

MAGNANO, GABRIEL GUS

Evaluacion de tecnic

73961

2015

73961



DOCTORADO EN CIENCIA, TECNOLOGÍA E INNOVACIÓN AGROPECUARIA

TRABAJO DE TESIS

“Evaluación de técnicas diagnósticas en tuberculosis caprina en áreas con alta y baja prevalencia de la región central de la República Argentina”

M.V. GABRIEL GUSTAVO MAGNANO

Director: JAVIER SANCHEZ

Co-Directora: VIRGINIA MEIKLE

Consejero de tesis: JOSÉ MARÍA RAVIOLO

*DEPARTAMENTO DE PATOLOGÍA ANIMAL
FACULTAD DE AGRONOMÍA Y VETERINARIA
UNIVERSIDAD NACIONAL DE RÍO CUARTO*

-Río Cuarto, Abril del 2015-

73801

MFN:
Classif:
T.928

INDICE

INTRODUCCIÓN	13
Introducción general sobre la tuberculosis	13
Situación de la tuberculosis en caprinos	13
Etiología de la tuberculosis	15
Micobacterias aisladas en caprinos	22
Signos clínicos	24
Patología macroscópica de la tuberculosis	26
Patología macroscópica de la tuberculosis en caprinos	28
Patología microscópica de la tuberculosis	32
Patología microscópica de la tuberculosis en caprinos	34
Inmunopatogenia	35
Comparación de técnicas diagnósticas	39
HIPÓTESIS	49
OBJETIVO GENERAL	49
Objetivos específicos	49
MATERIALES Y MÉTODOS	50
Establecimientos y tipo de producción	50
Muestreo	51
Pruebas diagnósticas	55
Técnica para evaluar la inmunidad celular	56
Prueba tuberculínica intradérmica (IDR)	56
Tuberculina	56
Procedimientos para la aplicación de la tuberculina	56
Lectura de la prueba e interpretación de los resultados	57

Técnicas para evaluar la inmunidad humoral	58
ELISA IDEXX	59
ELISA BIONOTE	61
TR Anigen	62
Inspección <i>post mortem</i>	63
Bacteriología	65
Toma de muestra para el diagnóstico bacteriológico	65
Tratamiento de la muestra previo al cultivo	65
Método de Petroff	66
Cultivo en medios selectivos para micobacterias	66
Medio de Löwenstein-Jensen	66
Medio de Stonebrink	66
Siembra en los medios de cultivo	67
Tinción de Ziehl Neelsen previo a la siembra	68
Tipificación por biología molecular	69
Histopatología	70
Toma de muestra para el diagnóstico histopatológico	70
Diagnóstico histopatológico	70
Elección de la prueba de oro	70
Clasificación de los animales	71
Análisis estadístico	71
RESULTADOS	73
Relación entre hallazgos patológicos microscópicos y cultivos bacterianos ..	73
Relación entre la IDR e infección	74
Relación entre la prueba serológica ELISA BIONOTE e infección	76

Relación entre la prueba serológica TR Anigen e infección	77
Relación entre la prueba serológica ELISA IDEXX e infección	78
Relación entre la presencia de lesiones macroscópicas y la condición sanitaria	78
Relación entre la IDR y las técnicas serológicas ELISA BIONOTE y TR Anigen.....	80
Relación entre ELISA BIONOTE y TR Anigen	81
Pruebas de ELISA BIONOTE y TR Anigen según las características de las lesiones macroscópicas	82
Bacteriología: cultivo de micobacterias, Tinción de Z-N presiembra y tipificación por medios moleculares	83
DISCUSIÓN	85
CONCLUSIONES	106
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	108

Evaluación de técnicas diagnósticas en tuberculosis caprina en áreas con alta y baja prevalencia de la región central de la República Argentina”

Fe de erratas:

Página 7. Donde dice: “... de los cuales 31 eran positivos a la IDR...” debe decir “... de los cuales **41** eran positivos a la IDR....”

Página 9 y página 106. Donde dice: “... las técnicas serológicas demostraron un alto valor predictivo negativo comparadas con la IDR...” debe decir “... las técnicas serológicas demostraron una mayor especificidad comparadas con la IDR...”

GLOSARIO

AI: animales infectados

ANI: animales no infectados

BAAR: bacilos ácido alcohol resistentes

CEPANZO: Centro Panamericano de Zoonosis

ELISA IDEXX: Técnica de Enzimo inmuno análisis indirecto IDEXX *M. bovis*

ELISA BIONOTE: Técnica de Enzimo inmuno análisis directo BIONOTE

Anigen BTB Ab ELISA 2.0

ES: especificidad

FAV: Facultad de Agronomía y Veterinaria

IDR: prueba tuberculínica de intradermorreacción

INTA: Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria

OIE: Organización Mundial de Sanidad Animal

PTBC: paratuberculosis

SE: sensibilidad

SENASA: Servicio Nacional de Sanidad Animal y Calidad Agroalimentaria

SI: sistema inmune

TBC: tuberculosis

TR Anigen: Test rápido inmunocromatográfico, Anigen Rapid Bovine TB Ab
Test, Bionote, Inc.

ufc: unidad formadora de colonias

UNRC: Universidad Nacional de Río Cuarto

WHO: Organización Mundial de la Salud

zAP: zona de alta prevalencia

zBP: zona de baja prevalencia

RESUMEN

La importancia del estudio de la tuberculosis en cabras radica principalmente en la transmisión de la enfermedad al hombre, como también hacia los bovinos y a otras especies con las que convive e interviene en mantener la enfermedad.

La especie caprina es susceptible a la infección por diferentes micobacterias, siendo *Mycobacterium bovis* y *M. caprae* los agentes involucrados en la mayoría de los casos clínicos.

La patología se presenta desde alteraciones granulomatosas clásicas hasta cavernas pulmonares que pueden comprometer la vida del animal.

La prueba oficial reconocida es la técnica tuberculínica intradérmica (IDR) y todo animal que resulte positivo, debe ser enviado a faena. Existen técnicas serológicas que complementan el diagnóstico.

Debido a que en Argentina no se han desarrollado trabajos científicos destinados a evaluar la técnica oficial de IDR en caprinos, como tampoco de pruebas serológicas, la importancia del presente proyecto radicó en contar con información práctica y científica que permita tomar decisiones técnicas correctas para el control y la erradicación de la tuberculosis caprina.

HIPÓTESIS

El grado de relación que existe entre los resultados de la IDR con otras pruebas diagnósticas de tuberculosis en cabras depende de la prevalencia zonal.

OBJETIVO GENERAL

El objetivo del presente trabajo fue evaluar la prueba oficial de IDR y compararla con técnicas serológicas comerciales en cabras provenientes de zonas de alta y baja prevalencia de tuberculosis.

Objetivos específicos

-Caracterizar animales infectados y no infectados mediante la aplicación de técnicas bacteriológicas e histopatológicas en ambas zonas.

-Comparar los resultados positivos y negativos de IDR en animales infectados y no infectados.

-Comparar los resultados de tres pruebas inmunológicas serológicas comerciales en animales infectados y no infectados.

-Cotejar los resultados entre IDR y pruebas inmunológicas serológicas.

-Relacionar IDR y técnicas inmunológicas serológicas con la presencia de lesiones macroscópicas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Inicialmente se determinaron zonas de alta y baja prevalencia de la enfermedad de las cuales se seleccionaron los animales a estudiar. Se utilizó un muestreo intencional o de conveniencia.

Zona de alta prevalencia (zAP)

En la **zAP** se analizaron solamente animales positivos a la IDR. La misma comprendió 9 establecimientos caprinos ubicados en la provincia de San Juan, Argentina. De esos predios se seleccionaron un total de 54 cabras.

Zona de baja prevalencia (zBP)

De esta zona se seleccionaron caprinos con resultados positivos y negativos a la IDR, que pertenecían a 14 productores. Se evaluaron en total 68 caprinos, de los cuales 31 eran positivos a la IDR y 27 negativos.

Se aplicaron las siguientes pruebas diagnósticas

Técnica para evaluar la inmunidad celular

-Prueba tuberculínica de intradermorreacción (IDR)

Técnicas para evaluar la inmunidad humoral

-ELISA IDEXX

-ELISA BIONOTE

-Prueba inmunocromatográfica rápida ANIGEN

Diagnóstico Patológico

-Patología macroscópica

-Patología microscópica

Diagnóstico bacteriológico específico para micobacterias

-Cultivo en medios de Stonebrink

-Cultivo en medios de Löwenstein-Jensen

-Tinción de Ziehl Neelsen

Tipificación de micobacterias por medio de biología molecular

-Spoligotyping

RESULTADOS

Se realizó la siguiente combinación entre las pruebas

- 1) Hallazgos patológicos microscópicos y cultivos bacterianos determinando así la condición sanitaria de los animales;
- 2) Prueba de IDR según la condición sanitaria;
- 3) Prueba serológica ELISA BIONOTE según la condición sanitaria;
- 4) Prueba serológica TR ANIGEN según la condición sanitaria;
- 5) Prueba serológica ELISA IDEXX según la condición sanitaria;

- 6) Presencia de lesiones macroscópicas según la condición sanitaria;
- 7) Prueba de IDR y técnicas serológicas ELISA BIONOTE y TR Anigen;
- 8) Pruebas de ELISA BIONOTE y TR ANIGEN entre ambas;
- 9) Pruebas de ELISA BIONOTE y TR ANIGEN según las características de las lesiones macroscópicas;
- 10) Bacteriología: cultivo de micobacterias, tinción de Z-N presiembra y tipificación por técnicas moleculares.

Destacando algunos de los resultados, para la **zAP**, se observó que el 87,04% de los IDR positivos eran **AI**. En el caso de las técnicas serológicas, el test ELISA BIONOTE clasificó como positivo al 37,93% de **AI** y el TR Anigen al 27,03% de ellos.

Para la **zBP**, donde el 100% de los animales fueron **ANI**, la IDR clasificó como negativos al 60,29%, el test ELISA BIONOTE al 100% y el TR Anigen al 97,37%.

CONCLUSIONES

Debido a que en la **zAP** los animales que fueron positivos a la IDR en su mayoría presentaron lesiones y aislamiento de micobacterias, no así las pruebas serológicas que dejaban muchos animales falsos negativos, la IDR sería la técnica recomendable para el diagnóstico in vivo en esas situaciones epidemiológicas.

Por otro lado en la **zBP** las técnicas serológicas demostraron un alto valor predictivo negativo comparadas con la IDR, lo que hace más indicado su uso.

DEDICATORIA

A Susana, Gabriela, Daniela y Matías.... ejes de mi vida

A mi vieja Nelly que junto a mi viejo siempre lucharon para que seamos felices... y lo consiguieron

A mi viejo...sé que te hubieras sentido muy orgulloso

AGRADECIMIENTOS

Me tocó llevar al papel el trabajo de muchas personas que participaron para llegar al final de este camino que no hace más que asegurar el significado de la ciencia... "siempre tiene más preguntas que respuestas"... por eso existe

A Javier Sánchez por los conocimientos, el tiempo y la paciencia aportada (con quién aprendí además lo difícil que es poner de acuerdo a un epidemiólogo con un patólogo).

A Virginia Meikle y José Raviolo participando en la idea y corrección del tema.

A José Giraudó, Manuel Schneider, Enrique Bérnago, Analía Macías, Erika Sticotti, Mauro Mació, Hernán Lovera, Laura Zapata, Carlos Rang, Daniela Zubeldia, Nelcy Schleef, eternos compañeros y corresponsables directos del trabajo que hicimos.

A todos los productores, que nos permitieron el trabajo en sus animales.

A los alumnos de la carrera de medicina veterinaria que cooperaron en las distintas actividades.

A los Directivos e integrantes del doctorado Binacional en Ciencia, Tecnología e Innovación Agropecuaria y a Posgrado de la FAV-UNRC, que gracias a su esfuerzo hacen posible la necesaria formación de docentes, sin tener que trasladarnos de nuestra Universidad.

A los integrantes docentes y no docentes del Departamento de Patología Animal

A Martín Zumárraga y Ángel Cataldi del Instituto de Biotecnología, INTA Castelar y a Bernardo Alonso del Departamento de Micobacterias, Dilab SENASA, Martínez, quienes colaboraron desinteresadamente en el procesamiento de las muestras para los diagnósticos moleculares y serológicos

A todo el personal técnico-profesional del INTA Pocitos, San Juan; Dirección de Desarrollo Pecuario, Ministerio de Producción y Desarrollo Económico, San Juan; Subsecretaría de Agricultura Familiar provincia de San Juan; Centro Regional Cuyo del SENASA; Subsecretaría de Agricultura Familiar provincia de Córdoba

Tener la necesidad de agradecer a tantas personas por su mayor o menor participación demarca, en gran medida, la importancia, el compromiso y la trascendencia de un trabajo.

INTRODUCCIÓN

Introducción general sobre la tuberculosis

La importancia del estudio de la tuberculosis en cabras radica principalmente en la transmisión de la enfermedad al hombre, como también hacia los bovinos y a otras especies con las que convive e interviene en mantener la enfermedad (Blood y Radostits, 1992; Gutierrez y col., 1997). En los últimos años se observa un aumento en el consumo de productos de origen caprino, lo que requiere, entre otras, mejorar la calidad sanitaria de los mismos (PROCAL II, 2011).

En algunos países donde la prevalencia de tuberculosis en los bovinos es muy baja, la significancia epidemiológica de las cabras en la transmisión de la enfermedad es considerada mínima. Sin embargo no ocurre lo mismo cuando esa prevalencia aumenta y es más estrecha la convivencia entre estas especies (Morris y col., 1994; Cousins, 2001).

En países donde han avanzado en la erradicación de la tuberculosis bovina mediante programas sanitarios nacionales o regionales, las cabras domésticas son monitoreadas para detectar la infección por *Mycobacterium bovis* (*M. bovis*). Como en el caso de nuestro país, el Servicio Nacional de Sanidad Animal y Calidad Agroalimentaria (SENASA) reglamentó el Plan Nacional de Control y Erradicación de Tuberculosis Bovina (SENASA, 1993), y a partir del año 2012 actualizó el mismo plan incluyendo obligatoriamente el diagnóstico en cabañas caprinas de leche y carne (SENASA, 2012). La prueba oficial reconocida es la técnica tuberculínica intradérmica (IDR) y todo animal que resulte positivo, debe ser enviado a faena. Debido a las características de la IDR, esta prueba ha sido evaluada en numerosos

trabajos en poblaciones bovinas (de la Rua y col., 2006; Schiller y col., 2010) pero en menor número en caprinos y menos aún en nuestro país.

El eje fundamental para el control de la tuberculosis animal, pasa por el riesgo que ella significa en el contagio hacia los humanos. La pasteurización de la leche y la inspección de la carne al momento de la faena, constituyen las principales medidas para disminuir ese riesgo. No obstante persisten grupos más expuestos que son aquellos que conviven o trabajan con animales, ya sean productores, veterinarios, empleados rurales, matarifes, entre otros (CEPANZO, 1991).

La información sobre el impacto de esta zoonosis en la salud pública se va conociendo más profundamente con el aumento en el número de laboratorios que realizan cultivo de micobacterias y con la aplicación de las técnicas moleculares que facilitan la identificación de las mismas, ya que el diagnóstico en humanos se limita, en general, al examen microscópico directo, con lo cual no es posible diferenciar entre *M. tuberculosis*, *M. bovis* y otras micobacterias (Caminero Luna, 2003; Etchechoury y col., 2010).

Según la Organización Mundial de la Salud, en Argentina aproximadamente unas 10.000 personas por año se enferman de tuberculosis (WHO, 2012), donde un porcentaje de ellas es debido al contagio de la enfermedad desde los animales. Datos presentados por Kantor y col., (2012) muestran una tendencia a disminuir la tuberculosis humana por *M. bovis* en nuestro país en los últimos 30 años, siendo actualmente entre 0,36% y 1,7% en tres Hospitales de referencia de las provincias de Santa Fé y Buenos Aires, donde los habitantes de zonas rurales y agroindustriales son los de mayor riesgo a estas infecciones. La disminución de los casos de tuberculosis zoonótica, está asociada a los logros en el control de la



tuberculosis animal, la cual es debida especialmente a la aplicación del plan nacional de control y erradicación la tuberculosis (Kantor y col., 2012).

Con respecto a las explotaciones caprinas en Argentina, se puede decir que se concentran casi exclusivamente en zonas marginales donde no se pueden llevar adelante otro tipo de producciones animales. Los cabritos y la leche con sus derivados son la fuente principal de ingresos económicos de esos productores (PROCAL II, 2011). En algunas regiones, y en la búsqueda de mejorar sus ingresos, los productores caprinos se han asociado en cooperativas que elaboran especialmente queso de cabra que luego venden regionalmente y en centros urbanos. La necesidad de contar con animales sanitariamente controlados, y más aún cuando hablamos de tuberculosis, ha llevado a que en los últimos años aumenten las consultas recibidas en nuestro laboratorio de Patología Animal de la FAV-UNRC, sobre el diagnóstico y control de la tuberculosis en esta especie.

Debido a que en Argentina no se han desarrollado trabajos científicos destinados a evaluar la aplicación de la técnica oficial de IDR en caprinos, la importancia del presente proyecto radicó en contar con información práctica y científica que permita tomar decisiones técnicas correctas para el control y la erradicación de la tuberculosis caprina.

Situación de la tuberculosis en los caprinos

Los escasos estudios publicados sobre la prevalencia de tuberculosis caprina en diferentes países, demuestran no sólo la presencia de la enfermedad sino también una marcada variación en la cantidad de animales infectados entre las regiones de un mismo territorio.

Por ejemplo Vergara y Delgado, (2011) en la provincia de Barrancas, Perú, encontraron solamente dos animales reaccionantes positivos sobre 412 caprinos criollos, pertenecientes a 24 hatos, lo que determinó una prevalencia en animales del 0,48%.

Por su parte Arellano Reynoso y col., (1999) investigaron la prevalencia de TBC y PTBC mediante la prueba tuberculínica comparada en cinco estados de la región central de México. De 392 animales tuberculinizados, el 0,5% fueron positivos y el 1,2% sospechosos a la tuberculina mamífera, sugiriendo que la tuberculosis está poco difundida en los caprinos en ese país.

En Brasil, en el estado de Paraíba, Severino Silvano do Santos y col., (2011) observaron en la faena lesiones compatibles con tuberculosis en el 1,46% de 8.058 cabras adultas.

De los países europeos, España es donde más profundamente se ha investigado la tuberculosis en cabras. Por las publicaciones observadas, esta enfermedad adquiere gran importancia en las actividades sanitarias locales y nacionales de los hatos caprinos. En la Comarca de Bejar (Salamanca) Fernández Benito y col., (2001) evaluaron la presencia en 699 animales pertenecientes a 30 rebaños caprinos. A la prueba tuberculínica el 14,02% de animales fueron positivos y el 73,91% de rebaños con cabras infectadas.

En 7 municipios del sur de España Cabello y col., (2002) estudiaron la tuberculosis aplicando la IDR a un total de 3862 caprinos; la prevalencia fue del 11,7% de animales positivos con más del 71% de las explotaciones con al menos un animal infectado. Los resultados de dicho estudio mostraron además una variación muy marcada en la prevalencia entre las explotaciones de diferentes zonas, siendo desde 0% hasta mayores del 20%.

En nuestro país, los pocos estudios de campo referidos a prevalencia en caprinos demuestran la presencia de la enfermedad, pero con bajo número de animales infectados. En un trabajo realizado por Tríbulo y col., (2002) en el norte de la provincia de Córdoba, se detectó un 2,6% de animales reaccionantes a la IDR de un total de 9.541. Sin embargo los caprinos reaccionantes estuvieron distribuidos en 41 de los 107 campos examinados.

Otro estudio en hatos de cabras lecheras de la localidad de Suipacha (pcia. de Buenos Aires), Herrera, (1997) observó el 1,58% de animales positivos a la IDR.

En la provincia de Santiago del Estero, de un total de 1.550 cabras estudiadas pertenecientes a 14 establecimientos, solamente encontraron el 7,3% de reacciones sospechosas y ningún animal positivo (Underwood y col., 2002).

Otra posibilidad de evaluar la presencia de la enfermedad a nivel regional y nacional, es a través de los datos de decomisos por tuberculosis aportados por los frigoríficos. No obstante en Argentina, esa información en cabras no es conocida por tres razones fundamentales: 1) la faena es principalmente de cabritos (2 a 3 meses de edad) y no de animales de mayor edad que tienen aumentadas las probabilidades de presentar lesiones macroscópicas por la cronicidad de la enfermedad, 2) los frigoríficos locales, que generalmente es donde se faenan los caprinos, no tienen la obligatoriedad de informar los decomisos a las instituciones sanitarias nacionales y 3) la faena informal y casera es muy frecuente en todas las regiones cabriteras del país (PROCAL II, 2011).

Etiología de la tuberculosis

Las micobacterias se incluyen taxonómicamente dentro del género *Mycobacterium* que es el único de la familia Micobacteriaceae y pertenecen al orden

Actinomicetales; se distinguen por su capacidad de producir ácidos micólicos y la complejidad de la pared rica en lípidos (Brock y Madigan, 1993; Holt y col., 1994; Dorranova y Torroba, 2007).

El género *Mycobacterium* incluye especies patógenas, no patógenas y saprófitas (Holt y col., 1994; Hines y col., 1995). Tanto las especies patógenas estrictas como las oportunistas pueden afectar al hombre y a los animales.

Se clasifican en dos grandes grupos: por un lado el Complejo *Mycobacterium tuberculosis* (MTC) que incluye *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. bovis* BCG, *M. caprae*, *M. africanum*, *M. orygis*, *M. microti*, *M. canetti*, *M. pinnipedi* y *M. mungi*, las cuales presentan más del 95% de homología en su ADN y por otro las micobacterias no tuberculosas también denominadas con el nombre de Micobacterias Atípicas o MOTT (*Mycobacteria other than tuberculosis*) (Rastogni y col., 2001; Dorransoro y Torroba, 2007). Dentro de estas últimas, algunas especies son reconocidas como patógenos potenciales en humanos y animales.

En los animales, las micobacterias que más frecuentemente provocan enfermedad son patógenas estrictas y entre ellas está *M. bovis* (Hines y col., 1995; Rastogni y col., 2001).

Las micobacterias son aerobias (aunque algunas especies son microaerófilas ya que requieren 10 % de CO₂), Gram positivas, inmóviles y no formadoras de esporas. La temperatura óptima de crecimiento es 37°C y la mayoría de las especies requieren entre 2 y 8 semanas para su desarrollo debido al escaso pasaje de nutrientes a través de la pared lipídica (Hines y col., 1995).

La conocida propiedad de resistir a la decoloración por ácidos en el momento de la tinción le da la denominación de bacilos ácidos resistentes (Holt y col., 1994). Esta forma de reacción ante los colorantes es debido al elevado contenido lipídico

de la pared de la bacteria que en algunos casos llega al 60% del peso seco de la misma (Angala y col., 2014).

Dentro de la estructura general de las micobacterias, la envoltura celular compuesta por membrana celular bacteriana, pared celular y cápsula, juega un papel importante en la adaptación del microorganismo en el huésped: promueve la adhesión del macrófago, la adquisición de nutrientes dentro del macrófago, inhibe las propiedades bactericidas, determina la eventual muerte celular, interviene en la supervivencia celular, modula la respuesta inmune y le otorga resistencia a drogas (Rastogni y col., 2001; Angala y col., 2014).

Las micobacterias requieren nutrientes especiales para su crecimiento ya que no se desarrollan en medios de cultivo estándares. Las necesidades son en general sencillas: glicerol o piruvato de sodio como fuente de carbono y una sal de amonio como fuente de nitrógeno. Medios semisintéticos (Middlebrook) y los basados en huevo (Löwenstein-Jensen, Stonebrink, Herrold's) son los más usados. Estos últimos utilizan yema de huevo en su composición para obtener elevados niveles de lípidos por los cuales las micobacterias tienen especial preferencia (Jorge y col., 2005).

El cultivo es positivo cuando aparecen colonias típicas y se considera que es negativo recién a los 60 días de observación (Kantor, 2000; Rastogni y col., 2001).

La identificación de las diferentes especies de micobacterias se basó tradicionalmente en distintos parámetros como la velocidad de crecimiento, la temperatura óptima, la morfología de las colonias, la producción de pigmentos y de niacina, la serotipificación, el crecimiento en medios selectivos, las propiedades bioquímicas como presencia o ausencia de enzimas tales como ureasa,

arilsulfatasa, catalasa y las características de enzimas específicas como la termorresistencia de la catalasa (Rastogni y col., 2001).

En los últimos años la biología molecular ha contribuido a la identificación y tipificación del MTC, principalmente *M. tuberculosis* y *M. bovis* utilizando métodos basados en la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) (Collins, y col., 1994; Durr y col., 2000; López, y col., 2003).

Numerosas investigaciones a nivel mundial han aplicado estas técnicas; mencionando algunos trabajos relacionados con Argentina y países de América Latina, Zumárraga y col., (2013) analizaron por spoligotyping 1.684 cepas de *M. bovis* aisladas de diferentes especies animales incluyendo humanos, identificando 269 spoligotipos diferentes. En los bovinos, de donde provenía la mayoría de los aislamientos, el 24,6% se correspondió con el denominado SB0140 considerado el más prevalente en Argentina y en países que tuvieron historial de relaciones comerciales con el Reino Unido. Si se evalúa solamente en nuestro país, dicho spoligotipo fue detectado en el 45% de los casos. En otro estudio realizado en muestras de bovinos recolectadas de un frigorífico en la provincia de Córdoba, Argentina, el genotipo SB0140 se correspondió con el 55,4% de los aislamientos (Macías y col., 2010).

Por otro lado, a partir de lesiones observadas en caprinos, Zumárraga y col., (2013) informaron de dos aislamientos de *M. bovis*, clasificando a uno de ellos como SB0145 y otro como SB0130. Ambos han sido aislados también en muestras de bovinos en Argentina (Macías y col., 2010).

La elevada frecuencia del SB0140 podría indicar que el mismo ha sido introducido más antiguamente en el país y por lo tanto se ha transmitido entre los bovinos por un tiempo más prolongado o que es más virulento y por consiguiente

más transmisible que otros genotipos (Zumárraga y col., 1999; Cataldi y col., 2002). Sin embargo en la provincia de Córdoba se estableció que SB0273 y SB0520 fueron los que produjeron mayor cantidad y severidad de lesiones tuberculosas (Garbaccio y col., 2014).

Los métodos de genotipificación han permitido además profundizar en los conocimientos sobre patogenia y epidemiología de las diferentes cepas, transformándose en una herramienta de utilidad para el control de la enfermedad (Collins y col., 1994; Barnes y Caves, 2003). En nuestro país y relacionado con la tuberculosis en las cabras, Martínez Vivot y col., (1997), aplicaron estas técnicas moleculares como herramienta de vigilancia epidemiológica para identificar el origen de la infección, al comparar micobacterias aisladas en bovinos y en cabras pertenecientes a un establecimiento lechero con antecedentes de la enfermedad. Los aislamientos a partir de lesiones en ambas especies, demostraron coincidencia entre los patrones de *M. bovis* SB0140, sugiriendo que la alimentación con leche de vaca a los cabritos, sería la posible fuente de contagio. Otro caso similar es el detallado por Napp y col., (2013) quienes describieron un brote de tuberculosis bovina en una granja española, la cual había sido saneada y repoblada meses después con animales provenientes de campos libres de tuberculosis. Aparecieron nuevamente bovinos infectados y la investigación los llevó a concluir que las cabras tuberculosas con las que convivían habían sido las que mantuvieron la infección en el campo. De esas cabras y de los bovinos aislaron *M. caprae* SB0416.

