



**UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA**

**FACULTAD DE VETERINARIA**

**Programa de Posgrados**

**EVALUACIÓN DE LAS PRUEBAS DE TUBERCULINA Y DEL  
TEST DE INTERFERÓN-GAMMA PARA EL DIAGNÓSTICO  
DE LA TUBERCULOSIS BOVINA Y SU MANEJO EN LOS  
PROGRAMAS DE CONTROL PRUEBA-SACRIFICIO**

Dr. Gonzalo Crosi Martínez DCV.

TESIS DE MAESTRÍA EN SALUD ANIMAL

**URUGUAY**

**2017**





**UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA**

**FACULTAD DE VETERINARIA**

**Programa de Posgrados**

**EVALUACIÓN DE LAS PRUEBAS DE TUBERCULINA Y DEL  
TEST DE INTERFERÓN-GAMMA PARA EL DIAGNÓSTICO  
DE LA TUBERCULOSIS BOVINA Y SU MANEJO EN LOS  
PROGRAMAS DE CONTROL PRUEBA-SACRIFICIO**

Dr. Gonzalo Crosi Martínez DCV.

---

**Dr. Andrés D. Gil MSc PhD**  
Director de Tesis

---

**Dr. Fernando Dutra MSc**  
Co-director

2017

# **INTEGRACIÓN DEL TRIBUNAL DE**

## **DEFENSA DE TESIS**

**Dr. Rodolfo Rivero MSc**  
**Jefe de Laboratorio Regional Noroeste**  
**División de Laboratorios Veterinarios**  
**Dirección General de Servicios Ganaderos**  
**Ministerio de Ganadería Agricultura y Pesca, Uruguay.**

**Dr. Fernando Paolicchi MSc**  
**Responsable de Laboratorio de Bacteriología**  
**Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria, Balcarce, Argentina**  
**Facultad de Ciencias Agrarias-Universidad de Mar del Plata,**  
**Argentina.**

**Dr. Federico Fernández**  
**Director de la División de Sanidad Animal**  
**Dirección General de Servicios Ganaderos**  
**Ministerio de Ganadería Agricultura y Pesca, Uruguay.**

# **ACTA DE DEFENSA DE TESIS**

## **Informe del Tribunal**

*La realización de la presente tesis de maestría fue posible gracias a:*

**Agencia Nacional de Investigación e Innovación (ANII)**

*Llamado a “Becas de Posgrado Nacionales en Área Estratégica 2013”*

*y*

*“Proyecto de investigación Aplicada Fondo María Viñas”*

*Jóvenes Investigadores-2013*



**Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca (MGAP)**



**División de Laboratorios Veterinarios (DILAVE-MGAP)**



## AGRADECIMIENTOS

Me gustaría expresar mi más sincero agradecimiento a todas y cada una de las personas que estuvieron a mi lado en el transcurso de esta etapa profesional de mi vida. En ustedes encontré un valioso apoyo moral y profesional, fueron una compañía con quien festejar cada uno de los logros y también sirvieron de sustento para todos esos momentos difíciles que no se pueden dejar de mencionar. Por esto, les reitero mi profundo agradecimiento por toda su colaboración sin la cual este trabajo no hubiese sido posible de culminar.

Quisiera comenzar agradeciendo a mis directores de tesis, Dr. Andrés D. Gil y Dr. Fernando Dutra, por los conocimientos técnicos brindados y la colaboración en la redacción de la tesis. Fundamentalmente al Dr. Andrés D. Gil, por tenerme en cuenta para realizar esta investigación de tanta importancia para la realidad sanitaria del país, por su ayuda en el diseño de los experimentos, por permitirme la vinculación con entidades públicas y privadas que fueron necesarias para el estudio, por su colaboración durante el procesamiento de los datos utilizando el programa estadístico y por su disposición a la hora de compartir sus conocimientos a cada momento que le era posible.

Agradecer al Director de DILAVE (MGAP), Dr. Álvaro Núñez, por autorizar y facilitar la realización de los análisis de laboratorio en las instalaciones oficiales de DILAVE, así como la utilización de los animales alojados en el establecimiento de Cardozo, Tacuarembó. Un enorme agradecimiento a los técnicos de DILAVE, Dra. Alejandra Suanes, Dra. Ximena Salaberry, Dr. Arturo Juambeltz y Per. Arg. Miguel Castro-Ramos, por sus conocimientos brindados y su colaboración incondicional en la realización de los muestreos y análisis de laboratorio de esta tesis.

Al Director de la División de Sanidad Animal (DSA-MGAP), Dr. Federico Fernández, por apoyar la realización de este trabajo de tesis y colaborar en la logística de las actividades de campo. Agradecer también a los veterinarios oficiales de la División de Sanidad Animal y División de Industria Animal, que permitieron mi actividad y colaboraron desde sus conocimientos y materiales brindados, principalmente a la Dra. María José Vázquez.

Un especial y enorme agradecimiento al Doctor en Medicina Veterinaria, Dr. Alfredo Garín, quien lamentablemente no se encuentra hoy entre nosotros. Por todo tu apoyo incondicional en la realización de esta tesis, por tu compañía y colaboración durante las pruebas de campo, por la transmisión de tus valiosos conocimientos y por todo lo bueno que representas en la carrera de Ciencias Veterinarias de la Universidad de la República, como docente y profesional, te digo MUCHAS GRACIAS ALFREDO QUERIDO!

Gracias a los funcionarios del MGAP que cumplen sus funciones en el establecimiento localizado en Cardozo, departamento de Tacuarembó, Sres. Javier Agüero y Juan Aguiar, quienes estuvieron presente en todas las visitas que se realizaron para las actividades que incluían bovinos sin historia de tuberculosis. Agradecerles por dedicar un tiempo extra a sus labores cotidianas para colaborar con el manejo de los animales incluidos en esta investigación. Agradecer por supuesto al Dr. Enrique Pochintesta,

como encargado del establecimiento quien permitió llevar a cabo las actividades con dichos bovinos.

Agradecer a la empresa NZ Farming System Uruguay/Olam International, en especial a su veterinaria responsable la Dra. Virginia Salveraglio, por permitir el uso de sus bovinos para la realización de las pruebas de diagnóstico sobre animales infectados y por brindar todos los datos que fueron indispensables para la ejecución de esta tesis.

Pasando a mi círculo personal, no encuentro palabras que me permitan reflejar el inmenso agradecimiento que siento hacia mi pareja, Cecilia Fernández, no sólo por su presencia en esta etapa profesional, sino que también por formar parte de mi vida. Fuiste realmente la persona que si me faltaba todo esto no hubiese llegado a buen puerto. Te agradezco de corazón por estar para disfrutar junto a mi cada uno de los pequeños logros, pero más aún te agradezco por no faltar en los momentos difíciles. Esos tropiezos en el camino que me llevaban a un estado de estrés y depresión, gracias a tu forma de ser, tu paciencia y tu fuerza, éstos fueron simples tropiezos pero nunca caídas. El ritmo de esta tesis podrá haber sido lento, pero gracias a vos siempre fue constante. Por todo esto y más... Muchas gracias AMOR.

Nunca me olvido de mi familia, que siempre estuvo y estará en los momentos de crecimiento como profesional y como persona. Gracias a mis padres, mis hermanos y mi sobrino, quienes si bien no participaron en esta tesis, sin dudas que fueron parte de la misma desde lo anímico y en forma incondicional. A mis padres por facilitarme el medio de transporte que me permitió llevar a cabo las pruebas de campo y el traslado de las diferentes muestras hasta el laboratorio.

