa de las LCT halladas en sistema digestivo

Características macroscópicas individuales de las LCT

De los 134 animales en estudio se obtuvieron 311 órganos con LCT que se incorporaron al estudio de sus características macroscópicas. Se analizaron las particularidades de las lesiones en su totalidad y luego en forma individual, las correspondientes al sistema respiratorio que fueron las que abarcaron el 63% de las muestras.

➤ PRESENCIA/AUSENCIA DE HALO ROJO PERIFÉRICO

De las 311 muestras analizadas, 58,2% (n= 181) no presentaron halo rojo rodeando la lesión (Figura 9).

Con respecto al sistema respiratorio, en pulmón (n=85), predominaron las que tenían halo rojo periférico (Figura 10), agrupando al 65,9% (n=56) de las muestras. En ganglios linfáticos mediastínicos y bronquiales (n=111), un 59% (n=66) de lesiones no presentaba halo rojo periférico (Figura 9).

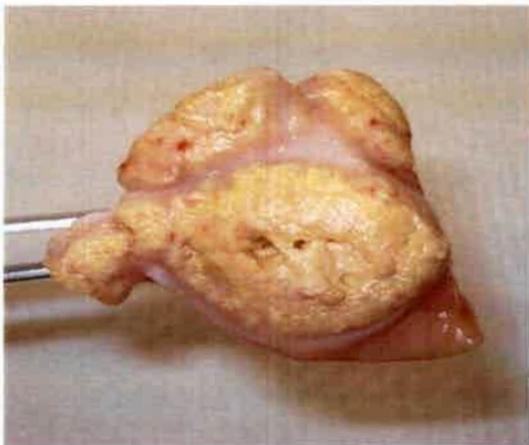


Figura 9: LCT en ganglio linfático en la cual se no se observa la presencia de halo rojo.

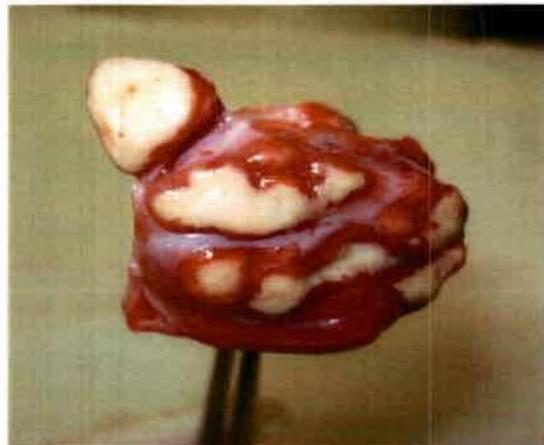


Figura 10: LCT en tejido pulmonar donde observa el halo rojo periférico

➤ PRESENCIA/AUSENCIA DE CÁPSULA

El 69,77% (n=217) de las muestras totales no presentaron cápsula fibrosa mientras que el 30,23% (n=94) si presentaron cápsula fibrosa rodeando la lesión (Figura 11).

En pulmón, el 52,7% (n=62) y en ganglios linfáticos del sistema respiratorio el 76,57% (n=85) se observaron sin cápsula periférica.



Figura 11: se señala (flecha) la cápsula fibrosa rodeando la lesión pulmonar

➤ PRESENCIA/AUSENCIA DE CALCIFICACIÓN

El 74,92% (n=233) de las muestras en estudio no evidenciaban calcificación.

En pulmón, en el 57% (n=67) de las muestras y en ganglios linfáticos respiratorios en el 70,27% (n=78) no se apreciaba esta característica.

➤ PRESENTACIÓN DE LAS LCT

La presentación predominante en la totalidad de las lesiones (n=311), fue la multifocal (más de un granuloma), (Figura 12) que agrupó al 89,06% (n=277) de las muestras, mientras que el 10,94% (n=34) presentaron lesiones focales (un sólo granuloma) (Figura 13).

Al analizar las lesiones en el sistema respiratorio, que fue el más afectado, se observó que en pulmón (n=85), la forma multifocal agrupó al 84,70% de las muestras y

el 15,3% presentó lesiones focales (Figura 13). En ganglios mediastínicos y bronquiales (n=111), la presentación multifocal también fue la más encontrada agrupando al 83,78% de las muestras.

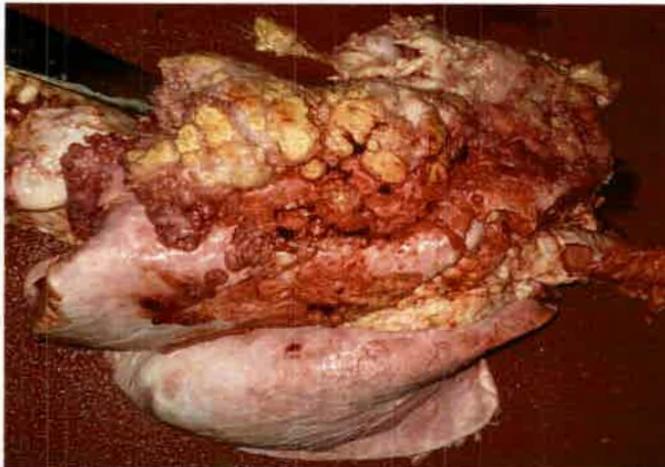


Figura 12: presentación multifocal de las LCT en pulmón.



Figura 13: presentación focal de LCT en lóbulo apical del pulmón.

➤ TAMAÑO DE LAS LCT

Con respecto al tamaño de las lesiones, en el 32,15% (n=100) de las muestras fue menor a 0,5 cm y en el 32,48% (n=101) de 0,5 a 1 cm. Estas dos categorías predominaron agrupando al 64,63% de las LCT. Un 26,37% (n=82) oscilaron entre 1 a 5 cm y sólo un 9% (n=28) fueron mayores a 5 cm (Figuras 14, 15 y 16).

Puntualmente en el pulmón, las lesiones de hasta 1 cm (Figura 16) fueron observadas en el 58,82% (n=50) de los casos, de 1 a 5 cm en el 28,23% (n=24) y mayores a 5 cm (Figura 12) en el 12,94% (n=11) de las muestras.

En ganglios linfáticos del sistema respiratorio, el tamaño de hasta 1 cm fue encontrado en el 71,17% (n=79) de las muestras, el 19,81% (n=22) eran de 1 a 5 cm (Figura 15) y el 9% (n=10) tenía un tamaño mayor a 5 cm.

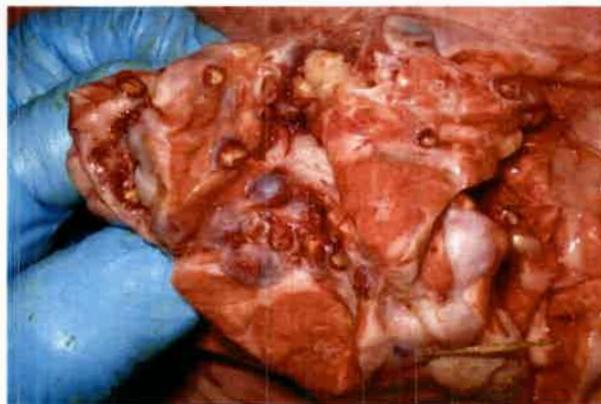


Figura 14: LCT multifocales de hasta 1cm en parénquima pulmonar

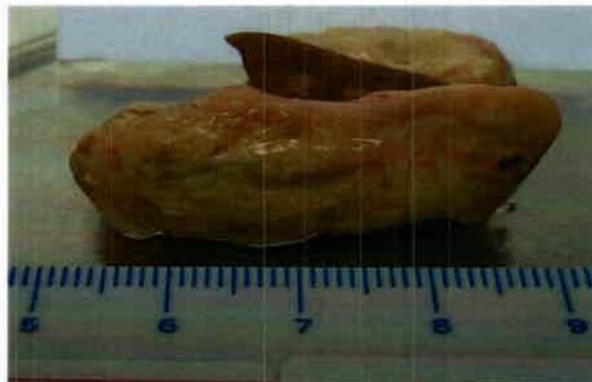


Figura 15: LCT de 1 a 5 cm en ganglios linfáticos.

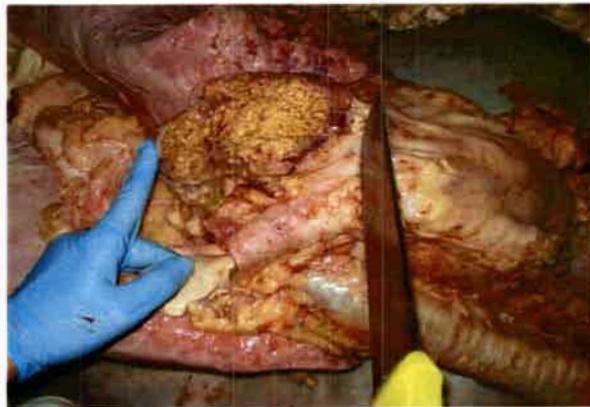


Figura 16: LCT en pulmón de tamaño mayor a 5cm.

Análisis bacteriológico

De los 150 bovinos con LCT muestreados, 134 (89,33%) presentaron crecimiento macroscópico de colonias compatibles con micobacterias y tinción de Z-N positiva. Los restantes 16 fueron negativos al cultivo. El porcentaje de recuperación de micobacterias a partir del material analizado fue del 89,33%.

El 100% de las muestras que presentaron crecimiento bacteriano, lo hicieron en el medio de ST (Figura 17) y el 20,9% también se desarrolló en el medio de LJ. Ninguna muestra creció únicamente en el medio de LJ.

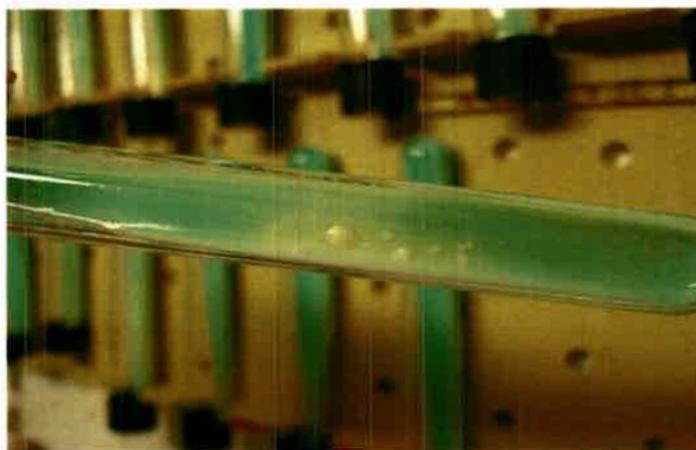


Figura 17: múltiples colonias de *M. bovis* en medio de ST.

➤ **Análisis histopatológico**

Por histopatología, de los 150 animales muestreados con lesiones macroscópicas compatibles con tuberculosis, 137 evidenciaron lesiones granulomatosas y 13 resultaron sin lesiones características de la enfermedad.

En 135 de los 150 animales muestreados hubo concordancia entre los resultados del aislamiento del agente y la histopatología: 128 positivos y 7 negativos a ambas técnicas. En 6 animales el cultivo fue positivo pero negativa la histopatología y finalmente 9 fueron negativos al cultivo pero positivos al análisis microscópico (Tabla 2).

Tabla 2: resultados obtenidos en el cultivo bacteriológico y en la histopatología de los 150 animales muestreados

Cultivo	Histopatología		Total
	Positiva	Negativa	
Positivo	128 (85,33%)	6 (4%)	134 (89,33%)
Negativo	9 (6%)	7 (4,66%)	16 (10,66%)
TOTAL	137 (91,33%)	13 (8,66%)	150 (100%)

En las muestras negativas tanto al cultivo como a la histopatología se diagnosticó microscópicamente 3 casos de actinobacilosis en pulmón, 2 de neumonías exudativas y 2 de leucosis en ganglios linfáticos.

➤ Tipificación molecular

A partir de los 134 aislamientos de *M. bovis*, se obtuvieron 19 spoligotipos diferentes: 9 agrupados, 8 únicos y 2 únicos y exclusivos (Figura 18).

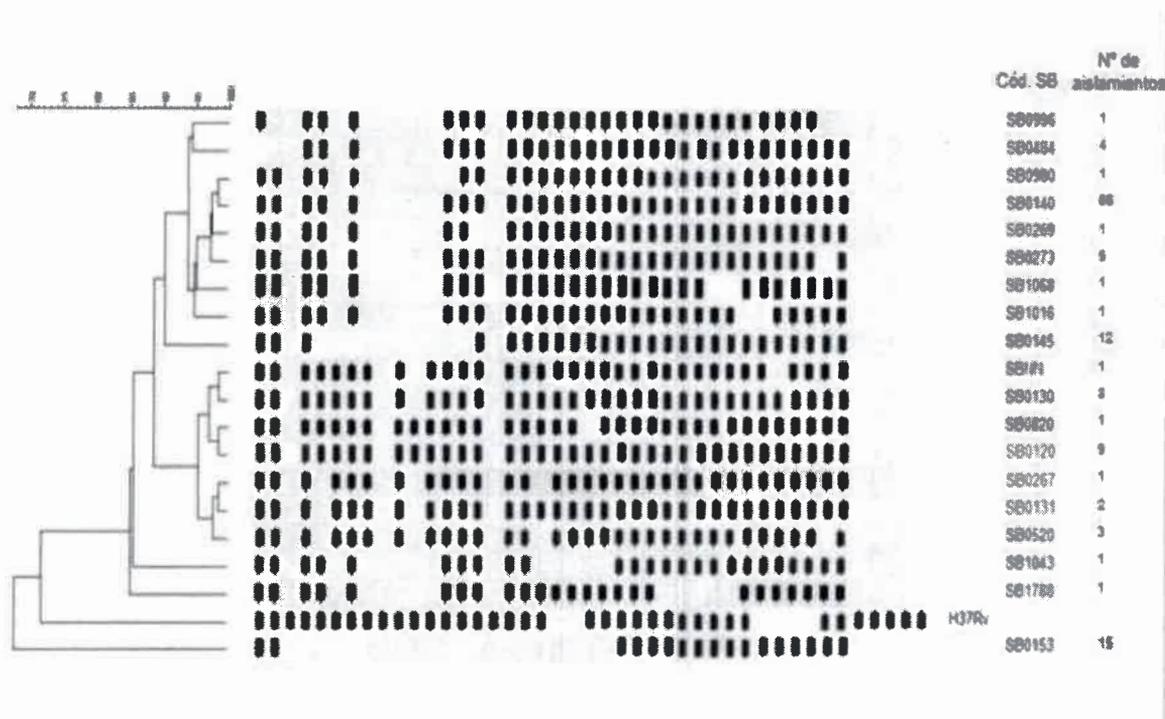


Figura 18: patrones de spoligotipos (SB) de *M. bovis* obtenidos y cantidad de aislamientos de cada uno. La cepa H37Rv fue utilizada como control.