Micobacterias aisladas en cabras

Si bien se han aislado diferentes micobacterias involucradas como agentes causales de la tuberculosis en las cabras, el principal es *M. bovis* identificándolo tanto en presentaciones de brotes como en rodeos infectados crónicamente.

En un brote en España, de 35 animales que presentaron lesiones, aislaron *M. bovis* en 10 de ellos. En un animal solamente, identificaron *M. tuberculosis* sin poder aclarar cual habría sido el origen de esta infección (Bernabé y col., 1991a).

También en la península Ibérica, pero en este caso en Portugal, Quintas y col., (2010) identificaron *M. bovis* como el único agente causal de las lesiones encontradas en 42 cabras faenadas de un campo con muy alta prevalencia.

Daniel y col., (2009) en el suroeste de Gales, aislaron micobacterias de 30 cabras pertenecientes a un rebaño. Los análisis mediante las técnicas de spoligotyping y repeticiones en tándem de número variable (VNTR) demostraron que todas ellas eran del mismo genotipo de *M. bovis*, perteneciendo a una cepa endémica de ese país. Ese mismo *M. bovis*, informaron Crawshaw y col., (2008) en un brote de tuberculosis en cabras en un campo de Reino Unido.

En una granja del norte de Italia, donde convivían bovinos y cabras detectaron tuberculosis por *M. bovis* en ambas especies. Las micobacterias presentaron el mismo patrón genético (Zanardi y col., 2013).

En Nigeria Cadmus y col., (2009) identificaron micobacterias a partir de lesiones observadas en faenas. Realizaron spoligotyping a 5 aislamientos, y clasificaron a 4 de ellos como *M. bovis* y a 1 como *M. tuberculosis*. Para los autores, la presencia de *M. bovis* sugiere una transmisión a partir de los bovinos más que una transmisión desde cabras infectadas. Para el caso de *M. tuberculosis* plantean una transmisión a partir de humanos fundamentado en el creciente avance de la

tuberculosis humana en ese país y en la frecuente cohabitación entre las personas y las cabras.

En el estado de Paraíba, Brasil, a partir de muestras recolectadas en frigoríficos con faena de cabras adultas, se identificó *M. bovis* SB0295 en una de ellas (Severino Silvano do Santos y col., 2011).

En España, Gomez y col., (1998) aplicaron la técnica de spoligotyping sobre 30 aislamientos de cabras, pertenecientes a 9 rebaños y encontraron 5 patrones diferentes de *M. bovis* pudiendo establecerse asociaciones tanto geográficas como raciales. Esos patrones resultaron diferentes a los de origen bovino que habían sido observados previamente.

Durante la última década y mediante estudios filogenéticos, se ha demostrado otro miembro del complejo *M. tuberculosis* también implicado en la tuberculosis caprina clasificándolo como *M. caprae* (Aranaz y col., 2003). Un estudio posterior de Rodriguez y col., (2011) en España, informaron sobre su identificación en diferentes especies animales. De un total de 791 aislamientos identificados, 542 fueron en cabras, 229 en bovinos, 2 en ovejas, 2 en cerdos domésticos, 14 en cerdos salvajes, 1 en ciervos y 1 en zorros. Según los autores, la asociación de altas tasas de infección en cabras por *M. caprae* estaría indicada por una rápida transmisión que tendría la bacteria una vez ingresada a un rodeo y por una razón sanitaria ya que los hatos caprinos no habían sido incorporados en las campañas de erradicación de la tuberculosis bovina, excepto en aquellos rodeos donde conviven caprinos con bovinos. Observaron también más cantidad de bovinos infectados por *M. caprae* en aquellas regiones con mayor densidad de ganado caprino, encontrando que más del 86% de los campos con bovinos infectados por *M. caprae*, tenían contacto con pequeños rumiantes.

Siguiendo con las comunicaciones que priorizan a *M. bovis*, Acosta y col., (1993) en las Islas Gran Canaria y Tenerife, obtuvieron aislamiento de micobacterias en 14 cabras con lesiones granulomatosas. De las mismas, 13 se correspondieron con *M. bovis* y una con *M. kansasii*, considerado dentro del grupo MOTT.

Otro caso de tuberculosis caprina donde se involucran a MOTT fue presentado por Arellano Reynoso y col., (1999) en México. De 36 animales necropsiados aislaron 9 micobacterias: 3 animales con *M. vaccae*; 1 con *M. vaccae* y *M. fortuitum*; 1 con *M. fortuitum*; 3 con *M. avium* subsp. *paratuberculosis* y 1 con *M. paratuberculosis*, *M. vaccae* y *M. fortuitum*; demostrando además la posibilidad de infecciones conjuntas en el mismo animal.

Signos clínicos

En el caso de la tuberculosis es importante aclarar los conceptos de animal infectado y animal enfermo. Animal infectado se define como aquel que ha estado en contacto con micobacterias y su sistema inmunitario ha permitido controlar la progresión de la bacteria aunque no eliminarla totalmente del organismo, por lo que se encuentra en un estado de latencia. El animal enfermo es aquel que presenta sintomatología o lesiones compatibles, debido a la proliferación de la bacteria por la incapacidad del sistema inmune para contenerla. La reacción de un animal a las pruebas diagnósticas inmunológicas, indican infección y no necesariamente enfermedad (Bezoz y col., 2012).

La tuberculosis es una enfermedad crónica y los signos clínicos pueden tardar meses o años en aparecer, como es en el caso de tuberculosis latentes que se reactivan en situaciones de inmunosupresión (Alvarez y col., 2009; Bezoz y col., 2012). Ejemplo de esto fue observado en reproducciones experimentales

inoculando cabras jóvenes con bajas dosis de *M. bovis*; si bien presentaban lesiones macroscópicas, no manifestaron síntomas ni pérdida del estado corporal durante los 3 meses que duró el estudio (Ramírez y col., 2003). No obstante esto no es lo más frecuente que ocurre en aquellos animales provenientes de campos con antecedentes de la enfermedad.

Los signos de infección por *M. bovis* pueden resultar muy inespecíficos y en la fase temprana de la enfermedad ser inaparentes. Entre los signos generales figuran principalmente pérdida de peso crónica, apetito variable y fiebre fluctuante.

Las demás presentaciones clínicas específicas dependen exclusivamente del lugar anatómico de asiento de las lesiones y la extensión de las mismas. Aquellos relacionados con el aparato respiratorio son relativamente comunes y en general leves, aunque en infecciones crónicas graves pueden ser muy evidentes e incluyen tos crónica húmeda y blanda, disnea, taquipnea, hiperpnea y sonidos pulmonares (Crawshaw y col., 2008).

La tuberculosis caprina ha sido ignorada y confundida muchas veces con otros procesos respiratorios como bronquitis verminosas o bronconeumonías las que en un momento y en algunas zonas hizo pensar que las cabras eran particularmente resistentes al bacilo tuberculoso (Cousins y col., 1993).

Menos comunes son síntomas digestivos que incluyen ulceración intestinal y diarrea. Cuando están afectados los ganglios linfáticos retrofaríngeos, pueden originar disfagia, estridor y salivación (Blood y Radostits, 1992; Quintas y col., 2010; Smith, 2010).

Rara vez se observan síntomas reproductivos como infertilidad, abortos, metritis y vaginitis, ya que en estos sistemas es muy baja la frecuencia de asiento de lesiones (Smith, 2010).

Los casos con presentación de mastitis tuberculosa son muy poco frecuentes siendo el consumo de leche cruda de esos animales un riesgo importante para la salud pública (O'Reilly y Daborn, 1995; Smith, 2010).

Una característica que ayuda al diagnóstico clínico, la plantean Daniel y col., (2009) cuando analizaron un brote de tuberculosis caprina, donde los animales que presentaban sintomatología no respondieron en ningún caso a los tratamientos sintomáticos de rutina realizados por los veterinarios.

La presentación final de la tuberculosis es la muerte del animal afectado. Si bien este porcentaje es generalmente muy bajo, Quintas y col., (2010) comunicaron que en un establecimiento de Portugal murieron más del 50% de un total de 127 cabras, las cuales presentaban inicialmente tos seca, luego emaciación progresiva, ocasionalmente diarrea y finalmente muerte.

En la experiencia obtenida por nuestro grupo de investigación de Salud en Rumiantes de la FAV-UNRC y la de otros autores en nuestro país (Garro y col., 2011), indican presencia de sintomatología muy manifiesta e incluso muerte en animales jóvenes (menores a dos meses de vida) tanto en caprinos como en bovinos; esta situación particular fue observada principalmente en aquellos campos con altas prevalencia de la enfermedad.

Patología macroscópica de la tuberculosis

El término tuberculosis es derivado del latín *Tuberculum* que significa hinchazón o nódulo. En la enfermedad, esos nódulos son denominados tubérculos (Hines y col., 1995).

Las lesiones tuberculosas son el prototipo de la inflamación granulomatosa. El granuloma (tubérculo) es principalmente celular y su desarrollo es descrito como

productivo o proliferativo, en contraste con las lesiones de tipo exudativas que pueden presentarse en algunas oportunidades (Jubb y col., 2007).

Además de la respuesta celular, la necrosis, que se observa en la mayoría de los casos, 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 en todas las especies animales. Finalmente 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 (Jubb y col., 2007; Hines y col., 1999).

Nieberle y Cohrs, (1966) plantean las diferentes alternativas que puede seguir una lesión tuberculosa desde su inicio:

- regresión y desaparición completa.

- latencia durante largos periodos de tiempo e incluso toda la vida del animal.

- progresión de las lesiones en el mismo órgano afectado.

- diseminación a otros órganos y tejidos, mediante diferentes vías, entre ellas linfática, hematológica o canalicular.

Si el granuloma falla en la contención de las micobacterias, como lo expresado en los dos últimos puntos, las mismas se extenderán a otras zonas del órgano y esa progresión de las lesiones conducirá a un aumento de la extensión y cambios en las características macroscópicas. Las lesiones adoptan un carácter más productivo y exudativo caracterizándose por áreas de necrosis caseosa mal delimitadas acompañadas de un infiltrado inflamatorio mixto y reducción en el número de células gigantes (Nieberle y Cohrs, 1966).

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 mediante vasos linfáticos, sanguíneos o por contigüidad. Dependiendo de la cantidad de microorganismos que lleguen a los tejidos, las nuevas lesiones serán múltiples y pequeñas (tuberculosis miliar) o escasas y de mayor tamaño (Jubb y col., 2007).

La combinación de la lesión inicial en el tejido de ingreso del agente y en el ganglio linfático satélite se conoce como complejo primario de Ranke; siempre está presente en la primera infección pero a veces no se encuentran los dos componentes, faltando la lesión en la puerta de entrada. Esto último se puede observar cuando la mucosa afectada es la faríngea o la intestinal, aunque la lesión en el ganglio satélite siempre está presente (Jubb y col., 2007).

Patología macroscópica de la tuberculosis en caprinos

Son varios los trabajos publicados donde evaluaron las características patológicas y la distribución de las lesiones en las cabras. Coincidentemente el sistema respiratorio es el principal asiento de lesiones.

En Murcia, España, Bernabé y col., (1991a) describieron lesiones pulmonares y generales observadas en 35 cabras. El 40% de los animales presentaron tuberculosis orgánica crónica asentada en el sistema respiratorio y el 48% con algún tipo de generalización. De las lesiones pulmonares diferenciaron nódulos únicos o múltiples, de contenido pastoso blancoamarillento, de 0,2 a 5 cm, en algunos casos calcificados, ubicados en su mayoría en las zonas dorsales de los pulmones.

En 30 de esos animales encontraron lesiones en los ganglios linfáticos mediastínicos caracterizadas por pequeños nódulos de 0,1 – 0,5 cm de diámetro,

conteniendo una sustancia pastosa, blanca o blanca amarillenta con algo de calcificación. La presencia de lesiones pulmones y en nódulos linfáticos mediastínicos, demostraron la ocurrencia de complejo primario respiratorio similar a lo observado en bovinos.

Similares hallazgos encontraron Daniel y col., (2009) en un brote de tuberculosis caprina donde 29 animales presentaron lesiones macroscópicas compatibles con la enfermedad. En todos los casos estaban comprometidos los nódulos linfáticos de la cavidad torácica, con lesiones típicamente caseosas variando de tamaño desde un pequeño punto hasta 2 cm de diámetro, algunas calcificadas. En 21 animales se localizaron en pulmones y variaron entre 2 y 5 cm de diámetro algunas de ellas más grandes y cavitarias que contenían pus amarillo con ubicación principalmente en los lóbulos pulmonares caudales.

Igualmente Crawshaw y col., (2008), en Reino Unido, reportaron un brote de 13 cabras, de las cuales 12 tenían lesiones tuberculosas grandes y pequeñas en pulmones y ganglios linfáticos mediastínicos.

Quintas y col., (2010) estudiaron un caso en un establecimiento con muy alta prevalencia. En 42 de 58 cabras faenadas encontraron lesiones macroscópicas compatibles que se ubicaron preferentemente en sistema respiratorio (ganglios linfáticos mediastínicos y pulmón). Dichos autores también encontraron lesiones en vías respiratorias y digestivas en 7 cabritos (animales muy jóvenes).

Grupos de investigadores han realizado reproducciones experimentales de la enfermedad para observar y comparar con las patologías que ocurren en infecciones naturales. Bezos y col., (2010) inocularon cabras con *M. caprae*, encontrando, a los 248 días posteriores, lesiones en pulmón y en linfonódulos mediastínicos en 6 animales desafiados.

Ramirez y col., (2003), también demostraron similitud de lesiones con las que ocurren en infección natural en bovinos. Para ello desafiaron experimentalmente cabras con bajas dosis de *M. bovis*. Nódulos con material caseoso pálido amarillento central con algo de calcificación, rodeados por una cápsula fibrosa, presentaban los pulmones y los linfonodos mediastínicos.

En otro estudio, Gonzalez Jaurrero y col., (2013) intentaron observar diferencias de las patologías al variar la dosis infectante. Para ello inocularon intratraquealmente cabras con dosis bajas (1.300 ufc) y altas (73.000 ufc) de *M. bovis*. Todos los animales con altas dosis presentaron más de 10 lesiones entre 2 y 5 cm de diámetro en pulmón y nódulos linfáticos mediastínicos, a las 8 semanas posinfección. Los animales con bajas dosis no presentaron lesiones visibles en la superficie de los pulmones pero sí lesiones palpables muy pequeñas, sugiriendo la importancia de la dosis infectante en la evolución de las lesiones y de la enfermedad.

Como se mencionó anteriormente, otra presentación patológica es la generalización donde varios órganos y/o tejidos pueden estar afectados. Bernabé y col., (1991b) encontraron generalización en bazo (n= 7 cabras), hígado (n= 12), intestino (n= 7), corazón (n= 1) y riñón (n= 1). Algo similar observaron Daniel y col., (2009) con lesiones extrapulmonares (nódulos linfáticos mesentéricos; hígado y bazo) en 11 de un total de 29 cabras.

Quintas y col., (2010) hallaron menos casos de generalización ya que solamente 2 de 42 animales, presentaron lesiones en nódulos mesentéricos y en otros órganos; todos pertenecían a un campo con alta prevalencia de tuberculosis.

Todos estos resultados indican que en hatos con animales infectados crónicamente y también en brotes, es frecuente la observación de lesiones generalizadas

La dosis infectante influye en la generalización, y si la misma es alta la aparición de lesiones en varios órganos puede suceder en corto tiempo. Bezos y col., (2010) refuerzan este concepto cuando observaron lesiones generalizadas en 3 de 6 cabras inoculadas experimentalmente con altas dosis de *M. caprae* y necropsiadas a los 8 meses pos desafío.

Reforzando este concepto, en 2 estudios realizados con dosis bajas de *M. bovis*, no hallaron diseminación de la enfermedad: Ramirez y col., (2003) en ninguno de los 8 cabritos a los 90 días posinfección y Gonzalez Jaurrero y col., (2013) en cabras adultas a las 8 semanas posinfección. Si bien las micobacterias fueron diferentes, por lo expuesto en los trabajos anteriores, ambas presentan elevada virulencia en los caprinos.

Una presentación pulmonar que tiene gran significación especialmente en la transmisión de la enfermedad, son las lesiones cavitarias. La licuefacción y la posterior formación de cavernas a nivel pulmonar, es frecuente en humanos y también en cabras y adquieren especial importancia debido al exagerado crecimiento extracelular de bacilos y a la propagación bronquial y eliminación respiratoria contagiando a otros animales y contaminando el medio ambiente. Si no se forman cavidades, el infectado es mucho menos contagioso (Dannenberg, 2009).

Buscando explicar el origen de las lesiones cavitarias, Sanchez y col., (2011) caracterizaron los mecanismos inmunológicos que conducen a la licuefacción con la posterior formación de esa patología. En las lesiones cavitarias hay sustancial población de neutrófilos y una disminución significativa de células T CD4⁺ y un

aumento de otras poblaciones de células T. La enzima sintasa oxido nítrico inducible (iNOS) que tiene función de frenar y eliminar el crecimiento de numerosos patógenos intracelulares, incluidos las micobacterias, fue solamente observada en un bajo número de células.

Histológicamente las lesiones cavitarias presentaron una sustancial acumulación de neutrófilos aunque ellos fueron incapaces de controlar la infección micobacteriana lo que indicaría que los mismos juegan un papel importante en el desarrollo de la lesión mas que en la protección del huésped (Sanchez y col., 2011).

Los autores sugieren que las lesiones cavitarias son sitios de reactivación donde las condiciones son óptimas para la proliferación de las micobacterias y los mecanismos inmunológicos son la base de la severa destrucción del tejido pulmonar y la característica patología cavitaria. La presencia de lesiones cavitarias internas comunicadas directamente con el árbol bronquial, indicarían que ese factor es muy importante para el crecimiento de las micobacterias ya que las mismas requieren de oxígeno para su desarrollo (Sanchez y col., 2011). A diferencia de las lesiones granulomatosas en las que son difíciles de observar los bacilos, en estas son muy abundantes (Nieberle y Cohrs, 1966).

El porcentaje de animales con patología de este tipo no es constante. Mientras que Crawshaw, y col., (2008) observaron varias cabras con esas lesiones en un grupo de 12 animales, Bernabé y col., (1991a) solamente la encontraron en una de 35 cabras necropsiadas.

Patología microscópica de la tuberculosis

La lesión histopatológica está caracterizada por una gran proliferación de linfocitos, entremezclados con macrófagos, células epitelioides y células gigantes de

Langhans; estas últimas presentan varios núcleos excéntricos y derivan de la fusión de macrófagos. A medida que la lesión progresa, el tubérculo presenta necrosis caseosa central y fibroplasia periférica. Estas dos características son variables y no se observan en todas las lesiones tuberculosas ni en todas las especies animales (Jubb y col.; 2007).

El granuloma actúa de control y limita la diseminación de la infección, pero también puede producir un importante daño tisular (Saunders y Cooper, 2000). El desarrollo del granuloma está dirigido por quimioquinas y citoquinas producidas por las células locales, provocando la migración de linfocitos, macrófagos y células dendríticas al lugar de la infección (Ehlers y Schaible, 2012). Tanto los linfocitos T como los B participan en la formación del granuloma (Gonzalez-Juarrero y col., 2001).

El granuloma, durante su proceso de contención de la infección, experimenta cambios en su estructura, composición celular y en el microambiente de citoquinas y quimioquinas (Gonzalez-Juarrero y col., 2001; Sanchez y col., 2008).

En bovinos se han establecido cuatro estadios evolutivos de los granulomas (Wango y col., 2005); esas mismas fases evolutivas han sido observadas en caprinos. Inicialmente los granulomas están compuestos por grupos irregulares no encapsulados de macrófagos epitelioides entre los que se sitúan linfocitos y unos pocos neutrófilos. En la medida que las lesiones avanzan, se forman granulomas grandes e irregulares, confluentes y delimitados por una cápsula conectiva gruesa; presentan además amplios centros de necrosis caseosa con extensa calcificación. Los macrófagos epitelioides y las células gigantes multinucleadas rodean a la necrosis y los acúmulos de linfocitos llegan a ser más prominentes cerca de la periferia de la cápsula fibrosa.

La necrosis de la porción central del granuloma se debe a factores que dependen del hospedador y de las micobacterias. Dentro de los productos químicos y enzimáticos que actúan en el foco, perforina y granulolisinas derivadas de células T CD8 y los metabolitos reactivos derivados del oxígeno y del nitrógeno de los macrófagos, contribuyen a la necrosis (Elkington y Friedland, 2006).

Por otro lado, proteínas de las micobacterias como ESAT6, pueden causar lisis de células pulmonares y facilitar la diseminación bacteriana (Hsu y col., 2003).

Según Dannenberg y Rook, (1994) la extensión de la necrosis depende del grado de activación de los macrófagos y de la virulencia de la micobacteria. En el caso de bacilos muy virulentos y macrófagos escasamente activados, el crecimiento de la micobacteria dentro de estos es muy elevado y serán destruidos por las células del sistema inmune. Este mecanismo conduce a dos efectos: la presencia de necrosis por caseificación en la cual se inhibe el crecimiento de la micobacteria y la sensibilización de linfocitos T CD4 debido a la abundancia de antígenos liberados, por lo que en los granulomas resultantes predominará la necrosis central. Por otro lado, la presencia de macrófagos altamente activados y/o escasa virulencia de las bacterias conducirá al desarrollo de un granuloma con escasa necrosis y elevado número de linfocitos. En algunos casos se puede llegar a la destrucción de la bacteria y por lo tanto a la eliminación temprana de la infección.

Patología microscópica de la tuberculosis en caprinos

Las escasas descripciones histopatológicas de lesiones tuberculosas en cabras, son concordantes con las observadas en bovinos. Bernabe y col., (1991b) realizaron un detalle minucioso de lesiones histopatológicas pulmonares observadas en cabras infectadas naturalmente, donde encontraron tres tipos de alteraciones: a)

predominantemente proliferativas caracterizadas por pequeños granulomas con centro de necrosis caseosa y calcificación; rodeados por células epitelioides, escasas células gigantes, linfocitos y una cápsula de tejido conectivo; b) formas proliferativa-exudativa con grandes masas necrosadas y algunas calcificadas rodeadas por numerosos focos granumomatosos pequeños compuestos de infiltrado de células epitelioides, células gigantes tipo Langhans y linfocitos, circunscriptos por una sustancia proteinacea, presumiblemente plasma coagulado; c) forma exudativa caracterizada por necrosis no calcificada, rodeada por un infiltrado de células no especificadas y grandes áreas de plasma coagulado que afectaba extensamente el parénquima pulmonar.

Cuando observaron las lesiones en los ganglios linfáticos encontraron formaciones granulomatosas con necrosis calcificadas en el centro rodeadas por una cápsula de tejido conectivo. Otros nódulos contenían grupos de células sin áreas de necrosis.

Lesiones microscópicas que concuerdan con las anteriores son descritas por Daniel y col., (2009) los que además mencionan la presencia de grupos de neutrófilos y leucocitos degenerados presentes en la interfaz entre el tejido viable y no viable en algunos de los casos estudiados.

Inmunopatogenia

El sistema inmune (SI) tiene la capacidad de reconocer y discriminar las estructuras propias de las ajenas caracterizándose por su especificidad y memoria. Los aspectos generales de la respuesta inmune ante las infecciones micobacterianas son aceptados en forma universal. La interacción y las funciones



efectoras de los linfocitos y de los macrófagos son la base de la respuesta inmune del huésped (Hines y col., 1995).

Cuando los bacilos llegan al tejido provocan una respuesta macrofágica de tipo cuerpo extraño; si no son destruidos por los macrófagos proliferan dentro de ellos junto con el material antigénico que sensibiliza a los linfocitos T. Estos linfocitos sensibilizados provocan atracción, proliferación y activación de macrófagos, los que derivan principalmente de los monocitos sanguíneos (Jubb y col., 2007).

La capacidad que poseen las micobacterias de resistir a la acción bactericida se ha estudiado frecuentemente. Los macrófagos con las micobacterias en su interior intentan destruirlas mediante la liberación de radicales libres los cuales tienen poco efecto contra ellas (Thoen y Bloom, 1995). Las micobacterias se multiplican dentro de los fagosomas donde las enzimas hidrolíticas generalmente fallan. Sus principios tóxicos destruyen fagosomas, interfieren con la formación del fagolisosoma, alteran la liberación de enzimas hidrolíticas por parte de los lisosomas y/o inactivan las enzimas liberadas dentro del fagolisosoma (Rastogni y col., 2001).

Si el microorganismo se multiplica y destruye al macrófago, otros fagocitan las bacterias libres y se repite el proceso. Esta agrupación de células mononucleares forma el llamado granuloma que, si continúa aumentando de tamaño, se puede observar a simple vista 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 Ag junto al complejo mayor de histocompatibilidad clase I y II, son funciones de estímulo y proliferación de clones de linfocitos T CD4+ y CD8+. La emergencia de los linfocitos T CD4+ y la secreción de citoquinas, coinciden con el inicio de la inmunidad (Hines y col., 1995). Estos linfocitos CD4 comprenden dos subpoblaciones: Th1 (helper tipo 1) y Th2 (helper

tipo 2), que derivan de precursores comunes pero difieren en el patrón de citoquinas que producen. Las células Th1 producen esencialmente IFN- γ e IL-2 que tienen como efecto aumentar la actividad microbicida de los macrófagos y la respuesta de hipersensibilidad de tipo retardada. Por su parte los Th2 producen IL-4, IL-5, IL-6 e IL-10 que estimulan el crecimiento y la diferenciación de los linfocitos B aumentando la respuesta de tipo humoral (Aranaz, 2013).

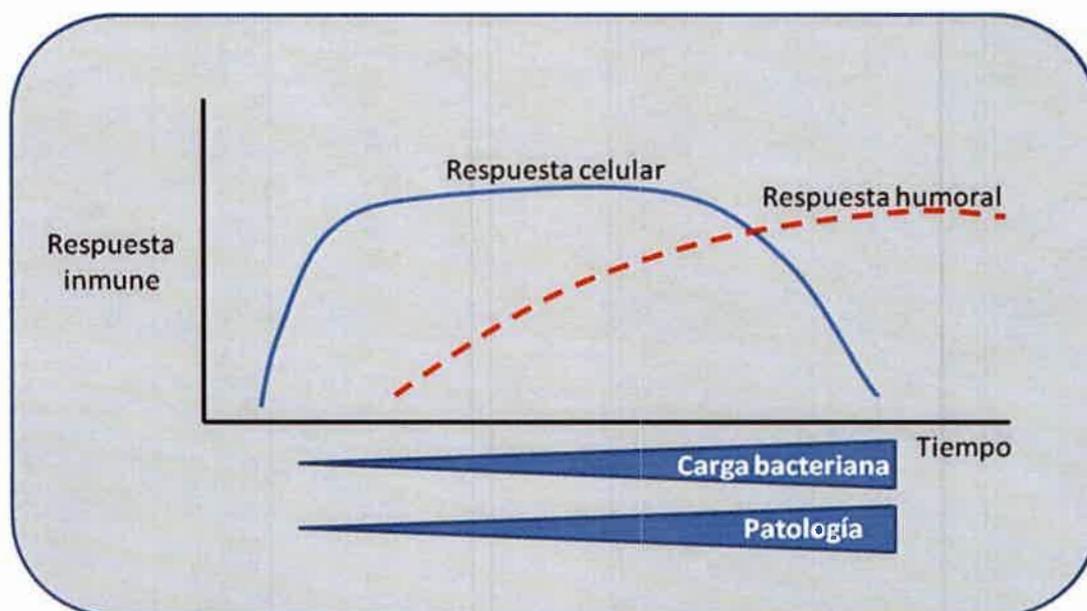
Otras células implicadas en la respuesta ante la infección con micobacterias, son las células dendríticas; actúan como presentadoras de Ag y producen IL-12 la cual promueve la expansión de subpoblaciones de linfocitos jugando un rol importante en la inmunidad mediada por células (IMC) (Benjamini y col., 1996; Aranaz, 2013). Se generan así células T de memoria que son capaces de responder ante la entrada de nuevos antígenos micobacterianos. Debido a que células de memoria tienen una larga vida, la hipersensibilidad retardada puede observarse aún varios años después de la exposición (Tizard, 2000).