# ÍNDICE

	Páginas
LISTA DE CUADROS, IMÁGENES Y FIGURAS.....	vi
GLOSARIO. Términos que se utilizan en la tesis.....	viii
RESUMEN .....	ix
SUMMARY .....	x
1. INTRODUCCIÓN .....	1
1.1. Historia de la enfermedad .....	1
1.1.1. La tuberculosis en el mundo.....	1
1.1.2. Descubrimiento de Koch. Tuberculina.....	3
1.1.3. Tuberculosis en Uruguay.....	4
1.2. Etiología.....	5
1.2.1. Características generales de las micobacterias .....	5
1.2.2. <i>Mycobacterium bovis</i> .....	7
1.3. Tuberculosis bovina como zoonosis .....	8
1.4. Tuberculosis en el ganado bovino. Generalidades.....	10
1.5. Epidemiología de la tuberculosis bovina .....	13
1.5.1. Fuentes de infección y vías de transmisión del <i>M. bovis</i> .....	14
1.5.2. Factores de riesgo .....	15
1.5.2.1. Relacionados con el animal .....	15
1.5.2.2. Relacionados con el ambiente y manejo.....	15
1.5.2.3. Relacionados con la sensibilidad del diagnóstico de campo .....	17
1.6. Patogenia.....	17
1.6.1. Dosis infectiva y factores de virulencia.....	18
1.6.2. Respuesta inmune .....	18
1.6.3. Formación de las lesiones. Características y distribución .....	21
2. ANTECEDENTES ESPECÍFICOS .....	25
2.1. Diagnóstico .....	25
2.1.1. Diagnóstico directo.....	26
2.1.1.1. Cultivo bacteriológico.....	26
2.1.1.2. Técnicas de biología molecular .....	28

2.1.1.3.	Diagnóstico histopatológico .....	28
2.1.1.4.	Inspección post-mortem.....	29
2.1.2.	Diagnóstico Indirecto .....	30
2.1.2.1.	Test de Tuberculina Intradérmica.....	30
2.1.2.1.1.	Test de Tuberculina Simple.....	32
2.1.2.1.2.	Test de Tuberculina Cervical Comparativa (TTCC).....	33
2.1.2.1.3.	Sensibilidad y especificidad de las pruebas de tuberculina....	34
2.1.2.2.	Test de interferón-gamma (IFN- $\gamma$ ).....	34
2.1.2.3.	Factores que influyen en la presentación de falsos negativos .....	40
2.1.2.3.1.	Relacionados con el animal.....	41
2.1.2.3.2.	Relacionados a la tuberculina (PPD) utilizada.....	42
2.1.2.3.3.	Relacionados al manejo y realización de las pruebas.....	43
2.1.2.4.	Factores que influyen en la presentación de falsos positivos .....	43
2.1.2.5.	Test de ELISA .....	44
2.2.	Normativa nacional.....	45
2.2.1.	Antecedentes .....	45
2.2.2.	Programa nacional de control y erradicación de la TBB.....	46
2.2.2.1.	Vigilancia epidemiológica a nivel de predios.....	46
2.2.2.2.	Vigilancia epidemiológica en establecimientos de faena .....	48
3.	PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA .....	50
4.	HIPÓTESIS Y OBJETIVOS GENERALES DE LA TESIS.....	51
5.	ESTRATEGIA DE LA INVESTIGACIÓN .....	53
6.	EXPERIMENTO I. EVALUACIÓN DE LA ESPECIFICIDAD DEL TEST DE TUBERCULINA ANO-CAUDAL SIMPLE Y TEST DE TUBERCULINA CERVICAL SIMPLE CUANDO SE UTILIZAN EN FORMA REPETIDA.....	54
6.1.	Hipótesis .....	54
6.2.	Objetivos.....	54
6.3.	Materiales y Métodos.....	54
6.3.1.	Selección de animales .....	54
6.3.2.	Test de Tuberculina Ano-Caudal Simple (TTACS).....	55
6.3.3.	Test de Tuberculina Cervical Simple (TTCS).....	56

6.3.4.	Test de interferón-gamma (BOVIGAM 2 <sup>®</sup> ).....	56
6.3.5.	Análisis estadístico .....	60
6.4.	Resultados.....	61
7.	EXPERIMENTO II. EVALUACIÓN DE LA SENSIBILIDAD DEL TEST DE INTERFERON-GAMMA Y DEL TEST DE TUBERCULINA CERVICAL SIMPLE CUANDO SE UTILIZAN EN FORMA REPETIDA Y EN PLAZOS CORTOS SOBRE BOVINOS INFECTADOS EN FORMA NATURAL. ....	64
7.1.	Hipótesis .....	64
7.2.	Objetivos.....	64
7.3.	Materiales y métodos .....	64
7.3.1.	Selección de animales .....	64
7.3.2.	Test de Tuberculina Cervical Simple (TTCS) y test de IFN- $\gamma$ .....	65
7.3.3.	Inspección <i>post-mortem</i> .....	66
7.3.4.	Diagnóstico histopatológico .....	66
7.3.5.	Cultivo e identificación de <i>Mycobacterium bovis</i> .....	67
7.3.6.	Análisis estadístico .....	67
7.4.	Resultados.....	68
8.	DISCUSIÓN .....	73
9.	CONCLUSIONES .....	82
10.	BIBLIOGRAFÍA CONSULTADA.....	83
11.	ANEXOS.....	94

## LISTA DE CUADROS, IMÁGENES Y FIGURAS

- Cuadro I.** Especies de micobacterias incluidas en el complejo MTBC y su principal hospedador. Adoptado de Casal (2016).
- Cuadro II.** Fórmula de preparación para diluir de conjugado con el diluyente azul.
- Cuadro III.** Espesor de la piel en respuesta a la inoculación de PPD<sub>b</sub> de bovinos sometidos a repeticiones del test de tuberculina cervical simple (TTCS).
- Cuadro IV.** Aumento del espesor de piel de bovinos provenientes de rodeos infectados con TBB a los que se les repitió el test de tuberculina intradérmica en diferentes momentos dentro del periodo de desensibilización.
- Cuadro V.** Resultados de diagnóstico *in-vitro* y *post-mortem* en bovinos positivos (n=32) al test de tuberculina cervical comparativa.
- Figura 1.** Representación esquemática del proceso tuberculoso. Adaptado de Lüchter (2004).
- Figura 2.** Representación esquemática del protocolo para la realización del test de IFN- $\gamma$  en el laboratorio (test Bovigam®). Adaptado de R. de la Rúa Domenech *et al.* (2006).
- Figura 3.** Representación esquemática del espectro de respuesta del sistema inmune bovino frente a diferentes pruebas de diagnóstico para la tuberculosis bovina. Adaptado de Vordermeier *et al.* (2004) *in* de la Rúa-Domenech *et al.* (2006).
- Figura 4.** Representación esquemática del protocolo utilizado en las pruebas de campo para evaluar la especificidad de los test de diagnóstico.
- Figura 5.** Placas de cultivo de 96 pocillos indicando la distribución utilizada en el laboratorio para el agregado de muestras de sangre, antígenos de estimulación (PPD<sub>b</sub> y PPD<sub>a</sub>), antígeno control Nil y mitógeno pokeweed.
- Figura 6.** Esquema del protocolo aplicado en las pruebas de campo para evaluar la sensibilidad del test de TTCS y el rendimiento del test de IFN- $\gamma$ .
- Imagen 1.** Lesiones características de tuberculosis perlada en pulmones de bovino.
- Imagen 2.** Medios de cultivo utilizados para el cultivo de *M. bovis* y características fenotípicas de las colonias.

- Imagen 3.** Corte histológico de un granuloma tuberculoso (Paolicchi F., 2017).
- Imagen 4.** Lesiones macroscópicas detectadas en faena compatibles con tuberculosis bovina.
- Imagen 5.** Muestras de ganglios linfáticos con lesiones luego de ser mantenidas en formol y posteriormente reducidas según protocolos de laboratorio.
- Gráfico 1.** Distribución de los valores registrados de aumento de espesor de piel según el número de repeticiones del test tuberculina cervical simple (TTCS)
- Gráfico 2.** Influencia del uso repetido del test de tuberculina cervical simple aplicado cada 60 días sobre el aumento de espesor de piel en bovinos provenientes de un rodeo libre de TBB.
- Gráfico 3.** Influencia del uso repetido del test de tuberculina sobre la intensidad de respuesta a la PPD<sub>b</sub> en bovinos provenientes de rodeos naturalmente infectados.
- Gráfico 4.** Producción de IFN- $\gamma$  en respuesta a la PPD<sub>b</sub> y PPD<sub>a</sub> registrado durante la repetición del test *in-vitro* en diferentes momentos dentro de los 60 días *post*-TTCC.
- Gráfico 5.** Comparación de la capacidad de detección de animales infectados entre el primer y segundo test de IFN- $\gamma$ .

## **GLOSARIO. Términos que se utilizan en la tesis.**

**TB:** Tuberculosis

**TBB:** Tuberculosis Bovina

**MTBC:** Complejo *Mycobacterium tuberculosis*. Integrado por micobacterias productoras de tuberculosis en humanos y animales.

**MAC:** Complejo *Mycobacterium avium*. Integrado por micobacterias causantes de infecciones en humanos y animales diferentes a la tuberculosis.

**PPDb:** Derivado Proteico Purificado bovino. Obtenido a partir de una cepa de *Mycobacterium bovis*. También denominado Tuberculina bovina.

**PPDa:** Derivado Proteico Purificado aviar. Obtenido a partir de una cepa de *Mycobacterium avium*. También denominado Tuberculina bovina.

**TTACS:** Test de Tuberculina Ano-Caudal Simple

**TTCS:** Test de Tuberculina Cervical Simple

**TTCC:** Test de Tuberculina Cervical Comparativa

**Test de IFN- $\gamma$ :** Prueba de medición *in-vitro* de Interferón-Gamma

**DO PPDb:** Valores de densidad óptica de interferón-gamma en sangre estimulada con el derivado proteico purificado bovino, medido por medio de un lector de ELISA.