Como se puede observar en la Figura 18, se detectaron dos grandes familias, una desde el SB0996 al SB0145 y otra del SBNN al SB0520 relacionadas en más del 90,35% y 95,45% respectivamente agrupando al 68,65% y 18,65% de los aislamientos estudiados.

El spoligotipo más frecuente, que se encontró en el 49,25% de los aislamientos (n=66) fue el SB0140 seguido por el SB0153 y SB0145 que se observaron en el 11,20% (n=15) y 9% (n=12) de los aislamientos respectivamente. El SB0120 (mismo spoligotipo de la cepa vacunal *M. bovis* BCG) y el SB0130 se identificaron en 6,71%

(n=9) y 6% (n=8) de las muestras. El resto se distribuyó en 14 spoligotipos diferentes. El 3,7% (n=5) pertenecieron al SB0273, 3% (n=4) al SB0484, 2,23% (n=3) al SB0520, y 1,49% (n=2) al SB0131. Los 8 aislamientos con spoligotipos únicos fueron los SB1043, SB0980, SB0267, SB0996, SB1068, SB1016, SB1788 y SB0269. Los SB0820 y SBNN fueron únicos y exclusivos al no haber sido descritos con anterioridad, no habérselos detectado nuevamente y no estar registrados en la base de datos internacional (Figura 19).

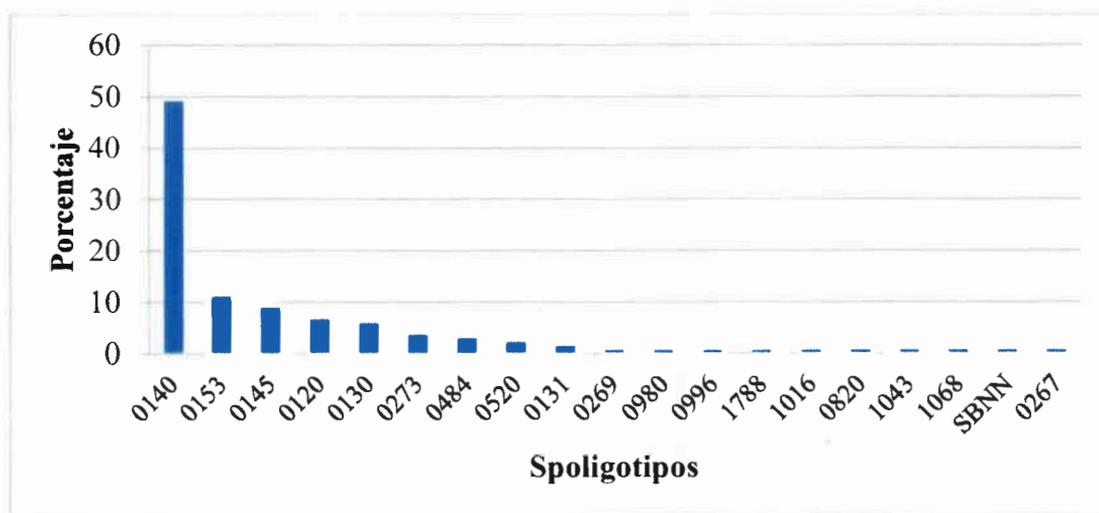


Figura 19: porcentaje de spoligotipos de *M. bovis* detectados.

➤ Distribución geográfica de los spoligotipos

Como se mencionó anteriormente, la georreferenciación de los establecimientos de origen de los animales detectados en frigorífico con LCT es posible si se obtiene el número de RENSPA del productor, de lo contrario no podemos acceder a la información provista por el VIG de SENASA. En la Figura 20 se observa el mapa de la provincia de Córdoba en el que se detalla la georreferenciación de cada establecimiento de donde provenían los animales en estudio. Sólo se pudieron georreferenciar 13

spoligotipos los que fueron identificados en animales provenientes de establecimientos particulares. Los 6 spoligotipos restantes provenían de animales de remates feria.

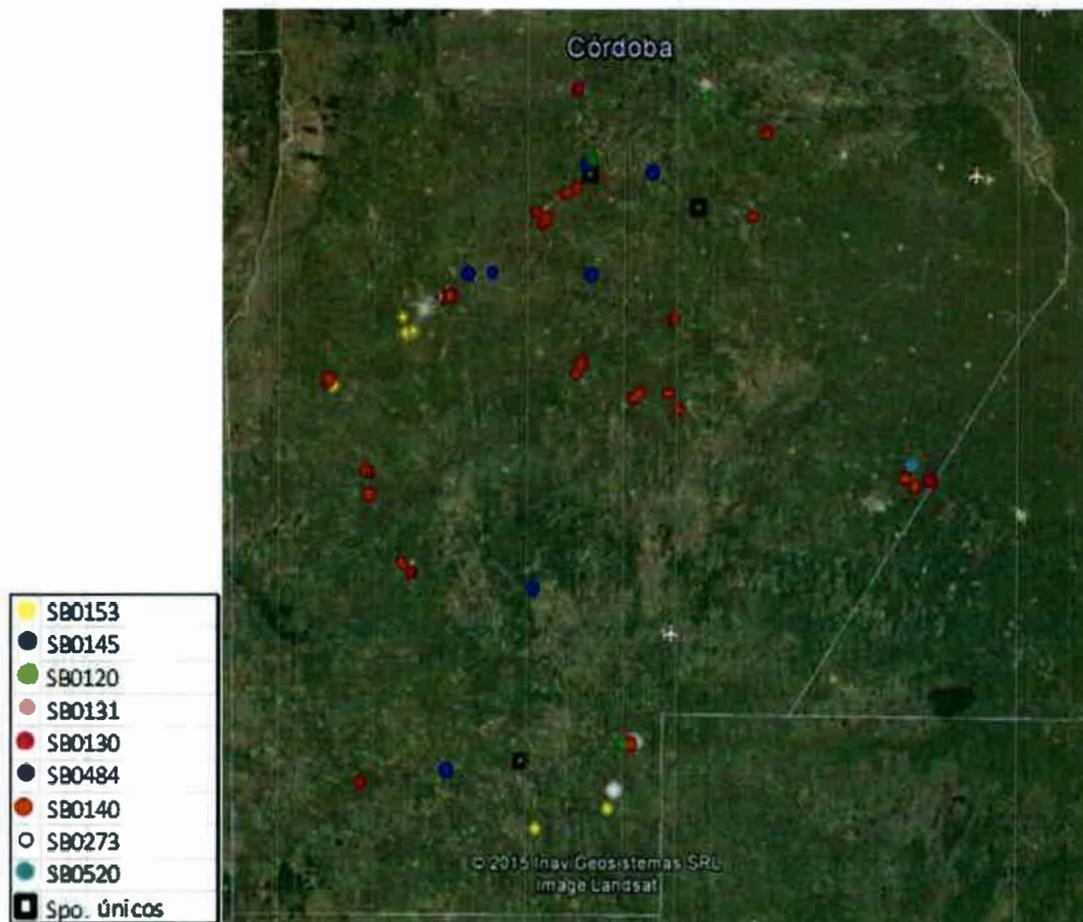


Figura 20: georreferenciación de los 13 spoligotipos encontrados en establecimientos particulares de la provincia de Córdoba

En el cuadro 3 se indica la cantidad y spoligotipos detectados por departamento en la provincia de Córdoba provenientes de productores particulares. En el Cuadro 4 se realiza el mismo análisis pero de los animales provenientes de remates feria.

En cuanto a la localización de los spoligotipos únicos y de los únicos y exclusivos, en el departamento General Roca y Tercero Arriba se detectaron spoligotipos únicos (SB1788 y SB1016) (Cuadro 3). En el departamento Gral. San Martín y Río Cuarto se ubicaron los patrones únicos y exclusivos (SB0820 y SBNN) (Cuadro3). Los 6

spoligotipos únicos restantes pertenecían a animales que provenían de remates feria por lo que no se pudo establecer su origen.

Cuadro 3: número de muestras procesadas y cantidad de spoligotipos aislados de animales provenientes de establecimientos particulares distribuidos por departamento en la provincia de Córdoba.

Departamento	Nº muestras	Spoligotipos/(nº de aislamientos)	Observaciones
Gral Roca.	6	SB0153 (2) SB0145 (1) SB0140 (1) SB0273 (1) SB1788 (1)	SB1788 es único.
Gral. San Martín	4	SB0145 (1) SB0120 (2) SB0820 (1)	Los dos aislamientos, SB0120 pertenecían al mismo establecimiento (tambo). El spoligotipo SB0820 es único y exclusivo.
Juárez Celman	16	SB0145 (2) SB0140 (13) SB0520 (1)	Dos aislamientos SB0140 pertenecían a un mismo establecimiento (invernada y cría).
Marcos Juárez	4	SB0520 (1) SB0140 (2) SB0130 (1)	
Roque Sáenz Peña	7	SB0145 (1) SB0140 (2) SB0131 (2) SB0273 (1) SB0120 (1)	Cuatro aislamientos (dos SB0140 y dos SB0131) pertenecían a un mismo establecimiento de engorde a corral.
Río Cuarto	22	SB0153 (6) SB0145 (1) SB0130 (1) SB0484 (1) SB 0140 (11) SB0520 (1) SBNN (1)	Tres aislamientos SB0153 pertenecían a un establecimiento de cría. Dos aislamientos SB0140 al mismo establecimiento (cría). El spoligotipo SBNN es único y exclusivo.
Unión	3	SB0140 (3)	
Tercero Arriba	4	SB0130 (1) SB0145 (1) SB 1016 (1) SB0120 (1)	El spoligotipo SB1016 es único.

Cuadro 4: número de muestras procesadas y cantidad de spoligotipos aislados de animales provenientes de remates feria distribuidos por departamento en la provincia de Córdoba

Departamento	Nº muestras	Spoligotipos/(nº de aislamientos)	Observaciones
Gral Roca.	3	SB0145 (1) SB0120 (1) SB1043 (1)	El patrón SB0120 y SB1043 provienen de la misma feria y el SB0145 de otra. El SB1043 es único.
Gral. San Martín	21	SB0153 (2) SB0145 (2) SB0130 (2) SB0140 (7) SB1068 (1) SB0269 (1) SB0273 (3) SB0980 (1) SB0120 (1) SB0996 (1)	Todos provenientes de la misma feria. Los spoligotipos, SB0980, SB0269, SB0996 y SB1068 son únicos.
Juárez Celman	8	SB0140 (4) SB0145 (2) SB0153 (1) SB0130 (1)	Todos provienen de una misma feria con excepción del SB0153 que proviene de otra.
Marcos Juárez	4	SB0153 (3) SB0120 (1)	Las tres muestras SB0153 pertenecen a una feria y la SB0120 a otra.
Roque Sáenz Peña	21	SB0140 (16) SB0130 (1) SB0267 (1) SB0484 (1) SB0145 (2)	El patrón SB0140 (1) proviene de una feria. Los patrones SB0140(6), SB0145 (2), SB0484 (1) y SB0130 (1) de otra feria El SB0140 (9) y el SB0267 (1) de otra feria. El SB0267 es único.
Río Cuarto	4	SB0140 (2) SB0484 (1) SB0120 (1)	Todos de la misma feria.
Unión	7	SB0140 (5) SB0130 (1) SB0120 (1)	Los aislamientos provienen de 4 ferias. Una a la que pertenecen 4 muestras SB0140. Otras tres a las que pertenecen una muestra SB 0140, una SB0120 y una SB0130.

ANÁLISIS DE LAS LCT SEGÚN SPOLIGOTIPO

Teniendo en cuenta la gran diversidad de spoligotipos hallada en este estudio, se trabajó con los 8 que presentaron mayor frecuencia: SB0153, SB0145, SB0120, SB0130, SB0484, SB0140, SB0273 y SB052, que agruparon al 91% del total de los aislamientos obtenidos.

Inicialmente, se realizó un análisis exploratorio de las características individuales de las LCT según el spoligotipo actuante. Para esto, se tomaron en cuenta por un lado las lesiones ubicadas en pulmón y por otro las ubicadas en la totalidad de los ganglios linfáticos en estudio (mediastínicos, mesentéricos, retrofaríngeos, gastrohepático, etc). Esto se debe a que la mayor parte de las lesiones se asentaron en estas ubicaciones y fueron muy escasas en otros órganos como bazo, hígado e intestino.

Posteriormente se evaluó la distribución anatómica de las lesiones según los diferentes spoligotipos.

Finalmente, se realizó un análisis del *score* de virulencia obtenido para cada animal según el spoligotipo actuante mediante el test no paramétrico de Kruskal-Wallis.

➤ **Análisis exploratorio de las LCT según spoligotipo**

En las Tablas 3 y 4 se presentan las características macroscópicas en estudio, asociadas a los diferentes spoligotipos en pulmón y en la totalidad de los ganglios linfáticos. El análisis se realizó sobre la base de estos datos.

Tabla 3: características de las LCT en pulmón según el spoligotipo. Halo rojo, cápsula y calcificación: 0=ausencia 1=presencia. Presentación: 1=focal, 2=multifocal. Tamaño: 1=menor a 0,5cm, 2= 0,5-1cm, 3= 1-5cm, 4=más de 5cm.

Spo.	Halo rojo		Cápsula		Calcificación		Presentación		Tamaño			
	0	1	0	1	0	1	1	2	1	2	3	4
0153	4	7	6	5	9	2	4	7	1	4	4	2
0145	2	5	3	4	6	1	1	6	0	5	1	1
0120	1	5	5	1	3	3	0	6	1	3	2	0
0130	0	4	2	2	4	0	0	4	2	1	1	0
0484	0	3	3	0	2	1	0	3	1	0	2	0
0140	16	24	30	10	33	7	1	39	13	9	12	6
0273	2	2	4	0	3	1	1	3	1	1	0	2
0520	1	2	3	0	3	0	0	3	2	1	0	0
Total	26	52	56	22	63	15	7	71	21	24	22	11

Tabla 4: características de las LCT en ganglios linfáticos según el spoligotipo. Halo rojo, cápsula y calcificación: 0=ausencia 1=presencia. Presentación: 1=focal, 2=multifocal. Tamaño: 1=menor a 0,5cm, 2= 0,5-1cm, 3= 1-5cm, 4= más de 5cm.