El diagnóstico de tuberculosis mediante la IDR se basa en la hipersensibilidad retardada o hipersensibilidad de tipo IV y resulta de la interacción entre el Ag inoculado, las células presentadoras de Ag y los linfocitos T. Cuando un animal está sensibilizado contra un Ag y el mismo se inocula vía intradérmica, es capturado por las células dendríticas que atraen a linfocitos Th1 circulantes, los que al reconocer al Ag se adhieren a las células endoteliales y emigran desde los capilares hacia el depósito del Ag. Las células Th1 secretan IFN γ e IL-2 y otras sustancias vasoactivas como la serotonina, IL-8 y factores quimiotácticos para linfocitos y basófilos. Todo este mecanismo provoca una mayor inflamación y aumento de la migración de células mononucleares hacia el lugar de inoculación. La mayoría de los linfocitos que acuden al sitio no están sensibilizados específicamente contra el Ag (solamente el

5% de ellos), predominando los linfocitos $\alpha/\beta+$, CD4+ y CD8+. Los macrófagos que llegan atraídos por la IL-8 y que son activados localmente por el IFN γ , ingieren y destruyen el Ag inyectado permitiendo que el tejido retorne al estado normal. Esta reacción se manifiesta macroscópicamente como una tumoración, firme y roja en el lugar de inoculación, alcanzando su mayor intensidad a las 48 o 72 h posteriores a la aplicación del Ag por vía intradérmica (Benjamini y col., 1996; Tizard, 2000).

Por otro lado la respuesta de anticuerpos producida en animales infectados con *M. bovis*, generalmente aparece en los estadios finales de la enfermedad (proceso conocido como anergia), a diferencia de la respuesta celular que se inicia posterior a la infección (Esquema 1).

Esquema 1. Representación esquemática que muestra la evolución de las respuestas inmune celular y humoral ante la infección por micobacterias, como así también las variaciones en la carga bacteriana y en el desarrollo de las lesiones, que se producen en un individuo infectado (Adaptado de Pollock y Neill, 2002).



Durante años se vienen realizando numerosos intentos para desarrollar test serológicos basados en la detección de anticuerpos contra proteínas micobacterianas como son la MPB70, MPB83, ESAT-6 y CFP-10 ya sean solas o combinadas en la misma técnica diagnóstica (Acosta y col., 2000; Aagaard y col., 2006). Y aunque la sensibilidad diagnóstica de esas pruebas es menor a la deseada, podrían jugar un rol importante en el diagnóstico especialmente cuando hay animales en diferentes etapas de la infección (Lilenbaum, 2013).

Se ha observado que la respuesta de anticuerpos en animales infectados, aumenta posterior a la aplicación de la tuberculina por lo que algunos autores aconsejan el uso en conjunto de la IDR y las técnicas serológicas para aumentar la sensibilidad de estas últimas (Buddle y col., 2009).

Comparación de técnicas diagnósticas de tuberculosis

Dentro de los métodos para el diagnóstico de la tuberculosis que más frecuentemente se utilizan en la actualidad se encuentran:

in vivo:

*prueba tuberculínica de intradermorreacción (IDR)

in vitro:

*prueba de interferón-gamma (IFN γ)

*pruebas de enzimoimmunoensayo (ELISAs)

*ensayo inmunocromatográfico

*cultivo de micobacterias en medios especiales

*lesiones macroscópicas

*histopatología

*tinción de Ziehl-Neelsen

*técnicas de Reacción en Cadena de Polimerasa (PCR)

De todas las técnicas mencionadas, la mayoría se aplican hace años en el diagnóstico de la tuberculosis en las diferentes especies y sus procedimientos son muy conocidos.

Brevemente se podría indicar de ellas que:

La IDR mide inmunidad celular y es la única prueba *In vivo* para tuberculosis en el ganado que está validada por la Organización Mundial de la de Sanidad Animal (OIE) para el comercio internacional. Esta técnica es la prueba oficial aprobada en Argentina por el SENASA para el diagnóstico de tuberculosis en las diferentes especies animales (SENASA, 2012).

Otro método de medición de la inmunidad mediada por células, que está adquiriendo cada vez mayor popularidad en los programas de control y de erradicación de la tuberculosis bovina, es la prueba de interferón-gamma (IFN γ) (Strain y col., 2011). La misma ha sido aprobada para su uso en varios programas nacionales, incluida la Unión Europea, EE.UU., Nueva Zelanda y Australia (OIE, 2013).

Muchas pruebas que miden la presencia de anticuerpos humorales fueron desarrolladas y puestas a prueba desde los años 1980 hasta la actualidad, donde es continua y amplia la evaluación de nuevos antígenos destinados a mejorar los resultados. Lamentablemente las mismas no han tenido un papel importante en los programas de control o de erradicación (Cousins y Florisson, 2005). Los ELISAs y los ensayos inmunocromatográficos presentan la misma dificultad; en general se considera que la detección humoral de anticuerpos es un mal indicador de la infección tuberculosa ya que este tipo de respuesta se eleva hacia la etapa final de la enfermedad.

La presencia de micobacterias se puede demostrar microscópicamente mediante la tinción de Ziehl-Neelsen realizada en frotis directos de muestras clínicas o sobre secciones de tejidos preparados. Esta técnica se caracteriza por su rapidez, su bajo costo y sin tener la necesidad de contar con laboratorios especializados. Como inconveniente muchas de las lesiones son a menudo paucibacilares, por ello la presencia de organismos ácido-alcohol resistentes puede no ser detectada (OIE, 2013).

El cultivo en medios de aislamiento especiales, es considerado la prueba de oro (OIE, 2013). No obstante presenta cierta complejidad en su desarrollo y el crecimiento de *M. bovis* puede demorar más allá de los 60 días posteriores a la siembra lo que implica una dificultad para el diagnóstico rápido y práctico.

El diagnóstico patológico presuntivo de tuberculosis se puede hacer si el tejido tiene lesiones macroscópicas granulomatosas y/o histológicas características con necrosis caseosa, mineralización, linfocitos, células epitelioides, células gigantes multinucleadas y macrófagos. De todas maneras la presencia de ese tipo de lesiones no indica la certeza de infección tuberculosa ya que otros agentes llevan a patologías similares (Jubb y col., 2007).

Dentro de las técnicas moleculares para la tipificación de micobacterias, se han desarrollado numerosos métodos basados en la PCR. Se destacan el de las Repeticiones en tándem de número variable (VNTRs) y el spoligotiping que permiten diferenciar tanto interespecie como intraespecie los agentes integrantes del complejo *M. tuberculosis* (Barnes y Cave, 2003; Supply y col., 2001).

Solamente se profundiza en algunos conceptos de las pruebas de ensayos rápidos inmunocromatográficos de flujo lateral por ser más reciente su uso en veterinaria y porque en nuestro medio se ofrecen comercialmente para diagnosticar

tuberculosis siendo desconocidas por la mayoría de los profesionales veterinarios. Desde su desarrollo inicial en la década de 1980, estas pruebas han ganado amplia aceptación en el mercado del diagnóstico *in vitro*. La razón principal de su notoriedad radica, entre otras ventajas, en la simplicidad del diseño, fáciles de transportar y almacenar ya que no requieren cadena de frío, con protocolos de uso muy simples y no demandan personal altamente especializado para su utilización. Los resultados son rápidos y fáciles de interpretar sin necesidad de apoyo de ningún instrumento diagnóstico (Traina y Felcaro, 2013).

Entre las pruebas rápidas para el diagnóstico de la tuberculosis, se encuentra comercialmente en nuestro país el de la empresa Bionote Inc. con el nombre comercial de Anigen Rapid Bovine TB Test Kit. El test se basa en la detección, en suero o plasma, de anticuerpos contra la proteína MPB70 secretada por *M. bovis* que fue identificada por ser altamente específica. Como información técnica la empresa comunica mediante sus catálogos, que no existe reacción cruzada con otras micobacterias, entre ellas *M. avium*, e indican valores de SE y ES en bovinos, del 81,7% y 91,4% respectivamente (Laboratorio BIONOTE, 2010).

Son muy pocos los trabajos donde evaluaron esta prueba rápida en bovinos y no se han encontrado publicaciones que comuniquen su uso en caprinos. Wheland y col., (2008), evaluaron 214 sueros de bovinos que presentaron cultivos positivos a *M. bovis* y obtuvieron SE del 83,6%. Por otro lado a partir de 79 sueros de animales no infectados, encontraron 83% de ES.

En otro trabajo realizado por Danbirni y col., (2009) aplicaron el test de Anigen rápido BIONOTE a 16 vacas lecheras que manifestaban tos y pérdida de producción. Los resultados arrojaron 62% (10/16) de positivas. A la faena, los animales no presentaron lesiones macroscópicas. Los autores mencionan la utilidad

que estaría dando el test en el diagnóstico de infecciones tempranas por tuberculosis.

Finalmente, El-Mahrouk y El-Balawy, (2010) en Arabia Saudita, evaluaron esta misma prueba rápida en sueros de 137 de vacas positivas a IDR y que luego fueron faenadas para detectar lesiones macroscópicas. De ese total de animales, 94 presentaron patologías y de ellos el 81,9% fue positivo a la prueba serológica; por lo que los autores destacan como importante el acuerdo entre las técnicas de IDR y el Antígeno rápido BIONOTE en los casos de animales con lesiones visibles macroscópicamente.

Debido a los datos antes expuestos, se podría decir que son necesarios futuros trabajos para evaluar en profundidad tanto la SE como la ES de la prueba rápida los cuales permitan tomar decisiones acertadas al utilizar la misma en el control de la enfermedad.

Volviendo a los demás métodos diagnósticos indicados inicialmente, se han realizado numerosos ensayos para compararlos entre ellos, pero especialmente en la especie bovina (Strain y col.; 2011), no así en caprinos donde el número de investigaciones han sido menor, observando a veces importante variación en los resultados obtenidos.

La mayoría de estos estudios se realizaron partiendo de casos de campo y fundamentalmente en presentaciones de brotes. Gutierrez y col., (1998) confrontaron diferentes pruebas diagnósticas para medir respuesta celular mediante IDR e IFN- γ , y respuesta humoral aplicando una prueba de ELISA con diferentes antígenos. Dichos autores utilizaron 63 cabras naturalmente infectadas y 13 provenientes de rodeos libres de TBC. La SE y la ES para la IDR fue de 83,7% y 100% respectivamente y del 83,7% y 96% para el IFN- γ . En el caso del ELISA los

resultados fueron mas bajos con una SE del 54,9% y una ES del 88%. En este trabajo tomaron como prueba de oro la presencia de lesiones y/o el cultivo positivo en cada animal.

Otra información de interés que aportan estos autores, es que cuando el ELISA fue repetido a los 15 días posteriores de haber inoculado el derivado proteico purificado de *M. bovis* (DPP bovino), los valores de SE aumentaron al 88,6%. O sea que algunos animales que habían dado resultado negativo al primer diagnóstico realizado en el mismo momento de la IDR, dieron positivos en esta segunda oportunidad.

En otro estudio Fernández Benito y col., (2001) testaron, por IDR y ELISA, cabras en hatos con infección mixta de TBC y PTBC en la región de Salamanca, España. El muestreo incluyó animales con y sin síntomas. Por sus resultados, concluyen que la IDR detectó mejor a los animales infectados en fases iniciales y también aquellos que habían superado la infección; mientras que la serología identificó mejor a los animales enfermos en fases avanzadas de la enfermedad.

Daniel y col., (2009) compararon los resultados de IDR, lesiones macroscópicas y cultivo de micobacterias en un brote de tuberculosis caprina por *M. bovis*, que se presentó al sur-oeste de Gales y en el oeste de Inglaterra en junio del 2008. Un total de 30 cabras positivas a la IDR y 5 animales en contacto, fueron necropsiadas para observación de lesiones y toma de muestras para cultivo de micobacterias. De las 30 cabras positivas, 29 presentaron lesiones macroscópicas y microscópicas compatibles. Con respecto al cultivo de micobacterias, encontraron correlación absoluta al compararla con la IDR (30 cultivos positivos de los 30 animales con IDR positiva). Por ello concluyen que existe una elevada correlación

entre estos tres diagnósticos en casos donde la tuberculosis caprina se presenta en forma de brotes.

Valores más bajos de SE fueron observados por Buendía y col., (2013) quienes compararon los resultados de la IDR, el IFN- γ y un ELISA experimental basado en la proteína MPB-70, en 162 caprinos infectados con *M. caprae* pertenecientes a 4 granjas de la región de Murcia, España. La SE en aquellos animales que presentaron lesiones macroscópicas, fue del 44,5% para la IDR, 65,3% para IFN- γ y 66,3% para la prueba de ELISA. La SE menor de la IDR la explican por la desensibilización que ocurre al repetir en varias oportunidades esta técnica al mismo animal, algo que había ocurrido en este caso. Esta disminución de la respuesta a la IDR ante las repetidas tuberculinizaciones, fue también observada por Schneider y col., (2007) en bovinos al aplicar la IDR en tres ocasiones cada 60 días. Coad y col., (2010) asociaron el efecto desensibilizante con la disminución en la respuesta de la IL-1 β y elevación de la respuesta de la IL-10. Estos cambios en los niveles del IL, no modificaron los resultados de la prueba de IFN- γ . Por otro lado, los resultados favorables al ELISA podrían deberse a la estimulación previa con la IDR, ya que todos los animales venían con varias tuberculinizaciones realizadas (Buendía y col., 2013).

En Brasil, Marassi y col., (2009) estudiaron un caso de tuberculosis en cabras infectadas con *M. bovis*. De 45 animales positivos a la IDR, 43 (95,6%) fueron positivos a un ELISA que utilizaba proteína MPB70 de *M. bovis* como antígeno. Estos resultados llevaron a los autores a considerar a esta prueba de ELISA como una herramienta fiable para el diagnóstico de la tuberculosis en rebaños de cabras.

Con un objetivo similar de cotejar técnicas diagnósticas y observar lesiones *post mortem*, otros autores realizaron inoculaciones experimentales; Perez de Val y col., (2011) inocularon 13 cabras con *M. caprae* vía endotraqueal. Al final del ensayo, el cual se extendió por 14 semanas pos-inoculación, todos los animales resultaron positivos a las pruebas de inmunidad celular (IDR e IFN- γ). La respuesta humoral medida por ELISA y que se evaluó semanalmente, indicó que si bien todos los animales fueron positivos alguna vez, la misma fue inconstante a lo largo de las semanas. También observaron diferencias según el tipo de antígeno empleado ya que cuando utilizaron DPP bovino solo fueron positivos recién al final del estudio y cuando recurrieron al antígeno recombinante MPB83, hubo respuesta en las mediciones previas a las 14 semanas. Los animales fueron faenados a las 14 semanas y todos presentaron lesiones. Comparando estos resultados con otros anteriores de los propios autores concluyen, además, que las lesiones en las cabras parecen ser más severas con *M. caprae* que con *M. bovis* en el mismo período de tiempo.

Bezoz y col., (2010) realizaron una infección experimental con *M. caprae* en 6 cabras y evaluaron la respuesta inmunológica mediante las pruebas de IDR e IFN- γ Bovigam®. A los 248 días pos-inoculación, los animales fueron necropsiados para observar la presencia de lesiones y proceder al aislamiento de las micobacterias. Todos los animales presentaron diversas patologías y fueron positivos a ambas técnicas inmunológicas.

Otro de los ejes de estudio es cómo influyen la presencia y el tipo de lesiones sobre los resultados de las pruebas diagnósticas. Gutierrez y col., (1998) clasificaron las patologías según se presentaban simples (lesiones que afectaban menos del 10 % del parénquima pulmonar y/o en nódulos linfáticos mediastínicos) o severas



involucrando pulmones (con lesiones cavitarias y nódulos caseosos), ganglios linfáticos y/o en otros órganos. Observaron una mayor respuesta al test de ELISA ante lesiones severas (100% de los animales resultaron positivos) que frente a lesiones simples (40,9% positivos); no hubo diferencias en el caso de la prueba de IFN- γ (aproximadamente 86% en ambas categorías) y mayor en las lesiones simples (86,4%) que en las severas (75%) en la IDR. La técnica de ELISA mostró también mayores resultados positivos que las otras técnicas cuando las cabras poseían lesiones cavitarias en pulmón. La SE de la IDR en esta categoría de patologías fue baja (75%), lo que para los autores representa un problema para detectar animales que están con gran eliminación de micobacterias por vía respiratoria.

Sanchez y col., (2011) destacan que en las lesiones cavernosas, existe una menor respuesta de células T CD4+ en comparación con lesiones de tipo granulomatosas. Esta baja respuesta podría dar lugar a una disminución de la SE de la prueba de IDR.

En el otro extremo están las situaciones epidemiológicas donde la presencia de la enfermedad no está confirmada; en estos casos la correlación entre las pruebas es más difícil de observar, inclusive algunos autores llegan a sugerir que las cabras no son tan susceptibles como los bovinos al no observar lesiones en animales positivos a la IDR (Lu y col., 1992).

En Argentina, Magnano y col., (2004) evaluaron la presencia de lesiones y aislamiento de micobacterias en 13 cabras que habían resultado positivas a la IDR y que provenían de una región donde se desconocía la presencia o ausencia de la enfermedad. En la totalidad de los animales, ambas alternativas diagnósticas fueron negativas.

Como resumen se podría indicar que son numerosas las causas que interfieren en los resultados de las diferentes pruebas diagnósticas. Buddle y col., (2009) mencionan como falsos negativos: infección muy inicial donde aún no se desarrollo la respuesta inmune; infección generalizada por *M. bovis* contribuyendo al estado de anergia; estrés asociado con pobre nutrición y transporte; etapa de periparto; infección viral concurrente; uso de drogas inmunosupresoras; entre otras.

Los resultados falsos positivos pueden estar causados por: infección con *M. avium subsp paratuberculosis*; vacunación contra enfermedad de Johne; exposición a micobacterias ambientales incluidas miembros del complejo *M. avium*; infecciones cutáneas con micobacterias no identificadas; infecciones con algunas especies de bacterias no tuberculosas (Buddle y col., 2009).

Por todo esto es que se plantea como un gran desafío el desarrollo de nuevas técnicas diagnósticas para animales vivos y la continua necesidad de evaluar el comportamiento de las mismas ante situaciones de prevalencia muy diferentes como ocurre con los niveles de infección entre países y aun dentro de un mismo país (Buddle y col., 2009; Norby y col., 2004).

HIPÓTESIS

El grado de relación que existe entre los resultados de la IDR con otras pruebas diagnósticas de tuberculosis en cabras depende de la prevalencia zonal.

OBJETIVO GENERAL

El objetivo del presente trabajo fue evaluar la prueba oficial de IDR y compararla con técnicas serológicas comerciales en cabras provenientes de zonas de alta y baja prevalencia de tuberculosis.

Objetivos específicos

- Caracterizar animales infectados y no infectados mediante la aplicación de técnicas bacteriológicas e histopatológicas en ambas zonas.
- Comparar los resultados positivos y negativos de IDR en animales infectados y no infectados.
- Comparar los resultados de tres pruebas inmunológicas serológicas comerciales en animales infectados y no infectados.
- Cotejar los resultados entre IDR y pruebas inmunológicas serológicas.
- Relacionar IDR y técnicas inmunológicas serológicas con la presencia de lesiones macroscópicas.

Durante años se vienen realizando numerosos intentos para desarrollar test serológicos basados en la detección de anticuerpos contra proteínas micobacterianas como son la MPB70, MPB83, ESAT-6 y CFP-10 ya sean solas o combinadas en la misma técnica diagnóstica (Acosta y col., 2000; Aagaard y col., 2006). Y aunque la sensibilidad diagnóstica de esas pruebas es menor a la deseada, podrían jugar un rol importante en el diagnóstico especialmente cuando hay animales en diferentes etapas de la infección (Lilenbaum, 2013).

Se ha observado que la respuesta de anticuerpos en animales infectados, aumenta posterior a la aplicación de la tuberculina por lo que algunos autores aconsejan el uso en conjunto de la IDR y las técnicas serológicas para aumentar la sensibilidad de estas últimas (Buddle y col., 2009).

Comparación de técnicas diagnósticas de tuberculosis

Dentro de los métodos para el diagnóstico de la tuberculosis que más frecuentemente se utilizan en la actualidad se encuentran:

in vivo:

*prueba tuberculínica de intradermorreacción (IDR)

in vitro:

*prueba de interferón-gamma (IFN γ)

*pruebas de enzimoimmunoensayo (ELISAs)

*ensayo inmunocromatográfico

*cultivo de micobacterias en medios especiales

*lesiones macroscópicas

*histopatología

*tinción de Ziehl-Neelsen

*técnicas de Reacción en Cadena de Polimerasa (PCR)

De todas las técnicas mencionadas, la mayoría se aplican hace años en el diagnóstico de la tuberculosis en las diferentes especies y sus procedimientos son muy conocidos.

Brevemente se podría indicar de ellas que:

La IDR mide inmunidad celular y es la única prueba *in vivo* para tuberculosis en el ganado que está validada por la Organización Mundial de la de Sanidad Animal (OIE) para el comercio internacional. Esta técnica es la prueba oficial aprobada en Argentina por el SENASA para el diagnóstico de tuberculosis en las diferentes especies animales (SENASA, 2012).

Otro método de medición de la inmunidad mediada por células, que está adquiriendo cada vez mayor popularidad en los programas de control y de erradicación de la tuberculosis bovina, es la prueba de interferón-gamma (IFN γ) (Strain y col., 2011). La misma ha sido aprobada para su uso en varios programas nacionales, incluida la Unión Europea, EE.UU., Nueva Zelanda y Australia (OIE, 2013).

Muchas pruebas que miden la presencia de anticuerpos humorales fueron desarrolladas y puestas a prueba desde los años 1980 hasta la actualidad, donde es continua y amplia la evaluación de nuevos antígenos destinados a mejorar los resultados. Lamentablemente las mismas no han tenido un papel importante en los programas de control o de erradicación (Cousins y Florisson, 2005). Los ELISAs y los ensayos inmunocromatográficos presentan la misma dificultad; en general se considera que la detección humoral de anticuerpos es un mal indicador de la infección tuberculosa ya que este tipo de respuesta se eleva hacia la etapa final de la enfermedad.

La presencia de micobacterias se puede demostrar microscópicamente mediante la tinción de Ziehl-Neelsen realizada en frotis directos de muestras clínicas o sobre secciones de tejidos preparados. Esta técnica se caracteriza por su rapidez, su bajo costo y sin tener la necesidad de contar con laboratorios especializados. Como inconveniente muchas de las lesiones son a menudo paucibacilares, por ello la presencia de organismos ácido-alcohol resistentes puede no ser detectada (OIE, 2013).

El cultivo en medios de aislamiento especiales, es considerado la prueba de oro (OIE, 2013). No obstante presenta cierta complejidad en su desarrollo y el crecimiento de *M. bovis* puede demorar más allá de los 60 días posteriores a la siembra lo que implica una dificultad para el diagnóstico rápido y práctico.

El diagnóstico patológico presuntivo de tuberculosis se puede hacer si el tejido tiene lesiones macroscópicas granulomatosas y/o histológicas características con necrosis caseosa, mineralización, linfocitos, células epitelioides, células gigantes multinucleadas y macrófagos. De todas maneras la presencia de ese tipo de lesiones no indica la certeza de infección tuberculosa ya que otros agentes llevan a patologías similares (Jubb y col., 2007).

Dentro de las técnicas moleculares para la tipificación de micobacterias, se han desarrollado numerosos métodos basados en la PCR. Se destacan el de las Repeticiones en tándem de número variable (VNTRs) y el spoligotiping que permiten diferenciar tanto interespecie como intraespecie los agentes integrantes del complejo *M. tuberculosis* (Barnes y Cave, 2003; Supply y col., 2001).

Solamente se profundiza en algunos conceptos de las pruebas de ensayos rápidos inmunocromatográficos de flujo lateral por ser más reciente su uso en veterinaria y porque en nuestro medio se ofrecen comercialmente para diagnosticar

tuberculosis siendo desconocidas por la mayoría de los profesionales veterinarios. Desde su desarrollo inicial en la década de 1980, estas pruebas han ganado amplia aceptación en el mercado del diagnóstico *in vitro*. La razón principal de su notoriedad radica, entre otras ventajas, en la simplicidad del diseño, fáciles de transportar y almacenar ya que no requieren cadena de frío, con protocolos de uso muy simples y no demandan personal altamente especializado para su utilización. Los resultados son rápidos y fáciles de interpretar sin necesidad de apoyo de ningún instrumento diagnóstico (Traina y Felcaro, 2013).

Entre las pruebas rápidas para el diagnóstico de la tuberculosis, se encuentra comercialmente en nuestro país el de la empresa Bionote Inc. con el nombre comercial de Anigen Rapid Bovine TB Test Kit. El test se basa en la detección, en suero o plasma, de anticuerpos contra la proteína MPB70 secretada por *M. bovis* que fue identificada por ser altamente específica. Como información técnica la empresa comunica mediante sus catálogos, que no existe reacción cruzada con otras micobacterias, entre ellas *M. avium*, e indican valores de SE y ES en bovinos, del 81,7% y 91,4% respectivamente (Laboratorio BIONOTE, 2010).

Son muy pocos los trabajos donde evaluaron esta prueba rápida en bovinos y no se han encontrado publicaciones que comuniquen su uso en caprinos. Wheland y col., (2008), evaluaron 214 sueros de bovinos que presentaron cultivos positivos a *M. bovis* y obtuvieron SE del 83,6%. Por otro lado a partir de 79 sueros de animales no infectados, encontraron 83% de ES.

En otro trabajo realizado por Danbirni y col., (2009) aplicaron el test de Anigen rápido BIONOTE a 16 vacas lecheras que manifestaban tos y pérdida de producción. Los resultados arrojaron 62% (10/16) de positivas. A la faena, los animales no presentaron lesiones macroscópicas. Los autores mencionan la utilidad

que estaría dando el test en el diagnóstico de infecciones tempranas por tuberculosis.

Finalmente, El-Mahrouk y El-Balawy, (2010) en Arabia Saudita, evaluaron esta misma prueba rápida en sueros de 137 de vacas positivas a IDR y que luego fueron faenadas para detectar lesiones macroscópicas. De ese total de animales, 94 presentaron patologías y de ellos el 81,9% fue positivo a la prueba serológica; por lo que los autores destacan como importante el acuerdo entre las técnicas de IDR y el Antígeno rápido BIONOTE en los casos de animales con lesiones visibles macroscópicamente.

Debido a los datos antes expuestos, se podría decir que son necesarios futuros trabajos para evaluar en profundidad tanto la SE como la ES de la prueba rápida los cuales permitan tomar decisiones acertadas al utilizar la misma en el control de la enfermedad.

Volviendo a los demás métodos diagnósticos indicados inicialmente, se han realizado numerosos ensayos para compararlos entre ellos, pero especialmente en la especie bovina (Strain y col.; 2011), no así en caprinos donde el número de investigaciones han sido menor, observando a veces importante variación en los resultados obtenidos.