**DO PPDa:** Valores de densidad óptica de interferón-gamma en sangre estimulada con el derivado proteico purificado aviar, medido por medio de un lector de ELISA.

## RESUMEN

En un primer experimento se evaluó en una población libre de tuberculosis bovina (TBB), cómo influye el uso reiterado de las pruebas de tuberculina sobre su especificidad. También se evaluó la especificidad del test de interferón-gamma (IFN- $\gamma$ ). Se seleccionaron 100 bovinos de raza Hereford, divididos en 2 grupos (n=50). Un grupo recibió 6 rondas del Test de Tuberculina Ano-Caudal Simple (TTACS) y el otro grupo 6 rondas del Test de Tuberculina Cervical Simple (TTCS), ambos con intervalos de 60 días entre pruebas. Al día 0 se tomaron muestras de sangre de todos los bovinos para la realización del test de IFN- $\gamma$ . Considerando que se partió de una población sana (no expuesta), la prueba *in-vitro* obtuvo una especificidad de 97%. En cuanto al TTCS, se observó un aumento significativo en la media del espesor de piel luego de 6 rondas del test, con 0,48mm más que la media de la primer ronda ( $p = 0,0034$ ). Utilizando el TTACS todos los animales se mantuvieron negativos durante el transcurso de este experimento. En un segundo estudio se evaluó el efecto de desensibilización a la tuberculina provocada por el uso del TTCS en diferentes plazos. Se evaluó también el comportamiento del test de IFN- $\gamma$  sobre estos animales desensibilizados. Se seleccionaron de un rodeo infectado, un total de 32 bovinos lecheros positivos al test de tuberculina comparativa (TTCC). El día 0 se tomaron muestras de sangre a todos los animales para realizar el test *in-vitro*. Se dividieron en 4 grupos (n=8) a los que se les repitió el test de tuberculina y test de IFN- $\gamma$  en diferentes intervalos dependiendo del grupo, a los 15, 30, 45 y 60 días *post*-TTCC. Se realizó un seguimiento hasta la faena para efectuar una inspección *post-mortem* en busca de lesiones compatibles con TBB y tomar muestras ganglios linfáticos para el análisis histopatológico y cultivo de *M. bovis*. En comparación con el primer test de tuberculina, se detectó que la media del espesor de piel disminuyó en forma significativa cuando el TTCS se aplicó a los 15 y 30 días. Esta reducción de la intensidad de respuesta a la tuberculina determinó una menor capacidad para detectar la infección, con la aparición de resultados falsos negativos, incluso cuando el test se repite luego de 45 días. Por otra parte, la repetición del test de IFN- $\gamma$  en diferentes intervalos de tiempo y luego del uso del test de tuberculina, no afectó su capacidad para detectar la infección ( $p = 0,006$ ). En base a los resultados de estos experimentos se concluyó que el TTACS puede aplicarse en forma reiterada con intervalos de al menos 60 días, sin que esto afecte su especificidad. Mientras que para el TTCS se necesitan futuros estudios que evalúen su comportamiento con un número mayor de repeticiones. Por otra parte, se comprobó la presencia del efecto de desensibilización cuando el test de tuberculina es repetido dentro de los 30 días. Mientras que el test de IFN- $\gamma$  no vio afectada su sensibilidad cuando es utilizado en animales desensibilizados por las pruebas cutáneas.

## SUMMARY

A first experiment evaluated a population free of bovine tuberculosis (BTB), as does a repeated tuberculin tests on its specificity. The specificity of the test of interferon-gamma (IFN- $\gamma$ ) was also evaluated. A total of 100 cattle, Hereford breed, were selected and divided into 2 groups ( $n = 50$ ). One group received 6 rounds of Simple Ano-Caudal Tuberculin Test (TTACS) and the other group 6 rounds of the Simple Cervical Tuberculin Test (TTCS), both with intervals of 60 days between tests. The day 0 blood samples were taken from all cattle to perform the IFN- $\gamma$  test. Considering that the animals come from a healthy population, the test *in-vitro* obtained a specificity of 97%. In terms of the TTCS, it was observed a significant increase in the average of the skin thickness after 6 rounds of the test, with 0,48 mm more than the average of the first round ( $p = 0,0034$ ). Using the TTACS, all animals remained negative during the course of this experiment. A second study evaluated the effect of desensitization to tuberculin caused by the use of the TTCS in inadequate deadlines. It was also evaluated the behavior of IFN- $\gamma$  test in these desensitized animals. A total of 32 positive dairy cattle to Comparative Tuberculin Test (TTCC), were selected from an infected farm. Day 0 blood samples were taken to all the animals to perform the test *in-vitro*. They were divided into 4 groups ( $n = 8$ ) in which the tuberculin test and IFN- $\gamma$  test were repeated at different intervals depending on the group, at 15, 30, 45 and 60 days *post*-TTCC. Tracked up to the slaughter house to carry out an inspection *post-mortem* to detect lesions compatible with TBB and take samples of lymph nodes for histopathological analysis and cultivation of *M. bovis*. In comparison with the first tuberculin test, the average of skin thickness decreased significantly when the TTCS was applied after 15 and 30 days. This reduction in the intensity of response to tuberculin determined a lower capacity of the test to detect infection, with the appearance of false negative results, even when the test is repeated after 45 days. On the other hand, the repetition of the IFN- $\gamma$  test at different intervals of time tested, did not affect his ability to detect positive animals ( $p = 0,006$ ). Based on the results of these experiments, it was concluded that the TTACS can be applied repeatedly, at intervals of at least 60 days, without affecting the specificity. While future studies that evaluate their behavior with one greater number of repetitions are required for the TTCS. On the other hand, presence of desensitization effect was detected when the tuberculin test is repeated within 30 days. While the IFN- $\gamma$  test not affected its sensitivity when it is used in desensitized animals.

# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1. Historia de la enfermedad

### 1.1.1. La tuberculosis en el mundo

La Tuberculosis lejos de ser una novedad, es una enfermedad que acompaña al hombre y a los animales desde hace miles de años. Se cree que el género de las micobacterias al que pertenecen los organismos causantes de esta enfermedad en el hombre y en animales se asoció primeramente con vertebrados, antes del paso de estos animales de la vida acuática a la terrestre, hace más de 300 millones de años. Sin embargo, su origen en el hombre sigue siendo inconcluso, cuando, cómo y donde se originó la tuberculosis ha sido sujeto de debate a lo largo de los años. Hay quienes creen que el *Mycobacterium tuerculosis*, agente causante de la tuberculosis humana, tiene su origen en los cerdos, de cuya micobacteria patógena se habrían desarrollado tanto la causante de la tuberculosis como la responsable de la lepra. Otros autores defienden la teoría de que el *M. tuberculosis* vendría de una forma bovina de micobacteria y que su aparición en el hombre data del Neolítico, ligada a la domesticación de los bóvidos y al aumento de la interacción humano-animal (Aranaz, 1996). De hecho, las similitudes genéticas e inmunológicas que proponen algunos investigadores sugieren que el *M. tuberculosis* evolucionó a través de mutaciones genéticas a partir del *M. bovis* luego de la domesticación del ganado vacuno. (Reichman & Hershfield, 2005).

En la Grecia clásica se utilizaba el término "*phthisis*", similar a la debilitación del cuerpo, para referirse a los síntomas producidos por tuberculosis. Esta enfermedad, que parecía ser bastante frecuente en la época, manifestaba síntomas como fiebre vespertina, sudoración, dolor torácico y la hemoptisis como signo patognomónico. En los escritos no se mencionaba el contagio, aunque conocían que la enfermedad podía producir brotes epidémicos. Posteriormente, en el siglo XVII, se produjeron avances en el diagnóstico donde se asociaron los tubérculos o nódulos, detectados en varios tejidos durante sucesivas autopsias, a los síntomas de la tisis que los pacientes habían manifestado en vida (Báguena, 1992 *in* Aranaz, 1996).

El siglo XIX, durante la revolución industrial en Europa, fue la época en que la enfermedad tuvo su mayor impacto, donde niños y adultos vivían y trabajaban en condiciones desfavorables para su salud, con bajos salarios y una pobre alimentación. Estas rudimentarias condiciones de vida favorecieron el desarrollo de la enfermedad, convirtiéndose en la principal causa de muerte entre los años 1850 y 1900, afectando mayormente a la clase obrera. Las proporciones epidémicas que alcanzó le valieron el sobrenombre de "mal del siglo", o también conocida como "peste blanca" (Caldwell, 1988 *in* Aranaz, 1996).