Spo.	Halo rojo		Cápsula		Calcificación		Presentación		Tamaño			
	0	1	0	1	0	1	1	2	1	2	3	4
0153	12	6	12	6	10	8	4	14	3	4	8	3
0145	15	5	13	7	12	8	1	19	9	3	8	0
0120	11	4	11	4	11	4	4	11	8	3	4	0
0130	4	2	5	1	5	1	0	6	4	1	1	0
0484	2	2	4	0	3	1	0	4	1	2	1	0
0140	38	27	46	19	52	13	11	54	24	26	10	5
0273	9	4	13	0	9	4	3	10	2	7	2	2
0520	3	1	3	1	1	3	0	4	2	2	0	0
Total	94	51	107	38	103	42	23	122	53	48	34	10

Inicialmente se realizó un análisis de proporciones de cada variable macroscópica según el spoligotipo correspondiente tanto en pulmón como en ganglios linfáticos.

- **Halo rojo:** en las Figuras 21 y 22 de barras múltiples relativas se presentan las proporciones de halo rojo en las LCT en pulmón y ganglios linfáticos. Se observa mayor presencia de halo rojo en las lesiones pulmonares ocurriendo lo inverso en ganglios linfáticos.

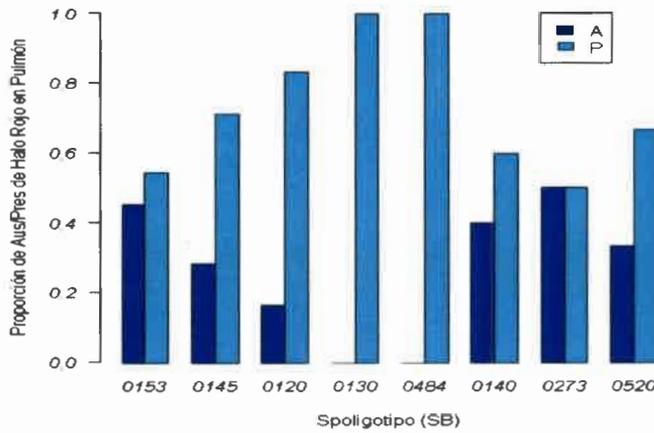


Figura 21: proporción de presencia (P) ausencia (A) de halo rojo en pulmón según spoligotipo.

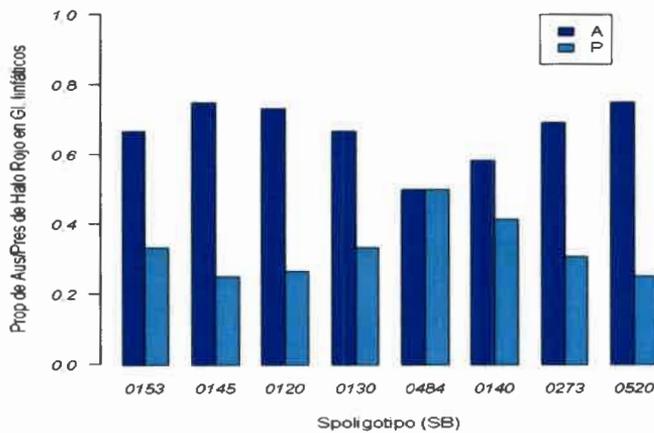


Figura 22: proporción de presencia (P) ausencia (A) de halo rojo en ganglios linfáticos según spoligotipo.

- **Cápsula:** las Figuras 23 y 24 demuestran la presencia o ausencia de cápsula en las LCT encontradas en pulmón y en ganglios linfáticos.

En pulmón (Figura 23), podemos observar que en el SB0145 la presencia de cápsula es mayor que la ausencia a diferencia de todos los demás spoligotipos. Por otra parte, el spoligotipo SB0520 presenta ausencia total de cápsula fibrosa rodeando la lesión en todas las muestras de tejido pulmonar. Los patrones SB0484 y SB0273

presentan ausencia de cápsula en la totalidad de las muestras tanto de pulmón como de ganglios linfáticos (Figuras 23 y 24).

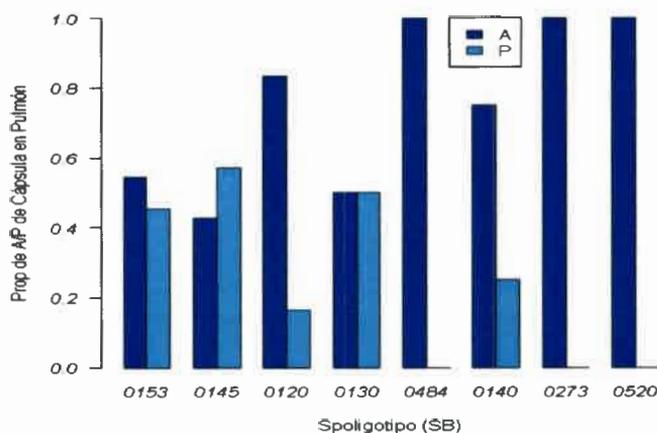


Figura 23: proporción de presencia (P) ausencia (A) de cápsula en pulmón según spoligotipo

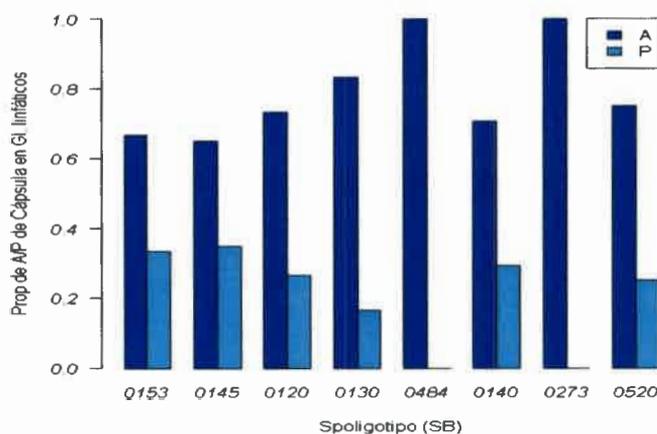


Figura 24: proporción de presencia (P) ausencia (A) de cápsula en ganglios linfáticos según spoligotipo.

- **Calcificación:** las Figuras 25 y 26 indican las proporciones de muestras con presencia o ausencia de calcificación según el spoligotipo. Para esta característica, en ganglios linfáticos (Figura 26) el patrón SB0520 presenta una mayor proporción de lesiones con presencia de calcificación en tanto que en el resto de los spoligotipos se

aprecia una mayor proporción de lesiones con ausencia de calcificación. No se evidenció calcificación en la totalidad de las muestras de pulmón correspondientes a los spoligotipos SB0130 y SB0520 (Figura 25).

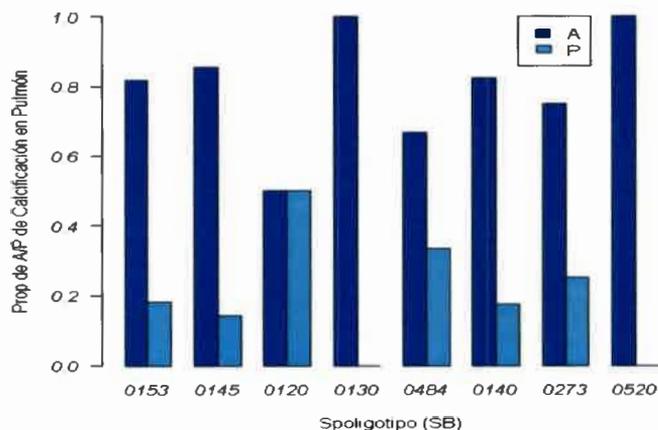


Figura 25: proporción de presencia (P) ausencia (A) de calcificación en pulmón según spoligotipo

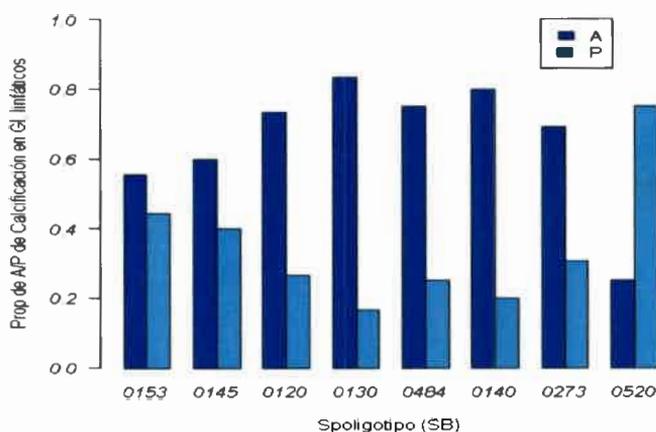


Figura 26: proporción de presencia (P) ausencia (A) de calcificación en ganglios linfáticos según spoligotipo

- **Presentación:** las Figuras 27 y 28 detallan la presentación focal o multifocal de las LCT descritas en pulmón y en ganglios linfáticos. Para todos los spoligotipos en estudio la proporción de lesiones multifocal fue ampliamente superior. Los patrones

SB0130, SB0484 y SB0520 tuvieron nula presentación focal tanto en pulmón como en ganglios linfáticos.

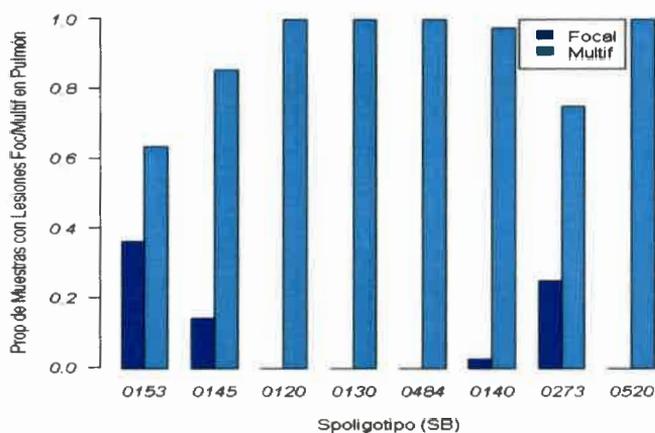


Figura 27: presentación focal o multifocal de las LCT en pulmón según spoligotipo

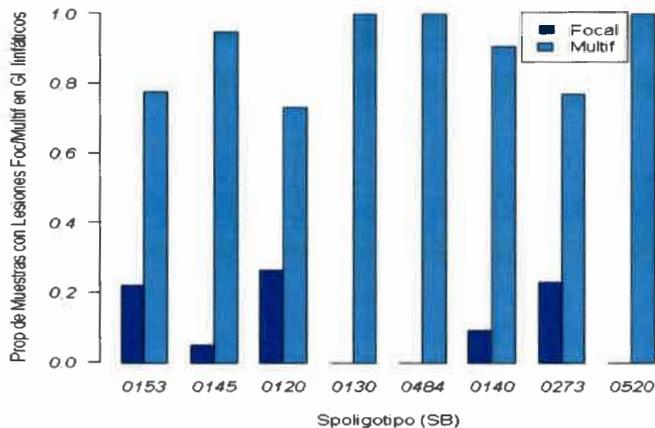


Figura 28: presentación focal o multifocal de las LCT en ganglios linfáticos según spoligotipo

- **Tamaño:** en las Figuras 29 y 30 se observa la proporción de lesiones de diferentes tamaños. En pulmón (Figura 29), se destaca el patrón SB0273, el único en donde la mayor proporción de las lesiones fueron de más de 5 cm.

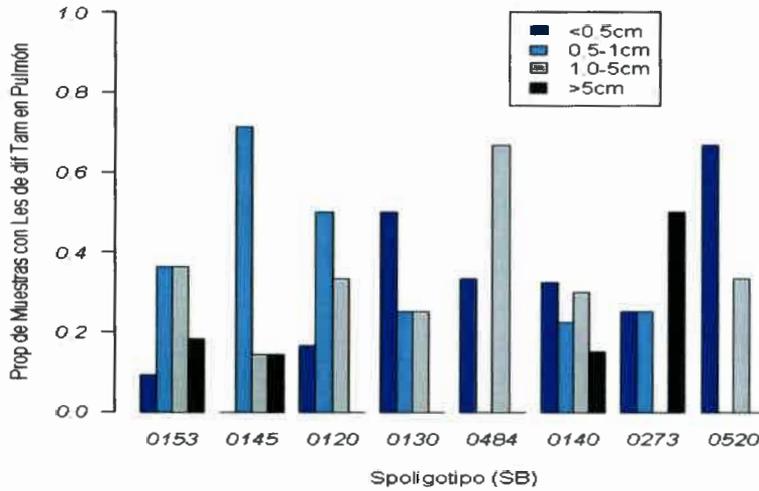


Figura 29: tamaño de las LCT en pulmón según spoligotipo

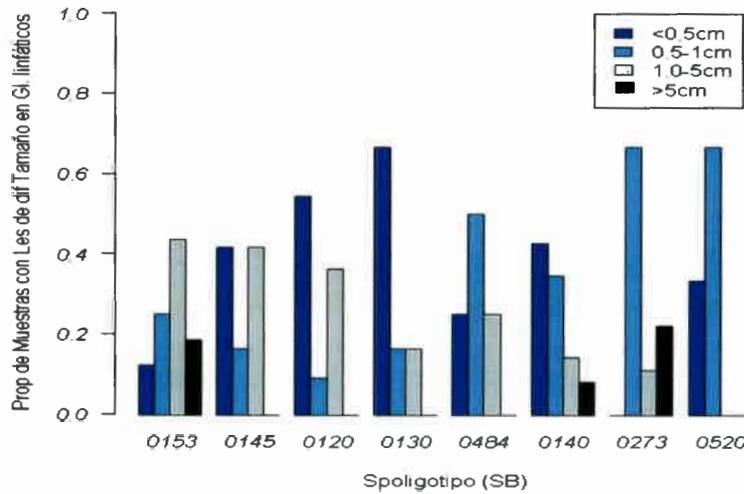


Figura 30: tamaño de las LCT en ganglios linfáticos según spoligotipo

➤ **Distribución anatómica de las LCT por spoligotipo**

Se observan a continuación los diferentes sistemas orgánicos afectados de acuerdo a cada spoligotipo (Figura 31).