La mayoría de estos estudios se realizaron partiendo de casos de campo y fundamentalmente en presentaciones de brotes. Gutierrez y col., (1998) confrontaron diferentes pruebas diagnósticas para medir respuesta celular mediante IDR e IFN- γ , y respuesta humoral aplicando una prueba de ELISA con diferentes antígenos. Dichos autores utilizaron 63 cabras naturalmente infectadas y 13 provenientes de rodeos libres de TBC. La SE y la ES para la IDR fue de 83,7% y 100% respectivamente y del 83,7% y 96% para el IFN- γ . En el caso del ELISA los

resultados fueron mas bajos con una SE del 54,9% y una ES del 88%. En este trabajo tomaron como prueba de oro la presencia de lesiones y/o el cultivo positivo en cada animal.

Otra información de interés que aportan estos autores, es que cuando el ELISA fue repetido a los 15 días posteriores de haber inoculado el derivado proteico purificado de *M. bovis* (DPP bovino), los valores de SE aumentaron al 88,6%. O sea que algunos animales que habían dado resultado negativo al primer diagnóstico realizado en el mismo momento de la IDR, dieron positivos en esta segunda oportunidad.

En otro estudio Fernández Benito y col., (2001) testaron, por IDR y ELISA, cabras en hatos con infección mixta de TBC y PTBC en la región de Salamanca, España. El muestreo incluyó animales con y sin síntomas. Por sus resultados, concluyen que la IDR detectó mejor a los animales infectados en fases iniciales y también aquellos que habían superado la infección; mientras que la serología identificó mejor a los animales enfermos en fases avanzadas de la enfermedad.

Daniel y col., (2009) compararon los resultados de IDR, lesiones macroscópicas y cultivo de micobacterias en un brote de tuberculosis caprina por *M. bovis*, que se presentó al sur-oeste de Gales y en el oeste de Inglaterra en junio del 2008. Un total de 30 cabras positivas a la IDR y 5 animales en contacto, fueron necropsiadas para observación de lesiones y toma de muestras para cultivo de micobacterias. De las 30 cabras positivas, 29 presentaron lesiones macroscópicas y microscópicas compatibles. Con respecto al cultivo de micobacterias, encontraron correlación absoluta al compararla con la IDR (30 cultivos positivos de los 30 animales con IDR positiva). Por ello concluyen que existe una elevada correlación

entre estos tres diagnósticos en casos donde la tuberculosis caprina se presenta en forma de brotes.

Valores más bajos de SE fueron observados por Buendía y col., (2013) quienes compararon los resultados de la IDR, el IFN- γ y un ELISA experimental basado en la proteína MPB-70, en 162 caprinos infectados con *M. caprae* pertenecientes a 4 granjas de la región de Murcia, España. La SE en aquellos animales que presentaron lesiones macroscópicas, fue del 44,5% para la IDR, 65,3% para IFN- γ y 66,3% para la prueba de ELISA. La SE menor de la IDR la explican por la desensibilización que ocurre al repetir en varias oportunidades esta técnica al mismo animal, algo que había ocurrido en este caso. Esta disminución de la respuesta a la IDR ante las repetidas tuberculinizaciones, fue también observada por Schneider y col., (2007) en bovinos al aplicar la IDR en tres ocasiones cada 60 días. Coad y col., (2010) asociaron el efecto desensibilizante con la disminución en la respuesta de la IL-1 β y elevación de la respuesta de la IL-10. Estos cambios en los niveles del IL, no modificaron los resultados de la prueba de IFN- γ . Por otro lado, los resultados favorables al ELISA podrían deberse a la estimulación previa con la IDR, ya que todos los animales venían con varias tuberculinizaciones realizadas (Buendía y col., 2013).

En Brasil, Marassi y col., (2009) estudiaron un caso de tuberculosis en cabras infectadas con *M. bovis*. De 45 animales positivos a la IDR, 43 (95,6%) fueron positivos a un ELISA que utilizaba proteína MPB70 de *M. bovis* como antígeno. Estos resultados llevaron a los autores a considerar a esta prueba de ELISA como una herramienta fiable para el diagnóstico de la tuberculosis en rebaños de cabras.

Con un objetivo similar de cotejar técnicas diagnósticas y observar lesiones *post mortem*, otros autores realizaron inoculaciones experimentales; Perez de Val y col., (2011) inocularon 13 cabras con *M. caprae* vía endotraqueal. Al final del ensayo, el cual se extendió por 14 semanas pos-inoculación, todos los animales resultaron positivos a las pruebas de inmunidad celular (IDR e IFN- γ). La respuesta humoral medida por ELISA y que se evaluó semanalmente, indicó que si bien todos los animales fueron positivos alguna vez, la misma fue inconstante a lo largo de las semanas. También observaron diferencias según el tipo de antígeno empleado ya que cuando utilizaron DPP bovino solo fueron positivos recién al final del estudio y cuando recurrieron al antígeno recombinante MPB83, hubo respuesta en las mediciones previas a las 14 semanas. Los animales fueron faenados a las 14 semanas y todos presentaron lesiones. Comparando estos resultados con otros anteriores de los propios autores concluyen, además, que las lesiones en las cabras parecen ser más severas con *M. caprae* que con *M. bovis* en el mismo período de tiempo.

Bezos y col., (2010) realizaron una infección experimental con *M. caprae* en 6 cabras y evaluaron la respuesta inmunológica mediante las pruebas de IDR e IFN- γ Bovigam®. A los 248 días pos-inoculación, los animales fueron necropsiados para observar la presencia de lesiones y proceder al aislamiento de las micobacterias. Todos los animales presentaron diversas patologías y fueron positivos a ambas técnicas inmunológicas.

Otro de los ejes de estudio es cómo influyen la presencia y el tipo de lesiones sobre los resultados de las pruebas diagnósticas. Gutierrez y col., (1998) clasificaron las patologías según se presentaban simples (lesiones que afectaban menos del 10 % del parénquima pulmonar y/o en nódulos linfáticos mediastínicos) o severas

involucrando pulmones (con lesiones cavitarias y nódulos caseosos), ganglios linfáticos y/o en otros órganos. Observaron una mayor respuesta al test de ELISA ante lesiones severas (100% de los animales resultaron positivos) que frente a lesiones simples (40,9% positivos); no hubo diferencias en el caso de la prueba de IFN- γ (aproximadamente 86% en ambas categorías) y mayor en las lesiones simples (86,4%) que en las severas (75%) en la IDR. La técnica de ELISA mostró también mayores resultados positivos que las otras técnicas cuando las cabras poseían lesiones cavitarias en pulmón. La SE de la IDR en esta categoría de patologías fue baja (75%), lo que para los autores representa un problema para detectar animales que están con gran eliminación de micobacterias por vía respiratoria.

Sanchez y col., (2011) destacan que en las lesiones cavernosas, existe una menor respuesta de células T CD4+ en comparación con lesiones de tipo granulomatosas. Esta baja respuesta podría dar lugar a una disminución de la SE de la prueba de IDR.

En el otro extremo están las situaciones epidemiológicas donde la presencia de la enfermedad no está confirmada; en estos casos la correlación entre las pruebas es más difícil de observar, inclusive algunos autores llegan a sugerir que las cabras no son tan susceptibles como los bovinos al no observar lesiones en animales positivos a la IDR (Lu y col., 1992).

En Argentina, Magnano y col., (2004) evaluaron la presencia de lesiones y aislamiento de micobacterias en 13 cabras que habían resultado positivas a la IDR y que provenían de una región donde se desconocía la presencia o ausencia de la enfermedad. En la totalidad de los animales, ambas alternativas diagnósticas fueron negativas.

Como resumen se podría indicar que son numerosas las causas que interfieren en los resultados de las diferentes pruebas diagnósticas. Buddle y col., (2009) mencionan como falsos negativos: infección muy inicial donde aún no se desarrollo la respuesta inmune; infección generalizada por *M. bovis* contribuyendo al estado de anergia; estrés asociado con pobre nutrición y transporte; etapa de periparto; infección viral concurrente; uso de drogas inmunosupresoras; entre otras.

Los resultados falsos positivos pueden estar causados por: infección con *M. avium subsp paratuberculosis*; vacunación contra enfermedad de Johne; exposición a micobacterias ambientales incluidas miembros del complejo *M. avium*; infecciones cutáneas con micobacterias no identificadas; infecciones con algunas especies de bacterias no tuberculosas (Buddle y col., 2009).

Por todo esto es que se plantea como un gran desafío el desarrollo de nuevas técnicas diagnósticas para animales vivos y la continua necesidad de evaluar el comportamiento de las mismas ante situaciones de prevalencia muy diferentes como ocurre con los niveles de infección entre países y aun dentro de un mismo país (Buddle y col., 2009; Norby y col., 2004).

HIPÓTESIS

El grado de relación que existe entre los resultados de la IDR con otras pruebas diagnósticas de tuberculosis en cabras depende de la prevalencia zonal.

OBJETIVO GENERAL

El objetivo del presente trabajo fue evaluar la prueba oficial de IDR y compararla con técnicas serológicas comerciales en cabras provenientes de zonas de alta y baja prevalencia de tuberculosis.

Objetivos específicos

-Caracterizar animales infectados y no infectados mediante la aplicación de técnicas bacteriológicas e histopatológicas en ambas zonas.

-Comparar los resultados positivos y negativos de IDR en animales infectados y no infectados.

-Comparar los resultados de tres pruebas inmunológicas serológicas comerciales en animales infectados y no infectados.

-Cotejar los resultados entre IDR y pruebas inmunológicas serológicas.

-Relacionar IDR y técnicas inmunológicas serológicas con la presencia de lesiones macroscópicas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Establecimientos y tipo de producción.

Los establecimientos en los que se realizó la presente investigación pertenecieron a pequeños productores familiares, especialmente de zonas marginales, que compartían similitudes socio-productivas. Sus majadas poseían entre 100 y 300 animales, en su mayoría de razas mestizas, con estado corporal normal a delgado. El sistema productivo, para todos los casos, era de cría extensiva donde los animales pastoreaban durante todo el día y por la noche permanecían en corrales de encierre (Figura 1).

Las explotaciones se sustentaban casi exclusivamente con la producción y venta de cabritos y en algunos casos sobre la venta de leche y/o queso de cabra.



Figura 1. Corral de encierre donde las cabras permanecen durante la noche; durante el día son llevadas a los campos de pastoreo.

Muestreo

Se utilizó un muestreo intencional o de conveniencia, que se incluye dentro de los métodos de muestreo no probabilísticos, buscando una selección de campos y animales lo más representativa posible. Ante esta situación es necesario tener presente la dificultad de generalizar o inferir los resultados a toda la población debido a que no se tiene certeza de que la muestra extraída sea totalmente representativa, ya que no todos los sujetos de la población tienen la misma probabilidad de ser elegidos.

Para la selección de establecimientos y de animales se utilizó la siguiente metodología que se puede dividir en dos etapas:

*Inicialmente se identificaron las áreas de estudio de alta y baja prevalencia de tuberculosis caprina, claramente diferenciadas según datos previos de nuestro grupo de investigación de Sanidad en Rumiantes de la FAV-UNRC, como así también por información aportada por veterinarios particulares y del servicio oficial que realizaban sus tareas en las áreas (datos no publicados).

Con respecto a datos previos de tuberculinizaciones que se utilizaron para determinar las zonas de bajas prevalencias, se tuvieron en cuenta los aportados por Tríbulo y col., 2002, en el norte de Córdoba, donde analizaron aproximadamente 10.000 cabras de 117 establecimientos arrojando un 0,4% de reaccionantes; los generados por el grupo de Sanidad en Rumiantes en la región de Chancaní con 331 cabras pertenecientes a 7 productores que arrojaron un 5% de positivas, y en la zona de Río Cuarto con prevalencias menores al 1% (datos no publicados). En todos los casos no se observaron signos clínicos compatibles ni se contaba con antecedentes aportados por los productores, de ninguno de los campos

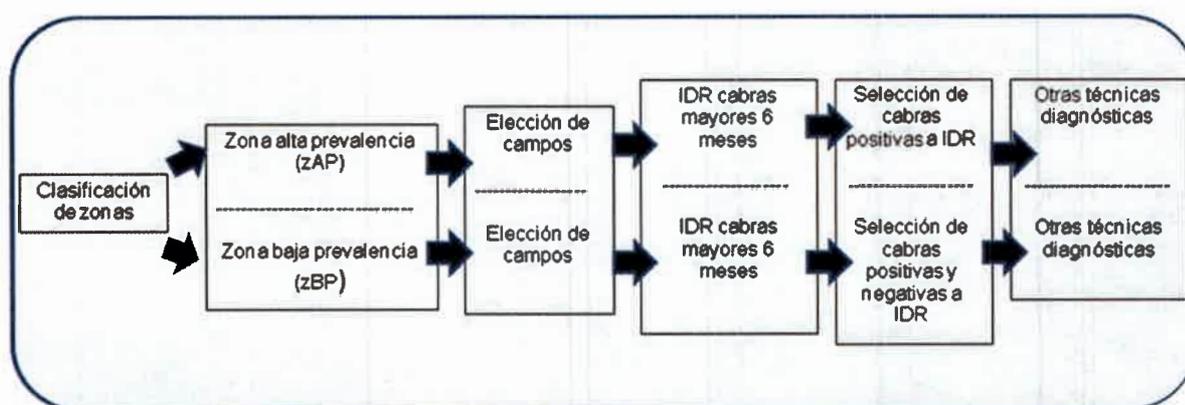
muestreados, que hicieran sospechar de la presencia de tuberculosis en sus caprinos.

Por otra parte en la región de alta prevalencia, con una extensión de unos 10 km, se tenían registros de aproximadamente 2.500 caprinos tuberculinizados pertenecientes a 18 establecimientos. En 4 de ellos no se hallaron animales reaccionantes mientras que en los otros 14 la prevalencia osciló entre el 1% y el 67%. En estos últimos se reportaron además cabras con sintomatología evidente y muerte por tuberculosis (datos no publicados).

Con todos estos antecedentes se eligieron las zonas y dentro de ellas los campos que se utilizaron para el trabajo.

*Posteriormente se realizó la tuberculinización de todos los caprinos mayores de 6 meses de edad en los diferentes hatos seleccionados de las dos zonas. Los resultados de esta prueba (positivos y negativos) sirvieron como base para la elección final de los animales a los cuales se les aplicaron las demás pruebas diagnósticas.

Esquema del desarrollo del trabajo



La cantidad de caprinos analizados de cada establecimiento, estuvo determinada por la predisposición de los propietarios de cuántos vender y por otro lado nuestra decisión de elegir un número bajo de animales de cada uno para

obtener una mayor cantidad de establecimientos muestreados y así conseguir una mayor representatividad en la información generada.

Finalmente se estudiaron un total de 122 caprinos, pertenecientes a 23 productores, ubicados en ambas regiones.

La elección de los animales para necropsia, se realizó ingresando al corral y seleccionando al azar entre los animales que habían resultado positivos o negativos a la IDR.

A continuación se detalla el número de animales y productores de las zonas de alta y baja prevalencia de tuberculosis

Zona de alta prevalencia (zAP)

En la **zAP** se analizaron solamente animales positivos a la IDR. Por razones económicas y fundamentalmente productivas, se resolvió, en conjunto con los productores, no faenar animales negativos a la IDR.

La misma comprendió 9 establecimientos caprinos ubicados en la provincia de San Juan, Argentina (Figura 2). En todos los casos el sistema de producción era de forma extensiva, en áreas marginales donde, debido a las características del clima y el suelo, es casi imposible la crianza de bovinos.

De esos predios se seleccionaron un total de 54 cabras (Figura 3). De ellas 53 fueron hembras adultas (mayores de 3 años) y un macho de 6 meses de edad.

Zona de baja prevalencia (zBP)

De esta zona se seleccionaron caprinos con resultados positivos y negativos a la IDR, que pertenecían a 14 productores de la provincia de Córdoba, Argentina. Tres de ellos ubicados en una región agrícola-ganadera cercana a la ciudad de Río Cuarto; 5 en una región ganadera y menos agrícola a la anterior del norte de la

provincia y 6 en una zona únicamente ganadera ubicada en cercanías de la reserva natural de Chancaní, al noroeste de la provincia (Figura 2).

Se evaluaron en total 68 caprinos (Figura 3); de ellos 66 fueron hembras adultas y 2 machos adultos. El detalle del número de animales y propietarios según el resultado a la IDR fue el siguiente:

Animales Positivos a la IDR: 41 distribuidos en 13 productores (2 de la zona rural de Río Cuarto, 5 del norte de Córdoba y 6 de la región de Chancaní)

Animales Negativos a la IDR: 27 pertenecientes a dos productores de la zona rural de Río Cuarto, en uno de los cuales también se seleccionaron animales positivos.

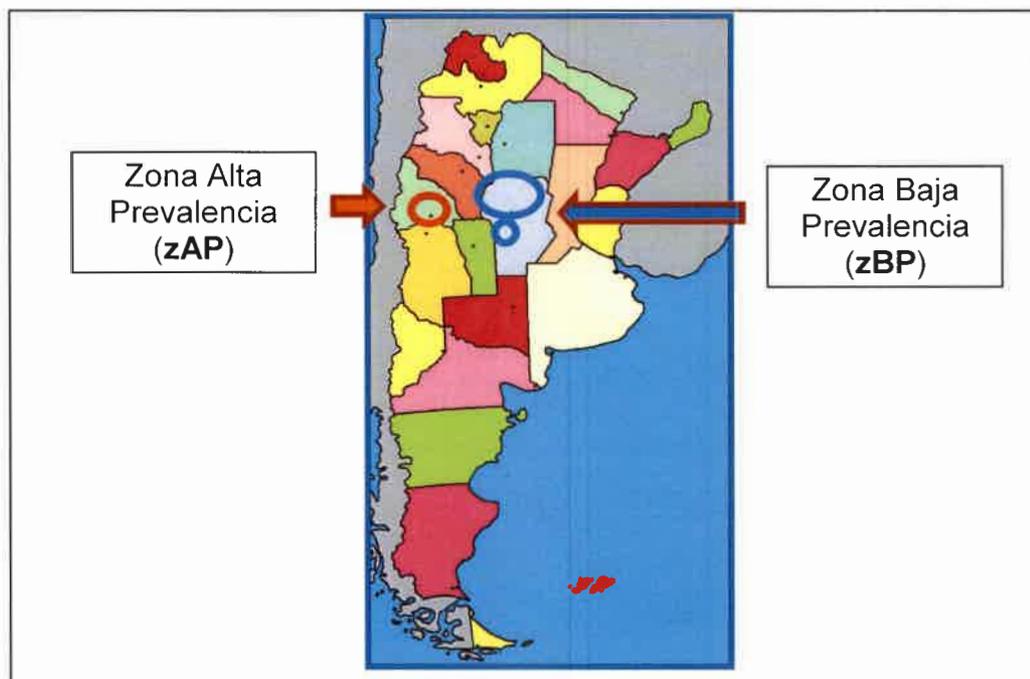


Figura 2. Distribución geográfica de la **zAP** (ubicada en la región sureste de la provincia de San Juan) y de la **zBP** (ubicada en dos regiones próximas entre sí de la provincia de Córdoba).

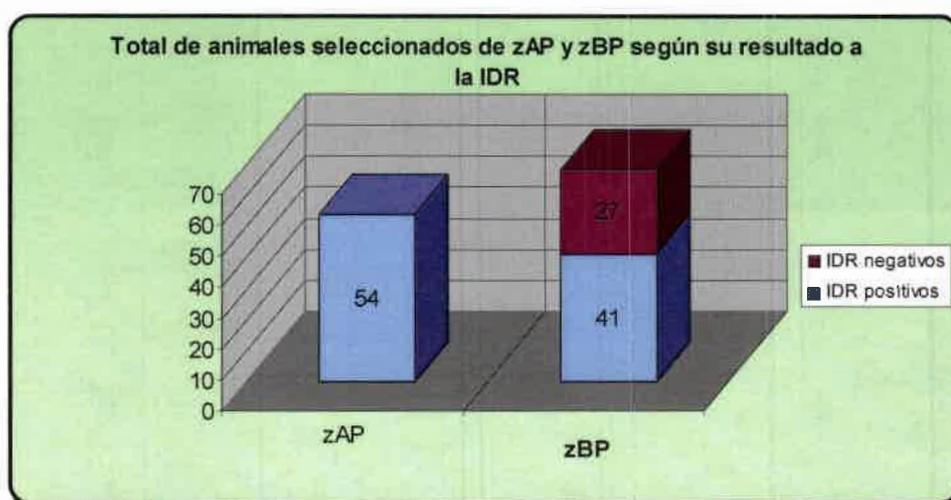


Figura 3. Se detalla el número de animales seleccionados en cada zona sobre un total de 122 caprinos. Los resultados de la IDR fueron la base de elección de los mismos; en la **zAP** solamente se analizaron animales positivos y en la **zBP** positivos y negativos.

Pruebas diagnósticas

A continuación se detallan las pruebas diagnósticas que se utilizaron en los animales seleccionados:

Técnica para evaluar la inmunidad celular

-Prueba tuberculínica de intradermorreacción (IDR)

Técnicas para evaluar la inmunidad humoral

-ELISA IDEXX

-ELISA BIONOTE

-TR Anigen

Diagnóstico Patológico

-Patología macroscópica

-Patología microscópica

Diagnóstico bacteriológico específico para micobacterias

-Cultivo en medio Stonebrink

-Cultivo en medio Löwenstein-Jensen

-Tinción de Ziehl Neelsen

Tipificación de micobacterias por medio de biología molecular

-Spoligotyping

Descripción de las técnicas diagnósticas

1. Técnica para la evaluar la inmunidad celular

Prueba tuberculínica de intradermorreacción

Tuberculina

Como los caprinos son susceptibles especialmente a *M. bovis*, se utilizó la tuberculina DPP bovino (derivado proteico purificado), elaborado a partir de la cepa de *M. bovis* AN₅. Las mismas fueron producidas por laboratorios particulares que poseen el control y la aprobación del SENASA.

Los frascos de tuberculinas fueron transportados y conservados entre 2-8 C°, y protegidos de la luz solar directa durante el trabajo de campo.

Procedimientos para la aplicación de la tuberculina

-Instrumental: se utilizaron jeringas metálicas de pequeño volumen (3 mL), graduadas en 0,1 mL y agujas hipodérmicas, reutilizables, calibre 6, longitud de la cánula 5 mm, punta tipo b (bisel corto).

-Técnica de aplicación de la tuberculina: una vez inmobilizado el animal se registró el número del individuo determinado por medio de caravanas. Inicialmente, utilizando un calibre, se procedió a la medición de uno de los pliegues anocaudales internos lugar donde se realizó la prueba. Cuando la piel estaba sucia en el punto de inoculación, se limpió con un algodón humedecido en agua evitando el uso de desinfectantes o productos químicos que irriten la piel. Posteriormente se procedió a insertar la aguja vía intradérmica e inyectar 0,1 mL de DPP bovino (Figura 4).

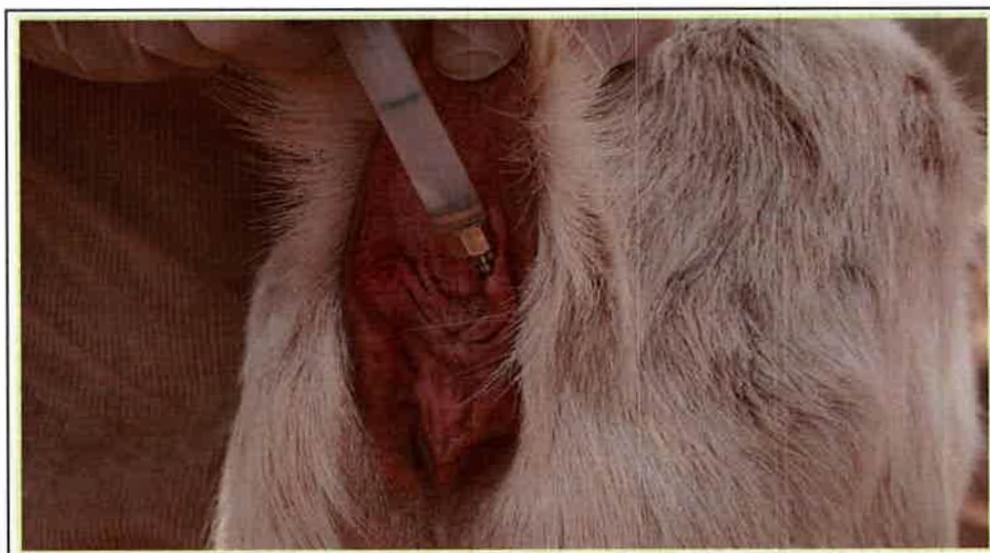


Figura 4. Inoculación intradérmica de 0,1 mL de DPP bovino en el pliegue anocaudal interno.

Lectura de la prueba e interpretación de los resultados

La lectura se realizó a las 72 horas posinoculación. Para tal fin se evaluó la existencia de reacción tisular en el área de aplicación de la tuberculina mediante



palpación y posteriormente se procedió a la medición del pliegue con el calibre (Figuras 5 y 6).

Para la interpretación del resultado diagnóstico en cada animal se siguió la reglamentación vigente a nivel nacional establecida por el SENASA (2012) donde la diferencia entre las mediciones previa a la inoculación y al momento de la lectura indicaba el resultado de cada animal: 0-2 mm: Negativo; 3-4mm: Sospechoso y 5 o más: Positivo. También se tuvo en cuenta la presencia de induración (tumoración) en el pliegue inoculado.

En una planilla de registro de los datos (protocolo de tuberculinización), se asentó toda esta información y se indicaron los resultados para cada animal.

2) Técnicas para evaluar la inmunidad humoral

Para el diagnóstico con las técnicas serológicas que miden inmunidad humoral, se recolectaron 5 ml de sangre, con jeringa y agujas estériles de la vena yugular.

Los animales se sujetaron, luego se limpió la zona del cuello con algodón y alcohol para posteriormente realizar la punción.

La sangre fue rápidamente colocada a un tubo de ensayo rotulado con el número del animal. Una vez liberado el suero, el mismo se transvasó a un tubo eppendorf de 1,5 mL de capacidad y se almacenó a -20°C hasta su procesamiento.

El momento de sangrado fue previo a la IDR o pasados al menos 90 días de realizada la prueba. Este manejo tenía como fin no alterar el resultado de las técnicas serológicas, hecho que se describe si se sangran los animales en los primeros días posteriores a la aplicación de la IDR (Gutierrez y col., 1998).

Para la realización de las tres pruebas serológicas, se siguieron y respetaron todos los pasos indicados por los laboratorios fabricantes según constaban en sus respectivos folletos.

Las pruebas de ELISA IDEXX y de ELISA BIONOTE se llevaron a cabo en el laboratorio de referencia nacional de SENASA ubicado en Martínez, Buenos Aires en conjunto con profesionales de ese laboratorio y de nuestro grupo de trabajo de la UNRC. Para tener mayor certeza y seguridad de los resultados, el diagnóstico de cada muestra se realizó por duplicado.

La TR Anigen, se realizó en el laboratorio de serología del Departamento de Patología Animal de la FAV-UNRC, con todas las condiciones ambientales aconsejadas por el laboratorio fabricante.

Con respecto al número de animales que se procesaron para cada prueba, en el caso de los ELISAs (BIONOTE y IDEXX) fueron un total de 71 de los cuales 29 pertenecían en la **zAP** y 42 a la **zBP**.

Por inmunocromatografía (TR Anigen) se evaluaron 82 cabras donde 44 correspondieron a **zAP** y 38 a **zBP**.