La tuberculosis fue una enfermedad alarmante y de la que poco se conocía. Por esta razón, había una imperiosa necesidad de generar conocimiento e infraestructura para poder responder frente a esta problemática. Para ello, en 1854, se impulsó la construcción del primer sanatorio dedicado exclusivamente al tratamiento de la tuberculosis pulmonar, utilizado posteriormente como prototipo para la instalación de

los sanatorios en países de Europa y en EEUU. A pesar del advenimiento de sucesivos sanatorios antituberculosos, populares y privados, era físicamente imposible abarcar a todas las personas enfermas. Los dispensarios antituberculosos se crearon con el objetivo de tratar aquellos pacientes que quedaban sin la debida atención. A su vez, estos dispensarios tenían como alcance la profilaxis de la enfermedad, mediante la difusión de medidas preventivas y la educación del enfermo (Aranaz, 1996).

En 1865, Jean Antoine Villemin, con el objetivo de evaluar el carácter infeccioso de la tuberculosis, focalizó sus investigaciones en las vías de transmisión de la misma. Observó que conejos inoculados con material tuberculoso proveniente de personas y vacas enfermas desarrollaban la enfermedad y que luego en un examen *post-mortem* revelaban granulomas tuberculosos localizados en peritoneo, pulmones y otros tejidos. En base a sus experimentos publica un libro llamado "*Études sur la tuberculose: preuves rationnelles et expérimentales de sa spécificité et de son inoculabilité*" el cual cuenta con datos científicos que demuestran la transmisión tanto del hombre a los animales como entre animales de la misma especie y de distinta especie (Aranaz, 1996).

Los años transcurrían y los conocimientos sobre esta enfermedad seguían creciendo. Un agente infeccioso capaz de enfermar tanto al hombre como a los animales, responsable de muchas muertes en el mundo. Theobland Smith, en 1898, identifica pequeñas pero constantes diferencias en cuanto a las características de los agentes causantes de tuberculosis humana y tuberculosis bovina. Particularmente, las cepas bovinas eran más cortas, crecían *in vitro* más lentamente y en menor cantidad y eran más virulentas para un grupo de animales de experimentación (conejos), en comparación con la cepa humana. Con el afán de seguir incrementando los conocimientos sobre esta enfermedad, el Ministerio de Agricultura Británico crea una comisión de trabajo experimental, a través de la cual se demostró la existencia de tres tipos diferentes de bacilos (humano, bovino y aviar), reuniendo evidencias científicas contundentes de la amenaza que suponía la tuberculosis del ganado bovino para la salud pública, adquirida por inhalación o por consumo de leche, estableciendo esta última como vía principal de transmisión del agente patógeno. Estos descubrimientos condujeron a la introducción de la pasteurización obligatoria de la leche, lo que determinó una disminución de la incidencia de la tuberculosis abdominal infantil (Aranaz, 1996). La conclusión final que alcanzó dicha comisión en el año 1911 fue que: "*las vacas tuberculosas suponen un riesgo para la Salud Pública, ya que el hombre debe ser incluido en la lista de animales susceptibles al bacilo de la tuberculosis bovina*" (Collins *et al.*, 1983 *in* Aranaz, 1996).

En cuanto al continente americano, Diego Armus (2007), mencionó que durante todo el siglo XIX la tisis había sido parte de la historia de países como Argentina. Sin embargo, no fue sino hasta el último tercio del siglo XIX que la tisis devino en tuberculosis, gracias a los avances de la bacteriología moderna y a la identificación del bacilo de Koch. Así, entre 1870 y 1950, la tuberculosis fue noticia recurrente en diarios y revistas de la región, con numerosas personas que enfermaron y otras que murieron.

Son variadas las obras que comenzaron a aparecer en la década de 1890 en especial para la Argentina y Brasil, basándose en las apreciaciones de investigadores que veían la relación existente entre esta patología y los procesos de urbanización, industrialización y modernización. En Argentina, Adrián Carbonetti publicó en el año

2011 "*La ciudad de la peste blanca, historia epidemiológica, política y cultural de la tuberculosis en la ciudad de Córdoba, Argentina, 1895-1947*", donde se analizó el impacto de la enfermedad sobre la mortalidad a lo largo del período de estudio. Se constató en el año 1918 una tasa de mortalidad cercana a 180 por cada 100.000 habitantes (Carbonetti, 2012).

Actualmente, la tuberculosis (TB) sigue siendo una de las enfermedades transmisibles más mortales a nivel internacional. Según el informe de la Organización Mundial de la Salud (OMS) para el año 2015 la incidencia de la TB en el mundo fue de 10,4 millones de nuevos casos. De éstos, más del 50% fueron hombres, 1,0 millón (10%) fueron niños y 1,2 millones (11%) eran personas VIH-positivas. El número estimado de muertos por esta enfermedad en el año 2015 fue de 1,4 millones, más 400.000 personas VIH-positivas con TB. A pesar de que el ritmo de reducción de la incidencia se mantuvo en 1,4% en el periodo 2014-2015 y el número de fallecidos por esta causa disminuyó en un 22% entre el año 2000 y 2015, la tuberculosis sigue siendo una de las diez principales causas mundiales de muerte en 2015. Por esta razón, Las Naciones Unidas se pusieron como meta a 15 años ponerle fin a la epidemia mundial de la tuberculosis. En base a los datos del año 2015, se propuso una reducción del 90% de las muertes por esta enfermedad y una reducción del 80% de su tasa de incidencia para el año 2030 (OMS, 2016).

### **1.1.2. Descubrimiento de Koch. Tuberculina.**

El descubrimiento del bacilo tuberculoso se debió al microbiólogo alemán Robert Koch, quien inició sus investigaciones con el agente causal de la tuberculosis en el año 1881. Para demostrar la presencia del microorganismo responsable de esta enfermedad utilizó la tinción de azul de metileno de Erlich en muestras de lesiones tuberculosas recientes. Posteriormente, preparó un medio de cultivo inoculando tejido tuberculoso de animales de experimentación, a partir del cual logró identificar pequeñas y tenues colonias luego de 2 semanas de incubación a 37°C. El cultivo puro de este aislamiento se lo inoculó a cobayas, las que murieron de tuberculosis con síntomas característicos. Para demostrar finalmente que dicho aislamiento producía la enfermedad, a partir de las lesiones tuberculosas desarrolladas en estos animales, fue capaz de aislar nuevamente el mismo bacilo patógeno (Aranaz, 1996).

Años después, en 1890, basándose en sus propias investigaciones, Koch anuncia el descubrimiento de una sustancia capaz de prevenir el crecimiento del bacilo tuberculoso, *in-vitro* y en animales, denominado un año después como "tuberculina". La misma consistía en un extracto glicerinado de un cultivo puro de bacilo tuberculoso. Sin embargo, esta sustancia fue rápidamente conocida como Tuberculina Antigua de Koch (OT, *Old Tuberculin*, siglas en inglés), debido a que ensayos posteriores demostraron que no era un remedio curativo, sino que más bien podía tener utilidad en el diagnóstico de la enfermedad (Monaghan *et al.*, 1994).

Fue el mismo Koch quien luego confirmó y describió su utilidad para el diagnóstico de la tuberculosis en el hombre. Observó que la aplicación de la tuberculina a individuos infectados era seguida de episodios de fiebre, escalofríos y vómitos que duraban varias horas, agregando que dichos síntomas no se presentaban en personas sanas (Monaghan *et al.*, 1994). Estudios realizados en Alemania adaptaron esta técnica de diagnóstico sobre bovinos, constatando que los animales con tuberculosis

manifestaban una reacción febril luego de la inoculación subcutánea de tuberculina, situación que no se repetía en vacas sanas. Frente a estos hallazgos, un comité de la Universidad de Pensilvania en el año 1891, concluyó que la tuberculina tenía a su vez valor en el diagnóstico de la tuberculosis del ganado bovino, sin evidencia de efecto curativo en los animales examinados (Miller, 1989 *in* Monaghan *et al.*, 1994).

### **1.1.3. Tuberculosis en Uruguay**

Los primeros registros de tuberculosis humana, también llamada “tisis”, se remontan al año 1871, 251 fallecidos con certificado médico de tuberculosis sobre un total de 4.380 muertes (Magallanes, 1998). Al finalizar el año 1943, motivados por la gravedad de la incidencia de tuberculosis en la población uruguaya, se inició en todo el país un movimiento colectivo denominado “Cruzada Antituberculosa Nacional”, propiciado por el Ministro de Salud Pública con el motivo de recaudar fondos para destinarlos a necesidades hospitalarias. Poco después, en 1946, el Poder Ejecutivo promulgó la ley 10.709 por la cual oficializó el movimiento generado en la Cruzada Antituberculosa Nacional y creó la “Comisión Honoraria para la Lucha Antituberculosa y Enfermedades Prevalentes” (CHLA-EP), encargada actualmente del Programa Nacional de Control de la Tuberculosis (PNC-TB). Con la visión de un Uruguay libre de tuberculosis, esta Comisión tiene como objetivo principal contribuir a reducir la prevalencia y mortalidad de la TB, asegurando al mismo tiempo que cada paciente enfermo tenga pleno acceso a un diagnóstico y tratamiento de calidad (CHELA-EP, 2011).