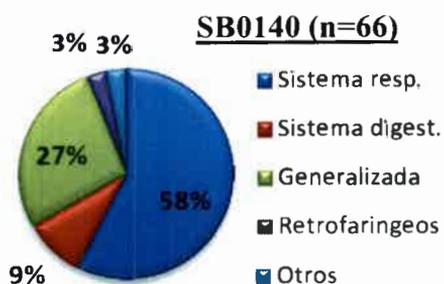
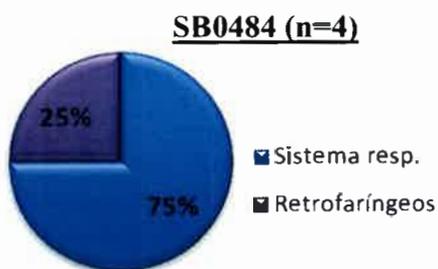
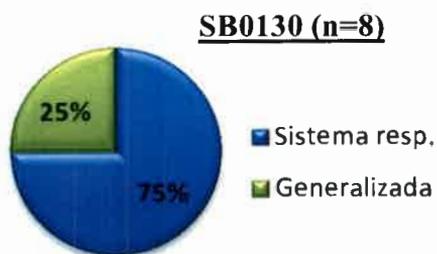
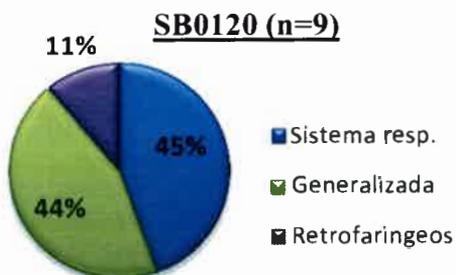
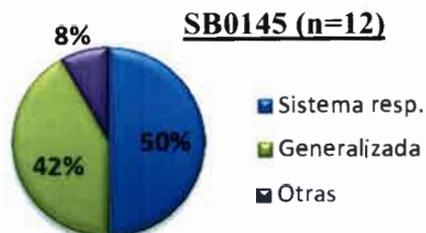
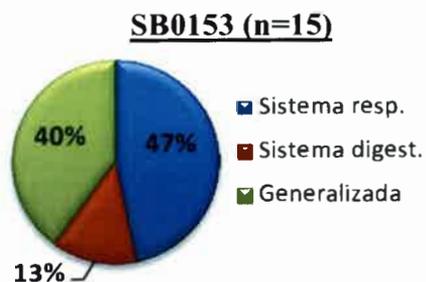




Figura 31: sistemas orgánicos afectados de acuerdo a cada spoligotipo.

Como podemos observar, todos los spoligotipos analizados, con excepción del SB0273 y el SB0520, afectaron principalmente el sistema respiratorio.

El SB0273 y el SB0520 fueron los únicos que se observaron en mayor proporción en la forma generalizada de la enfermedad. Por el contrario, el SB0484 fue el único que no se observó en la forma generalizada de la enfermedad, todas las lesiones provocadas por aislamientos con este spoligotipo fueron principalmente en sistema respiratorio y en ganglios linfáticos retrofaríngeos.

Se destaca la baja proporción de lesiones en sistema digestivo. Sólo los patrones SB0140 y SB0153 estuvieron involucrados en aislamientos que afectaron este sistema.

➤ **Análisis del score de virulencia según spoligotipo**

Al realizar el análisis exploratorio del score total de cada animal según el spoligotipo se observa que el coeficiente de variación, para cada spoligotipo, es superior al 30% indicando que hay una considerable variabilidad, la que se puede observar en el siguiente gráfico (Figura 32).

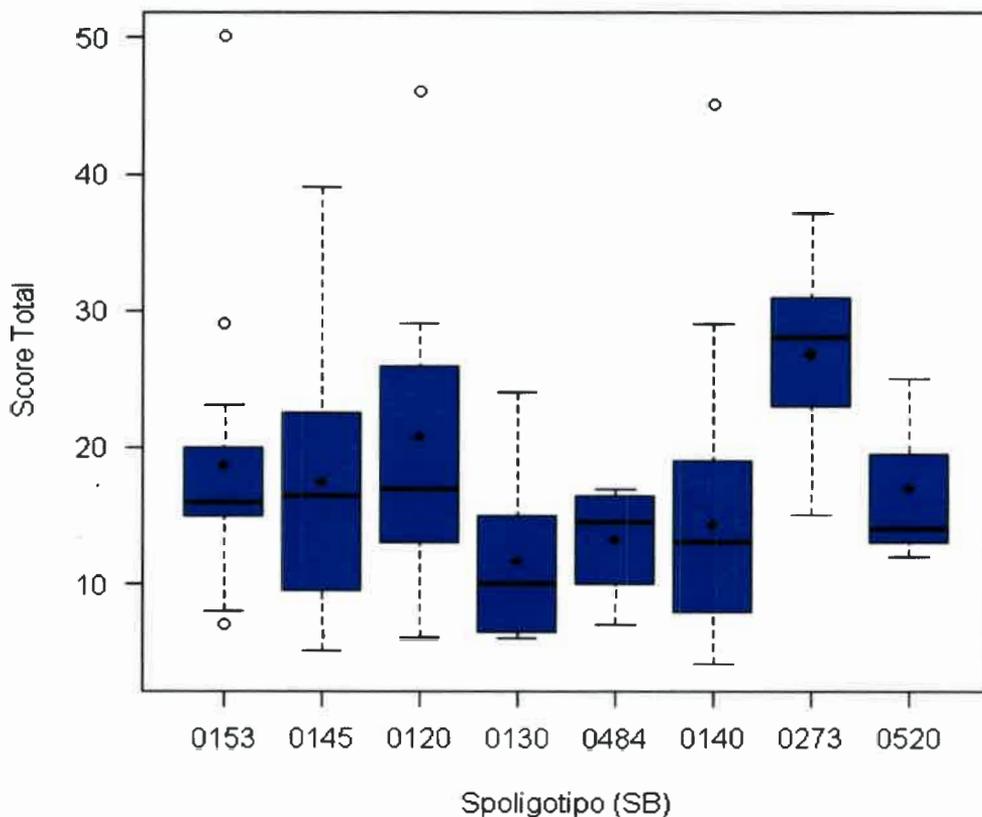


Figura 32: gráfico de cajas en el que se observa la media, la mediana y la dispersión de los scores para cada spoligotipo.

El spoligotipo SB0130 es el que presenta el menor score con una mediana de 10, en tanto que el spoligotipo SB0273 presenta el mayor score con una mediana de 28.

El spoligotipo SB0140, que fue el más frecuentemente hallado en este estudio, presenta una mediana de 13.

Los spoligotipos SB0153, SB0145 y SB0120 tienen medianas muy semejantes, de 16; 16,5 y 17 respectivamente.

• **Test de Kruskal-Wallis**

Se realizó el test no paramétrico de Kruskal-Wallis para comparar las 8 poblaciones determinadas por los spoligotipos.

Se obtuvo un valor $p=0,029$ por lo que hay evidencias estadísticamente significativas que indican que el efecto de los scores totales es diferente para al menos un spoligotipo.

En el Cuadro 5 se pueden observar las diferencias, significativas o no significativas, entre los tratamientos de los spoligotipos realizados de a pares en base al rango promedio, obtenidas con una prueba *a posteriori* no paramétrica.

Spo.	SB0273 102.60	SB0120 76.67	SB0153 74.30	SB0520 67.33	SB0145 66.42	SB0484 55.25	SB0140 55.03	SB0130 41.69
SB0273	-	Ns	Ns	Ns	Ns	Sig	Sig	Sig
SB0120		-	Ns	Ns	Ns	Ns	Ns	Sig
SB0153			-	Ns	Ns	Ns	Ns	Sig
SB0520				-	Ns	Ns	Ns	Ns
SB0145					-	Ns	Ns	Ns
SB0484						-	Ns	Ns
SB0140							-	Ns
SB0130								-

Cuadro 5: representación de las diferencias significativas (Sig) o no significativas (Ns) entre los spoligotipos para los diferentes score de virulencia.

El spoligotipo SB0273 presenta el mayor rango promedio ubicándose en primer lugar en base al score planteado y es significativamente diferente de los spoligotipos SB0484, SB0140 y SB0130.

Los spoligotipos SB0120 y SB0153 son estadísticamente diferentes del SB0130.

No se observaron diferencias estadísticamente significativas en el resto de los spoligotipos detectados en este estudio.

DISCUSIÓN

De acuerdo a la hipótesis planteada se pudo demostrar que en la provincia de Córdoba se observa una considerable diversidad genética en las cepas de *M. bovis* que provocan lesiones macroscópicas de distintos grados en bovinos existiendo diferencias que nos permiten inferir que algunos genotipos son más virulentos que otros.

En cuanto al predominio del genotipo actuante según el origen geográfico de los animales, no se pudo realizar en la totalidad de las muestras debido a que no fue posible identificar la procedencia de los bovinos en la mitad de los casos ya que fueron comercializados mediante remate feria.

En una primera etapa, al analizar los resultados de la tipificación de los aislamientos obtenidos en nuestro estudio (Figura 18), se observa que nuestra provincia cuenta con una variedad genética importante de cepas de *M. bovis* (19 spoligotipos diferentes). Este número de spoligotipos se correlaciona con el hallado en bovinos de las provincias de Buenos Aires (n=26) y Santa Fe (n=28), considerando la información de la base de datos de spoligotipos del Instituto de Biotecnología, del CICVyA-INTA, en la que se cuenta con los spoligotipos de 1550 aislamientos de *M. bovis* de Argentina, de los cuales 1026 corresponden a bovinos. Estas tres provincias son las que concentran más de la mitad del ganado bovino del país (56,43%). De un total de 51.646.544 existencias bovinas en la República Argentina, Buenos Aires colabora con 17.476.258 siendo la provincia con mayor cantidad de ganado del país seguida por Santa Fe que cuenta con 6.566.999 bovinos y Córdoba que se ubica en cuarto lugar, luego de Corrientes, con 4.453.904 bovinos (SENASA, 2014).

De los 19 spoligotipos identificados en nuestra provincia, dos (SB0820 y SBNN) no habían sido detectados hasta el momento en Argentina ni descritos en la base de datos internacional del VLA (www.mbovis.org), considerándose únicos y exclusivos. Por otro lado, ocho (SB1043, SB0980, SB0267, SB0996, SB1068, SB1016, SB1788 y SB0269) han sido detectados en un único aislamiento por lo que fueron definidos como únicos en nuestro estudio. La presencia de patrones únicos y exclusivos no detectados previamente podría deberse, como citan otros autores (Aguilar y col., 2009; Zumárraga y col., 2010) a que no toda la población de bovinos con TB ha sido analizada y los que resultaron únicos podrían encontrarse en una muy baja proporción en la población estudiada.

En la provincia de Córdoba, al igual que globalmente en Argentina, el SB0140 predomina ampliamente, agrupando al 49,25% de los aislamientos estudiados (Figura 19). El mismo, es también el más frecuente en países vecinos como Chile. Sin embargo, en Brasil y México se encuentra en muy baja proporción y allí predomina el SB0121, no detectado aún en nuestro país. Venezuela, en cambio, no posee registros del patrón SB0140 (Zumárraga y col., 2013).

El amplio predominio del spoligotipo SB0140, podría indicar que se trate de un grupo de cepas más virulentas o que haya sido introducido al país más antiguamente y por lo tanto se ha transmitido entre los bovinos por un tiempo más prolongado (Zumárraga y col., 1999; Cataldi y col., 2002; Smith y col., 2011; Zumárraga y col., 2013). Algunos autores, sugieren que el ingreso y predominio en nuestro país es debido a las estrechas relaciones comerciales ancestrales mantenidas entre el Reino Unido y los países que fueron colonia, por la importación de razas británicas hacia fines del siglo

XIX y comienzos del siglo XX, ya que en ellos predomina también este patrón (Cataldi y col., 2002; Smith y col., 2011).

Con respecto al SB0130, fue encontrado sólo en 8 de las 134 muestras, ubicándose en el quinto lugar en orden de frecuencia en la provincia de Córdoba (Figura 19); aunque ha sido descrito como el segundo más prevalente en Argentina (Zumárraga y col., 2013). El mismo tiene una frecuencia mucho mayor en la provincia de Santa Fe en donde ocupa el segundo lugar mientras que en Buenos Aires es el tercero en frecuencia entre los bovinos estudiados (base de datos del Instituto de Biotecnología, CICVyA, INTA datos no publicados).

El hecho de encontrar spoligotipos compartidos con otras regiones de nuestro país o con países vecinos sugiere una relación epidemiológica entre diferentes regiones. Sobre la base de esto se puede mencionar a los patrones SB0153 y SB0145, descritos en bovinos del noroeste argentino y el SB0120 identificado en bovinos de Brasil, Paraguay, Corrientes y en porcinos de Santa Fé y Buenos Aires (Zumárraga y col., 1999; Barandiaran y col. 2011; Zumárraga y col., 2013).

Se detallan a continuación en el Cuadro 6 los diferentes spoligotipos hallados en la provincia de Córdoba detectados también en bovinos de otras provincias del país hasta el año 2015 que demuestra la presencia de spoligotipos compartidos entre diferentes regiones (información de la base de datos del Instituto de Biotecnología CICVyA-INTA).

Cuadro 6: spoligotipos y número de aislamientos hallados en la provincia de Córdoba detectados también en bovinos de otras provincias del país hasta el año 2015.

Spoligotipo	Buenos Aires	Chaco	Corrientes	Entre Ríos	Formosa	Misiones	La Pampa	Santa Fe
SB0120	7		6	2				14
SB0130	17	22	30	2	1			46
SB0131	11		3	1				12
SB0140	83	75	24	17	7	2		138
SB0145	50	11	3					9
SB0153	4	1						4
SB0267	2			1				
SB0269		1	2				2	2
SB0484	15	2						11
SB0520	3							
SB0820	1							
SB0980	4							3
SB0996								1

Por otra parte, algunos patrones de *M. bovis* identificados en nuestro estudio, también han sido aislados en humanos de diferentes provincias de nuestro país lo cual denota el riesgo de transmisión zoonótica de la enfermedad (Cicuta y col., 2001; Etchechoury y col., 2010). Tal es el caso del SB0140 en humanos infectados con *M. bovis* (Etchechoury y col., 2010). Debido a que no siempre en humanos se realiza el cultivo y la tipificación de micobacterias, el potencial zoonótico de *M. bovis* se encuentra en muchos casos subestimado y se carece en ocasiones de estadísticas que nos permitan conocer realmente la incidencia del *M. bovis* en la población humana (Müller y col., 2013).

La presencia de los mismos spoligotipos en otras especies animales respalda la transmisión interespecie. Se resumen a continuación (Cuadro 7) los spoligotipos detectados en nuestro trabajo que también fueron identificados en humanos y en otras especies en Argentina hasta el año 2015 (información de la base de datos del Instituto de Biotecnología CICVyA-INTA).

Cuadro 7: spoligotipos detectados en bovinos, humanos y otras especies en Argentina hasta el año 2015. AS: Animal Silvestre; Bu: Búfalo; H: Humano; C: Cerdo; Ca: Cabra; Ci: Ciervo; Co: Comadreja; G: Gato; J: Jabalí.