El número de animales que se procesó con cada técnica serológica, dependió fundamentalmente de las posibilidades de acceder a una cantidad fija de determinaciones para cada kit. Debido a ello el número de muestras no fue homogéneo para todas las pruebas.

a) *Técnica de Enzimo inmuno análisis indirecto IDEXX M. bovis (ELISA IDEXX)*

El kit para la detección de anticuerpos frente a *M. bovis* de IDEXX es un inmunoensayo enzimático diseñado para el análisis de muestras bovinas de suero y

plasma. Pegados a cada pocillo de la placa, utiliza dos antígenos recombinantes de *M. bovis* que son los de mayor frecuencia de reconocimiento MPB83 y MPB70 (Wiker, 2009).

Este kit fue certificado por la OIE en mayo del 2012 y declarado apto para la detección de anticuerpos de *M. bovis* en muestras de plasma o suero de ganado bovino únicamente, con el fin de usarse como una prueba adicional, junto con otros métodos, para el diagnóstico y manejo de la infección por *M. bovis* (OIE, Resolución N° 24, 2012).

Procedimiento según indicaciones del fabricante. Laboratorio IDEXX (2013)

- Inicialmente se colocaron 100 µL de cada muestra del suero problema diluido y de los sueros controles positivos y negativos dentro de los pocillos.
- Se cubrió la placa e incubó a 18-26°C por 60 minutos.
- El líquido sobrenadante de los pocillos se aspiró y luego se lavaron los mismos con 300 µL de solución de lavado, repitiendo 4 veces.
- Se agregó a cada pocillo 100 µL de conjugado específico IgG anti-bovino.
- Se cubrió la placa e incubó nuevamente a 18-26°C por 30 minutos.
- Se retiró el líquido sobrenadante y se lavó 4 veces como lo indicado en el punto 3.
- Se agregó 100 µL del sustrato TMB dentro de cada pocillo.
- Otra vez se cubrió la placa e incubó a 18-26°C por 15 minutos.
- Finalmente se incorporó 100 µL de solución de frenado en cada pocillo.

- La lectura se realizó a una absorbancia a 450 nm y se calcularon los resultados.

b) *Técnica de Enzimo inmuno análisis directo BIONOTE Anigen BTB Ab ELISA 2.0 (ELISA BIONOTE)*

A diferencia del laboratorio anterior, BIONOTE Anigen desarrolló una técnica de ELISA directo para detectar anticuerpos contra *M. bovis*, utilizando solamente la proteína MPB70.

La información aportada por el laboratorio indica una SE del 88.1% y una ES del 99.2% en bovinos, en ambos casos comparadas con la prueba de IDR

Procedimiento según indicaciones del fabricante. Laboratorio Bionote (2013)

- Inicialmente se preparó la placa de prueba de antígeno recubierto BTB.
- Se agregaron 50 µL de los sueros controles y de las muestras en los pocillos.
- Luego se incorporó 50 µL de antígeno de *M. bovis* marcado con peroxidasa del rábano picante (HRP) a cada recipiente.
- Se incubó la placa durante 60 minutos a 37 °C.
- Se realizó un lavado de la placa 6 veces con 350 µL solución de lavado diluída y luego se aspiró el líquido sobrenadante.
- Se añadió 100 µL de solución de sustrato mixto (listo para usar) a cada pocillo e incubó durante 15 minutos a temperatura ambiente.
- Finalmente se incorporó 100 µL de solución de frenado a cada recipiente.

- La medición se realizó a una longitud de onda de 450 nm y se calcularon los resultados.

c) Test rápido inmunocromatográfico, Anigen Rapid Bovine TB Ab Test, Bionote, Inc. (TR Anigen)

El test da la posibilidad de utilizarlo con sangre, plasma o suero. En nuestro trabajo se utilizaron solamente muestras de suero.

Procedimiento según especificaciones del fabricante. Laboratorio Bionote (2010)

- Se retiró el kit del material contenedor y se colocó en una superficie plana y seca.
- Se incorporó 10 μ L de suero en el orificio del dispositivo indicado con una "S".
- Se esperó durante 1 minuto y posteriormente se agregaron 3 gotas de la suspensión buffer dentro del hoyo indicado para la misma.
- A los 20 minutos se procedió a leer los resultados observando las ventanas de la placa.

Interpretación de la prueba

Inicialmente se observó la banda coloreada del control, simbolizada con la letra "C" que indica que el test se realizó correctamente. De no aparecer dicha línea, el mismo se consideró no válido:

Negativo: presencia de una sola banda en el sector "C" de la ventana.

Positivo: presencia de 2 bandas en los sectores "C" y "T" dentro de la ventana (Figura 7).

Inspección *post mortem*

Los 122 animales seleccionados para el estudio, fueron eutanasiados para realizar una minuciosa observación en búsqueda de lesiones macroscópicas compatibles con tuberculosis y posterior toma de muestra para bacteriología e histopatología. La inspección *post mortem* de algunos animales se realizó en la sala de necropsia del Departamento de Patología Animal de la FAV-UNRC y otros durante la faena en frigoríficos regionales que cuentan con inspección veterinaria oficial. Esto dependió fundamentalmente de la posibilidad de trasladar los animales hasta la UNRC. Si bien la necropsia, por la mayor disponibilidad de tiempo, es más sensible que la inspección durante la faena para la observación de lesiones macroscópicas, la factibilidad económica hace que esta última sea una buena metodología para la inspección de gran número de animales (Corner, 1994). No obstante cuando los animales fueron faenados en los frigoríficos, se dispusieron esos días únicamente para las faenas de las cabras lo que permitió realizar las actividades con el tiempo adecuado para una correcta observación y toma de muestras.

Durante la faena se inspeccionaron los animales iniciando con un examen general de órganos y sistemas, continuando con una observación particular externa y palpación-presión de los mismos y finalmente realizando cortes foliados de pulmón, hígado, bazo y demás órganos del tracto-gastrointestinal como también ganglios linfáticos retrofaríngeos, parotídeos, mediastínicos, bronquiales, mesentéricos y gastro-hepáticos. Según Corner, (1994) solamente con la inspección del pulmón y de los ganglios linfáticos antes mencionados, se detectan más del 95% de los bovinos que presentan lesiones macroscópicas compatibles con tuberculosis.

Con la finalidad de obtener datos objetivos al momento de la necropsia, se diseñó una planilla similar a la propuesta por Garbaccio y col., (2014) con adaptaciones que se consideraron importantes de realizar. En la misma se detallaron las lesiones que se observaban en los distintos tejidos y órganos, con sus respectivas características macroscópicas y distribución.

Se consideraron lesiones compatibles con tuberculosis tanto aquellas que se presentaban como nodulares, de diferentes tamaños, conteniendo en su interior un material caseoso, pálido amarillento, con o sin calcificación y que podían o no estar rodeados por una cápsula fibrosa (Figura 8), como las otras que se observaban como cavidades de diferentes tamaños, con ausencia de tejido pulmonar dentro de las mismas y con contenido mixto pastoso-caseoso; en algunos casos, a este contenido se le sumaba un exudado seroso (cavernas pulmonares) (Figura 9).

En el presente trabajo se estudió además si las características patológicas y la ubicación de las lesiones modificaban los resultados de la pruebas serológicas. Algunos autores asocian mayor porcentaje de positivos con la presencia de lesiones generalizadas y cavernosas pulmonares (Gutierrez y col.; 1998).

Para tal fin se relacionaron las pruebas de ELISA BIONOTE y TR Anigen con las lesiones macroscópicas. La información de las características patológicas se sintetizó en lesiones respiratorias (incluía nódulos linfáticos mediastínicos y/o pulmones con o sin lesiones cavernosas), digestivas (en tracto gastrointestinal y/o hígado) y generalizadas (en varios órganos de diferentes sistemas).

Para analizar esta relación, en el caso del test ELISA BIONOTE, se aplicó a un total de 29 animales y el TR Anigen a 44, todos pertenecientes a la **zAP** y que presentaron lesiones macroscópicas.

Para tener mayor certeza en los resultados obtenidos, todas las actividades de campo y necropsias fueron realizadas por integrantes del grupo de investigación de Salud en Rumiantes FAV-UNRC, capacitados en el tema, en conjunto con Médicos Veterinarios locales donde se realizaban las tareas diagnósticas.

Bacteriología

Toma de muestra para el diagnóstico bacteriológico

El muestreo para el diagnóstico bacteriológico se realizó dependiendo de la presencia o ausencia de alteraciones macroscópicas. En el primer caso se recolectaron muestras de aproximadamente 5 x 5 cm donde se incluía el tejido u órgano con la lesión. En el caso que el animal no presentaba lesiones se extrajeron los ganglios linfáticos retrofaríngeos, mediastínicos, mesentéricos y gastrohepáticos considerados los principales lugares de ubicación de las micobacterias (Corner, 1994). -

Las muestras fueron colocadas individualmente en frascos estériles, identificadas y refrigeradas hasta su traslado al laboratorio. Cuando se procesaron inmediatamente, se mantuvieron refrigeradas a 4°C. En ocasiones, cuando el número de muestras era elevado, se las mantuvo congeladas a temperatura de -20°C.

Tratamiento de la muestra previo al cultivo

Secciones de cada una de las muestras, se colocaron en un mortero previamente esterilizado envuelto en papel aluminio. Se agregó una pequeña cantidad de arena estéril y se homogeneizó el tejido; posteriormente se colocó 3 mL de agua destilada estéril a pH 7. Con una pipeta Pasteur, provista de una propipeta

de goma, se trasvasó aproximadamente 2 mL de la suspensión a un tubo con tapa a rosca estéril.

Para eliminar la flora asociada que se encuentra en la mayoría de las muestras, se procedió a la decontaminación según el método de Petroff.

Método de Petroff

Al tubo con tapa a rosca que contenía la muestra se le agregó 4 mL de solución estéril de hidróxido de sodio al 4%, se mezcló e incubó a 37°C durante 20 minutos agitando cada 5 minutos. Posteriormente se centrifugó 5 minutos a 2500-3000 rpm y se eliminó el sobrenadante. Para neutralizar se agregó 1-2 gotas de una solución de rojo fenol al 4% y 1-2 gotas de una solución de ácido sulfúrico al 10%. Se lavó con 3 mL de agua destilada estéril para eliminar los restos de ácido y se procedió a centrifugar durante 5 minutos. Se eliminó el sobrenadante y se agregó 1-2 mL de agua destilada estéril.

Cultivo en medios selectivos para micobacterias

El material recolectado se sembró en los medios de Löwenstein-Jensen y de Stonebrink, que se emplean rutinariamente para el cultivo de las micobacterias. La preparación de los medios se realizó en el laboratorio de micobacterias de la FAV-UNRC.

Medio de Löwenstein-Jensen (L-J)

Fórmula:

Fosfato monopotásico anhidro (PO ₄ H ₂ K)	2,4 g
Sulfato de magnesio (SO ₄ Mg7H 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.....	1000,0 mL
Solución verde de malaquita al 2% recién preparada.....	20,0 mL

Medio de Stonebrink (St)

Fórmula:

Fosfato monopotásico anhidro (PO ₄ H ₂ K).....	3,5 g
Fosfato disódico (NaHPO ₄ 2H ₂ O).....	2,0 g
Piruvato de sodio.....	6,25 g
Agua destilada.....	500,0 mL
Huevos enteros.....	1000,0 mL
Solución verde de malaquita al 2% recién preparada.....	20,0 mL

Siembra de los medios de cultivo

Luego de procesadas las muestras por el método de Petroff, se inocularon de 4 a 5 gotas de la suspensión en 2 tubos con medio de L-J y en 2 tubos con medio de St. Ambos medios se incubaron en aerobiosis, a 37°C por el término de 60 días. Se realizaron observaciones cada tres días las primeras dos semanas y luego una vez por semana durante todo el período, registrando el tiempo de desarrollo de las colonias y morfología de las mismas (Kantor y Bernardelli, 1986) (Figura 10).

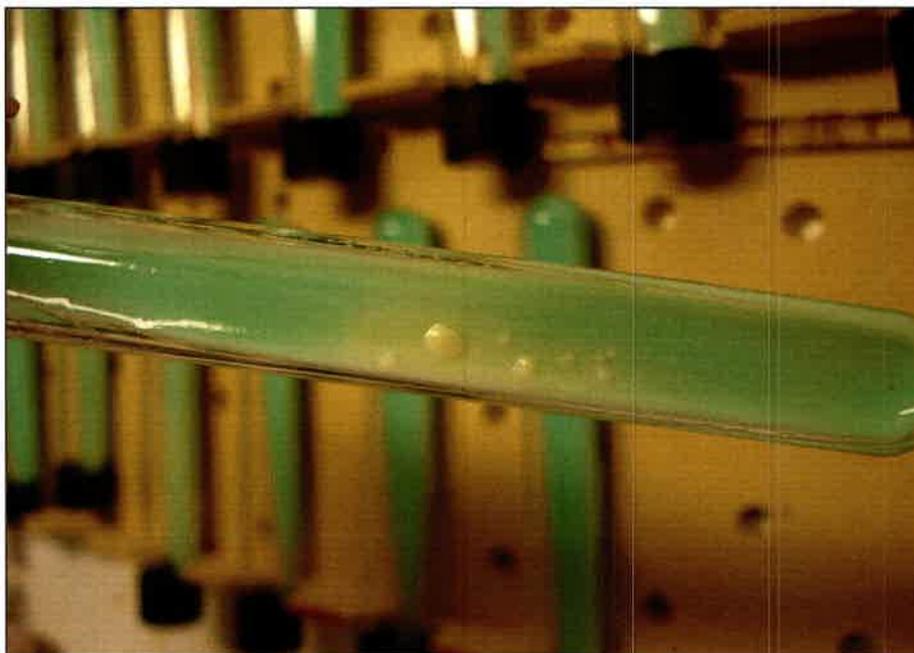


Figura 10. Se observan colonias de micobacterias en medio de St.

Transcurrido dicho tiempo y antes de la eliminación de los tubos, se realizó un extendido a cada uno con tinción de Ziehl Neelsen (Z-N) para observar presencia de bacilos ácido alcohol resistentes (BAAR). Se consideró un cultivo positivo cuando se constataba la presencia de colonias en uno o más tubos con los medios de cultivo y cuando la tinción de Z-N, realizada a las mismas, indicaba la presencia de BAAR.

Los tubos con los medios de cultivo que resultaron positivos, se enviaron al Instituto de Biotecnología del INTA Castelar (Buenos Aires, Argentina), para su tipificación molecular.

Tinción de Ziehl Neelsen previo a la siembra

Otra metodología que se aplicó fue la tinción con Z-N antes de realizar la siembra. Para ello, posteriormente a la decontaminación de las muestras y antes de inocular las gotas en cada tubo con los medios, se realizó un extendido sobre un portaobjeto y se coloreó con tinción de Z-N para evaluar la presencia de BAAR.

Las mismas se observaron con microscopio óptico a 1000x (Figura 11)

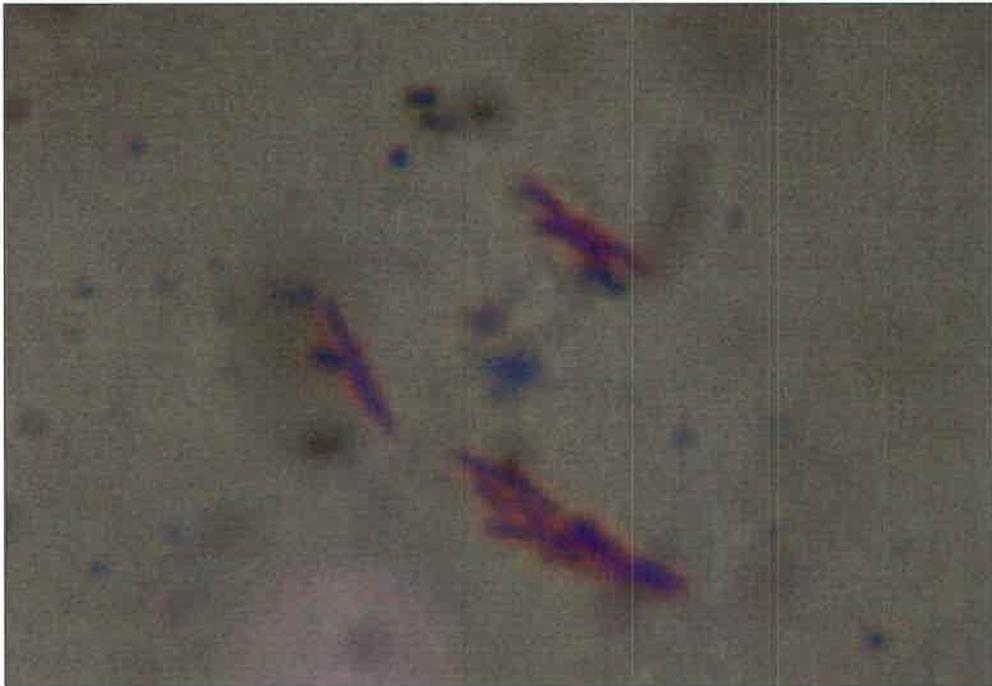


Figura 11. BAAR en la tinción de Z-N presiembra.

Tipificación por biología molecular de las micobacterias aisladas

La técnica de spoligotyping se realizó en el Instituto de Biotecnología CICVyA del INTA Castelar según el protocolo descrito por Kamerbeek y col., (1997). La región de las repeticiones directas (DR) se amplificó por PCR, utilizando uno de los oligonucleótidos iniciadores biotinilado. Luego, los productos amplificados se hibridaron a los oligonucleótidos espaciadores que se encuentran fijados covalentemente en la membrana de nylon y dispuestos paralelamente entre sí. Finalmente, se detectó la hibridación por quimioluminiscencia y se reveló por autorradiografía.

Un patrón de spoligotyping se define por la presencia o ausencia de cada uno de los 43 espaciadores en estudio y se lo designa arbitrariamente con un número. La ausencia de los espaciadores 3, 9, 16 y 39 a 43 definen al patrón característico de *M. bovis* (Dale y col., 2001). La nomenclatura de los patrones identificados fue la de

la base de datos de la Universidad de Sussex (www.mbovis.org) para poder realizar comparaciones con los patrones obtenidos mundialmente.

Del total de micobacterias aisladas, finalmente se tipificaron 36, todas pertenecientes a animales de la **zAP**.

Histopatología

Toma de muestra para el diagnóstico histopatológico

Para el diagnóstico histopatológico se recolectaron muestras de 1 x 1 cm de lesiones macroscópicas compatibles con tuberculosis. En los casos donde los animales no presentaban lesiones macroscópicas se recolectaron muestras de linfonodos retrofaríngeos, mediastínico, mesentéricos y gastrohepáticos.

Las mismas fueron fijadas en formaldehído al 10%, deshidratadas, impregnadas en parafina y cortadas en secciones de 5 micras; se colorearon con la tinción de hematoxilina-eosina para observar lesiones en los tejidos.

Diagnóstico histopatológico

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

Elección de la prueba de oro alternativa

Para clasificar los animales se decidió formular una prueba de oro alternativa, teniendo en cuenta para ello los resultados tanto del cultivo bacteriano como de la histopatología. Cuando al menos una de las dos pruebas fue positiva el animal se



consideró verdadero positivo y en el caso que ambas técnicas resultaron negativas, ese individuo se catalogó como verdadero negativo.

Clasificación de los animales

Basados en los resultados de la prueba de oro alternativa se asignaron dos condiciones sanitarias:

1. **Animal Infectado (AI)** cuando resultó verdadero positivo
2. **Animal No Infectado (ANI)** cuando resultó verdadero negativo

Análisis estadístico

Los resultados de todas las pruebas diagnósticas fueron expresados en positivos y negativos siguiendo los procedimientos estándares o recomendados en los *kit* comerciales.

Luego la comparación de las técnicas se llevó a cabo a través de tablas de frecuencias. La asociación de los resultados fue evaluada estadísticamente mediante la prueba de chi-cuadrado.

Por su parte todos los Intervalos de confianza (I.C.) exactos, se basaron en la distribución binomial.

Para la determinación de la SE y ES cada prueba fue comparada con la prueba de oro alternativa de acuerdo al siguiente criterio: una muestra fue considerada verdaderamente positiva si dio resultado positivo al cultivo y/o histopatología.

Para lograr los objetivos planteados, se relacionaron las diferentes técnicas diagnósticas entre sí agrupando los animales según las zonas: por un lado todos los

seleccionados de la **zAP** y por otro los de la **zBP**; y a su vez por la condición sanitaria (**AI** o **ANI**) de cada cabra dentro de esa zona.

También se realizó una descripción ampliada de los hallazgos bacteriológicos y de la tipificación mediante técnicas de biología molecular.

Los análisis estadísticos fueron llevados a cabo usando el paquete estadístico Stata 11 (StataCorp., 2009).

RESULTADOS

A continuación se indica la secuencia utilizada en el análisis de los resultados la cual incluye los siguientes 10 puntos:

1. Hallazgos patológicos microscópicos y cultivos bacterianos determinando así la condición sanitaria de los animales;
2. Prueba de IDR según la condición sanitaria;
3. Prueba serológica ELISA BIONOTE según la condición sanitaria;
4. Prueba serológica TR ANIGEN según la condición sanitaria;
5. Prueba serológica ELISA IDEXX según la condición sanitaria;
6. Presencia de lesiones macroscópicas según la condición sanitaria;
7. Prueba de IDR y técnicas serológicas ELISA BONOTE y TR Anigen;
8. Pruebas de ELISA BIONOTE y TR ANIGEN entre ambas;
9. Pruebas de ELISA BIONOTE y TR ANIGEN según las características de las lesiones macroscópicas;
10. Bacteriología: cultivo de micobacterias, tinción de Z-N presiembra y tipificación por técnicas moleculares.

Relación entre hallazgos patológicos microscópicos y cultivos bacterianos

De los 54 animales seleccionados en la **zAP**, 38 (70,37%) resultaron positivos al cultivo, de los cuales 36 también fueron positivos a la patología microscópica (Tabla 1). Pero como se describió en la elección de la prueba de oro alternativa, los animales se consideraron infectados cuando al menos una de estas técnicas era

positiva. Esto eleva finalmente a 47 (87,04%) los **AI** (tabla 1). Se observó diferencia estadísticamente significativa ($P \leq 0,001$) al relacionar ambas pruebas diagnósticas

Tabla 1. Relación de la patología microscópica y los cultivos, en los caprinos de la **zAP**. Valores entre paréntesis representan porcentajes sobre el total de animales seleccionados (n= 54).

Patología microscópica	Cultivo		Total
	Negativo	Positivo	
Negativo	7 (12,96%)	2 (3,70%)	9 (16,66%)
Positivo	9 (16,67%)	36 (66,67%)	45 (83,34%)
Total	16 (29,63%)	38 (70,37%)	54

Cuando se analizó la relación entre las lesiones microscópicas y el cultivo bacteriano en la **zBP**, se observó que la totalidad de las cabras (n= 68) resultaron negativas a ambas técnicas. Es por ello que todos los animales fueron considerados como **ANI** o verdaderos negativos.

Relación entre la IDR e infección

Un total de 54 animales de la **zAP** y 68 de la **zBP** fueron seleccionados para evaluar la relación entre la IDR y la condición sanitaria. Para la **zAP** solo se evaluaron animales que habían sido positivos a la IDR (Tabla 2) mientras que en la **zBP** se incluyeron IDR positivos y negativos (Tabla 3).

De la Tabla 2 se puede observar que el valor predictivo positivo (VPP) fue del 87,04% ya que de los 54 animales IDR positivos, 47 fueron **AI**.

Tabla 2. Relación entre la IDR con la condición sanitaria en la **zAP**. Los porcentajes están basados sobre un n= 54.

Condición sanitaria	IDR (+)
ANI	7 (12,96%)
AI	47 (87,04%)
Total	54 (100%)

Tabla 3. Relación entre la IDR y la condición sanitaria en la **zBP**. Los porcentajes están realizados sobre un n= 68.

Condición sanitaria	IDR (-)	IDR (+)	Total
ANI	27 (39,71%)	41 (60,29%)	68 (100%)

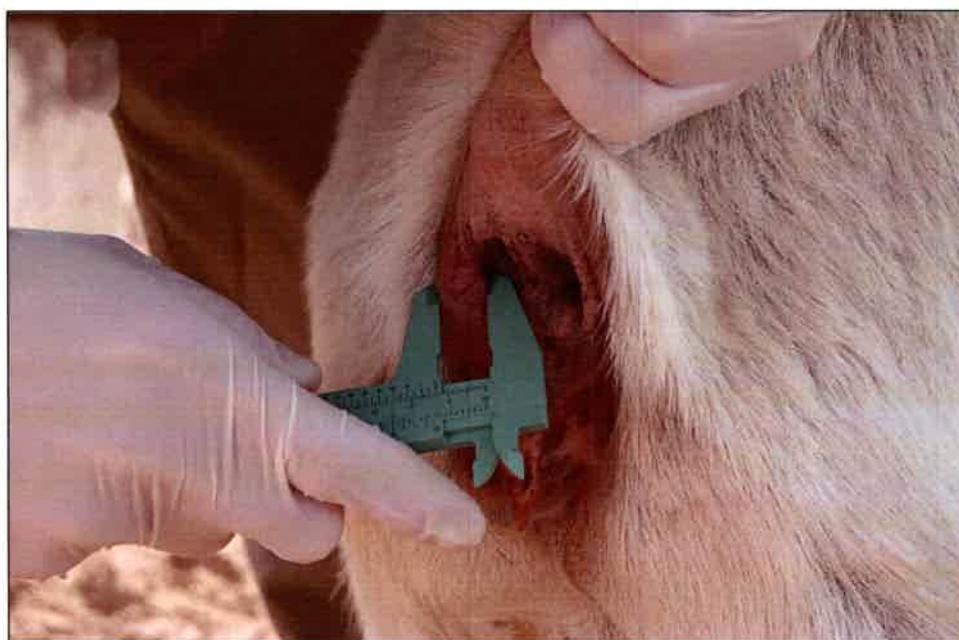


Figura 5. Reacción positiva en el pliegue anocaudal interno. Se observa el mismo aumentado de tamaño y con reacción firme a la palpación (induración).

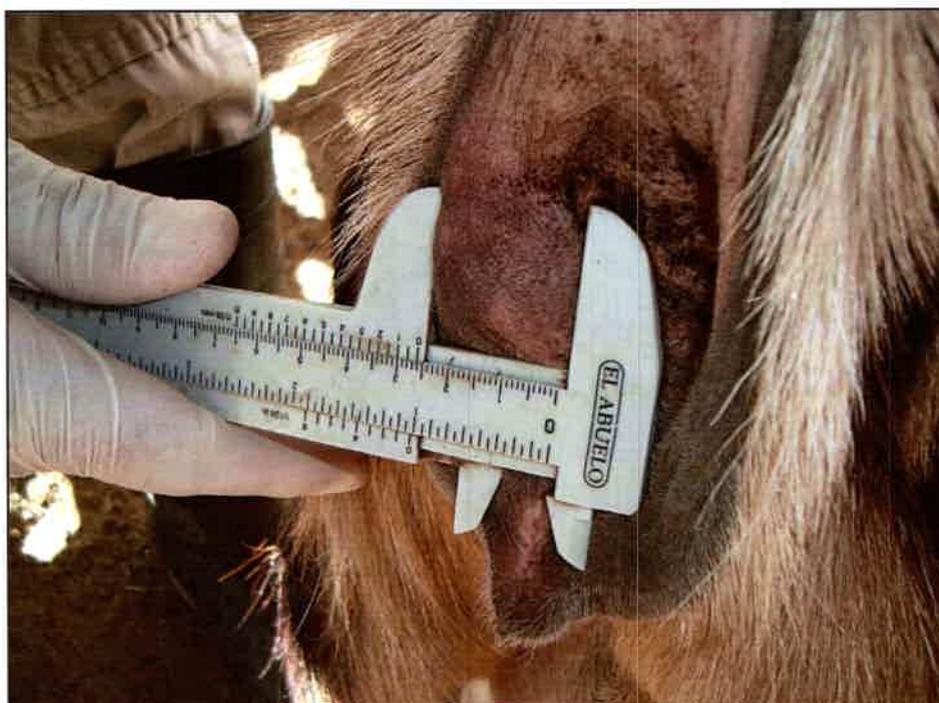


Figura 6. Reacción positiva en el pliegue anocaudal interno. Se observa el mayor aumento en el tamaño del pliegue con respecto al animal de la Figura 5.