La puesta en marcha del PNC-TB en Uruguay tuvo sus frutos y se demostró por los resultados de un estudio retrospectivo sobre la incidencia de la enfermedad, llevado a cabo en el país en el período comprendido entre los años 1957-2005. En el mismo, se constató una marcada reducción de la incidencia de más del 50%, particularmente en la década del 80 (Rodríguez de Marco *et al.*, 2007). Más cercano en el tiempo, en el año 2013, según un informe epidemiológico de la CHLA-EP, se registraron un total de 785 nuevos casos de tuberculosis, equivalente a una tasa de incidencia de 23,1 casos nuevos cada 100.000 habitantes por año. Teniendo en cuenta que el objetivo de la Comisión para eliminar la TB como un problema sanitario en el país, es mantener, durante 3 años consecutivos, una incidencia  $\leq 5$  casos por cada 100.000 habitantes, los resultados del año 2013 en particular indicaron que aún queda mucho camino por recorrer (CHLA-EP, 2013).

En cuanto a la Tuberculosis Bovina (TBB), han transcurrido ya algo más de 128 años desde los primeros reportes de vacas enfermas en el país. La Asociación Rural en 1887 motivó un cambio de mentalidad nacional a través de sus reclamos para que se efectúen inspecciones a las vacas en tambos urbanos, con la finalidad de detectar y eliminar aquellos animales enfermos o sospechosos de serlo. Fue así que un año después, el Dr. Visaires, detectó y ordenó la eliminación de 17 vacas enfermas, de las cuales dos presentaban tuberculosis pulmonar. Hallazgo que fue oficialmente comunicado en 1893 por el profesor Carlosena de la Sociedad de Medicina de Montevideo (Magallanes, 1998).

La presentación de la TBB está fuertemente influenciada por la raza de los bovinos, lo que se manifestó en forma histórica en Uruguay. El ganado lechero ha sido la raza más afectada en el país, debido a las diferencias existentes en sus sistemas de producción

cuando se lo compara con el ganado de carne. En esta última raza, es común observar un régimen de producción extensivo, donde los animales se mantienen en bajas densidades. En cambio, la producción lechera determina que las vacas se mantengan en un régimen de semi-estabulación, con altas densidades y en contacto directo, principalmente en el momento del ordeño, determinando mayores probabilidades de transmisión del agente patógeno (Casas Olascoaga, 2013).

En los últimos años, Uruguay ha experimentado un notorio cambio a nivel productivo, particularmente en el sector lechero. Desde 1987, se manifiesta en el país una tendencia de constante aumento en la que la producción de leche, medida en cantidad anual remitida a planta (litros/día). Sin embargo, este aumento viene acompañado con un descenso, también constante, de la cantidad de productores remitentes de leche. Durante el período 2008-2015, el total remitido de leche (millones de litros/año) en Uruguay aumento un 30%, con un aumento de litros anuales producidos/vaca masa de 21%, acompañados de una caída en el número de remitentes de un 17% (MGAP-DIEA, 2016). Los cambios que ha tenido el país en cuanto a la instalación de grandes tambos con vacas cada vez más productivas, con un incremento en la carga animal y altas tasas de contacto, son posibles factores que estarían influyendo en la presentación y diseminación de la enfermedad. Tal es así, que del año 2011 al 2016, se han registrado 95 nuevos focos en el país, con un total de 40 focos abiertos a noviembre del 2016 (DSA-MGAP, comunicación personal). Determinando, hasta el año 2015, el envío a sacrificio de un total de 13.259 bovinos reaccionantes a las pruebas de tuberculina intradérmica (Fernández, 2015).

## **1.2. Etiología**

### **1.2.1. Características generales de las micobacterias**

El agente causal de esta enfermedad corresponde al género *Mycobacterium*, familia *Mycobacteriaceae*. Este género contiene una amplia gama de especies, dentro de las que se encuentran las responsables de dos de las enfermedades de mayor relevancia histórica para la Salud Pública, Tuberculosis y Lepra (Aranaz, 1996).

Es un bacilo gram-positivo, aerobio, ácido-alcohol resistente (AAR), intracelular, inmóvil y no formador de esporas. Gran parte de su peso seco lo constituye su pared multiestratificada compuesta por lípidos. Dentro de éstos se incluyen los ácidos micólicos, característicos de las micobacterias, que le confiere su condición de AAR. Aunque también deben esta denominación a su característica de resistir a la decoloración con alcohol ácido una vez que se logró la tinción (Joklik *et al.*, 1997). La gran cantidad de lípidos concentrados en la pared celular le brindan resistencia frente a determinados fármacos, desinfectantes y resistencia a factores adversos en el medio ambiente tales como la desecación (Acha & Szyfres, 2001; Lüchter, 2004). Son bacterias con gran resistencia al calor, aunque las radiaciones ultravioletas y la pasteurización (exposición a 72°C durante 15 segundos) son capaces de inactivarlas (Casal, 2016).

Las micobacterias se pueden clasificar de diversas maneras. Una clasificación que utiliza sus características de cultivo microbiológico, las diferencia en dos grandes grupos:

**Micobacterias difícilmente cultivables o no cultivables:** son aquellas causantes de lesiones dérmicas y nerviosas, como es el ejemplo de *M. leprae* y *M. lepraemurium*.

**Micobacterias cultivables:** estas micobacterias se dividen a su vez en dos subgrupos, según su velocidad de crecimiento:

- a. De crecimiento rápido: colonias visibles en menos de 7 días.
- b. De crecimiento lento: requieren al menos entre 2 y 6 semanas para crecer. En este grupo se encuentran las micobacterias de mayor importancia para la Salud Animal y la Salud Pública.

Una segunda clasificación de las micobacterias cultivables tiene un enfoque clínico:

- a. Micobacterias productoras de tuberculosis: (1) complejo *Mycobacterium tuberculosis* (MTBC), este grupo lo integran las micobacterias productoras de tuberculosis humana y animal; (2) complejo *Mycobacterium avium* (MAC), también capaz de generar infecciones en humanos y animales. Este último grupo, dentro del cual se encuentra por ejemplo el *M. avium* subespecie *paratuberculosis* (agente causal de la paratuberculosis o enfermedad de Johne en rumiantes), puede originar interferencia con las pruebas de diagnóstico para la tuberculosis bovina debido a la similitud antigénica existente entre especies.
- b. Micobacterias no productoras de tuberculosis: también denominadas atípicas, micobacterias no tuberculosas o micobacterias ambientales potencialmente patógenas ("*micobacteria other than tuberculosis*": MOTT) (Casal, 2016).

Las micobacterias del complejo MTBC tienen uno de los abanicos de hospedadores más amplios de todas las bacterias patógenas, produciendo enfermedad tanto en animales domésticos como en salvajes. En la tabla 1 se detallan las especies incluidas en el MTBC y su hospedador principal.

### Cuadro I.

Especies de micobacterias incluidas en el complejo MTBC y su principal hospedador. Adoptado de Casal (2016).

ESPECIE	HOSPEDADOR PRINCIPAL
<i>M. tuberculosis</i> (Koch, 1882)	Humanos
<i>M. microti</i> (Reed, 1957)	Roedores
Variante genética <i>Dassie bacillus</i> (Wagner <i>et al.</i> , 1958)	Damán roquero
<i>M. africanum</i> (Castets & Sarrat, 1969)	Humanos y primates
<i>M. bovis</i> (Karlson & Lessel, 1970)	Bovinos
Variante genética <i>Oryx bacillus</i> (Lomme <i>et al.</i> , 1976; van Ingen <i>et al.</i> , 2012)	Órice
<i>M. bovis</i> BCG (bacilo Calmette-Guérin) (Grange <i>et al.</i> , 1983)	Cepa vacunal
<i>M. canetti</i> (van Soolingen <i>et al.</i> , 1997)	Humanos
<i>M. caprae</i> (Aranaz <i>et al.</i> , 2003)	Caprinos
<i>M. pinnipedii</i> (Castro Ramos <i>et al.</i> , 1998; 2006**; Cousins <i>et al.</i> , 2003)	Pinnípedos
<i>M. mungi</i> (Alexander <i>et al.</i> , 2010)*	Mangosta
<i>M. suricattae</i> (Parsons <i>et al.</i> , 2013)*	Suricato

\* Especies propuestas para ser incluidas en el MTBC.

\*\* Aislamiento en pinnípedos de Uruguay.

Si bien cada especie del complejo tiene un hospedador principal en el que causa lesiones con mayor frecuencia, es factible que si las condiciones epidemiológicas son favorables, serán también capaces de infectar a otras especies de animales y al hombre (Aranaz, 2013 *in* CEBASEV, 2013).