Spoligotipo	Buenos Aires	Chaco	Córdoba	Corrientes	Entre Ríos	La Pampa	Santa Fe
SB0120	6C		3C				5AS
SB0130	15C; 1Ca; 1G; 1H		9C	1AS	1C		2AS; 10H
SB0131	1C		3C				1C; 1H
SB0140	70C; 1Ci; 11G; 9H;	1Ci	24C; 16Ca	2Bu	3C	3C; 1J	6AS; 26C; 14H
SB0145	2C; 1Ca; 3H		1C				1C; 3H
SB0153	1C; 1G; 8H		2C				3H
SB0267							1H
SB0269	1Ci 1H;						
SB0484	2C; 4G		4C		1C	1C	1Co
SB0520	1H				2C		
SB0980	1G		2C				
SB1043	1H						

Cuando se evaluó la ubicación de las LCT en los diferentes sistemas, se observó una gran mayoría afectando el sistema respiratorio (Figura 6), reafirmando esta vía como la principal en la transmisión de la enfermedad, tal como citan numerosos autores (Whipple y col., 1996; Abdala y col., 1999; Abdala y col., 2002; Magnano y col., 2010; Menin y col., 2013; Wright y col., 2013). En concordancia con estos autores, la forma digestiva fue de escasa presentación. Se evidenció un porcentaje de tuberculosis generalizada del 32,84% (Figura 6), comparable al 25% y 26,83% reportado por Abdala y col., (1999; 2002) y menor al 66,2% descrito por Menin y col., (2013).

En cuanto al análisis de las lesiones macroscópicas provocadas por los diferentes spoligotipos sobre la base del *score* planteado, hubo diferencias estadísticamente significativas que indican que los spoligotipos SB0273, SB0120 y SB0153 serían más virulentos que otros (Cuadro 5). Es importante, al desarrollar un *score* para evaluar la virulencia de los diferentes spoligotipos, que exista una correlación real entre el *score* propuesto y el grado de la patología en cada animal. Buddle y col., (2008) para evaluar la eficacia de la vacunación del ganado utilizando diferentes vías de inoculación basaron su *score* sólo el número total de lesiones (ninguna lesión=0; 1-9 lesiones=1; 10-29 =2; 30-99=3; 100-199=4 y más de 200 lesiones=5). Por su parte Vordermeier y col., (2002) y Palmer y col., (2007) asignaron diferentes scores al pulmón y a ganglios linfáticos teniendo en cuenta la cantidad y el tamaño de los granulomas. Dunn y North, (1995) realizaron un ranking de virulencia con dos cepas de *M. bovis* y tres de *M. tuberculosis* inoculadas en ratones y el mismo se basó en la velocidad de crecimiento de las micobacterias en pulmón e hígado, la capacidad de causar patología pulmonar y el tiempo de muerte de los ratones. Todos los estudios llevados a cabo por dichos autores fueron realizados con inoculaciones experimentales y por lo tanto con un control estricto de variables como dosis inoculada y tiempo de infección. Al hablar de infecciones naturales, donde no se pueden controlar estas variables, Menin y col., (2013) estudiaron la patología de la TB en bovinos naturalmente infectados utilizando dos scores: uno para evaluar la diseminación anatómica de las lesiones y otro propuesto por Vordermeier y col., (2002) que se mencionó en párrafos anteriores, para el análisis de la severidad de la patología.



En nuestro estudio, se trabajó con animales naturalmente infectados y todos los órganos afectados fueron considerados en el *score* desarrollado sobre la base de estudios previos realizados por diversos autores (Vordermeier y col., 2002; Palmer y col., 2007; Buddle y col., 2008; Menin y col. 2013; Wright y col., 2013). Todas las variables se encuentran integradas y fueron tenidas en cuenta para obtener el *score* de virulencia (Cuadro 1): el tamaño de las lesiones, la cantidad, su diseminación anatómica y las características particulares como presencia/ausencia de halo rojo periférico, cápsula y calcificación. Estas características particulares de las LCT, son consideradas las de mayor importancia en el análisis del grado de avance de la enfermedad por diversos autores (Vordermeier y col., 2002; Palmer y col., 2007; Buddle y col., 2008; Menin y col., 2013). Sobre la base de este análisis es que en nuestro trabajo, el patrón SB0273 demostró ser el de mayor virulencia en nuestro estudio y fue significativamente diferente de los spoligotipos SB0484, SB0140 y SB0130 (Cuadro 5). Resultados similares utilizando el mismo *score* de virulencia se obtuvieron en un trabajo realizado por Garbaccio y col., (2014). En el mismo, se estudiaron 192 aislamientos de bovinos de los cuales 67 pertenecen a la provincia de Córdoba y se encuentran incluidos en el presente trabajo de tesis, 63 a Buenos Aires y 62 a Santa Fe. El patrón SB0273 también fue el más virulento al compararlo con el SB0140, mayoritario en el estudio y el SB0145 considerado en su análisis el de menor virulencia. En nuestro trabajo se aumentó ampliamente la cantidad de cepas de la provincia de Córdoba en estudio (n=134) llegando a la misma conclusión en cuanto a la mayor virulencia del spoligotipo SB0273.

Wright y col., (2013) también obtuvieron resultados similares al analizar la virulencia de diferentes genotipos de *M. bovis* aislados de animales naturalmente infectados (n=2776) en Irlanda del Norte. Como medida de la virulencia utilizaron la proporción de reaccionantes a la IDR en los que posteriormente encontraron LCT. La proporción de reactores con LCT varió de acuerdo a los diferentes genotipos, del 44% para brotes causados por el SB0140 al 73% en los causados por el SB0273, ubicándose este último en primer lugar en cuanto a virulencia seguido por el SB0145 y por último el SB0140.

Al analizar las características particulares de las lesiones en los animales con el patrón más virulento (SB0273) se observa que la totalidad de las muestras tanto de pulmón como de ganglios linfáticos presentaban ausencia de cápsula fibrosa rodeando la lesión (Figuras 23 y 24). Esta característica es asociada con una mayor virulencia de la cepa actuante ya que la cápsula juega un rol fundamental en el control de la proliferación de las micobacterias en infecciones naturales limitando la diseminación de las mismas (Volkman y col., 2004; Russell, 2007; Gil y col., 2010; Menin y col., 2013). También se pudo apreciar que este patrón fue el que presentó la mayor proporción de lesiones de más de 5 cm tanto en pulmón como en ganglios linfáticos (Figuras 29 y 30). Ambas características (ausencia de cápsula y lesiones mayores a 5 cm) indican una mayor virulencia de la cepa y estarían asociadas a una mayor carga micobacteriana en el tejido afectado y a una incapacidad del sistema inmune del huésped para controlar la infección (Volkman y col., 2004; Menin y col., 2013; Garbaccio y col., 2014). Sumado a estas características particulares de las lesiones, lo bovinos con este patrón también presentaron el mayor porcentaje (80%) de tuberculosis generalizada (Figura 31), el cual

se encuentra muy por encima de los valores generales de tuberculosis diseminada descritos por diversos autores (Abdala y col., 1999; Abdala y col., 2002; Torres, 1998; Menin y col., 2013). Sin embargo, Wright y col., (2013) al evaluar si el genotipo influye en la distribución de las lesiones tuberculosas no encontraron asociación entre la virulencia y la distribución de las lesiones en el tracto respiratorio inferior.

Hay evidencias de la presencia del patrón SB0273 en Irlanda, Australia y Reino Unido (www.mbovis.org) pero en Argentina, sólo ha sido hallado en bovinos del sur de la provincia de Córdoba y no hay reportes del mismo en otras regiones de América Latina lo que hace aún más importante su estudio en la provincia de Córdoba.

Por otra parte, continuando con el análisis de virulencia, podemos observar que los patrones SB0120 y SB0153 se ubicaron en segundo y tercer lugar respectivamente en cuanto al *score* (Cuadro 5). Ambos fueron estadísticamente diferentes del SB0130, segundo patrón más prevalente en nuestro país (Zumárraga y col., 2013) que fue considerado el de menor virulencia. Resultados diferentes se obtuvieron en el trabajo de Garbaccio y col., (2014) ya que el patrón ubicado en segundo lugar fue el SB0520 que en nuestro caso no evidenció diferencias estadísticamente significativas con ningún spoligotipo y se ubicó en el cuarto lugar en el ranking promedio (Cuadro 5).

El patrón SB0140, mayoritario en nuestro estudio, se ubica en el séptimo lugar en cuanto al ranking promedio de los 8 spoligotipos estudiados (Cuadro 5). En concordancia, Aguilar y col., (2009) al comparar en un modelo murino, cinco cepas de *M. bovis*: dos aisladas de bovinos (SB0140), una de humano (SB1413) y dos de jabalíes (SB0140 y SB1055) observaron que las cepas de bovinos con este patrón fueron menos virulentas que el resto de las cepas estudiadas. En los estudios realizados por Garbaccio

y col., (2014) y Wright y col., (2013) el spoligotipon SB0140 también se encuentra dentro de los menor virulencia.

Como podemos observar los spoligotipos de bovinos más prevalentes en Argentina, SB0140 y SB0130, han sido asociados a cepas de menor virulencia en nuestro estudio (Cuadro 5). También han sido los que presentaron el menor porcentaje de animales con tuberculosis generalizada indicando un control eficiente de la diseminación de micobacterias por parte del huésped.

Debemos destacar que no hubo diferencias estadísticamente significativas entre los tres spoligotipos más prevalentes en este estudio, SB0140, SB0153 y SB0145, que fueron los que agruparon al 69,4% de los animales analizados.

En cuanto a la georreferenciación de los establecimientos de origen de animales con TBb, para una posterior regionalización de los patrones obtenidos, en este trabajo no fue posible identificar la procedencia del 50,75% (n=68) de los animales faenados ya que provenían de remates feria. Esta falta de localización llevó a no poder realizar un análisis exhaustivo de la distribución espacial de los diferentes patrones de spoligotipos encontrados en la provincia (Figura 20). La pérdida de información se debe principalmente a que los lotes individuales adquiridos por los frigoríficos en subasta, se concentran en lotes mayores a fin de facilitar su traslado a destino. Si bien existe documentación individual por lote subastado y obligatoriedad por parte de los propietarios remitentes de identificar los bovinos con marca a fuego, la individualización de los lotes a su llegada al frigorífico suele ser muy dificultosa y no se logra determinar el origen real de los mismos. Esto impide también, conocer el tipo de producción que se realiza en el establecimiento de origen y las existencias ganaderas,

entre otros datos. Por ello, cuando en los programas de control y erradicación se plantea el monitoreo en faena como herramienta para identificar campos infectados, como se puede observar, no es tan sencillo determinar el origen de los animales. Estudios realizados en nuestro país por Abdala y col., (1999; 2002), Torres, (1998), Magnano, (2008b; 2010) también hacen énfasis en esta problemática.

En el caso de productores individuales este problema no se presenta ya que el animal es identificado en frigorífico mediante el RENSPA y, en conjunto con el SENASA, se pueden obtener todos los datos del establecimiento. No obstante, se torna dificultoso si se intentase lograr la caracterización epidemiológica de la enfermedad en diferentes regiones, ya que con esta metodología, se conoce el origen de los establecimientos desde donde se enviaron los animales a faena pero ello no significa necesariamente el origen real de cada animal hasta llegar allí. En nuestro trabajo, y confirmando este concepto, podemos observar que en los únicos establecimientos en donde encontramos diferentes spoligotipos (Cuadro 3) fue en los engordes a corral donde se adquieren animales de diferentes orígenes y se los encierra para su terminación.

El mismo problema se presenta también en otros países. En E.E.U.U, sólo se determinó el origen del 50-70% de los animales con LCT detectados en faena (Kaneene y col., 2006). En Australia y en las Islas Británicas, en cambio, es más estricto el control del movimiento de animales y la trazabilidad se encuentra asegurada en el 100% de los bovinos faenados lo cual ha contribuido en gran medida al control y erradicación de la enfermedad (Cousins y Roberts, 2001; Radunz, 2006).

Retomando la georreferenciación de los spoligotipos, podemos mencionar una amplia distribución del SB0140 que se encontró en seis de los ocho departamentos de la provincia de Córdoba estudiados (Figura 20), consecuentemente con su mayor frecuencia en este estudio y en nuestro país. También se destaca la extensa distribución del SB0145 que con un número mucho menor de muestras ($n=7$) que también se lo encontró en seis departamentos y el SB120 en el que los cuatro aislamientos identificados se distribuyeron en tres departamentos. En cambio, el SB0153 con mayor cantidad de aislamientos ($n=8$) sólo se concentró en dos departamentos alejados del sur de la provincia. Los dos aislamientos con spoligotipo SB0273 también se encontraron en dos departamentos limítrofes (Figura 20). Este spoligotipo fue el que resultó más virulento del estudio y no ha sido aún detectado aún en otras provincias de nuestro país ni de América Latina.

Finalmente, como anexo a los objetivos principales de nuestro estudio y haciendo mención al cultivo bacteriológico, podemos mencionar que el porcentaje de recuperación de micobacterias a partir del material analizado fue alto (89,33%) si lo comparamos con los resultados obtenidos por diferentes autores. Biffa y col., (2010) aislaron micobacterias en el 31,2% de 337 carcasas con LCT, Müller, y col., (2008) obtuvieron un 35% de aislamientos ($n=60$), Araujo y col., (2005) un 23,6% ($n=72$) y el 9,2% fue reportado por Cleaveland y col., (2007). Este elevado porcentaje de recuperación obtenido pudo deberse a la conjunción de múltiples factores, entre ellos, el entrenamiento adecuado del personal veterinario y encargados de la inspección durante la faena identificando correctamente las LCT y el trabajo en el laboratorio siguiendo

protocolos estandarizados que se inician desde la preparación de los medios de cultivo hasta la siembra y recuperación de las colonias micobacterianas.

Se reconfirmó la eficiencia del medio ST para el desarrollo de *M. bovis* ya que el 100% de las muestras que presentaron crecimiento lo hicieron en este medio de cultivo. Diversos autores refuerzan su utilidad en la siembra de micobacterias principalmente en el caso de la obtención de aislamientos en humanos, ya que con excepción de los centros de referencia en los que también se utiliza el medio de ST para aumentar la recuperación de *M. bovis*, en general se limitan casi exclusivamente al uso del medio de LJ en el cual obtuvimos sólo un 20,9% de muestras positivas (Corner, 1994; Sapúlveda y col., 2001; Soldá y col., 2005; Robe-Austerman y col., 2013).