Relación entre la prueba serológica ELISA BIONOTE e infección

Otra de las relaciones que se estudió, fue entre el ELISA BIONOTE y la condición sanitaria. En **zAP**, se analizaron 29 sueros de **AI**. De ellos 11 resultaron positivos lo que indicó una SE del 37,93% (I.C. 20,69% – 57,74%). Los restantes 18 (62,07%) fueron negativos.

En la **zBP**, esta misma relación se realizó sobre 42 sueros **ANI**. Aquí los resultados indicaron que el 100% fueron negativos al ELISA BIONOTE.

Relación entre la prueba serológica TR Anigen e infección

Para comparar el TR Anigen con la condición sanitaria en **zAP**, se utilizaron en total 44 sueros de los cuales 37 eran **AI** y 7 **ANI**. De los **AI**, la técnica clasificó 10 como positivos dando una SE del 27,03% (I.C. 13,76% – 44,12%) y de los **ANI** a todos como negativos siendo por lo tanto la ES de 100% (I.C. 59,04% - 100%).

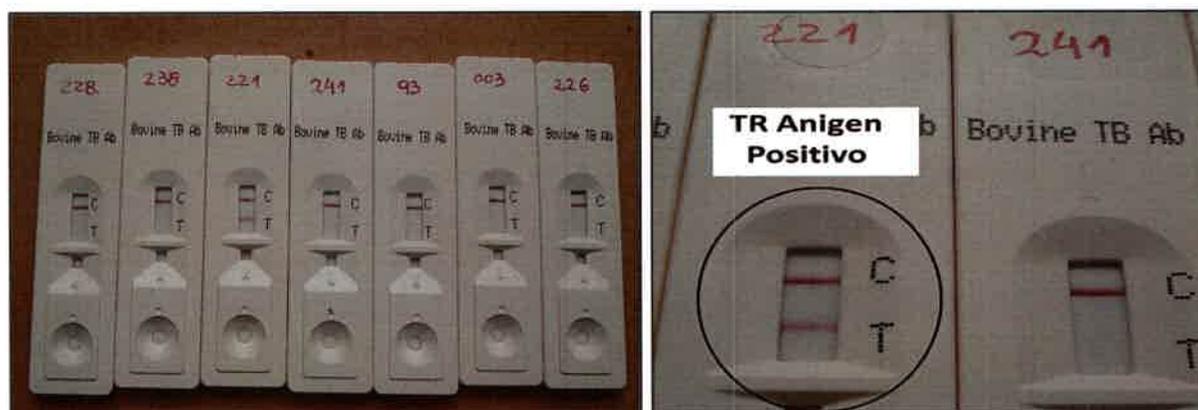


Figura 7. Dispositivos del TR Anigen donde se observan, en las respectivas ventanas, el resultado para cada animal. En el ejemplo, a la derecha, el animal 221 con ambas líneas (C y T) indica positivo y el 241, solamente con la línea C, negativo.

Tabla 4. Se detalla la relación entre el TR Anigen y la condición sanitaria en **zAP**. Los porcentajes se basan por un lado en el total de **ANI** (n= 7) y por el otro sobre el total de **AI** (n= 37).

Condición sanitaria	TR Anigen (-)	TR Anigen (+)	Total
ANI	7 (100%)	0 (0%)	7 (100%)
AI	27 (72,97%)	10 (27,03%)	37 (100%)
Total	34	10	44

En la **zBP** se analizaron 38 sueros de **ANI**, de los cuales 37 fueron negativos al TR Anigen, por lo tanto la ES fue del 97,37% (I.C. 86,19% - 99,93%). Solamente 1 (2,63%) cabra resultó positiva.

Relación entre la prueba serológica ELISA IDEXX e infección

Para comparar la técnica de ELISA IDEXX según la condición sanitaria, se utilizaron un total de 71 muestras de suero de las cuales 29 pertenecían a cabras de la **zAP** todas ellas infectadas y 42 a la **zBP** todas no infectadas. El 100% de los animales de ambas zonas fueron negativas a la técnica de ELISA IDEXX.

Relación entre la presencia de lesiones macroscópicas y la condición sanitaria

Se estudió, en ambas zonas, la relación entre **AI** o **ANI** con la presencia de lesiones macroscópicas. Se observó una asociación estadísticamente significativa ($P \leq 0,001$) entre ambas en el caso de los **AI** de la **zAP**.

Tabla 5. Resultados obtenidos al comparar la presencia de lesiones macroscópicas con la condición sanitaria en **zAP**. Los valores porcentuales se basan por un lado en el total de **ANI** (n= 7) y por el otro sobre el total de **AI** (n= 47).

Condición sanitaria	Lesiones macroscópicas		Total
	Negativo	Positivo	
ANI	7 (100%)	0 (0%)	7 (100%)
AI	3 (6,38%)	44 (93,62%)	47 (100%)
Total	10	44	54



Figura 8. Lesión nodular, pequeña, granulomatosa, en ganglio linfático mediastínico.

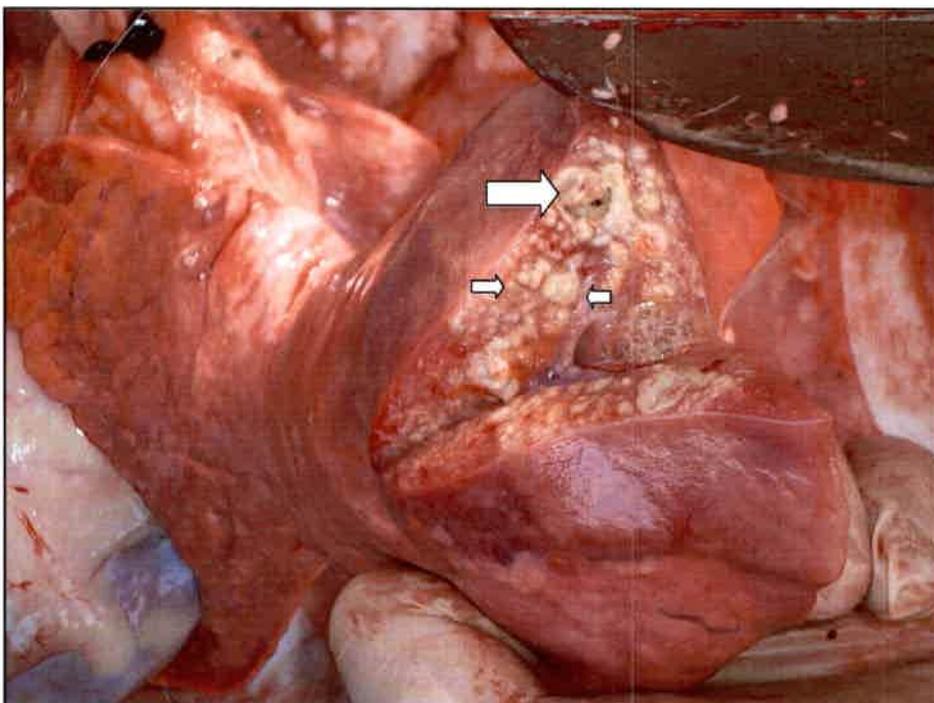


Figura 9. Múltiples lesiones granulomatosas focales (flechas pequeñas) y cavernosas (flecha grande), en el lóbulo diafragmático del pulmón.

Para la **zBP**, donde las 68 (100%) cabras no estaban infectadas, hubo 63 (92,65%) que no presentaron lesiones macroscópicas y 5 (7,35%) con algún tipo de lesión compatible con tuberculosis que al cultivo y a la histopatología resultaron negativas.

Relación entre la IDR y las técnicas serológicas ELISA BIONOTE y TR Anigen

Se estudió la relación entre la IDR que mide inmunidad celular y las pruebas de ELISA BIONOTE y TR Anigen que miden inmunidad humoral. Estos resultados brindan información por un lado sobre las variaciones en las diferentes respuestas inmunológicas y por el otro que sucedería ante una situación hipotética de no poder contar con las pruebas de oro debido a que no se pueda realizar la necropsia.

Como se aclaró anteriormente, todos los animales seleccionados en la **zAP** fueron positivos a la IDR. La prueba de ELISA BIONOTE se aplicó a un total de 29 sueros y la técnica TR Anigen a 44.

El porcentaje de animales positivos a la IDR y ELISA BIONOTE fue del 37,93% (I.C. 20,69% - 57,74%). En el caso de la IDR y TR Anigen, del 22,73% (I.C. 11,47% - 37,84%) (Tabla 6).

Tabla 6. Relación entre IDR y las pruebas serológicas ELISA BIONOTE y TR Anigen en la **zAP**. Los porcentajes están basados sobre el total de sueros utilizados para cada prueba.

IDR	ELISA BIONOTE			TR Anigen		
	Negativo	Positivo	Total	Negativo	Positivo	Total
Positivo	18 (62,07%)	11 (37,93%)	29 (100%)	34 (77,27%)	10 (22,73%)	44 (100%)

En la **zBP** se seleccionaron 22 sueros de cabras negativas a IDR y 20 de positivas, para compararlas con ELISA BIONOTE (n= 42). Y por otro lado 19 sueros de positivas a IDR y 19 de negativas, para relacionarlas con el test TR Anigen (n=38).

Tabla 7. Relación entre la IDR con ambas técnicas serológicas: ELISA BIONOTE (n= 42) y TR Anigen (n= 38), en **zBP**. Los valores porcentuales se basan en el total de animales positivos o negativos a IDR que fueron comparados con cada test.

IDR	ELISA BIONOTE			TR Anigen		
	Negativo	Positivo	Total	Negativo	Positivo	Total
Negativo	22 (100%)	0 (0%)	22 (100%)	18 (94,74%)	1 (5,26%)	19 (100%)
Positivo	20 (100%)	0 (0%)	20 (100%)	19 (100%)	0 (0%)	19 (100%)
Total	42	0	42	37	1	38

Relación entre ELISA BIONOTE y TR Anigen

Se compararon los resultados entre dos técnicas que miden inmunidad humoral, pero con diferente metodología, como son ELISA BIONOTE y TR Anigen, en 24 animales de la **zAP** (Tabla 8) y 37 de la **zBP** (Tabla 9).

En la **zAP** hubo asociación estadísticamente significativa ($P \leq 0,027$) entre ambas técnicas diagnósticas.

En la **zBP** se observó alta proporción (97,30%) de animales negativos detectados por las dos pruebas.

Tabla 8. Relación entre ELISA BIONOTE y TR Anigen en **zAP** sobre un total de 24 **AI**. Los porcentajes indican la concordancia entre ambos test para cada uno de los resultados.

ELISA BIONOTE	TR Anigen		Total
	Negativo	Positivo	
Negativo	14 (58,33%)	1 (4,17%)	15
Positivo	5 (20,83%)	4 (16,67%)	9
Total	19	5	24 (100%)

Tabla 9. Relación entre ELISA BIONOTE y TR Anigen en animales de la **zBP**.

Los 37 sueros pertenecían a **ANI**.

ELISA BIONOTE	TR Anigen		Total
	Negativo	Positivo	
Negativo	36 (97,30%)	1 (2,70%)	37 (100%)

Pruebas de ELISA BIONOTE y TR Anigen según las características de las lesiones macroscópicas

Otro de los puntos que se analizó fue la relación entre los resultados de las pruebas de ELISA BIONOTE y TR Anigen con la distribución de las lesiones macroscópicas y la presencia o ausencia de lesiones cavernosas en pulmón. Esta información permitió observar el comportamiento de las técnicas frente a las diferentes presentaciones patológicas y compararlas con otros autores que asocian mayor porcentaje de positivos con la presencia de lesiones generalizadas y cavernosas pulmonares.

El test ELISA BIONOTE se aplicó a un total de 29 animales y el TR Anigen a 44, todos pertenecientes a la **zAP** y que presentaban lesiones macroscópicas.

Tabla 10. Resultados de las técnicas serológicas de ELISA BIONOTE y TR Anigen según la distribución de lesiones y la presencia de cavernas pulmonares. Los

valores indican el número absoluto de animales con ese tipo de lesión (clasificadas de I al V) para cada resultado del test.

	I	II	III	IV	V	TOTAL
ELISA BIONOTE +	4	2	3	1	1	11
ELISA BIONOTE -	13	3	2	0	0	18
Total	17	5	5	1	1	29
TR Anigen +	8	0	1	1	0	10
TR Anigen -	23	6	2	1	2	34
Total	31	6	3	2	2	44

I) lesiones granulomatosas ubicadas solo en sistema respiratorio (pulmón y/o ganglios linfáticos mediastínicos)

II) tuberculosis generalizada (lesiones granulomatosas en varios órganos)

III) lesiones granulomatosas ubicadas únicamente en sistema respiratorio y, sumado a ellas, lesiones cavernosas en pulmón

IV) tuberculosis generalizada sumado a lesiones cavernosas en pulmón

V) lesiones granulomatosas solo en aparato digestivo

Bacteriología: cultivo de micobacterias, tinción de Z-N presiembrado y tipificación por medios moleculares

Con respecto a los resultados bacteriológicos, se puede indicar que de las muestras que se sembraron pertenecientes a los 54 animales en la **zAP**, 38 (70,37%) presentaron crecimiento en al menos uno de los medios de cultivo.

Cuando se analizó en cuál de estos medios hubo desarrollo de esas 38 muestras positivas, se observó que el 100% fue en medio de Stonebrink y a su vez el 23,68% (9 especímenes) en Löwenstein-Jensen.



Mientras que de las muestras de los 68 animales de la **zBP**, el 100% de ellas no demostró crecimiento en ninguno de los medios evaluados.

Por otro lado, los resultados de las tinciones de Z-N realizadas previas a la siembra, indicaron que de los 54 animales de la **zAP**, 10 (18,5%) fueron positivas.

Si se toma solamente en cuenta los animales de esta zona que presentaron cultivo positivo (n= 38), el porcentaje de muestras positivas a Z-N presiembra se elevó al 26,32%.

En la **zBP**, una muestra (1,47%) de las 68, presentó bacilos ácido alcohol resistente. A partir de ella no hubo crecimiento en ninguno de los medios de cultivo. Ese animal resultó positivo a la prueba de IDR y no presentó lesiones macroscópicas ni microscópicas.

Con respecto a la identificación utilizando la técnica molecular de spoligotyping, se observó que el total de las micobacterias tipificadas (n= 36), se correspondieron con *M. bovis* SB0140. Todas las muestras pertenecían a animales de la **zAP**.

DISCUSIÓN

Para el presente trabajo y con la finalidad de evaluar la prueba oficial de IDR y compararla con técnicas serológicas comerciales en cabras provenientes de zonas de alta y baja prevalencia de tuberculosis, se planteó la hipótesis que el grado de relación entre ellas depende de la prevalencia zonal. De acuerdo a los resultados obtenidos la hipótesis es aceptada.

Inicialmente se hace referencia a la elección de la prueba de oro alternativa. En la mayoría de los trabajos de tuberculosis y en otras enfermedades bacterianas, cuando se va a evaluar una prueba diagnóstica a campo, adoptan el cultivo como prueba de oro ya que posee una especificidad del 100% (OIE, 2008). No obstante hay animales infectados que presentan lesiones y los cultivos arrojan resultados negativos (Corner, 1994). En estos casos la histopatología pasa a ser una herramienta diagnóstica complementaria de mucha ayuda para aumentar la SE de la prueba de oro. Podríamos respaldarnos en estudios realizados por Varello y col., (2008) que indican valores mayores al 90% de SE y ES para la técnica histopatológica. Debido a esto es que se decidió formular una prueba de oro alternativa, al igual que lo planteado por Gutierrez y col., (1998) y Buendía y col., (2013) teniendo en cuenta para ello los resultados tanto del cultivo bacteriano como de la histopatología para cada animal, clasificando como verdadero positivo cuando al menos una de las dos pruebas arrojaba ese resultado. En caso de que ambas técnicas fueran negativas, ese individuo se clasificó como verdadero negativo. Como se observará más adelante, en el presente trabajo hubo animales que solo fueron positivos a una de estas pruebas.

Debido a que todas las técnicas diagnósticas tienen en mayor o menor medida limitaciones, es que se considera importante realizar el siguiente comentario sobre las aquí utilizadas como prueba de oro alternativa. Dentro de los inconvenientes que presenta la histopatología como diagnóstico es la posibilidad de dar resultados falsos negativos ante las siguientes situaciones: 1) al no encontrar ninguna lesión macroscópica en la observación de los tejidos, es azaroso que los cortes histológicos coincidan con las áreas en las cuales se encuentren las lesiones microscópicas; 2) que las lesiones macro y microscópicas se ubiquen en otros tejidos distintos a los analizados y 3) que los animales estudiados no presenten lesiones microscópicas. Y por otro lado, un resultado falso positivo puede darse fundamentalmente por la presencia de agentes infecciosos diferentes a micobacterias (*Nocardias*, *Actynomices*, *Rodococcus*) que produzcan idénticas lesiones (Corner, 1994).

Con respecto al cultivo bacteriano, podríamos agregar como limitantes la incapacidad de las micobacterias de desarrollarse en cualquiera de los medios de cultivo específicos por alteraciones o mala calidad de los mismos o también al daño en los microorganismos provocado durante el procedimiento de descontaminación previo a la siembra; ambos son algunos de los motivos para no aislar micobacterias de animales infectados (Barrera, 2008). Para el presente estudio, la decisión de intercalar periódicamente en el proceso de siembra muestras controles positivas pertenecientes al banco de muestras del departamento de Patología Animal de la FAV-UNRC, obteniendo de ellas siempre resultados positivos, llevó a descartar en gran parte las limitaciones antes expuestas.

Por otro lado varios trabajos reportan aislamiento de micobacterias a partir de tejidos sin lesiones. Aunque esto es probable, las posibilidades de aislamiento son

menores que cuando se toman las muestras de lesiones compatibles que garantizan en gran medida la presencia del agente. Ello, sin lugar a dudas, hace menos sensible el diagnóstico bacteriológico (Payeur y col., 1981; Whipple y col., 1996).

A continuación se analizan y discuten, en forma particular, los resultados obtenidos.

La formulación de la prueba de oro alternativa se puede justificar con los siguientes resultados y conceptos. En la Tabla 1, donde se relaciona el cultivo con las lesiones microscópicas en los 54 animales de la **zAP**, se observa que 38 (70,37%) casos fueron positivos al cultivo por lo que deberían considerarse como verdaderos positivos (OIE, 2008). Es necesario indicar, como se presenta en la misma tabla, que dentro de los 38 en los que se aislaron micobacterias, hubo dos animales que no tuvieron lesiones microscópicas.

Si en lugar de considerar como prueba de oro al cultivo bacteriano se hace solamente con las lesiones microscópicas, se observa que de las 54 cabras evaluadas en **zAP**, 45 (83,34%) presentaron alteraciones histológicas compatibles, las que deberían ser consideradas también como verdaderas positivas. Hubo 9 animales (dentro de los 45) que fueron negativos a los cultivos, pero presentaron lesiones microscópicas granulomatosas compatibles con tuberculosis.

Finalmente, y tomando ambas técnicas para determinar la prueba de oro alternativa, los resultados arrojaron que de los 54 animales de la **zAP**, 47 (87,04%) deben ser considerados como verdaderos positivos o animales infectados (**AI**) ya que ese fue el resultado de, al menos, una de las técnicas (36 a ambas pruebas, 2 solamente al cultivo y 9 únicamente a la histopatología). Los otros 7 (12,96%) fueron negativos a ambas técnicas por lo que se clasificaron como verdaderos negativos o animales no infectados (**ANI**).

Trasladando el mismo razonamiento para categorizar la condición sanitaria en los animales de la **zBP**, de los 68 (100%), ninguno presentó cultivo positivo ni lesiones microscópicas, por lo tanto todos fueron considerarlos como verdaderos negativos o animales no infectados (**ANI**).

Una vez categorizados como infectados o no infectados en sus respectivas zonas, el siguiente paso fue evaluar la técnica de IDR; se observó que los resultados cambiaron marcadamente con la variación de la prevalencia zonal. Norby y col., (2004) en bovinos, encontraron una diferencia similar, no obstante la observada en las cabras en nuestro trabajo fue aún más acentuada entre las áreas.

Como se observa en la Tabla 2, en la **zAP**, de los 54 animales que reaccionaron a la IDR, 47 (87.04%) fueron considerados **AI**. Debido a la estrategia de muestreo no es posible calcular la SE de la IDR en esa zona, ya que inicialmente todas las cabras seleccionadas eran positivas. Pero una información obtenida importante es que el 87,04% de ellas presentaron lesiones microscópicas y/o aislamiento de micobacterias. Esto estaría indicando que el valor predictivo positivo para dicha técnica, en la **zAP**, fue elevado. Hallazgos similares observaron Quintas y col., (2010) con un alto porcentaje de cabras positivas a la IDR, que presentaron lesiones. Al igual que en nuestro caso, los animales provenían de campos infectados y presentaban síntomas clínicos, mortandad y altos porcentajes de positivos a IDR.

Otros autores también encontraron esta relación positiva; Crawshaw y col., (2008) en un brote de tuberculosis en cabras en Reino Unido, observaron lesiones cavernosas en la mayoría de los animales IDR positivos, aislando *M bovis* SB0140 idéntico al identificado en nuestro trabajo.

Un porcentaje menor, observaron Acosta y col., (1993) cuando evaluaron un establecimiento con animales naturalmente infectados encontrando lesiones en algo

menos que el 50% de los animales IDR positivos. Estos autores proponen que la variación en la dosis infectante estaría determinando que algunos animales presenten lesiones y otros no. Basados en este último concepto, se considera que en las **zAP** la exposición a dosis infectante altas sería muy frecuente y ello se justifica por la presencia de lesiones en la mayoría de los animales infectados como se profundizará más adelante.

Por los resultados hallados, y apoyados en los obtenidos por los autores mencionados en párrafos anteriores, se deduce que en campos con problemas importantes de tuberculosis y altas prevalencias, la asociación entre los resultados positivos de la IDR y la presencia o ausencia de lesiones microscópicas y/o el cultivo bacteriano, es muy alta.

En reproducciones experimentales de la enfermedad los hallazgos fueron similares a los casos de campo comentados anteriormente. Ramirez y col., (2003) inocularon cabritos con *M bovis*; todos fueron positivos a la IDR y presentaron lesiones, no así el grupo no inoculado usado como control.

En el caso de los 7 (12,96%) animales restantes de la **zAP** (Tabla 2), clasificados según su condición sanitaria como **ANI** se corresponderían con falsos positivos a la IDR. En párrafos más abajo, se discuten las posibles causas de este tipo de presentación.

Cuando se analizan los resultados de la relación entre la IDR y la condición sanitaria en la **zBP** (Tabla 3), donde 27 (39,71%) cabras eran negativas y 41 (60,29%) positivas a la IDR, ninguna presentó cultivo positivo ni lesiones microscópicas y por lo tanto fueron clasificados como **ANI**. Esto determinó que la ES de la IDR fuese del 100% ya que los 27 IDR(-) fueron verdaderos negativos o **ANI**. El inconveniente que presentó esta prueba fue al evaluar los resultados positivos; de

los 41 animales que resultaron IDR(+), todos fueron negativos a la prueba de oro alternativa.

Estos últimos resultados señalan la dificultad de aplicar la IDR en las zonas de baja prevalencia con características epidemiológicas similares a las del presente estudio, debido a que se estarían eliminando animales positivos a la tuberculina pero sin lesiones tanto macroscópicas como microscópicas y en los cuales no es posible el aislamiento de micobacterias de sus tejidos.

Para Corner y col., (1990) una de las causas de encontrar reaccionantes a la IDR sin lesiones visibles, es la ocurrencia de infecciones en momentos cercanos de la faena de los animales. Esto determinaría que el tiempo infección-observación de lesiones sea corto y no alcancen a manifestarse macroscópicamente. Con esta información podríamos inferir que en nuestro estudio, está la posibilidad que algunos de los animales fueron eutanasiados antes que se desarrollen los granulomas típicos; no obstante esta inferencia solo se debería hacer para aquellos animales de la **zAP** que es en los únicos que se encontraron lesiones.

Otra posibilidad que plantean algunos autores es que se realice la faena a corta edad lo que llevaría a no tener el tiempo suficiente para que se expresen las lesiones (Jubb y col., 2007; Thoen, 1995); en nuestro trabajo los animales estudiados eran casi en su totalidad adultos por lo tanto la edad no sería un factor importante para no encontrar lesiones en las necropsias.

Otra hipótesis que se puede desarrollar, también relacionada con la ausencia de lesiones, es que las mismas desaparecieron pero se mantuvo la respuesta inmune. Este planteo ya lo inició Lucke, (1954) en los cerdos y también es aceptado por Pollock y Neill, (2002) y Corner, (1994) en bovinos, quienes consideran que existe un porcentaje de error en la prueba tuberculínica debido a la sensibilidad

residual de las lesiones tuberculosas curadas. En el presente estudio, esta posibilidad podría ser aceptada para los casos de aquellos animales IDR+ y sin lesiones de la **zAP**. Pero no sería adecuada para justificar todos los casos en la **zBP** ya que sería muy poco probable que en los 41 animales IDR+ hayan desaparecido las lesiones macroscópicas y que no queden indicios de antiguas lesiones.

Algunos investigadores plantean una alternativa que podría concordar con nuestras observaciones en la **zBP**; según Gardner y Hird, (1989) la aparición esporádica de la enfermedad estaría dada por una inconstante exposición a una fuente común medioambiental, siendo además baja la contaminación en ese hábitat. Si bien esta conclusión es realizada por estos autores al estudiar la tuberculosis en los porcinos, también la describen Pollock y Neill, (2002) en bovinos expuestos a ambientes escasamente contaminados que sensibilizan a los animales resultando positivos a la prueba de IDR sin encontrar lesiones.

Otro aporte valioso puede considerarse los resultados obtenidos por Ramirez y col., (2003) quienes inocularon cabritos con una dosis de 500 ufc *M bovis* (considerada por ellos como baja) y al tercer mes solamente hallaron lesiones pequeñas sin generalización temprana; se podría pensar que la dosis infectante en las **zBP** podría ser aún más baja lo que llevaría a no encontrar lesiones y que los animales resulten positivos a la IDR. Por otro lado estas dosis reducidas, determinarían una baja prevalencia general, donde los animales abortan la enfermedad o se recuperan de ella provocando que no aparezcan lesiones macroscópicas ni microscópicas, permaneciendo así solamente la respuesta inmune de tipo celular.

Estas apreciaciones se refuerzan con un análisis desde el punto de vista inmunológico planteado por Tizard, (2000) el cual sostiene que la estimulación del

sistema inmune por las micobacterias y la larga vida de los linfocitos T de memoria, son los responsables de desencadenar y mantener la reacción de hipersensibilidad tipo IV durante toda la existencia del animal, permitiendo que una vez que entró en contacto con alguna micobacteria, reaccione positivamente a la IDR por varios años sin la necesidad de llegar a presentar lesiones macroscópicas ni aún mantener la infección durante toda su vida.