#### 1.2.2. *Mycobacterium bovis*

El *Mycobacterium bovis* es el agente infeccioso específico de la tuberculosis en el ganado vacuno, perteneciente al complejo *Mycobacterium tuberculosis* (MTBC). Se considera la especie con mayor rango de hospedadores y la más ubicua. Si bien el principal reservorio es el bovino, estudios científicos también demostraron su presencia en humanos, en animales domésticos como ovejas, cabras, cerdos, caballos, camélidos, búfalos, conejos, perros, gatos y en animales silvestres como el ciervo, tejón, jabalí, zorro y liebre (Liébana *et al.*, 1996; Aranaz *et al.*, 2004; Rodríguez-Campos *et al.*, 2014; Casal, 2016).

El *M. bovis* es un microorganismo aerobio estricto, con una temperatura óptima de crecimiento de 35-37°C (Mesófilo) y un pH cercano a la neutralidad entre 6,7 y 6,9. Presenta un desarrollo muy lento a la hora de cultivarlo, verificando aproximadamente a los 30 días las colonias típicas, redondeadas, brillantes y de color crema. Los medios de cultivo más comúnmente utilizados son el *Löwenstein-Jensen* y *Stonebrink*, siendo este último el medio de elección para el crecimiento de *M. bovis* (SENASA, 2000; Lüchter, 2004).

*M. bovis* y *M. tuberculosis* son probablemente los dos miembros más importantes del grupo de especies que integran el complejo *Mycobacterium tuberculosis*, y que a su

vez, cuentan con similitudes genéticas entre sí. Cuando se realizó una comparación del ADN de estas dos especies, se observó que más del 97% de sus genes fueron idénticos. Bajo esta base científica, se puede asumir que los factores de virulencia de estas especies, su habilidad para infectar, sobrevivir y causar enfermedad en el huésped, tienden a ser idénticas (Collins, 2001).

En Uruguay, en el año 1986, se aislaron y tipificaron, entre otras micobacterias atípicas, el *M. bovis* a partir de muestras de agua de un arroyo y tajarar cercanos a una zona donde se había presentado un brote de tuberculosis (Errico *et al.*, 1988). Posteriormente, en un estudio realizado en el período 1990-1992 se recolectaron muestras de fuentes hídricas de veinte establecimientos de la cuenca lechera de Uruguay, incluyendo bebederos y desagües de salas de ordeño. Se aislaron 7 cepas de micobacterias, 2 de las cuales eran de *M. bovis*, hallazgos que confirmaron la capacidad del patógeno para sobrevivir en el medio ambiente (Castro Ramos *et al.*, 2000). Así mismo, se han aislado micobacterias del complejo *M. avium* (MAC) tanto de bovinos con lesiones granulomatosas, como de suinos con y sin lesiones (Errico *et al.*, 1989).

### **1.3. Tuberculosis bovina como zoonosis**

Ya fue mencionada la importancia de la tuberculosis en la actualidad como uno de los problemas de Salud Pública más importantes a nivel mundial. Causa enfermedad en millones de personas cada año y junto con el virus de la inmunodeficiencia en humanos (VIH) son de las principales causas de muertes humanas en el mundo. (OMS, 2016). No en vano es considerada una de las enfermedades infecciosas más antigua y devastadora, conocida como “*el capitán de todos los señores de la muerte*” (Aranaz, 1996).

La tuberculosis humana es causada principalmente por el *Mycobacterium tuberculosis*. Sin embargo, el riesgo que implica la tuberculosis bovina para la salud pública es reconocido hace ya muchos años. La incidencia de tuberculosis pulmonar causada por *M. bovis* es mayor en trabajadores de explotaciones ganaderas y mataderos, en comparación con los habitantes urbanos (OIE, 2009). Esto se debe a que la transmisión de este patógeno al hombre ocurre principalmente por vía aerógena, a través de aerosoles, o por consumo de alimentos de origen animal contaminados y sin un tratamiento térmico adecuado (Enfermedad Transmitida por Alimentos-ETA), donde el ejemplo más común es la leche sin pasteurizar (Cosivi *et al.*, 1998; Müller *et al.*, 2013). Reconociendo este riesgo para la salud pública, el *M. bovis* fue identificado por la Autoridad Europea en Seguridad Alimentaria (EFSA), como uno de los peligros microbiológicos potencialmente transmisibles al hombre a través del consumo de leche que no ha sido sometida a un tratamiento térmico adecuado (EFSA, 2015).

Los productos lácteos elaborados a partir de leche cruda (sin pasteurizar) son también una fuente de transmisión de este patógeno (FDA, 2012). En una investigación llevada a cabo en Estados Unidos se logró aislar el *M. bovis* de quesos frescos en los que se utilizó leche sin pasteurizar para su elaboración, lo que sugirió que la infección en humanos es posible a través del consumo de este tipo de alimentos (Harris *et al.*, 2007). En este contexto, se debe prestar especial atención a la producción de quesos artesanales, debido a que generalmente son elaborados por productores familiares con poca disponibilidad de tecnologías. En el año 2013, comenzó a funcionar el Proyecto

de Apoyo al Desarrollo de la Quesería Artesanal en Uruguay, gestionado por el Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca (MGAP), en conjunto con el Instituto Nacional de la Leche (INALE) y los Gobiernos Departamentales de Soriano, San José y Flores. En el marco de este proyecto, se llevaron a cabo capacitaciones a productores, con el objetivo de contribuir a la elaboración de un alimento inocuo y de calidad (<http://www.inale.org/>).

A pesar de que el *M. bovis* raramente se localiza en el músculo esquelético de la carcasa, salvo en etapas avanzadas de la enfermedad (EFSA, 2003), se considera a la carne cruda o insuficientemente cocida como otra fuente de transmisión del bacilo tuberculoso (FDA, 2012). La carne fresca cuenta con características intrínsecas favorables para el crecimiento bacteriano, como la alta actividad de agua (>0,99). Sin embargo, los tratamientos térmicos que comúnmente se aplican previos a su consumo son suficientes para destruir el bacilo tuberculoso. En productos cárnicos la relación tiempo/temperatura recomendados para la destrucción de este patógeno es 61°C por un minuto o 55°C durante al menos 10 minutos (Cressey *et al.*, 2006). En conclusión, si se aplican las medidas de control adecuadas como la vigilancia de tuberculosis a nivel de campo y en plantas de faena, en combinación con la correcta inspección *ante-mortem*, el nivel de riesgo que implica este patógeno para la salud pública asociado al consumo de carne, es considerado bajo (EFSA, 2003).

Actualmente a nivel mundial, en países donde la tuberculosis bovina está bien controlada o fue eliminada en algunas áreas, los casos de infección humana por *M. bovis* son pocos. Un análisis realizado en Europa reveló una proporción de 0,4% (rango 0%-21,1%) de infección por *M. bovis* o *M. caprae* sobre el total de casos de tuberculosis humana reportados (Müller *et al.*, 2013). En el año 2014, fueron 143 los casos confirmados de tuberculosis humana debido al *M. bovis*, involucrando a 9 países del continente (EFSA & ECDPC, 2015). Por el contrario, en países africanos donde la tuberculosis bovina es una enfermedad prevalente, con una pasteurización regular de la leche y en ausencia de una inspección de carnes en mataderos, esta enfermedad adquiere mayor relevancia para la Salud Pública. Situación que se ve exacerbada con la presencia de factores de riesgo, como puede ser la alta prevalencia de VIH, que facilita la transmisión y progresión de la enfermedad (Cosivi *et al.*, 1998).

De forma similar al continente europeo, en Latinoamérica la incidencia de tuberculosis en humanos debida al bacilo tuberculoso del bovino es muy baja. Entre los años 1970 y 2007, tan solo cuatro países informaron casos confirmados de tuberculosis en humanos debida a *M. bovis*: Ecuador, Brasil, Venezuela y Argentina, la mayoría registrados en este último país, con un promedio de infección entre 0,3% y 1% del total de casos de tuberculosis (de Kantor *et al.*, 2008a; 2008b). Se debe considerar que la incidencia real es difícil de estimar en forma correcta, debido a que cuando se hacen cultivos, los medios de cultivo mayormente disponibles en los laboratorios de América Latina y en los de muchos otros países, son los de Löwenstein Jensen (LJ) y Ogawa, con glicerol, en los que el *M. bovis* muy difícilmente se desarrolle. Por esta razón, la importancia relativa del *M. bovis* con respecto al *M. tuberculosis* como causa de enfermedad humana ha sido en general subvalorada (de Kantor *et al.*, 2012).