En cuanto al análisis microscópico de las LCT, los datos obtenidos permiten posicionar a la histopatología como una técnica complementaria y orientadora adecuada y relativamente rápida para el diagnóstico de la TBB a partir de tejidos ya que obtuvo un 90% de concordancia (Tabla 2) con el cultivo bacteriano. Valores similares obtuvieron Varelo y col., (2008) observando una alta correlación positiva al comparar el cultivo con la histopatología observando una sensibilidad de 93,4% y una especificidad del 92,3%; y Chavez y col., (2004) quienes encontraron buena concordancia entre ambas técnicas con un valor kappa= 0, 52. Si bien la histopatología no es la prueba de oro, es una técnica sencilla de implementar si se cuenta con recursos humanos capacitados. El tiempo de diagnóstico es mucho menor que el del cultivo dando una respuesta diagnóstica alternativa mucho más rápida y que no requiere de costos elevados para su realización. El actual plan nacional de control y erradicación de la TBB en nuestro país contempla que los servicios de laboratorios de referencia de la

red podrán utilizar el diagnóstico bacteriológico y/o histopatológico en los casos en los que se necesite la confirmación de la enfermedad.

CONCLUSIONES

De acuerdo a lo planteado en el presente estudio se concluye que en la provincia de Córdoba existe una considerable variedad de genotipos de *M. bovis* que han sido caracterizados y se encuentran disponibles para futuros estudios. Los mismos poseen diferentes grados de virulencia al evaluarlas de acuerdo a las características de las lesiones que provocan. Los datos generados contribuyen al avance en el estudio de la epidemiología molecular de la TBB que es cada vez más utilizada para comprender la distribución y dinámica de la transmisión del *M. bovis*.

El conocimiento de los genotipos de *M. bovis* que afectan a una región, nos permitirá dar explicaciones a nuevas situaciones y brindará herramientas tendientes a mejorar las medidas de prevención y control de la TBB.

Por otra parte, observamos que el monitoreo de LCT en faena y la posterior identificación del establecimiento de origen no resulta tan sencillo cuando se intenta llevar a la práctica bajo las actuales condiciones de trazabilidad de nuestro país. Conocer las limitaciones y situaciones reales que surgen en el control de la TBB en nuestra provincia brinda información práctica que nos debe permitir implementar las tecnologías más avanzadas sin descuidar las bases diagnósticas y epidemiológicas de la enfermedad y contribuir con las políticas tendientes a controlar y erradicar la enfermedad en nuestro territorio.



BIBLIOGRAFÍA

- Abdala, A.; Tarabla, H.; Bertero, S.; Torres, P. 1999. Vigilancia Epidemiológica de la tuberculosis bovina en el Departamento Castellanos, Santa Fe. *Revista Argentina de Microbiología*, 31(1): 13-14.
- Abdala, A.; Tarabla, H. 2002a. Estimación de la prevalencia de Tuberculosis bovina en el Departamento San Justo (Provincia de Córdoba, Argentina) a partir de información obtenida en frigoríficos. XIV Reunión de la Asociación Argentina de Veterinarios de Laboratorio de Diagnóstico, 14 y 15 de noviembre, Villa Gral. Belgrano, Córdoba, Argentina.
- Abdala, A.; Tarabla, H.; Bertero, S. 2002b. Estimación de la prevalencia de tuberculosis bovina en rodeos lecheros del departamento las colonias, Santa Fe. *Revista FAVE - Ciencias Veterinarias*, 1(1): 15-20.
- Abdala, A.; Tarabla, H.; Garbaccio, S.; Jorge, C.; Traversa, C.; Cataldi, A. 2006. Aislamiento de *Mycobacterium bovis* en fauna silvestre. Disponible en <http://www.producción-animal.com.ar/fauna/74-sanidad.pdf>.
- Aguilar, D.; Zumarraga, M.; Jiménez, R.; Gioffré, A.; Bernardelli, A; Orozco, H.; Cataldi, A. 2009. *Mycobacterium bovis* with different genotypes and from different hosts induce dissimilar immunopathological lesions in a mouse model of tuberculosis. *Clinical and Experimental Immunology*, 157(1): 139-147.
- Aguirre, A.; Fernandez, O.; Ferreyra, M.; Savini, A.; Poggio, G. 2007. Tuberculosis humana producida por *Mycobacterium bovis*. *Revista del tórax*, 8(15): 139-147.
- Ameni, G.; Aseffa, A.; Engers, H.; Young, D.; Hewinson, G.; Vordermeier, M. 2006. Cattle husbandry in Ethiopia is a predominant factor affecting the pathology of

bovine tuberculosis and gamma interferon responses to mycobacterial antigens. *Clinical and Vaccine Immunology*, 13(9): 1030–1036.

- Andreevskaia, S.; Chernousova, L.; Smirnova, T.; Larionova, E.; Kuzmin A. 2007. Impact of *Mycobacterium tuberculosis* genotype on survival in mice with experimental tuberculosis. *Problemy Tuberkuleza i Boleznei Legkikh*, (7): 45-50.
- Anexo resolución 949/12 Ministerio de la Producción de Santa Fe. Plan Regional de Control y Erradicación de la tuberculosis bovina, bubalina, ovina, caprina y porcina de la provincia de Santa Fe (en el marco de la resolución SENASA 128/12).
- Angala, S.; Belardinelli, J.; Huc-Claustre, E.; Wheat, W.; Jackson, M. 2014. The cell envelope glycoconjugates of *Mycobacterium tuberculosis*. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 49(5): 361-399.
- Aranaz, A.; Liebana, E.; Gómez-Mampaso, E.; Galan, J.; Cousins, D.; Ortega, A. 1999. *Mycobacterium tuberculosis subsp. caprae subsp. nov.*: a taxonomic study of a new member of the *Mycobacterium tuberculosis* complex isolated from goats in Spain. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 49(3): 1263-1273.
- Araújo, C.; Leite, C.; Prince, K.; Jorge, K.; Osório, R. 2005. *Mycobacterium bovis* identification by molecular method from post-mortem inspected cattle obtained in abattoirs of Mato Grosso do Sul, Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 100(7): 749-752.
- Asselineau, J.; Lanèelle, G. 1998. Mycobacterial lipids: a historical perspective. *Front Bioscience*, 1(3): 164-174.
- Barandiaran, S.; Martínez Vivot, M.; Falsoni, E.; Moras, E.; Cataldi, A., Zumárraga, M. 2011. Nuevos Spoligotipos de *Mycobacterium bovis* de aislamientos obtenidos de

cerdos de Argentina. XII Jornadas de Divulgación Técnico Científicas, Facultad de Ciencias Veterinarias, UNR, Argentina.

- Barnes, P.; Cave, M. 2003. Molecular epidemiology of tuberculosis. *New England Journal of Medicine*, 349(12):1149-1156.
- Barrera, L. 2008. Manual para el diagnóstico bacteriológico de tuberculosis. Normas y guía técnica, parte II cultivo. Organización Mundial de la Salud (OMS). Disponible en [http://www.sld.cu/galerias/pdf/sitios/tuberculosis/tb-labs-cultivo\[2\].pdf](http://www.sld.cu/galerias/pdf/sitios/tuberculosis/tb-labs-cultivo[2].pdf).
- Barrera, L.; Kantor, I. 1987. Nontuberculosis mycobacteria and *Mycobacterium bovis* as cause of human disease in Argentina. *Tropical and Geographical Medicine*, 39(3): 222-227.
- Benjamini, E.; Sunshine, G.; Leskowitz, S. 1996. *Immunology. A short course*. 3ed. Editorial Wiley-Liss, Nueva York, 299-314.
- Bezos, J.; Casal, C.; Garcia Fernandez, I.; Mateos Garcia, A. 2012. La respuesta inmunitaria frente a la tuberculosis en rumiantes domésticos. PV ALBEITAR. Disponible en: <http://albeitar.portalveterinaria.com/noticia/11081/>.
- Biffa, D.; Inangolet, F.; Bogale, A.; Oloya, J.; Djonne, B.; Skjerve, E. 2010. Risk factors associated with prevalence of tuberculosis-like lesions and associated mycobacteria in cattle slaughtered at public and export abattoirs in Ethiopia. *Tropical Animal Health and Production*, 43(2): 529–538.
- Blanco, F.; Bianco, M.; Meikle, V.; Garbaccio, S.; Vagnoni, L.; Cataldi, A.; Bigi, F. 2011. Respuesta inmune en terneros experimentalmente infectados con diferentes dosis de *Mycobacterium bovis*. *Revista de Investigaciones Agropecuarias*, 37(2): 189-192.

- Buddle, B.; Denis, M.; Aldwell, F.; Vordermeier, H.; Glyn Hewinson, R.; Wedlock, N. 2008. Vaccination of cattle with *Mycobacterium bovis* BCG by a combination of systemic and oral routes. *Tuberculosis (Edinburg, Scotland)* 88(6): 595-600.
- Buddle, B.; Livingstone, P.; de Lisle, G. 2009. Advances in ante-mortem diagnosis of tuberculosis in cattle. *New Zealand Veterinary Journal*, 57(4):173-180.
- Bulletin of the World Health Organization. 1994. Zoonotic tuberculosis (*Mycobacterium bovis*): memorandum from a WHO meeting (with the participation of FAO), 72(6): 851-857.
- Caminero Luna, J. 2003. Guía de la tuberculosis para médicos especialistas. Unión Internacional contra la Tuberculosis y Enfermedades Respiratorias (UICTER), Paris, Francia.
- Caminero, L. 2006. La erradicación de la Tuberculosis: ¿Mito o realidad? *Enfermedades Emergentes*, 8(4): 271-281.
- Casal, C.; Bezos, J.; Diez-Guerrier, A.; Alvarez, J.; Rodriguez-Campos, S.; Romero, B.; de Juan, L.; Mateos, A.; Linscott, R.; Martel, E.; Lawrence, J.; Aranaz, A.; Dominguez, L. 2012. New tools in the control and diagnostics of Bovine tuberculosis. 1st *Mycobacterium bovis* American Regional Conference, 19-22 de agosto, Merida, Yucatán, México.
- Cataldi, A.; Gioffré, M.; Santtangelo, P.; Alito, A.; Caimi, K.; Bigi, F.; Romano, M.; Zumárraga, M. 2002. La cepa de *M. bovis* que predomina en la Argentina es también predominante en las Islas Británicas: ¿la tuberculosis bovina provino de Inglaterra? *Revista Argentina de Microbiología*, 34(1): 1-6.

- Chávez, C.; Díaz, C.; González, R.; Otero, F.; Sepúlveda, N.; Salazar, D. 2004. Concordancia de la PCR y métodos rutinarios para el diagnóstico de tuberculosis bovina. *Veterinaria México*, 35(3): 225-236.
- Cicuta, E.; Zumárraga, M.; Alito, A.; Cataldi, A.; Romano, I. 2001. Tipificación molecular de aislamientos de *Mycobacterium bovis* del nordeste argentino. Disponible en <http://www1.unne.edu.ar/cyt/2001/4-veterinarias/v-006.pdf> 27/06/2014.
- Cleaveland, S.; Shaw, D.; Mfinanga, S.; Shirima, G.; Kazwala, R.; Eblate, E.; Sharp, M. 2007. *Mycobacterium bovis* in rural Tanzania: Risk factors for infection in human and cattle populations. *Tuberculosis*, 87(1): 30-43.
- Clemens, D. 1997. *Mycobacterium tuberculosis*: Bringing down the wall. *Trends Microbiology*, 5(10): 383-385.
- Collins, D.; Radford A.; de Lisle G.; Jacobe H. 1994. Diagnosis and epidemiology of bovine tuberculosis using molecular biological approaches. *Veterinary Microbiology*, 40(1-2): 83-90.
- Corner, L. 1990. Efficiency of inspection procedures for the detection of tuberculosis lesions in cattle. *Australian Veterinary Journal*, 67(11): 389-392.
- Corner, L. 1994. Post mortem diagnosis of *Mycobacterium bovis* infection in cattle. *Veterinary Microbiology*, 40(1-2): 53-63.
- Cosivi, O.; Grange, J.; Daborn, C.; Raviglione, M.; Fujikura, T.; Cousins, D. 1998. Zoonotic tuberculosis due to *Mycobacterium bovis* in developing countries. *Emerging Infectious Disease*, 4(1): 59-70.

- Cotran, R.; Kumar, V.; Collins, T. 2000. Patología estructural y funcional. 6ta Ed. Mc Graw Hill Interamericana, España.
- Cousins, D.; Roberts, J. 2001. Australia's campaign to eradicate bovine tuberculosis: the battle for freedom and beyond. *Tuberculosis*, 81(1-2): 5-15.
- Cousins, D.; Bastida, R.; Cataldi, A.; Quse, V.; Redrobe, S.; Dow, S.; Duignan, P.; Murray, A.; Dupont, C.; Ahmed, N.; Collins, D.; Butler, W.; Dawson, D.; Rodríguez, D.; Loureiro, J.; Romano, M.; Alito, A.; Zumarraga, M.; Bernardelli, A. 2003. Tuberculosis in seals caused by a novel member of the *Mycobacterium tuberculosis* complex: *Mycobacterium pinnipedii* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 53(5): 1305–1314.
- Dale, J.; Brittain, D.; Cataldi, A.; Cousins, D.; Crawford, J.; Driscoll, J.; Heersma, H.; Lillebaek, T.; Quitugua, T.; Rastogi, N.; Skuce, R.; Sola, C.; Van Soolingen, D.; Vincent, V. 2001. Spacer oligonucleotide typing of bacteria of the *Mycobacterium tuberculosis* complex: recommendations for standardised nomenclature. *International Journal of Tuberculosis and Lung Disease*, 5(3): 216-219.
- De la Rúa-Domenech, R.; Goodchildb, A.; Vordermeier, H.; Hewinson, R.; Christiansenb, K.; Clifton-Hadleyd, R. 2006. Ante mortem diagnosis of tuberculosis in cattle: A review of the tuberculin tests, γ -interferon assay and other ancillary diagnostic techniques. *Research in Veterinary Science*, 81(2): 190–210.
- Doherty, M.; Monaghan, M.; Bassett, H.; Quinn, P.; Davis, W. 1996. Effect of dietary restriction on cell-mediated immune responses in cattle infected with *Mycobacterium bovis*. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 49(4): 307-320.

- Dorronsoro, I.; Torroba, L. 2007. Microbiología de la tuberculosis. Anales del Sistema Sanitario de Navarra, 30(2): 67-84.
- Dunn, P.; North, R. 1995. Virulence ranking of some *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium bovis* strains according to their ability to multiply in the lungs, induce pathology, and cause mortality in mice. Infection and Immunity, 63(9): 3428-3437.
- Elias, K.; Hussein, D.; Asseged, B.; Wondwossen, T.; Gebeyehu, M. 2008. Status of bovine tuberculosis in Addis Ababa dairy farms. Revue scientifique et technique (International Office of Epizootics), 27(3): 915-923.
- Etchechoury, G.; Echeverría V.; Morcillo, N.; Sequeira, M.; Imperiale, B.; López, M.; Caimi, K.; Zumárraga, M.; Cataldi, A.; Romano, M. 2010. Molecular typing of *Mycobacterium bovis* isolates in Argentina: first description of a person-to-person transmission case. Zoonoses and Public Health, 57(6): 375–381.
- Fisanotti, J.; Alito, A.; Bigi, F.; Latini, O.; Roxo, E.; Cicuta, E.; Zumarraga, M.; Cataldi, A.; Romano, I. 1998. Molecular epidemiology of *Mycobacterium bovis* isolates from South America. Veterinary Microbiology, 60(2-4): 251-257.
- Frothingham, R.; Meeker-O'Connell, W. 1998. Genetic diversity in the *Mycobacterium tuberculosis* complex based on variable numbers of tandem DNA repeats. Microbiology, 144(5): 1189–1196.
- Frothingham, R.; Strickland, P.; Bretzel, G.; Ramaswamy, S.; Musser, J.; Williams, D. 1999. Phenotypic and genotypic characterization of *Mycobacterium africanum* isolates from West Africa. Journal of Clinical Microbiology, 37(6): 1921-1926.