Pensar en una respuesta cruzada al DPP bovino debido a la presencia de micobacterias atípicas es posible. Acosta y col., (1993) y Arellano Reynoso y col., (1999) identificaron diferentes micobacterias de este grupo en cabras. Si bien esto podría haber sucedido, posiblemente deberíamos haber obtenido crecimiento de las mismas en alguno de los dos medios de cultivo durante el procesamiento de los órganos y tejidos que pertenecían a los animales IDR positivos de las **zBP**. No obstante las bacterias de este grupo son menos patógenas y generalmente producen infección pero no lesiones; ello se traduce en una dificultad real cuando se intenta aislar micobacterias a partir de tejidos que no presentan patologías. Sería importante, para ayudar a aclarar esta problemática, la búsqueda de micobacterias atípicas a partir de otras muestras como ser hisopado nasales en esas cabras con IDR positivas (Neill y col., 1998).

Bezoz y col., (2012) observaron interferencia en el diagnóstico, utilizando la IDR, en campos libres de TBC donde las cabras se vacunaban contra paratuberculosis y también en aquellos con animales infectados por *Corynebacterium pseudotuberculosis*. En nuestro caso la primera opción se debe descartar ya que en Argentina no se vacuna ninguna especie animal contra esa enfermedad. Y con respecto a la infección con *C. pseudotuberculosis*, si bien no se realizaron pruebas diagnósticas para determinar su presencia, en ningún animal

examinado se observaron lesiones macroscópicas compatibles que hicieran sospechar su presencia.

Como puede observarse son varias las razones por las cuales no se encuentran lesiones en animales positivos a la IDR y no tendríamos todos los fundamentos teóricos ni prácticos para aseverar cuál fue la causa determinante de estos resultados fundamentalmente en aquellos pertenecientes a las **zBP**.

Se considera necesario realizar el siguiente comentario en referencia a los resultados de la IDR. Se observó una gran variación en el tipo de reacciones encontradas en el lugar de inoculación entre los animales de ambas zonas. Mientras que en la **zAP** las reacciones positivas se presentaban firmes, de gran tamaño, generalmente mayores de 15 mm con algunas que sobrepasaban los 30 mm y la mayoría calientes al tacto (Figura 6), en las **zBP** las mismas se caracterizaron casi todas por ser de pequeño espesor, con diferencias entre las mediciones preinoculación y postinoculación menores de 10 mm promediando los 6-7 mm. En muchas de ellas la induración observada en el pliegue fue poco notoria.

Esta diferencia observada en el tipo de reacciones de la prueba tuberculínica, podría estar explicando que los animales de las **zAP** tienen un contacto mas frecuente con las micobacterias y una dosis infectante mayor, debido a la presencia de muchos animales infectados, con lesiones y sintomatología que contagian y contaminan el ambiente; esta razón llevaría a desarrollar principalmente una respuesta de tipo celular exacerbada y también respuesta humoral sobre todo en aquellos animales con infección mas crónica (Aranaz, 2013).

A diferencia, en las **zBP** existiría una menor cantidad de micobacterias en el ambiente y en los animales portadores, y con ello mayor dificultad para la transmisión y el desarrollo de la enfermedad, lo que llevaría a encontrar solamente

una respuesta inmune de tipo celular débil con reacciones poco evidentes a la prueba tuberculínica.

Otro de los objetivos fue evaluar pruebas que miden inmunidad de tipo humoral como son dos ELISAs comerciales (ELISA BIONOTE y ELISA IDEXX) y una técnica inmunocromatográfica rápida (TR Anigen).

En el caso del ELISA BIONOTE para la **zAP**, asumiendo que el muestreo no fue al azar y que la técnica se comportaría similar si hubiese animales IDR negativos en esa zona, de 29 **AI**, 11 resultaron positivos. Por ello se puede decir que la SE de la técnica fue del 37,93%. Los otros 18 animales la prueba los clasificó como negativos; esto indica que el 62,07% de las cabras evaluadas resultaron ser falsas negativas. Valores superiores obtuvieron Gutierrez y col., (1998) utilizando una técnica de ELISA diferente a la del laboratorio BIONOTE, también en cabras naturalmente infectadas; sus resultados indicaron una SE de 54,9%. En ese trabajo emplearon un ELISA con IgG anticaprino y en cambio el elaborado por el laboratorio BIONOTE utiliza IgG antibovino. Esta podría ser una explicación a la diferencia de SE encontrada. Por otro lado el valor del I.C. de nuestro trabajo incluye el porcentaje encontrado por esos autores y tanto el número de animales como la selección de IDR positivos pueden modificar los resultados.

Buendía y col., (2013) también observaron una SE más elevada llegando al 66,3% para una prueba de ELISA desarrollada a partir del antígeno MPB-70. No obstante, en esos animales, había como antecedentes varias pruebas de IDR lo que está comprobado aumenta la respuesta humoral que miden las pruebas de ELISA (Gutierrez y col., 1998). En nuestro caso ninguna cabra tuvo más de una prueba de IDR ni se tomaron muestras de sangre antes de los 90 días posteriores a la IDR, por lo tanto el efecto booster de las repeticiones del DPP bovino debe ser descartado.

En la **zBP** los 42 **ANI** examinados fueron negativos al ELISA BIONOTE por lo que podemos decir que en esa situación epidemiológica la ES de la técnica fue del 100%.

Cuando se utilizó la técnica ELISA de IDEXX los resultados fueron diferentes a las otras pruebas serológicas en la **zAP**. De los 29 **AI** el 100% se clasificaron como negativos. Cuando esta misma prueba se aplicó en las cabras de la **zBP**, de los 42 **ANI** todos fueron negativos.

Debido a los resultados obtenidos en la **zAP**, donde las otras dos pruebas serológicas arrojaron resultados positivos en algunos animales infectados y tuvieron cierta concordancia entre ellas, como se verá más adelante, y sumado a la indicación de los fabricantes de no ser una técnica adecuada para otra especie animal que no sea los bovinos, a este kit no lo consideramos en el análisis global de las pruebas. Es necesario comentar que esta técnica de ELISA indirecto, utiliza como anticuerpo secundario un conjugado con IgG antibovino y no IgG anticaprino como sería apropiado en el diagnóstico para las cabras. La decisión de evaluar el método de IDEXX respondía a dos razones fundamentales: 1) tener una experiencia sobre esta especie ya que no se cuenta en el país, ni en toda la bibliografía internacional consultada, con datos semejantes y 2) con ello dar respuesta concreta a las consultas reiteradas de médicos veterinarios que querían aplicar la técnica a cabras en situaciones problemáticas donde se hace muy dificultoso el diagnóstico de rutina de la IDR.

Otra técnica serológica que se relacionó con la condición sanitaria fue la TR Anigen. Los resultados (Tabla 4), muestran que en las **zAP** de los 37 **AI**, el TR Anigen calificó como positivos a 10 de ellos dando una SE del 27,03%. En los 27

(72,97%) restantes, el resultado fue negativo, lo que indicaría una elevada proporción de falsos negativos basados en la prueba de oro alternativa.

Como también se observa en la Tabla 4, los 7 (100%) **ANI**, fueron negativos a la TR Anigen. Ello indica que la técnica no arrojó ningún animal como falso positivo en la **zAP**. Sin embargo, y debido al tamaño muestral, los valores podrían ser inferiores.

Estos resultados se modificaron en las **zBP** donde de las 38 cabras verdaderas negativas, solamente una (2,63%) resultó positiva. Por ello podríamos decir que la ES de la TR Anigen fue elevada (97,37%) por lo tanto es muy bajo el porcentaje de animales falsos positivos que se eliminarían del hato al usar esta técnica en zonas con prevalencias bajas.

Al momento no se encontraron publicaciones sobre resultados del uso de la TR Anigen en caprinos, por lo tanto se refuerza aun más la importancia de nuestra experiencia. Los datos de SE y ES están basados en trabajos sobre bovinos. En todos los casos la SE fue mayor a la que obtuvimos en las cabras. Whelan y col., (2008) encontraron valores que oscilaron al 83% de SE y ES. El-Mahrouk y El-Balawy, (2010), hallaron porcentajes del 81,9% de SE especialmente en aquellos bovinos que presentaron lesiones.

Finalmente Danbirni y col., (2009) indicaron un 62% de SE, no hallando lesiones macroscópicas en los bovinos faenados; pero no sería adecuado interpretar, como hicieron los autores, que esos animales estarían en una etapa inicial de la infección por no encontrar lesiones en ninguno de ellos, debido a que la inmunidad humoral se hace más marcada al final de la enfermedad especialmente cuando los animales presentan lesiones generalizadas.

De acuerdo a nuestros resultados, se podría generalizar que el uso de las técnicas que miden inmunidad humoral (ELISA BIONOTE y TR Anigen), fue favorable para clasificar como negativos a un muy alto porcentaje de **ANI** en **zBP** ya que presentaron alta ES en esa área; esto determinaría una escasa eliminación de animales falsos positivos. El inconveniente que mostraron fue la baja SE en las **zAP** clasificando como positivos a un bajo número de **AI**. Esto último llevaría a eliminar un porcentaje muy bajo de animales infectados, quedando en el establecimiento muchos enfermos y eso permitiría que se siga transmitiendo la enfermedad siendo muy largo, costoso y difícil el saneamiento.

Otros de los resultados que se relacionaron fueron la presencia de lesiones macroscópicas según la condición sanitaria. La información generada es de utilidad para predecir el porcentaje de **AI** que presentarían alguna patología compatible. Como se observa en la Tabla 5, para la **zAP**, de los 47 animales que fueron positivos a la prueba de oro alternativa, 44 (93,62%) presentaron al menos una lesión macroscópica. Ese porcentaje, que podríamos considerarlo como muy alto, se puede explicar fundamentalmente por la especie y tipo de micobacteria actuante y por la dosis infectante. *M. bovis* ha sido la especie más usualmente aislada de casos de campo (Bernabé y col., 1991a; Crawshaw, y col., 2008; Quintas y col., 2010; Ramirez y col., 2003; Johnson y col., 2007; Gonzalez Jaurrero y col., 2013), que, junto con *M. caprae*, es uno de los principales patógenos en los caprinos (Rodriguez y col., 2011). Como veremos mas adelante todos los aislamientos de nuestro trabajo se correspondieron con *M. bovis*.

Con respecto a la dosis infectante hay algunas contradicciones entre autores. Johson y col., (2007), con dosis tan bajas como 1ufc de *M. bovis* lograron reproducir lesiones en nódulos linfáticos respiratorios y en pulmones; no obstante Ramirez y

col., (2003) necesitaron inocular 500 ufc de la misma bacteria en cabritos y solo observaron pequeñas lesiones a los 3 meses pos desafío. Posiblemente estos últimos si hubiesen dejado transcurrir más tiempo hubiesen encontrado lesiones más extensas.

González Jaurrero y col., (2013) inocularon intratraquealmente cabras con dosis de 1.300 ufc de *M. bovis* sin encontrar lesiones visibles pasadas las 8 semanas pos inoculación; diferente fue cuando inocularon con 73.000 ufc, en ese caso todos los animales manifestaron alteraciones en pulmones y en nódulos linfáticos mediastínicos.

Por toda esta información aportada, podríamos presuponer que las cabras que tuvieron lesiones en nuestro estudio, deberían haberse infectado con cargas altas de micobacterias, ya que las patologías se presentaron de mayor tamaño que las descritas por los otros autores, y en muchos casos no solamente en sistema respiratorio sino en otros órganos.

Aunque no fue el objetivo del presente estudio clasificar los diferentes tipos de lesiones encontradas, es relevante detallar que varios animales presentaron cavernas pulmonares, que son consideradas de alta eliminación de micobacterias y que favorecen la transmisión de la enfermedad de un animal a otro (Crawshaw y col., 2008; Dannenberg, 2009).

Hay que recordar que si bien en la **zAP** solo se necropsiaron animales positivos a la IDR y esto seguramente aumentó la posibilidad de encontrar lesiones en las cabras estudiadas, el porcentaje tan elevado estaría indicando que en esta zona el contagio con *M. bovis* sería muy importante.

Por nuestra experiencia y la de otros autores, donde se observa que la mayoría de las lesiones se ubican en vías respiratorias y que es frecuente la



eliminación de micobacterias por esa vía, se considera que el corral de encierre nocturno es el momento de mayor riesgo de contagio debido al contacto mas directo y estrecho entre los animales (Magnano y col., 2010; Deresa y col., 2013).

Continuando con la Tabla 5, tres cabras infectadas, fueron positivas al cultivo y no tuvieron patologías macroscópicas observables. En estos casos, como describe Gonzalez Jaurrero y col., (2013) es posible una baja dosis infectante, o fue insuficiente el tiempo que transcurrió entre la infección y la necropsia para el desarrollo de lesiones que puedan visualizarse.

Y como un resultado esperado, los 7 animales que no estaban infectados, no presentaron lesiones macroscópicas (Tabla 5).

Al relacionar los resultados de los hallazgos macroscópicos con la condición sanitaria pero en la **zBP**, hubo 5 caprinos que presentaron patologías similares a tuberculosis. Pero cuando fueron examinadas microscópicamente, ninguna de ellas se correspondió con lesiones de tipo granulomatosas. Cuatro fueron histológicamente compatibles con infección parasitaria (tres en ganglios mediastínicos y una en pulmón) y en la quinta se diagnóstico una lesión neoplásica hepática. Todas estas lesiones macroscópicas son incluidas en el diagnóstico diferencial ya que comparten algunas características patológicas con las lesiones granulomatosas y se requiere el aporte de la histopatología para llegar a una clasificación correcta de cada una (Cotran y col., 2000; Jubb y col., 2007).

Otro de los objetivos planteados fue analizar la relación entre la IDR y las pruebas que miden inmunidad humoral de ELISA BIONOTE y TR Anigen en ambas zonas. Como se observa en la Tabla 6, para la **zAP**, donde todos los animales eran reaccionantes a la IDR, el 37,93% y el 22,73% fueron positivos para ELISA BIONOTE y TR Anigen respectivamente. Si bien no hubo diferencia

estadísticamente significativa, el kit de ELISA BIONOTE demostró cierta tendencia a identificar una mayor proporción de animales IDR positivos, por lo que se podría sugerir el uso de esta técnica de ELISA para utilizar en las **zAP**.

En el caso de las **zBP** (Tabla 7) se encontró una asociación significativa entre los resultados negativos de la IDR y del ELISA BIONOTE (100%) y levemente menor con el TR Anigen (94,74%) donde un solo animal fue positivo a esta última.

La diferencia se observa cuando se comparan los resultados positivos de la IDR en esta zona. En este caso no se observa ninguna asociación ya que ningún animal reaccionante a la IDR fue positivo a las otras técnicas. Si se considera que ambas técnicas serológicas miden inmunidad de tipo humoral y la IDR inmunidad de tipo celular, se podría presuponer, como eje más importante, que los animales examinados presentaban en ese momento solamente inmunidad de tipo celular.

Las diferencias entre los resultados a las diferentes técnicas en ambas zonas podrían explicarse, de acuerdo a lo expresado por algunos autores (de la Rúa y Domenech, 2006; Aranaz, 2013), por los cambios que ocurren con la respuesta inmune a lo largo de la infección y a características propias de las pruebas diagnósticas.

Es necesario mencionar que en información aportada por el laboratorio fabricante, al comparar ELISA BIONOTE con IDR en bovinos, obtuvieron SE del 88,1%. Si bien ese dato es muy superior al obtenido en nuestro trabajo, se considera que debido a los diferentes especies animales utilizadas, no nos parece oportuno comparar los resultados.

Otro de los puntos que se analizó, fue el acuerdo entre los resultados de las dos técnicas serológicas ELISA BIONOTE y TR Anigen. Como se observa en la Tabla 8, para la **zAP**, un 75% de los animales (18 de 24) compartieron el mismo

resultado; en 4 casos fueron positivos a las dos pruebas y en 14 negativos a ambas. Podríamos decir que existió una buena relación entre ellas.

Cuando se compararon estas técnicas en la **zBP** (Tabla 9), el 97,30% de los 37 animales evaluados fueron negativos para ambos métodos, lo que indicó que en esta región la asociación fue aún mayor.

Consideramos que con prevalencias bajas, cualquiera de estos kit comerciales sería de utilidad y la decisión de usar uno u otro pasaría mas por cuestiones operativas y económicas que por la seguridad de sus resultados, ya que como se puede observar el porcentaje de falsos positivos fue 0% para ELISA BIONOTE y muy bajo (2,70%) para TR Anigen.

Como se ha indicado anteriormente, no se encontraron trabajos en la bibliografía mundial sobre la aplicación de estos kit en caprinos, ello nos dificulta la comparación con otros autores.

Se podría destacar, como dato alentador, que ambas técnicas tuvieron resultados similares, tanto positivos como negativos, en la evaluación de la inmunidad humoral.

También se investigó la relación entre las pruebas de ELISA BIONOTE y TR Anigen con la distribución de las lesiones macroscópicas y fundamentalmente con la presencia o ausencia de lesiones cavernosas en pulmón. Hay autores (Buendía y col., 2013) que encontraron mayor positividad a una técnica de ELISA a medida que aumentaba la distribución de las lesiones, llegando a obtener una SE del 66,3% en cabras con lesiones cavernosas pulmonares. Si bien en nuestro caso el número de animales analizados no fue elevado, buscamos obtener alguna referencia que nos permita aún más justificar la decisión de aplicar o no estas técnicas en campos con problemas. Como se observa en la Tabla 10 cuando las lesiones se ubicaron

únicamente en sistema respiratorio (I), 4 de 17 (23,53%) fueron positivas a ELISA BIONOTE y 8 de 31 (21,81%) a TR Anigen, Si la tuberculosis se presentaba con una distribución generalizada (II), 2 de 5 (20%) y 0 de 6 (0%) fueron positivos a cada técnica respectivamente.

Si se asocian los animales del grupo III y IV que son los que presentaron lesiones cavernosas con o sin lesiones generalizadas, encontramos un aumento en los porcentajes ya que 4 de 6 (66%) y 2 de 5 (40%) dieron resultado positivos a ELISA BIONOTE y TR Anigen respectivamente.

Uno de los inconvenientes demostrados con estos hallazgos, y que tiene fuerte implicancia epidemiológica, es que animales con lesiones cavernosas fueron negativos a las pruebas, los cuales quedan en el campo y ello facilita la transmisión de la enfermedad debido a que, con el mismo concepto que plantean Nieberle y Cohrs, (1966) y Dannenberg, (2009), ante esa presentación patológica es cuando más microorganismos son liberados al medio ambiente.

Dentro de los diagnósticos bacteriológicos, se aplicaron el cultivo de micobacterias y la tinción de Z-N previa a la siembra. Cuando se evalúa en qué medio hubo mayor crecimiento de micobacterias, se observa que el 100% desarrollaron en medio de Stonebrink y solamente el 23,68% lo hicieron en Löwenstein-Jensen. Estos resultados refuerzan la capacidad de multiplicación que tiene *M. bovis* en Stonebrink comparado con Löwenstein-Jensen. Por lo tanto, y confirmando lo expresado por Jorge y col., (2005) nunca debe usarse este último como medio único para el cultivo si se sospecha de la presencia de *M. bovis* ya que existe una alta posibilidad de dar resultados falsos negativos.

La tinción de Z-N presiembra es una alternativa diagnóstica que ayuda, en cierto modo, a predecir el resultado de los cultivos bacterianos, ya que se colorea

parte del material procesado y decontaminado, que seguidamente se va a depositar en los tubos con los medios de cultivo. La SE observada fue baja ya que solo 10 (26,32%) muestras fueron positivas. Por lo tanto un resultado negativo presiembra no fue un indicador seguro de la ausencia de micobacterias en la muestra.

Con respecto a la **zBP**, hubo una muestra (1,47%) de las 68 que presentó BAAR presiembra. A partir de ella no hubo crecimiento en ninguno de los medios de cultivo. Ese animal contaba con el antecedente de haber dado positivo a la prueba de IDR y no presentar lesiones macroscópicas ni microscópicas, por lo tanto se correspondió como no infectado. La explicación para la presencia de BAAR en esa muestra, se podría relacionar con algún otro agente no micobacteriano que sea capaz de teñirse con Z-N como pueden ser Nocardias, Corynebacterias, entre otras (Velasco y col., 2008).

También se estudió el resultado de los cultivos según la presencia de lesiones macroscópicas, lo que permite determinar el porcentaje de recuperación de micobacterias a partir de tejidos. Cuando se relacionó la presencia de lesiones con cultivos positivos, hubo coincidencia en el 73,47% de los casos. Este valor lo consideramos alto al compararlo con otros autores que han estudiado esta relación en bovinos, Varello y col., (2008) obtuvo el 70%, Estrada y col., (2004) el 52% y Morales y col., (2005) el 22%. Al menos dos de las razones, indicadas por Gormley y col.; (2014) que determinan una mejor relación entre lesiones y aislamiento y que podrían justificar nuestros resultados, serían la capacidad del personal técnico en clasificar correctamente las lesiones macroscópicas compatibles diferenciándolas de otras patologías similares y la utilización en el laboratorio de técnicas de aislamiento estandarizadas con un control severo de todas las etapas desde la preparación de los medios de cultivo, la decontaminación de las muestras, la siembra y el posterior

seguimiento hasta la recuperación final de las colonias para su identificación por biología molecular.

Por otro lado hubo un muy bajo porcentaje (2,74%) de aislamientos a partir de tejidos sin lesiones macroscópicas. Como se ha discutido anteriormente con los hallazgos de Gonzalez Jaurrero y col., (2013) esto es posible principalmente por una baja dosis infectante o por insuficiente tiempo entre infección y necropsia que no permitió el desarrollo de lesiones evidentes.

El presente trabajo, de tipificación de micobacterias aisladas en caprinos por medio de biología molecular, es el primero que se realiza en el país con un número elevado de especímenes (n= 36). Todas ellas fueron identificadas como *M. bovis*. Martinez Vivot y col., (1997) en Argentina aislaron *M. bovis* en una cabra que compartía el ambiente con bovinos tuberculosos. Otros autores, Daniel y col., (2009) Crawshan y col., (2008) también identificaron esa micobacteria en brotes con presentación clínica y epidemiológica similares a los encontrados en nuestro estudio.

Con respecto al spoligotipo de los *M. bovis* identificados, todos se correspondieron con SB0140. El mismo ha sido descrito como el más prevalente en bovinos de Argentina y de países que tuvieron historia de relaciones comerciales con Reino Unido. Zumárraga y col., (2013) lo obtuvieron del 24,6% de las muestras en diferentes especies animales pertenecientes a varios países de Latinoamérica. En la provincia de Córdoba el 55,4% de los aislamientos en lesiones de bovinos pertenecieron a ese spoligotipo (Macías y col., 2010).

En los casos publicados por Martinez Vivot y col., (1997), Daniel y col., (2009), Crawshan y col., (2008) estuvo involucrado *M. bovis* SB0140. Sumado a nuestros resultados, llevaría a presuponer que al menos ese spoligotipo sería de alta virulencia en las cabras.

La presencia de un solo spoligotipo podría ser explicada, entre otros, por el número bajo de cepas aisladas y tipificadas en nuestro trabajo; por una población caprina bastante cerrada donde son muy pocos los movimientos de animales hacia regiones diferentes del país ya que en las zonas estudiadas los productores solo intercambian los machos con los vecinos o por el escaso contacto con bovinos que podrían transmitir otros spoligotipos; esto último es debido a que en casi todos esos establecimientos no había bovinos ya que las condiciones ambientales especialmente las pocas lluvias, determinan una escasa producción vegetal que hace casi imposible la cría de vacunos.

Sería de mucha importancia continuar con investigaciones tendientes a observar la presencia de tuberculosis bovina de esa región o de aquellas que movilizan bovinos a las zonas problemas, y mediante la aplicación de técnicas moleculares como VNTR, comparar los aislamientos de *M. bovis* que nos permitan realizar un estudio epidemiológico entre las cepas. Martinez Vivot y col., (1997), Zanardi y col., (2013), Napp y col., (2013) mediante la aplicación de estas técnicas lograron explicar cómo se transmitió la enfermedad entre bovinos y caprinos.

CONCLUSIONES

Debido a que en la **zAP** los animales que fueron positivos a la IDR en su mayoría presentaron lesiones y aislamiento de micobacterias, no así las pruebas serológicas que dejaban muchos animales falsos negativos, la IDR para el diagnóstico in vivo sería la técnica recomendable en esas situaciones epidemiológicas.

Por otro lado en la **zBP** las técnicas serológicas demostraron un alto valor predictivo negativo comparadas con la IDR, lo que hace más indicado su uso.

Se debe tener en cuenta que positividad a la reacción tuberculínica no es sinónimo de enfermedad, por ello consideramos que para determinar un hato caprino infectado se deberían evaluar otros factores tales como antecedentes clínicos y epidemiológicos, tamaño de las reacciones, presencia de lesiones compatibles y/o aislamiento de micobacterias.

Como futuras líneas de estudio que consideramos importante profundizar se pueden destacar:

- *Continuar y profundizar las investigaciones sobre la presente temática con un mayor número de muestras que permitan reforzar los resultados obtenidos

- *Iniciar estudios conjuntos con integrantes de los sistemas de salud en humanos, tanto oficiales como privados, para conocer la implicancia de esta zoonosis a partir de los caprinos y prevenir la transmisión de la enfermedad a todas aquellas personas en riesgo

- *Conocer la realidad de la tuberculosis en otras especies animales que comparten hábitat con los caprinos, especialmente en los bovinos

- *Evaluar la presencia en el ambiente de micobacterias patógenas y ambientales que influyen en los resultados de las técnicas diagnósticas

Si bien los resultados aquí presentados no se pueden trasladar linealmente a toda la población caprina, constituyen un valioso aporte al conocimiento de la tuberculosis en esa especie considerando lo incipiente del tema en nuestro país.



REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aagaard, C.; Govaerts, M.; Meikle, V.; Vallecillo, A.; Gutierrez-Pabello, J.; Suarez-Güemes, F.; McNair, J.; Cataldi, A.; Espitia, C.; Andersen, P.; Pollock, J. 2006. Optimizing antigen cocktails for detection of *Mycobacterium bovis* in herds with different prevalences of bovine tuberculosis: ESAT6-CFP10 mixture shows optimal sensitivity and specificity. *Journal Clinical Microbiology*, 44(12): 4326-4335.
- Acosta, B.; Real, F.; Ferrer, O.; Deniz, S. 1993. Tuberculosis caprina en Gran Canaria y Tenerife. XVIII Jornadas Científicas de la Sociedad Española de Ovinotecnia y Caprinotecnia. 23-25 septiembre, Albacete, España.
- Acosta, B.; Real, L.; Leon, F.; Deniz, S.; Ferrer, O.; Rosario, I.; Ramirez, A. 2000. ELISA for anti-MPB70: an option the diagnosis of goat tuberculosis caused by *Mycobacterium bovis*. *Australian Veterinary Journal*, 78(6): 423-424.
- Álvarez, N.; Borrero, R.; Reyes, F.; Camacho, F.; Mohd, N.; Sarmiento, M.; Acosta, A. 2009. Mecanismos de evasión y persistencia de *Mycobacterium tuberculosis* durante el estado de latencia y posibles estrategias para el control de la infección latente. *VacciMonitor*, 18(3): 18-25.
- 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.; Cousins, D.; Mateos, A.; Domínguez, L. 2003. Elevation of *Mycobacterium tuberculosis* subsp. *caprae* Aranaz et al. 1999 to species rank

as *Mycobacterium caprae* comb. nov., sp. nov. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 53(6): 1785-1789.