En Uruguay hasta el año 2011 no se habían reportado casos confirmados de tuberculosis en humanos por este patógeno de los bovinos. Los estudios bacteriológicos sistemáticos realizados a nivel nacional para el aislamiento e

identificación de *M. bovis* siempre fueron negativos, incidiendo en este aspecto las medidas de control a nivel veterinario, sumadas a la pasteurización de la leche y controles sanitarios de sus productos derivados. Sin embargo, no es posible descartar la existencia de casos no confirmados o erróneamente tipificados como TB humana. En el 2011 se detectaron en el país los primeros tres casos con *M. bovis* como agente etiológico causal, cuya confirmación se llevó a cabo en el Instituto Pasteur de Montevideo, a través de la tipificación fenotípica y secuenciación genómica. Luego del estudio epidemiológico efectuado sobre dichos casos, se constató que uno de ellos contaba con historia de contacto con animales en un zoológico, otro fue un paciente VIH positivo que había trabajado en íntimo contacto con bovinos, mientras que el tercero ingería habitualmente leche cruda (Rivas *et al.*, 2012).

Si bien el *M. bovis* es responsable de una baja proporción de tuberculosis humana, es necesario seguir desarrollando e implementando medidas para el control, eliminación y posible erradicación de esta infección en humanos. En este sentido, la Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE) incluye a la tuberculosis dentro del grupo de riesgo/peligro III, para la cual se deben de tomar las precauciones necesarias para la prevención de una infección en el ser humano (OIE, 2009). Una de las acciones preventivas, conocida y demostrada ya desde el año 1940, es el adecuado tratamiento térmico de la leche, como la pasteurización (Thoen *et al.*, 2006). Con el objetivo de salvaguardar la salud pública, las medidas de control deberían enfocarse en: (1) higiene de alimentos en mataderos-frigoríficos, plantas procesadoras de carne e industria láctea; (2) correcta cocción de la carne y pasteurización de la leche; (3) protección de los trabajadores en riesgo (teniendo en cuenta la transmisión por vía respiratoria); (4) reforzar las actividades de control de la tuberculosis bovina en los animales y en el hombre (de Kantor *et al.*, 2008b).

#### **1.4. Tuberculosis en el ganado bovino. Generalidades**

La tuberculosis bovina (TBB) es una enfermedad infecto-contagiosa que a lo largo de los años ha adquirido gran relevancia a nivel mundial, debido a la repercusión que tiene sobre la Salud Pública, sobre la salud, bienestar y productividad de los animales y debido a las grandes pérdidas económicas que tiene como consecuencia (Pollock & Neill, 2002). En países desarrollados, con programas de erradicación implementados, han logrado eliminar la enfermedad o reducirla en forma significativa. Por el contrario, en la mayoría de los países en vías de desarrollo sigue siendo en muchos casos una enfermedad endémica, afectando principalmente al ganado lechero (Casal, 2016).

Si bien el peligro para la Salud Pública es una realidad, el impacto que tiene la enfermedad a nivel productivo y económico es tal vez el efecto más visible y que convierte a la tuberculosis bovina en uno de los principales desafíos para la sanidad animal en el mundo. La disminución de la producción (leche, carne), la muerte de los animales y los decomisos totales o parciales de las carcasas debido a las lesiones que esta manifiesta, son algunas de las consecuencias negativas de esta enfermedad (Lüchter, 2004). Donde mejor se advierte el perjuicio económico es en la producción lechera. En Uruguay, una vez que se diagnostica TBB en un animal, el establecimiento pasa a ser un foco y toma el carácter de interdicto, prohibiendo la salida de cualquier animal. Esto sin duda afecta la economía del productor por la imposibilidad de venta de sus animales. A su vez, todos los bovinos confirmados como positivos serán enviados a faena obligatoria, donde, si bien el productor es indemnizado, se generan

pérdidas económicas indirectas, ya que se pierde la unidad productora de leche y la genética de dicho animal. Son situaciones que provocan restricciones de carácter comercial tanto para el mercado interno como para la exportación, lo que indudablemente repercute negativamente en el sector ganadero e industrial.

En bovinos la tuberculosis usualmente se presenta como una enfermedad de lenta evolución, crónica y debilitante, aunque es posible una manifestación aguda y rápidamente progresiva. El período de incubación de este patógeno en condiciones naturales suele ser extenso, meses o incluso hasta años, debido a la capacidad de la bacteria de permanecer en estado latente y reactivarse en situaciones de estrés o por edad avanzada. Por esta razón, es posible que un animal infectado transmita el patógeno en el rodeo durante un período de tiempo prolongado, sin manifestarse en forma clínica (OIE, 2009). Las infecciones tempranas al ser asintomáticas determinan que, durante la vigilancia epidemiológica en establecimientos expuestos, una gran de animales infectados son detectados en forma temprana sin una sintomatología evidente (CFSPH-IICAB, 2009). Por otra parte, existen dificultades para realizar un diagnóstico clínico preciso, debido a que presenta una sintomatología inespecífica y común a otras enfermedades. Se manifiesta con emaciación progresiva, fiebre fluctuante (aunque no es habitual), debilidad e inapetencia (Lüchter, 2004). Cuando la infección involucra al sistema respiratorio, se presenta una disnea, con una respiración más profunda, y tos intermitente que se acentúa en las primeras horas del día y durante climas fríos. Si se afecta el tracto digestivo se puede observar una diarrea intermitente a causa de úlceras tuberculosas en intestino, aunque es poco frecuente (Radostits *et al.*, 2002). En algunos casos existe agrandamiento de ganglios linfáticos, los que pueden romperse y drenar, u obstruir vasos sanguíneos, vías respiratorias o tracto digestivo, dependiendo de su localización (CFSPH-IICAB, 2009).

Otros órganos blancos del bacilo tuberculoso son el útero y la ubre. La metritis tuberculosa provoca infertilidad, abortos hacia el final de la gestación o el nacimiento de terneros vivos que mueren de tuberculosis generalizada al poco tiempo. Por su parte, la mastitis tuberculosa es de gran importancia epidemiológica debido al riesgo de transmisión del agente patógeno, tanto al hombre como al ternero lactante. El síntoma más característico de esta presentación es la hipertrofia e induración marcada, que se manifiesta primariamente en la parte superior de los cuartos traseros de la ubre. A pesar de esto, resulta difícil diferenciarla clínicamente de otros tipos de mastitis, aumentando así el riesgo de transmisión cuando no es diagnosticado a tiempo (Radostits *et al.*, 2002).

El riesgo para la Salud Pública, las implicancias productivas, reproductivas y económicas para el sector ganadero e industrial, la ausencia de síntomas patognomónicos, la aparición tardía de sintomatología, así como el amplio espectro de especies domésticas y silvestres susceptibles al *M. bovis*, hacen que el control de esta enfermedad sea un desafío epidemiológico de difícil abordaje en todo el mundo. No en vano la OIE define a la TBB dentro de su Código Sanitario para los Animales Terrestres como una de las afecciones de notificación obligatoria (OIE, 2016).

En los países desarrollados, como también sucede en Uruguay, se han implementado campañas oficiales de carácter obligatorio para el control y la erradicación de la tuberculosis en el ganado bovino. Dado que se ha puesto en tela de juicio la eficacia del tratamiento de animales con los fármacos utilizados en humanos (Radostits *et al.*,

2002) y, que por normas oficiales algunos países han prohibido el tratamiento de esta enfermedad (Lüchter, 2004), la estrategia de estos programas nacionales para combatir la TBB es la prevención. Utilizando como medidas eficaces una vigilancia a nivel de campo con la aplicación de las pruebas de tuberculina, el sacrificio de animales positivos a dichas pruebas y la vigilancia veterinaria en frigoríficos.

Cuando se detectan animales positivos y luego de que estos sean enviados a faena, corresponde aplicar procedimientos efectivos de limpieza y desinfección de instalaciones, equipos y utensilios, por métodos físicos como el calor o químicos, utilizando por ejemplo fenol al 5% como desinfectante (Radostits *et al.*, 2002). Una vez que se haya logrado el saneamiento del predio foco, se debe evitar la re-introducción del bacilo tuberculoso. En este sentido, se recomienda que los nuevos animales que se pretenda adquirir en el establecimiento, provengan de rodeos certificados como libres y cuenten con un resultado negativo al tests de tuberculina (Schiller *et al.*, 2011). En forma complementaria y para mayor seguridad, resulta efectivo llevar a cabo una cuarentena de los animales que ingresaran por primera vez al rodeo. De esta forma se mantienen apartados a fin de detectar alguna sintomatología y poder repetir el test de diagnóstico (USDA-APHIS, 2014).

A pesar de que estas estrategias basadas en el diagnóstico de campo y sacrificio de reaccionantes han sido mundialmente incluidas dentro de los programas de control de la TBB, existen países donde no resultó ser una política exitosa para erradicar la enfermedad. Países desarrollados como Inglaterra, Irlanda y Nueva Zelanda, cuentan con poblaciones de animales silvestres que actúan como reservorio y fuentes de infección del *M. bovis*, favoreciendo el mantenimiento de la enfermedad. En estas situaciones, desde un punto de vista económico y cultural, el desarrollo de una vacuna para la TBB puede ser una estrategia alternativa aceptada y que puede contribuir a una prevención exitosa de la tuberculosis (Collins, 2001).