- Garbaccio, S.; Macias, A.; Shimizu, E.; Paolicchi, F.; Pezzone, N.; Magnano, G.; Zapata, L.; Abdala, A.; Tarabla, H.; Peyru, M.; Caimi, K.; Zumárraga, M.; Canal, A.; Cataldi, A. 2014. Association between spoligotype-VNTR types and virulence of *Mycobacterium bovis* in cattle. *Virulence*, 5(2): 297-302.
- Garro, C.; Morris, W.; Delgado, F.; Garbaccio, S. 2011. Tuberculosis bovina en terneros. *Veterinaria Argentina*, 28(276): 35-45.
- Gil, O.; Díaz, I.; Vilaplana, C.; Tapia, G.; Díaz, J. 2010. Granuloma encapsulation is a key factor for containing tuberculosis infection in minipigs. *PLoS One Biology*, 5(4): e1030.
- Gilbert, M.; Mitchell, A.; Bourn, D.; Mawdsley, J.; Clifton-Hadley, R.; Wint, W. 2005. Cattle movements and bovine tuberculosis in Great Britain. *Nature*, 435: 491–496.
- Gopal, R.; Goodchild, A.; Hewinson, G.; De la Rua-Domenech, R.; Clifton-Hadley, R. 2006. Introduction of bovine tuberculosis to north-east England by bought-in cattle. *Veterinary Record*, 159(9): 265–271.
- Gormley, E.; Doyle, M.; Fitzsimons, T.; McGill, K.; Collins, J. 2006. Diagnosis of *Mycobacterium bovis* infection in cattle by use of the gamma-interferon (Bovigam) assay. *Veterinary Microbiology*, 112(2-4):171-179.
- Green, D.; Kiss, I.; Mitchell, A.; Kao, R. 2008. Estimates for local and movement-based transmission of bovine tuberculosis in British cattle. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Science*, 275(1638): 1001-1005.
- Griffin, J.; Hahsey, T.; Lynch, K.; Salman, M.; Mccarthy, J.; Hurley, T. 1993. The association of cattle husbandry practices, environmental factors and farmer

characteristics with the occurrence of chronic bovine tuberculosis in dairy herds in the Republic of Ireland. *Preventive Veterinary Medicine*, 17(3-4): 145-160.

- Hesseling, A.; Marais, B.; Kirchner, H.; Mandalakas, A.; Brittle, W.; Victor, T.; Warren, R.; Schaaf, H. 2010. Mycobacterial genotype is associated with disease phenotype in children. *International Journal of Tuberculosis and lung disease*, 14(10): 1252–1258.
- Hines, M.; Kreeger, J.; Herron, A. 1995. Mycobacterial infections of animals: pathology and pathogenesis. *Laboratory Animal Science*, 45(4): 334-351.
- Horstkotte, M.; Sobottka, I.; Schewe, C.; Schäfer, P.; Laufs, R.; Rüscher-Gerdes, S.; Niemann, S. 2001. *Mycobacterium microti* llama-type infection presenting as pulmonary tuberculosis in a human immunodeficiency virus-positive patient. *Journal of Clinical Microbiology*, 39(1): 406-407.
- Humblet, M.; Boschioli, M.; Saegerman, C. 2009. Classification of worldwide bovine tuberculosis risk factors in cattle: a stratified approach. *Veterinary Research*, 40(5): 50.
- Imperiale, B.; Zumárraga, M.; Gioffré, A.; Di Giulio, B.; Cataldi, A.; Morcillo, N. 2012. Disease caused by non-tuberculous mycobacteria: diagnostic procedures and treatment evaluation in the North of Buenos Aires Province. *Revista Argentina de Microbiología*, 44(1): 3-9.
- Instituto Panamericano de Protección de alimentos y Zoonosis-INNPAZ. 1993. Manual de normas y procedimientos técnicos para la bacteriología de la tuberculosis. Comité Asesor de la OPS/OMS en Bacteriología de la Tuberculosis, Martínez, Buenos Aires, Argentina.

- Jorge, C.; Alito, A.; Bernardelli, A.; Canal, A.; Cataldi, A.; Cicuta, M.; Gentile, F.; Kistermann, J.; Magnano, G.; Martinez Vivot, M.; Oriani, S.; Paolicchi, F.; Romano, I.; Schneider, M.; Torres, P.; Zumárraga, J. 2005. Manual de diagnóstico de Micobacterias de importancia en medicina veterinaria. Comisión Científica de Micobacterias. 1ed. Imprenta Acosta Hnos. Santa Fe, Argentina.
- Jubb, K.; Kennedy, P.; Palmer, N. 2007. Pathology of Domestic Animals. 5ed. Tomo 2. Elsevier Saunders, 606-610.
- 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.
- Kaneene, J.; Miller, R.; Meyer, R. 2006. Abattoir surveillance: the U.S. experience. *Veterinary Microbiology*, 112(2-4): 273-282.
- Kantor, I.; Bernardelli, A. 1986. Manual de instrucciones. Procesamiento y cultivo de muestras para la identificación de *Mycobacterium tuberculosis* y *M. bovis*. Dirección de diagnóstico y control técnico. DILACOT- SENASA, Buenos Aires, Argentina.
- Kantor, I.; Ritacco, V. 2006. An update on bovine tuberculosis programmes in Latin American and Caribbean countries. *Veterinary Microbiology*, 112(2-4): 111-118.
- Kantor, I.; Ambroggi, M.; Poggi, S.; Morcillo, N.; Da Silva, M.; Telles, M.; Ribeiro, O.; Torres, M.; Polo, C.; Ribón, W.; García, V.; Kuffo, D.; Asencios, L.; Vásquez, L.; Rivas, C.; de Waard, J. 2008. Human *Mycobacterium bovis* infection in ten Latin American countries. *Tuberculosis*, 88(4): 358-360.

- Kathleen, A.; Laver, A.; Michel, A.; Williams, M.; van Helden, P.; Warren, R.; van Pittius, N. 2010. Novel *Mycobacterium tuberculosis* complex pathogen, *M. mungi*. *Emerging Infectious Diseases*, 16(8): 1296-1299.
- Kent, L.; Mc Hugh, T.; Billington, O.; Dale, J.; Gillespie, S. 1995. Demonstration of homology between IS6110 of *Mycobacterium tuberculosis* and DNAs of other *Mycobacterium spp.* *Journal of Clinical Microbiology*, 33(9): 2290-2293.
- Kremer, K.; Kam Yan Au, B.; Chi Wai Yip, P.; Skuce, R.; Supply, P.; Man Kam, K.; van Soolingen, D. 2005. Use of variable-number tandem-repeat typing to differentiate *Mycobacterium tuberculosis* Beijing family isolates from Hong Kong and comparison with IS6110 restriction fragment length polymorphism typing and spoligotyping. *Journal of Clinical Microbiology*, 43(1): 314–320.
- Kremer, K.; Van Soolingen, D.; Van Embden, J.; Hughes, S.; Inwald, J.; Hewinson, G. 1998. *Mycobacterium microti*: more widespread than previously thought. *Journal of Clinical Microbiology*, 36(9): 2793-2794.
- Lopez, B.; Aguilar, D.; Orozco, H.; Burger, M.; Espita, C.; Ritacco, V.; Barrera, I.; Kremer, K.; Hernandez, R.; Huygen, K.; Van Soolingen, D. 2003. A marked difference in pathogenesis and immune response induced by different *Mycobacterium tuberculosis* genotypes. *Clinical and Experimental Immunology*, 133(1): 30–37.
- Macias A.; Magnano; G.; Giraudo; J.; Schneider, M.; Maciό; M.; Sticotti; E., Zapata; L., Zumárraga; M.; Cataldi, A. 2010. Tipificación molecular de aislamientos de *Mycobacterium bovis* en bovinos de la provincia de Córdoba, Argentina. XVIII

Reunión Científico Técnica de la Asociación Argentina de Veterinarios de Laboratorio de Diagnóstico 3-5 de noviembre, Mercedes, Corrientes, Argentina.

- Magnano, G.; Schneider, M.; Giraudó, J.; Bérghamo, E.; Macías, A.; Sticotti, E.; Macío, M.; Pérez Zabala, V.; Centorbi, C. 2008a. Evaluación en la transmisión de la tuberculosis bovina en un rodeo de cría. XVIII Reunión Científica Técnica de la Asociación Argentina de Veterinarios de Laboratorios de Diagnóstico, 29-31 de octubre, Santa Fe, Argentina.
- Magnano, G.; Zapata, L.; Macías, A.; Schneider, M.; Bérghamo, E.; Giraudó, J.; Schleef, N.; Ferreira, A.; Vega, P.; Macío, M.; Sticotti, E.; Bernardelli, A. 2008b. Vigilancia Epidemiológica de la Tuberculosis Bovina por medio de la faena en un frigorífico de Córdoba, Argentina. III Congreso Latinoamericano de Zoonosis 18-20 de junio, Buenos Aires, Argentina.
- Magnano, G.; Macías, A.; Giraudó, J.; Schneider, M.; Macío, M.; Sticotti, E.; Zapata, L.; Alvarez, C. 2010. Vigilancia epidemiológica en frigorífico como apoyo al saneamiento en campos infectados por tuberculosis. XVIII Reunión Científico Técnica de la Asociación Argentina de Veterinarios de Laboratorio de Diagnóstico 3-5 de noviembre, Mercedes, Corrientes, Argentina.
- Magnano, G.; Schneider, M.; Macías, A.; Sticotti, E.; Pérez Zavala, V.; Giraudó, J.; Macío, M.; Zumarraga, M. 2011. Eliminación de micobacterias por vía respiratoria en bovinos positivos a la prueba tuberculínica. V Jornada Científico Técnica de la Facultad de Agronomía y Veterinaria, 1 de abril, UNRC, Río Cuarto, Córdoba, Argentina.

- Magnano, G.; Schneider, M.; Bérnago, E.; Lovera, H.; Navarro, F.; Macías, A.; Sticotti, E.; Mació, M.; Giraudo, J. 2012. Evaluación de brucelosis y tuberculosis bovina en establecimientos de cría y tambo de la región centro de Argentina. *Veterinaria Argentina*, 29(290): 1-10.
- Magnano, G.; Macías, A.; Zapata, L.; Schneider, M.; Bérnago, E.; Sticotti, E.; Mació, M.; Rodrigo, I.; Sanchez, M.; Alonso, B.; Giraudo, J. 2013. Evaluación de la sensibilidad de dos técnicas serológicas de ELISA en el diagnóstico de la tuberculosis bovina. XXXII Jornadas de Actualización en Ciencias Veterinarias, 18-20 de octubre, Colegio Médico Veterinario de la provincia de Córdoba, Argentina.
- Manabe, Y.; Dannenberg, A.; Tyagi, S.; Hatem, C.; Yoder, M.; Woolwine, C.; Zook, B.; Pitt, M.; Bishai, W. 2003. Different strains of *Mycobacterium tuberculosis* cause various spectrums of disease in the rabbit model of tuberculosis. *Infection and Immunity*, 71(10): 6004–6011.
- Meikle, V.; Schneider, M.; Azenzo, G.; Zumárraga, M.; Magnano, G.; Cataldi, A. 2007. Individual animals of a cattle herd infected with the same *Mycobacterium bovis* genotype shows important variations in bacteriological, histopathological and immune response parameters. *Zoonoses Public Health*, 54(2): 86-93.
- Meikle, V.; Bianco, M.; Blanco, F.; Gioffré, A.; Garbaccio, S.; Vagnoni, L.; Di Rienzo, J.; Canal, A.; Bigi, F.; Cataldi, A. 2011. Evaluation of pathogenesis caused in cattle and guinea pig by a *Mycobacterium bovis* strain isolated from wild boar. *BMC Veterinary Research*, 7(37): 1-7.
- Menin, A.; Fleith, R.; Reck, C.; Marlow, M.; Fernandes, P.; Pilati, C.; Báfica, A. 2013. Asymptomatic Cattle Naturally Infected with *Mycobacterium bovis* Present

Exacerbated Tissue Pathology and Bacterial Dissemination. *Plos One Biology*, 8(1): e53884.

- Menzies, F.; Neill, S. 2000. Cattle-to-cattle transmission of bovine tuberculosis. *The Veterinary Journal*, 160(2): 92-106.
- Michel, A.; Borna, M.; van Helden, P. 2010. *Mycobacterium bovis* at the animal–human interface: A problem, or not? *Veterinary Microbiology*, 140(3-4): 371–381.
- Monaghan, M.; Doherty, M., Collins, J.; Kazda, J.; Quinn, P. 1994. The tuberculin test. *Veterinary Microbiology*, 40(1-2):111-124.
- Monies, R.; Head, J. 1999. Bovine tuberculosis in housed calves. *Veterinary Record*, 145(25): 743.
- Morales, A.; Martinez, I.; Carlos, A.; Alvarez, G.; Alvarez, M.; Maldonado, J. 2005. Comparación de histopatología, cultivo y PCR en el diagnóstico de la tuberculosis bovina. *Revista científica FCV-LUZ*, 15(2): 103-108.
- Müller, B.; Dürr, S.; Alonso, S.; Hattendorf, J.; Laisse, C.; Parsons, S.; van Helden, P.; Zinsstag, J. 2013. Zoonotic *Mycobacterium bovis*–induced tuberculosis in humans. *Emerging Infectious Diseases* 19(6): 899-908.
- Müller, B.; Steiner, B.; Bonfoh, B.; Fane, A.; Smith, N.; Zinsstag, J. 2008. Molecular characterisation of *Mycobacterium bovis* isolated from cattle slaughtered at the Bamako abattoir in Mali. *BMC Veterinary Research*, 4(26): 1-6.
- Murray, P.; Kobayashi, G.; Pfaller, M.; Rosenthal, K. 1999. *Microbiología Médica*. 2ed. Capítulo 35: *Mycobacterium*. Editorial Harcourt Brace.
- Nishibe, C.; Canevari, A.; Dalla Costa, R.; Pinto, B.; Varuzza, L.; Cataldi, A.; Bernardelli, A.; Bigi, F.; Blanco, F.; Zumárraga, M.; Almeida, N.; Araújo, F. 2013.