- Aranaz. A. 2013. Tuberculosis bovina: características de la respuesta inmune. En el curso: Diagnóstico y control de enfermedades producidas por micobacterias: tuberculosis y paratuberculosis. CEBASEV, Buenos Aires, 10 al 13 de septiembre.
- Arellano Reynoso, B.; Ramirez Casillas, I.; Diaz Aparicio, E.; Valero Elizondo, G.; Santillan Flores, M. 1999. Tuberculosis diagnosis in goat flocks using double intradermal test and bacteriology. Técnica Pecuaria de México, 37(1): 55-58.
- Barnes, P.; Cave, M. 2003. Molecular epidemiology of tuberculosis. New England Journal 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)
- Benjamini, E.; Sunshine, G.; Leskowitz, S. 1996. Immunology. A short course. 3ed. Editorial Wiley-Liss, Nueva York, 299-314.
- Bernabé, A.; Gomez, M.; Navarro, J.; Gómez, S.; Sanchez, J.; Sidrach, J.; Menchen, V.; Vera, A.; Sierra, M. 1991a. Morphopathology of caprine tuberculosis. I: Pulmonary tuberculosis. Annales de Veterinaria de Murcia, 6/7: 9-20.
- Bernabé, A.; Gomez, M.; Navarro, J.; Gómez, S.; Sanchez, J.; Sidrach, J.; Menchen, V. Vera, A.; Sierra, M. 1991b. Morphopathology of caprine

- tuberculosis. II: Generalization of tuberculosis. *Annales de Veterinaria de Murcia*, 6/7: 21-29.
- Bezos, J.; de Juan, L.; Romero, B.; Alvarez, J.; Mazzucchelli, F.; Mateos, A.; Dominguez, L.; Aranaz, A. 2010. Experimental infection with *Mycobacterium caprae* in goats and evaluation of immunological status in tuberculosis and paratuberculosis co-infected animals. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 133(2-4): 269–275.
 - 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/11081/10/12/2013>.
 - Bezos, J.; Álvarez, J.; Mínguez, O.; Marqués, S.; Martín, O.; Vigo, V.; Pieltain, C.; Romero, B.; Rodríguez, S.; Casal, C.; Mateos, A.; Domínguez, L.; de Juan, L. 2012. Evaluation of specificity of tuberculosis diagnostic assays in caprine flocks under different epidemiological situations. *Research in Veterinary Science*, 93(2): 636-640.
 - Blood, D.; Radostits, O. 1992. *Medicina Veterinaria*. 7ed. Nueva Editorial Interamericana, México, 764-774.
 - Brock, T.; Madigan, M. 1993. *Microbiología*. Capítulo 19: *Mycobacterium*. 6ed. Prentice Hall Hispanoamericana S.A. México, 851-853.
 - Buddle M.; Livingstone, P.; Lisle, G. 2009. Advances in ante-mortem diagnosis of tuberculosis in cattle. *New Zealand Veterinary Journal*, 5(4): 173-180.
 - Buendía, A.; Navarro, J.; Salinas, J.; McNair, J.; de Juan, L.; Ortega, N.; Cámara, P.; Torreblanca, P.; Sanchez, J. 2013. Ante-mortem diagnosis of caprine tuberculosis in persistently infected herds: Influence of lesion type on

the sensitivity of diagnostic tests. *Research in Veterinary Science*. 95(3): 1107-1113.

- Cabello, A.; Bachs, E.; Alcaide, E.; Zorrilla I.; Fariñas, F. 2002. Estudio de prevalencia de artritis-encefalitis caprina, paratuberculosis y tuberculosis en ganado caprino de raza malagueña. XXVII Jornadas Científicas y VI Jornadas Internacionales de la Sociedad Española de Ovinotecnia y Caprinotecnia, Valencia, 19 -21 septiembre, 534-542.
- Cadmus, S.; Adesokan, H.; Jenkins, A.; van Soolingen, D. 2009. *Mycobacterium bovis* and *M. tuberculosis* in goat, Nigeria. *Emerging Infectious Diseases*, 15(12): 2066-2067.
- Caminero Luna, J. 2003. Guía de la tuberculosis para médicos especialistas. Unión Internacional contra la Tuberculosis y Enfermedades Respiratorias (UICTER), Paris, Francia.
- Cataldi, A.; Gioffré, M.; Santangelo, 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.
- Centro Panamericano de Zoonosis (CEPANZO). 1991. Situación de la Tuberculosis Bovina en América Latina y el Caribe. Publicación especial N° 10: 47.
- Coad, M.; Clifford, D.; Rhodes, S.; Hewinson, R.; Vordermeier, H.; Whelan, A. 2010. Repeat tuberculin skin testing leads to desensitisation in naturally infected tuberculous cattle which is associated with elevated interleukin-10 and decreased interleukin-1 beta response. *Veterinary Research*, 41(2): 14.

- Collins, D.; Radford A.; de Lisle G.; Jacobs H. 1994. Diagnosis and epidemiology of bovine tuberculosis using molecular biological approaches. *Veterinary Microbiology*, 40(1-2): 83-90.
- Corner, L. 1994. *Post mortem* diagnostic of *Mycobacterium bovis* infection in cattle. *Veterinary Microbiology*. 40(1-2): 53-63.
- Cotran, R.; Kumar, V.; Collins, T. 2000. Patología estructural y funcional. 6ta Ed. Mc Graw Hill Interamericana, España.
- Cousins, D., Francis, B.; Casey, R.; Mayberry, C. 1993. *Mycobacterium bovis* infection in a goat. *Australian Veterinary Journal*, 70(7): 262-263.
- Cousins, D. 2001. *Mycobacterium bovis* infection and control in domestic livestock. *Review Scientific and Technical, Office International Epizooties*, 20(1): 71-85.
- Cousins, D.; Florisson, N. 2005. A review of tests available for use in the diagnosis of tuberculosis in non-bovine species. *Review Scientific and Technical, Office International Epizooties*, 24(3): 1039-1059.
- Crawshaw, T.; Daniel, R.; Clifton-Hadley, R.; Clark, J.; Evans, H.; Rolfe, S.; de la Rúa-Domenech, R. 2008. TB in goats caused by *Mycobacterium bovis*. *Veterinary Record*, 163(4): 127.
- 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.

- Danbirni,, S.; Sackey, A.; Kudi, A.; Okaiyeto, S.; Pewan, S. 2009. A comparison of one-step Anigen[®] Rapid Bovine Tuberculosis Antibodies Test sensitivity to *post mortem* gross lesions in diagnosing bovine tuberculosis in a dairy herd in Kaduna State. *Research Journal of Dairy Sciences*, 3(2): 32-34.
- Daniel, R.; Evans, H.; Rolfe, S.; de la Rúa-Domenech, R.; Crawshaw, T.; Higgins, R.; Schock, A.; Clifton-Hadley,R. 2009. Outbreak of tuberculosis caused by *Mycobacterium bovis* in golden Guernsey goats in Great Britain *Veterinary Record*, 165(12): 335-342.
- Dannenberg, A. 2009. Liquefaction and cavity formation in pulmonary TB: a simple method in rabbit skin to test inhibitors. *Tuberculosis*, 86(5): 337-348
- Dannenberg, A.; Rook, G. 1994. Pathogenesis of pulmonary tuberculosis: an interplay of tissue-damaging and macrophage-activating immune responses— dual mechanisms that control bacillary multiplication. En: *Tuberculosis: pathogenesis, protection, and control*. Editorial Bloom B.R. American Society for Microbiology, Washington, D.C, 459–483.
- de la Rúa-Domenech, R.; Goodchild, A.; Vordemeier, H.; Hewinson, R.; Christiansen, K. 2006. Ante-mortem diagnosis in cattle: a review of the tuberculin test, gamma interferon assay and other ancillary diagnostic techniques. *Research in Veterinary Science*, 81(2): 190-210.
- Deresa, B.; Conraths, F.; Gobena Ameni, G. 2013. Abattoir-based study on the epidemiology of caprine tuberculosis in Ethiopia using conventional and molecular tools. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 55(1):15.
- Dorronsoro, I.; Torroba, L. 2007. Microbiología de la tuberculosis. *Anales del Sistema Sanitario de Navarra*, vol 30, Supl 2.

- Durr, P.; Hewinson, R.; Clifton-RS, H. 2000. Epidemiología molecular de la tuberculosis bovina. I: *Mycobacterium bovis* genotipado. Review Science and Technology, 9(3): 675-688.
- Ehlers, S.; Schaible, U. 2012. The Granuloma in Tuberculosis: dynamics of a host-pathogen collusion. Frontiers in Immunology, 3: 411.
- Elkington, P.; Friedland, J. 2006. Matrix metalloproteinases in destructive pulmonary pathology. Thorax, 61(3): 259-266.
- El-Mahrouk, M.; El-Balawy, M. 2010. Bacteriological, serological, molecular characterization and risk assessment of bovine tuberculosis in cattle. Egyptian Journal of Comparative Pathology and Clinical Pathology, 23(1): 64-84.
- Estrada Chávez, C.; Arriaga Díaz, C.; Pérez González, R; Díaz Otero, F.; Villegas Sepúlveda, N.; González Salazar, D. 2004. Concordancia de la PCR y métodos rutinarios para el diagnóstico de tuberculosis bovina. Veterinaria México, 35(3): 225-236.
- Etchechoury, I.; Valencia, G.; 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 Public Health, 57(6): 375-381.
- Fernández Benito, V.; Sánchez García, R.; Velasco, J. 2001. Estimación serológica e intradermorreacción doble (tuberculosis-paratuberculosis) en 30 rebaños caprinos de la Comarca de Bejar (Salamanca). XXVI Jornadas científicas y V Internacionales de la Sociedad Española de Ovinotecnia y Caprinotecnia, 20-22 septiembre, Sevilla, España.
- 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.
- Gardner, I.; Hird, D. 1989. Environmental source of mycobacteriosis in a California swine herd. *Canadian Journal of Veterinary Research*, 53(1): 33-37.
 - Garro, C.; Morris, W.; Delgado, F.; Garbaccio, S. 2011. Tuberculosis Bovina en terneros. *Veterinaria Argentina*, 23:(276). Disponible en: <http://www.veterinariargentina.com/revista/2011/04/tuberculosis-bovina-en-terneros>
 - Gomez, N.; Gutierrez, M.; Geijo, M.; García Marín, J. 1998. Identificación y diferenciación de variantes de *Mycobacterium bovis* en la tuberculosis caprina. *Producción Ovina y Caprina*, 23: 295-296.
 - Gonzalez-Juarrero, M.; Turner, O.; Turner, J.; Marietta, P.; Brooks, J.; Orme, I. 2001. Temporal and spatial arrangement of lymphocytes within lung granulomas induced by aerosol infection with *Mycobacterium tuberculosis*. *Infection and Immunity*, 69(3): 1722-1728.
 - Gonzalez-Juarrero, M.; Bosco-Lauth, A.; Podell, B.; Soffler, C.; Brooks, E.; Izzo, A.; Sanchez-Campillo, J.; Bowen, R. 2013. Experimental aerosol *Mycobacterium bovis* model of infection in goats. *Tuberculosis*, 93(5): 558-564.
 - Gormley, E.; Corner, L.; Costello, E.; Rodriguez-Campos, S. 2014. Bacteriological diagnosis and molecular strain typing of *Mycobacterium bovis* and *Mycobacterium caprae*. *Research in Veterinary Science*, 97: 530-543
 - Gutierrez, M., Samper, S.; Jimenez, M.; Van Embdem, J.; Martín, J.; Martín, C. 1997. Identification by spoligotyping of a caprine genotype in

- Mycobacterium bovis* strains causing human tuberculosis. *Journal of Clinical Microbiology*, 35(12): 3328-3330.
- Gutiérrez, M.; Tellechea, J.; García Marín, J. 1998. Evaluation of cellular and serological diagnostic tests for the detection of *Mycobacterium bovis*-infected goats. *Veterinary Microbiology*, 62(4): 281-290.
 - Herrera, M. 1997. Determinación de reaccionantes a PPD bovina y aviar en rodeos lecheros caprinos y ovinos. Tesis de grado. Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional del Centro de la provincia de Buenos Aires, Tandil, Argentina.
 - Hines, M.; Keeger, J.; Herron, A. 1995. Mycobacterial infections of animals: pathology and pathogenesis. *Laboratory Animal Science*, 45(4): 334-351.
 - Hines, M.; Balwin, C.; Styer, E.; Hullinger, G.; Cole, J. 1999. Effects of macrophage inhibitory factor-A3 (MIF-A3) on cytokine secretion and phagolysosome fusion in murine macrophages. *Veterinary Microbiology*, 65(1): 47-60.
 - Holt, J.; Krieg, V.; Sneath, P.; Staley, J.; Willians, S. 1994. The Mycobacteria. *Bergey's Manual of determinative bacteriology*. 9ed. Editorial Lippincott Willians & Wilkins, USA, 597-603.
 - Hsu, T.; Hingley-Wilson, S.; Chen, B.; Chen, M.; Dai, A.; Morin, P.; Marks, C.; Padiyar, J.; Goulding, C.; Gingery, M.; Eisenberg, D.; Russell, R.; Derrick, S.; Collins, F.; Morris, S.; King, C.; Jacobs, W. 2003. The primary mechanism of attenuation of bacillus Calmette–Guerin is a loss of secreted lytic function required for invasion of lung interstitial tissue. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(21): 12420–12425.

- Johnson, L.; Dean, G.; Rhodes, S.; Hewinson, G.; Vordermeier, M.; Wangoo, A. 2007. Low-dose *Mycobacterium bovis* infection in cattle results in pathology indistinguishable from that of high-dose infection. *Tuberculosis*, 87(1): 71–76.
- 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.; Embden, J. 1997. Simultaneous detection and strain differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* for diagnosis and epidemiology. *Journal of Clinical Microbiology*, 35(4): 907-914.
- 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. 2000. Agente Etiológico. En: Actualización en tuberculosis bovina. Redacción: Subcomisión Nacional de Tuberculosis Bovina, Dr. Pedro Torres, Jefe Programa Tuberculosis. SENASA. Impreso en Buenos Aires, ARGENTINA – Disponible en:
<http://www.senasa.gov.ar/Archivos/File/File1009-6.pdf>

- Kantor, I.; Torres, P.; Morcillo, N.; Imaz, M.; Sequeira M. 2012. La tuberculosis zoonótica en la Argentina. Medicina (Buenos Aires), 72: 514-520. Disponible en: <http://www.medicinabuenosaires.com/revistas/vol72-12/6/514-520-med6-17.pdf>
- Laboratorio BIONOTE. 2010. Anigen Rapid Bovine TB Ab Test Kit. Disponible en: <http://www.bionote.co.kr/File/Upload/2010/02/15/2010-02-15.pdf>
- Laboratorio BIONOTE. 2013. Kit BTB Ab ELISA 2.0. Disponible en: [http://www.bionote.co.kr/File/Upload/2013/07/08/2013-07-08\(5\).pdf](http://www.bionote.co.kr/File/Upload/2013/07/08/2013-07-08(5).pdf)
- Laboratorio IDEXX. 2013. Kit para la detección de Anticuerpos frente a *Mycobacterium bovis*. Disponible en: http://www.idexx.es/html/es_es/livestock-poultry/ruminant/bovine-tuberculosis.html 27/12/2013
- Lilienbaum, W. 2013. Tuberculosis: uso de técnicas de inmunidad celular: Gama Interferón versus tuberculina. Uso de ELISA y experiencias de campo. CEBASEV, 10 al 13 de septiembre, Buenos Aires, Argentina.
- 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.
- Lu, Y.; Tsai, H.; Tsung, C.; Chen, C.; Lee, H.; Hung, H.; Lee, S. 1992. Goat tuberculosis in Taiwan. Taiwan Journal of Veterinary Medicine and Animal Husbandry, 59:61-68.

- Lucke, D. 1954. Tuberculosis in horse, pig, sheep and goat. *Veterinary Record* 70: 529-536. Citado por Thoen, C. 1999. Tuberculosis. En *Enfermedades del cerdo*. 8va edición, Ed Intermédica, Colombia, 515-522.
- Macias, A.; Magnano, G.; Giraudo, J.; Schneider, M.; Mació, 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 Científica Técnica de la Asociación Argentina de Veterinarios de Laboratorios de Diagnóstico, 3-5 de noviembre, Mercedes, Corrientes, Argentina.
- Magnano, G.; Urbani, C.; Schneider, M.; Giraudo, J. 2004. Tuberculosis caprina: comparación entre animales positivos a la prueba de intradermorreacción y la presencia de lesiones y/o aislamiento. *Veterinaria Argentina*, 21(208): 570-576.
- Magnano, G.; Schneider, M.; Macias, A.; Sticotti, E.; Giraudo, J.; Mació, M.; Cialella, M.; Getzrow, N.; Rodríguez, M.; Camuñas, C. 2010. Eliminación de micobacterias por vía respiratoria en caprinos positivos a la prueba tuberculínica. XVIII Reunión Científico Técnica de la Asociación Argentina de Veterinarios de Laboratorio de Diagnóstico, 3-5 de noviembre, Mercedes, Corrientes, Argentina.
- Marassi, C.; Almeida, C.; Pinheiro, S.; Vasconcellos, S.; Lilenbaum, W. 2009. The use of MPB70-ELISA for the diagnosis of caprine tuberculosis in Brazil. *Veterinary Research Communication*, 33(8): 937-943.
- Martínez Vivot, M.; Romano, M.; Torres, P. 1997. Aplicación del spoligotyping al análisis de transmisión del *Mycobacterium bovis*, de rodeos bovinos a caprinos. Taller internacional sobre infecciones humanas y animales

producidas por Clamidias, Micobacterias, Brucelas y Borrietas. Buenos Aires, 25 julio al 4 de agosto. Asociación Argentina de Zoonosis. INTA, UBA, Argentina.

- Morales, A.; Martínez 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 Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad de Zulia, 15(2): 103-108.
- Morris, R.; Pfeiffer, D.; Jackson, R. 1994. The epidemiology of *Mycobacterium bovis* infections. Veterinary Microbiology, 40(1): 153-177.
- Napp, S.; Allepuz, A.; Mercader, I.; Nofrarías, M.; López-Soria, S.; Domingo, M.; Romero, B.; Bezos, J.; Pérez de Val, B. 2013. Evidence of goats acting as domestic reservoirs of bovine tuberculosis. Veterinary Record, 172(25): 663-663.
- Neill, S; Hanna, J; O'Brien, J.; McCracken, R. 1998. Excretion of *Mycobacterium bovis* by experimentally infected cattle. Veterinary Record, 123(13): 340-343.
- Nieberle, K.; Cohrs, P. 1966. Tuberculosis. En: Textbook of special pathology anatomy of domestic animals. Pergamon Press Ltd., London.
- Norby, B.; Bartlett, P.; Fitzgerald, S.; Granger, L.; Bruning-Fann, C.; Whipple, D.; Payeur, J. 2004. The sensitivity of gross necropsy, caudal fold and comparative cervical tests for the diagnosis of bovine tuberculosis. Journal of Veterinary Diagnostic Investigations, 16(2):126-131.
- OIE, 2008. Terrestrial Manual capítulo, 2.4.7. Bovine tuberculosis.
- OIE, Asamblea Mundial de delegados. Resolución N° 24, mayo de 2012, Disponible en:

http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Our_scientific_expertise/docs/pdf/Es_OIE_GS_2012_Resolucion_n%20B024.pdf

- OIE, 2013. Terrestrial Manual, chapter 2.4.7. Bovine tuberculosis.
- O'Reilly, L.; Daborn, C. 1995. The epidemiology of *Mycobacterium bovis* infections in animals and man: A review. *Tubercle and Lung Disease*, 76(1): 1–46.
- Payeur, J.; Brown, J.; Higginbotham, A. 1981. Mycobacterial isolation from swine tissues. *Proceeding of the United States Animal Health Association*, 85: 475-484.
- Pérez de Val, B.; López-Soria, S.; Nofrarías, M.; Martín, M.; Vordermeier, M.; Villarreal-Ramos, B.; Romera, N.; Escobar, M.; Solanes, D.; Cardona, P.; Domingo, M. 2011. Experimental model of tuberculosis in the domestic goat after endobronchial infection with *Mycobacterium caprae*. *Clinical and Vaccine Immunology*, 18(11): 1872-1881.
- Pollock, J; Neill, S. 2002. *Mycobacterium bovis* infection and tuberculosis in cattle. *Veterinary Journal*, 163(2): 115-127.
- PROCAL II. 2011. Caracterización del sector caprino en la Argentina. Disponible en:
http://www.alimentosargentinos.gob.ar/contenido/procal/seccionprocal/caracterizacion_del_sector_caprino_en_argentina.php
- Quintas, H.; Reis, J.; Pires, I.; Alegria, N. 2010. Tuberculosis in goats. *Veterinary Record*, 166(14): 437-438.
- Ramirez, I.; Santillan, M.; Dante, V. 2003. The goat as an experimental ruminant model for tuberculosis infection. *Small Ruminant Research*, 47(2):113–116.

- Rastogni, N.; Legrand, E.; Sola, C. 2001. The Mycobacteria: an introduction to nomenclature and pathogenesis. Review Scientific and Technical, Office International Epizooties, 20(1): 21-54.
- Rodríguez, S.; Bezos, J.; Romero, B.; de Juan, L.; Álvarez, J.; Castellanos, E.; Moya, N.; Lozano, F.; Tariq Javed, M.; Sáez-Llorente, J.; Liébana, E.; Mateos, A.; Domínguez, L.; Aranaz, A. 2011. *Mycobacterium caprae* infection in livestock and wildlife, Spain. Emerging Infectious Disease, 17(3): 532-535.
- Sanchez, J.; Tomás, L.; Buendía, A.; Navarro, J. 2008. Avances en inmunología y métodos de diagnóstico en la tuberculosis caprina. XXXIII Jornadas científicas y XII Internacionales de la Sociedad Española de Ovinotecnia y Caprinotecnia (SEOC), 24-27 de Septiembre, Almería, España.
- Sanchez, J.; Tomas, L.; Ortega, N.; Buendia, A.; del Rio, L.; Salinas, J.; Bezos, J.; Caro, M.; Navarro, J. 2011. Microscopical and immunological features of tuberculoid granulomata and cavitary pulmonary tuberculosis in naturally infected goats. Journal of Comparative Pathology, 145(2-3): 107–117.
- Saunders, B.; Cooper. A. 2000. Restraining mycobacteria: Role of granulomas in mycobacterial infections. Immunology and Cell Biology, 78(4): 334–341.
- 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.; Magnano, G.; Bergamo, E.; Urbani, C.; Herrera, P.; Quiroga, A.; Macías, A.; Meikle, V.; Cataldi, A.; Giraudo, J. 2007. Repetición de la

prueba de intradermorreacción tuberculínica en bovinos naturalmente infectados y modificaciones del pliegue anocaudal. Revista InVet, 9(1): 27-33.

- Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria (SENASA). 1993. Plan Nacional de Control y Erradicación de la Tuberculosis Bovina. Resol. 1287/93, Buenos Aires, Argentina.
- Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria (SENASA). 2012. Plan Nacional de Control y Erradicación de la Tuberculosis Bovina en la República Argentina, Resol. 128/12, Buenos Aires, Argentina.
- Severino Silvano dos Santos, H.; Regina Pinheiro, S.; Oliveira de Souza, G.; Corsi Dib, C.; Reis do Rosário, T.; Melville, P.; Alves, C.; Santos de Azevedo, S. 2011. *Mycobacterium bovis* infection in goats from the northeast region of Brazil. Brazilian Journal of Microbiology, 42(4): 1437-1439.
- Smith, B. 2010. Medicina interna de grandes animales. 4ta edición. Ed. ELSEVIER, 661-662.
- Stata 11 (StataCorp. 2009. Stata Statistical Software: Release 11. College Station, TX: StataCorp LP) y BLCM (Bayes Latent Class Models http://www.nandinidendukuri.com/index.php?option=com_content&view=article&id=60:blcm-bayes-latent-class-models&catid=41:software&Itemid=60
- Strain, S.; McNair, J.; McDowell, S. 2011. Bovine tuberculosis: A review of diagnostic tests for *M. bovis* infection in cattle. Bacteriology Branch, Veterinary Sciences Division, Agri-Food and Biosciences Institute. Disponible en: <http://www.dardni.gov.uk/afbi-literature-review-tb-review-diagnostic-tests-cattle.pdf>
- Supply, P.; Sarah, L.; Savine, E.; Kremer, K.; Van Soolingen, D.; Locht, C. 2001. Automated high-throughput genotyping for study of global epidemiology

- of *Mycobacterium tuberculosis* based on mycobacterial interspersed repetitive units. *Journal of Clinical Microbiology*, 39(10): 3563–3571.
- Thoen, C.; Bloom, B. 1995. Pathogenesis of *Mycobacterium bovis*. En *Mycobacterium bovis* infections in animals and humans. Thoen, C. and Steele, 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.
 - Traina, M.; Felcaro, M. 2013. Ensayos rápidos inmunocromatográficos de flujo lateral. Disponible en:
<http://notiwiener.com.ar/2013/08/ensayos-rapidos-inmunocromatograficos-de-flujo-lateral/>
 - Tribulo, H.; Tribulo, R.; Villata, L.; Chesta, P.; Colla, C.; Schneider, M.; Magnano, G.; Giraudó, J. 2002. Estudio de la prevalencia de brucelosis y tuberculosis en hatos caprinos de la región centro y norte de la provincia de Córdoba. XIV Reunión Científica Técnica de la Asociación Argentina de Veterinarios de Laboratorios de Diagnóstico, 13-15 de noviembre, Villa General Belgrano, Córdoba, Argentina.
 - Underwood, S.; Decaminada, E.; Grimoldi, F.; Moras, E.; Carfagnini, J. 2002. Prevalencia de Brucelosis, Tuberculosis y Paratuberculosis en cabras para carne de minifundistas en Villa Ojo de Agua, Santiago del Estero. 25° Congreso Argentino de Producción Animal, 2-4 de octubre, Buenos Aires, Argentina.
 - 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*, 20:164–169.

- Velasco, J.; Araque, M.; Araujo, E.; Longa, A.; Nieves, B.; Ramírez, A.; Sánchez, K.; Velazco, E. 2008. Manual práctico de bacteriología clínica. Editorial Venezolana C. A.
- Vergara G.; Delgado A. 2011. Prevalencia de tuberculosis caprina en la provincia de Barranca. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*, 22(3): 268-273.
- 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.
- Whelan, C.; Shuralev, E.; O'Keeffe, G.; Hyland, P.; Kwok, H.; Snoddy, P.; O'Brien, A.; Connolly, A.; Quinn, P.; Groll, M.; Watterson, T.; Call, S.; Kenny, K.; Duignan, A.; Hamilton, M.; Buddle, B.; Johnston, J.; Davis, W.; Olwill, S; Clarke, J. 2008. Multiplex Immunoassay for serological diagnosis of *Mycobacterium bovis* Infection in Cattle. *Clinical and Vaccine Immunology*, 15(12): 1834–1838.
- 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.
- Wiker, H. 2009. MPB70 and MPB83-major antigens of *Mycobacterium bovis*. *Scandinavian journal of immunology*, 69(6): 492-499.

- World Health Organization (WHO), 2012. Global tuberculosis report. Disponible en:
http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/75938/1/9789241564502_eng.pdf
- Zanardi, G.; Boniotti, M.; Gaffuri, A.; Casto, B.; Zanon, M.; Pacciarini, M. 2013. Tuberculosis transmission by *Mycobacterium bovis* in a mixed cattle and goat herd. *Research in Veterinary Science*, 95(2):430-433.
- 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.; Arriaga, C.; Barandiaran, S.; Cobos-Marín, J.; de Waard, Estrada-García, I.; Figueiredo, T.; Figueroa, A.; Giménez, F.; Gomes, H.; Gonzalez, 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.