Draft genome sequence of *Mycobacterium bovis* 04-303, a highly virulent strain from Argentina. *Genome Announcement*, 1(6): 913-931.

- OIE (World Organization for Animal Health), 2004. Annual Animal Disease Status, Bovine Tuberculosis. <http://www.oie.int>.
- OIE Terrestrial Manual. 2012. Capítulo 2.4.7. Bovine Tuberculosis.
- OIE Procedure for Registration of Diagnostic Kits- Abstract sheet 2012. IDEXX Laboratories – MBAT Kit.
- OIE bolletín. 2013. El concepto “Una sola salud” enfoque de la OIE. Disponible en <http://www.oie.int/fileadmin/Home/esp/Publications>
- OMS. 2013. Manual de bioseguridad en el laboratorio de tuberculosis. Disponible en http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/92661/1/9789243504636_spa.pdf
- Palmer, M.; Waters, W.; Thacker, T. 2007. Lesion development and immunohistochemical changes in granulomas from cattle experimentally infected with *Mycobacterium bovis*. *Veterinary Pathology*, 44(6): 863- 874.
- Perez, A.; Ward, M.; Torres, P.; Ritacco, V. 2002. Use of spatial statistics and monitoring data to identify clustering of bovine tuberculosis in Argentina. *Preventive Veterinary Medicine*, 56(1): 63-74.
- Pollock, J.; Douglas, A.; Mackie, D.; Neill, S. 1994. Identification of bovine T-cell epitopes for three *Mycobacterium bovis* antigens: MPB70, 19,000 MW and MPB57. *Immunology*, 82(1): 9–15.
- Pollock, J; Neill, S. 2002. *Mycobacterium bovis* infection and tuberculosis in cattle. *Veterinary Journal*, 163(2): 115-127.

- Porphyre, T.; Stevenson, M.; McKenzie, J. 2008. Risk factors for bovine tuberculosis in New Zeland cattle and their relationship with possum control strategies. *Preventive Veterinary Medicine*, 86(1-2): 93-106.
- Radunz, B. 2006. Surveillance and risk management during the latter stages of eradication: experiences from Australia. *Veterinary Microbiology*, 112(2-4): 283-290.
- Ramírez-Villaescusa, A.; Medley, G.; Mason, S.; Green, L. 2010. Risk factors for herd breakdown with bovine tuberculosis in 148 cattle herds in the south west of England. *Preventive Veterinary Medicine*, 95(3-4): 224-230.
- Rivas, C.; Greif, G.; Coitinho, C.; Araújo, L.; Laserra, P.; Robello, C. 2012. Primeros casos de tuberculosis pulmonar por *Mycobacterium bovis*. *Revista Médica Uruguay*, 28(3): 209-214.
- Robbe-Austerman, S.; Bravo, D.; Harris, B. 2013. Comparison of the MGIT 960, BACTEC 460 TB and solid media for isolation of *Mycobacterium bovis* in United States veterinary specimens *BMC Veterinary Research*, 9(74): 2-6.
- Runyon, P. 1959. Anonymous mycobacteria in pulmonary disease. *The medical clinics of North America*, 43(1): 273- 277.
- Russell, D. 2007. Who puts the tubercle in tuberculosis? *Nature Reviews Microbiology*, 5(1): 39-47.
- Schiller, I.; Oesch, O.; Vordermeier, H.; Palmer, M.; Harris, B.; Orloski, K.; Buddle, B.; Thacker, T.; Lyashchenko, K.; Waters, W. 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*, 57(4): 205–220.

- Schneider, M.; Macías, A.; Magnano, G.; Bérnago, E.; Zumarraga, M.; Pérez Zavala, V.; Sticotti, E.; Giraudo, J. 2007. Eliminación de micobacterias por leche en bovinos reactivos a la prueba tuberculínica. XI Congreso Argentino de Microbiología, 10, 11 y 12 de octubre, Córdoba, Argentina.
- Secretaría de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentación. Departamento de Lechería. 1996. “Principales Cuencas Lecheras Argentinas” SAGPyA, Argentina.
- SENASA Resolución N° 87/09: Nuevos procedimientos de actualización electrónica de la información. Implementación. Disponible en <http://www.senasa.gov.ar>
- SENASA. 1993. Plan Nacional de Control y Erradicación de la Tuberculosis Bovina. Resol. 1287/93. SENASA, Buenos Aires, Argentina.
- SENASA. 2012. Resolución 128/12 Plan Nacional de Control y Erradicación de la Tuberculosis Bovina en la República Argentina, Buenos Aires, Argentina.
- SENASA, 2014. Existencias bovinas: Elaborado por la Dirección de Control de Gestión y Programas especiales, SIGSA disponible en la base de datos de www.senasa.gov.ar.
- Sepúlveda, A.; García-Martos, P.; Rodríguez, M.; Márquez, A.; Puerto, J.; Salderreaga, A. 2001. Evaluación del medio de Stonebrink para la recuperación de micobacterias. *Revista de Diagnóstico Biológico*, 50(4): 189-192.
- Shimizu, E.; Macías, A.; Paolicchi, F.; Magnano, G.; Zapata, L.; Fernández, A.; Canal, A.; Garbaccio, S.; Cataldi, A.; Caimi, K.; Zumárraga, M. 2014. Genotyping

Mycobacterium bovis from cattle in the Central Pampas of Argentina: temporal and regional trends. *Memorias Instituto Oswaldo Cruz*, 109(2): 236-245.

- Smith, N.; Berg, S.; Dale, J.; Allen, A.; Rodriguez, S.; Romero, B.; Matos, F.; Ghebremichael, S.; Karoui, C.; Donati, C.; Machado, A.; Mucavele, C.; Kazwala, R.; Hilty, M.; Cadmus, S.; Ngandolo, B.; Habtamu, M.; Oloya, J.; Muller, A.; Milian-Suazo, F.; Andrievskaia, O.; Projahn, M.; Barandiaran, S.; Macías, A.; Muller, B.; Zanini, M.; Ikuta, C.; Rosales Rodriguez, C.; Pinheiro, S.; Figueroa, A.; Cho, S.; Mosavari, N.; Chuang, P.; Jou, R. 2011. European 1: A globally important clonal complex of *Mycobacterium bovis*. *Infection, Genetics and Evolution*, 11(6): 1340–1351.
- Software estadístico R projet. Disponible en www.r-projet.org.
- Soldá, P.; Rojo, S.; Cosiansi, M.; Barnes, A. 2005. Frecuencia de tuberculosis pulmonar y extrapulmonar en un hospital de referencia de la provincia de Córdoba, 1991-2003. *Revista de Microbiología*, 37(2): 89-91.
- Supply, P.; Allix, C.; Lesjean, S.; Cardoso-Oelemann, M.; Rusch-Gerdes, S.; Willery, E.; Savine, E.; Haas, P.; Deutekom, H.; Roring, S.; Bifani, P.; Kurepina, N.; Kreiswirth, B.; Sola, C.; Rastogi, N.; Vatin, V.; Gutierrez, M.; Fauville, M.; Niemann, S.; Skuce, R.; Kremer, K.; Locht, C.; 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.

- Thoen, C.; Bloom, B. 1995. Pathogenesis of *Mycobacterium bovis*. En *Mycobacterium bovis* infections in animals and humans. Thoen. C. and Bloom, J. 1ed. Editorial Iowa State University Press, USA, 3-14.
- Tizard, I. 2000. Type IV hypersensitivity: delayed hypersensitivity. En *Veterinary Immunology: An introduction*. 6ta edición. Ed. W.B. Saunder Company, USA, 343-347
- Torres, P.; Perez, A.; Andrada, M.; Riart, G.; Sarradell, J.; Gomez Ezquerro, C. 1998. Estudio de prevalencia de Tuberculosis bovina evaluada por inspección macroscópica de los animales faenados en los frigoríficos con inspección federal de la República Argentina en el período marzo 1995- febrero 1997. 2º Congreso Argentino de Zoonosis. 13 de abril, Buenos Aires, Argentina.
- Torres, P. 2010. Las pruebas tuberculínicas en el ganado bovino. Disponible en <http://www.senasa.gov.ar>.
- Torres, P. 2011. Situación actual de la tuberculosis bovina en la República Argentina. Disponible en <http://www.senasa.gov.ar>
- Torres, P. 2013. Situación de la Tuberculosis Bovina en la República Argentina. Diagnóstico y control de enfermedades producidas por micobacterias: Tuberculosis y Paratuberculosis. 10-13 de septiembre, Buenos Aires, Argentina.
- Van Ingen, J.; Rahim, Z.; Mulder, A.; Boeree, M.; Simeone, R.; Brosch, R.; van Soolingen, D. 2012. Characterization of *Mycobacterium orygis* as *M. tuberculosis* Complex Subspecies. *Emerging Infectious Diseases*, 18(4): 653-655.
- Van Soolingen, D.; Haas, W.; Haagsma, J.; Eger, T.; Hermans, P.; Ritacco, V; Alito, A.; Embden, A. 1994. Use of various genetic markers in differentiation of

Mycobacterium bovis strains from animals and humans and for studying epidemiology of bovine tuberculosis. *Journal of Clinical Microbiology*, 32(10): 2425-2433.

- Van Soolingen, D.; Hoogenboezem, T.; de Haas, P. 1997. A novel pathogenic taxon of the *Mycobacterium tuberculosis* complex, Canetti: characterization of an exceptional isolate from Africa. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 47(4): 1236–1245.
- 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*, 20(2): 164–169.
- Volkman, H.; Clay, H.; Beery, D.; Chang, J.; Sherman, D. 2004. Tuberculous granuloma formation is enhanced by a *Mycobacterium* virulence determinant. *PLoS Biology*, 2(11): e367.
- Vordermeier, H.; Chambers, M.; Cockle, P.; Whelan, A.; Simmons, J.; Hewinson, R. 2002. Correlation of ESAT-6-specific gamma interferon production with pathology in cattle following *Mycobacterium bovis* BCG vaccination against experimental bovine tuberculosis. *Infection and Immunity*, 70(6): 3026-3032.
- 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, (WC1+) T cells and CD68+ cells. *Journal of Comparative Pathology*, 133(4): 223-234.

- Waters, W.; Buddle, B.; Vordermeier, H.; Gormley, E.; Palmer, M.; Thacker, T.; Bannantine, J.; Stabel, J.; Linscott, R.; Martel, E.; Milian, F.; Foshaug, W.; Lawrence, J. 2011. Development and evaluation of an enzyme-linked immunosorbent assay for use in the detection of bovine tuberculosis in cattle. *Clinical Vaccine Immunology*, 18(11): 1882–1888.
- Welsh, M. 1995. Effects of bovine viral diarrhoea virus/mucosal disease virus on the functional properties of bovine mononuclear cells. Ph.D. Thesis. Belfast: Queen's University of Belfast.
- Welsh, M.; Cunningham, R.; Corbett, D.; Girvin, R.; McNair, J.; Skuce, R.; Bryson, D.; Pollock, J. 2005. Influence of pathological progression on the balance between cellular and humoral immune responses in bovine tuberculosis. *Immunology*, 114(1): 101–111.
- Whipple, D.; Boli, C.; Miller, J. 1996. Distribution of lesions in cattle infected with *Mycobacterium bovis*. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 8(3): 351-354.
- Wood, P.; Corner, L.; Rothel, J.; Baldock, C.; Jones, S.; Cousins, D.; McCormick, B.; Francis, B.; Creeper, J.; Tweddle, N. 1991. Field comparison of the interferon-gamma assay and the intradermal tuberculin test for the diagnosis of bovine tuberculosis. *Australian Veterinary Journal*, 68(9): 286-90.
- World Organisation for Animal Health (WHO). 2013. Terrestrial Animal Health Code VOLUME II. Bovine Tuberculosis. Chapter 11.6. Ed. 22.
- Wright, D.; Allen, A.; Mallon, T.; McDowell, S.; Bishop, S.; Glass, E.; Bermingham, M.; Woolliams, J.; Skuce, R. 2013. Field-isolated genotypes of *Mycobacterium bovis*

vary in virulence and influence case pathology but do not affect outbreak size. PLoS ONE 8(9): e74503.

- Xavier, F.; Seagar, A.; Doig, C.; Rayner, A.; Claxton, P.; Laurenson, I. 2007. Human and animal infections with *Mycobacterium microti*. Emerging Infectious Diseases, 13(12): 1924-1927.
- Zumárraga, M.; Martín, C.; Samper, S.; Alito, A.; Latini, O.; Bigi, F.; Roxo, E.; Cicuta, E.; Errico, F.; Ramos, M.; Cataldi, A., van Soolingen, D.; Romano, I. 1999. Usefulness of spoligotyping in molecular epidemiology of *Mycobacterium bovis* related infections in South America. Journal of Clinical Microbiology, 37(2): 269-303.
- Zumárraga, M.; Garbaccio, S.; Rodríguez, L.; Huertas, P.; Shimizu, E.; Morcella, C.; Paolicchi, F.; Abdala, A.; Tarabla, H.; Macías, A.; Magnano, G.; Schneider, M.; Pezzone, N.; Marini, R.; Canal, A.; Fernández, A.; Barandiaran, S.; Martínez Vivot, M.; Cataldi, A. 2010. Spoligotipos de aislamientos de *M. bovis* obtenidos entre 2008-2010. XVIII Reunión Científico Técnica de la AAVLD, 3-5 de noviembre, Mercedes, Corrientes, Argentina.
- Zumárraga, M.; Soutullo, A.; Garcia, M.; Marini, R.; Abdala, A.; Tarabla, H.; Echaide, S.; López, M.; Zervini, E.; Canal, A.; Cataldi, A. 2012. Detection of *Mycobacterium bovis*-infected dairy herds using PCR in bulk tank milk samples. Foodborne Pathogens and Disease, 9(2): 132-137.
- Zumárraga, M.; Arriaga, C.; Barandiaran, S.; Cobos-Marín, L.; de Waard, J.; Estrada-García, I.; Figueiredo, T.; Figueroa, A.; Giménez, F.; Gomes, H.; Gonzalez y Merchand, J.; Macías, A.; Milián-Suazo, F.; Rodríguez, C.; Santillán, M.; Suffys, P.;

Trangoni, M.; Zárraga, A.; Cataldi, A. 2013. Understanding the relationship between *Mycobacterium bovis* spoligotypes from cattle in Latin American Countries. *Research in Veterinary Science*, 94(1): 9–21.