En bovinos, para las campañas de vacunación y estudios de eficacia, se usa la cepa del bacilo Calmette-Guerin (BCG). Es una cepa atenuada del *M. bovis* utilizada en humanos desde 1921 y sigue siendo en la actualidad la única vacuna aprobada para la tuberculosis humana (Canto Alarcon *et al.*, 2013). La introducción de la vacunación en humanos motivó la realización de estudios experimentales dirigidos a evaluar el nivel de protección que generaba esta vacuna en bovinos. Los resultados indicaron la existencia de una amplia variabilidad, entre 0 y 75% de protección (Vordermeier *et al.*, 2002; Waters *et al.*, 2012). Esta alta variabilidad y el hecho de que la vacunación compromete la especificidad de las pruebas de tuberculina intradérmica utilizadas en el diagnóstico (Vordermeier *et al.*, 2001), han determinado posiciones opuestas entre países sobre los beneficios de su aplicación. En aquellos donde el test de tuberculina intradérmica es el único test oficial utilizado para estimar la prevalencia de TBB, está contraindicado el uso de la vacuna BCG en programas oficiales de control, debido a que la respuesta inmune puede interferir con el diagnóstico (Lüchter, 2004). Los animales vacunados pueden reaccionar al test de tuberculina, incluso pueden ser positivos a técnicas *in-vitro* como el IFN- $\gamma$ , a pesar de no estar infectados (Vordermeier *et al.*, 2001; EFSA, 2013). De todas formas, sí se ha demostrado que la BCG, a pesar de que no evita la infección, es capaz de disminuir el desarrollo y gravedad de las lesiones en el animal, asociado con una menor excreción y diseminación del bacilo tuberculoso (Vordermeier *et al.*, 2014).

## 1.5. Epidemiología de la tuberculosis bovina

Antes de pensar en recomendar o implementar medidas de control para una enfermedad, se necesita conocer las características de la misma. La epidemiología, con su mirada preventiva, es una herramienta para cumplir con estos objetivos. Conocer las características del agente infeccioso, del huésped y del ambiente que lo rodea, permite identificar factores de riesgo que se vinculan con la aparición y distribución de la enfermedad, permitiendo luego diseñar programas de control y erradicación.

Ya fue mencionado que el *M. bovis* es uno de los agentes patógenos con mayor espectro de huéspedes susceptibles. No sólo afecta a los animales domésticos, sobre los cuales el ser humano tiene posibilidades de manejo, sino que también a los animales silvestres que al ser un reservorio del bacilo tuberculoso juegan un papel importante en la epidemiología. Estas características hacen de la tuberculosis bovina una enfermedad con un patrón epidemiológico muy complejo, principalmente en lo que refiere a las vías de transmisión al bovino (Morris *et al.*, 1994).

El *M. bovis* a pesar de ser una bacteria intracelular, tiene la capacidad de sobrevivir en el medio ambiente si las condiciones son favorables (Fine *et al.*, 2011). Según demostraron diferentes investigadores citados por Morris *et al.* (1994), la supervivencia del *M. bovis* en el medio ambiente depende de múltiples factores, como la temperatura, exposición a la luz solar (deseccación, rayos ultravioletas), humedad, pH, oxígeno disuelto y microflora natural. Sobre estos, se considera que la disponibilidad de nutrientes es el factor de mayor relevancia, debido a que cuando ésta es escasa afecta en forma negativa a la resistencia del patógeno frente a los demás factores ambientales (Wray, 1975 *in* Morris *et al.*, 1994). En este sentido, el tiempo de supervivencia del bacilo tuberculoso varía según la estacionalidad y el sustrato en el cual se encuentren. Fine *et al.* (2011), evaluaron el efecto estacional sobre la persistencia del *M. bovis* en el medio ambiente, en sustratos como el suelo, la ración y el agua. Registraron un promedio de persistencia de un mes en períodos fríos, con temperaturas promedio de 0°C (otoño-invierno), mientras que en épocas cálidas (primavera-verano), con temperaturas de 21°C, la supervivencia disminuyó a 1 semana. En este estudio, el agua resultó ser el sustrato que permitía una mayor persistencia en el medio, con un registro máximo de 58 días en otoño-invierno y hasta 48 días en primavera-verano. Como conclusión final se determinó que el efecto estacional de la supervivencia del *M. bovis* se debió a las variaciones de la temperatura. Por otra parte, la materia fecal en pasturas permite una persistencia de al menos 5 meses en invierno y menos de 2 meses en verano. Mientras que si las condiciones son más favorables, como por ejemplo con una protección frente a rayos solares, estos registros podrían ser superiores (Williams & Hoy, 1930).

Estos hallazgos científicos permiten reconocer sustratos en donde el patógeno es capaz de sobrevivir y que por lo tanto se convierten en fuentes de infección para el bovino. A su vez, tiene especial importancia en países donde las especies salvajes, susceptibles al *M. bovis*, se mantienen en cercanías del ganado vacuno, con acceso a la misma fuente de agua y alimento. Países en los cuales es necesario poner en marcha acciones preventivas frente al riesgo potencial de transmisión indirecta a partir de animales silvestres infectados (Fine *et al.*, 2011).

### 1.5.1. Fuentes de infección y vías de transmisión del *M. bovis*

Considerando el amplio rango de huéspedes domésticos y salvajes que el *M. bovis* es capaz de colonizar, existen numerosos caminos por los cuales la tuberculosis puede transmitirse al bovino de forma directa o indirecta a través de pasturas, aguas o fomites, debido a la capacidad del microorganismo de sobrevivir en el medio ambiente. Sin embargo, el propio ganado bovino enfermo sigue siendo la principal fuente de infección para el mantenimiento de la tuberculosis en aquellos países o regiones en las que aún no ha sido erradicada. (Neill, *et al.*, 1994; Neill *et al.*, 2001).

Si bien las vías de infección están fuertemente influenciadas por factores como la edad de los animales, las características del medio ambiente, el clima y las prácticas de manejo en el establecimiento, la excreción por las vías aéreas e inhalación de *M. bovis* es el camino más utilizado por este microorganismo para ingresar a su hospedador (de Kantor *et al.*, 2008b; Neill *et al.*, 2001; Radostits *et al.*, 2002). Esta vía de transmisión se ve facilitada por el comportamiento natural del bovino, especialmente en rodeos lecheros con altas densidades de stock como ocurre durante el ordeño, en *feed lots*, remates de feria y maniobras de transporte.

En cuanto a la edad, en terneros jóvenes lactantes es esperable que la vía oral sea la de mayor presentación, debido a la ingestión de leche contaminada proveniente de madres infectadas (Canal, 2013). Sin embargo, la infección mamaria sobreviene de manera tardía en la evolución de la enfermedad, lo que determina que sea menos frecuente en países desarrollados con un programa de control y erradicación establecido, donde los animales infectados son detectados y eliminados del rodeo en forma temprana (Neill, *et al.*, 1994). En adultos, aunque con menos frecuencia, la infección por la vía digestiva puede presentarse cuando las condiciones ambientales son favorables para la supervivencia del *M. bovis*, presente en las pasturas o agua de bebederos que eventualmente fueran contaminadas por heces de animales enfermos (Radostits *et al.*, 2002). A pesar de esto, es probable que la contaminación de praderas no tenga un efecto sustancial en la epidemiología de la enfermedad, ya que la dosis oral infectiva es alta y la persistencia de esta bacteria en el medio no siempre es duradera (Morris *et al.*, 1994).

Otras vías de transmisión reconocidas, aunque menos frecuentes, son las siguientes: (1) infección cutánea, generada por contaminación de heridas primarias con micobacterias. Esta presentación suele limitarse al punto de entrada y al ganglio linfático regional. (2) Infección congénita, a través de vasos umbilicales (útero infectado). Se caracteriza por la formación de un complejo primario en hígado que puede diseminarse y causar la muerte del animal en pocas semanas. (3) Transmisión venérea, la cual tiene lugar en situaciones en que el macho o la hembra cuentan con un tracto genital infectado. (4) Infección intra-mamaria, por el uso de infusiones contaminadas (iatrogenia) o por malas prácticas higiénicas al momento del ordeño (Neill, *et al.*, 1994).

## **1.5.2. Factores de riesgo**

Para desarrollar sistemas de vigilancia dirigidos al control de cualquier enfermedad, que permitan optimizar la sensibilidad del sistema minimizando los costos, es adecuado pensar en la implementación de una vigilancia basada en riesgo (Wells *et al.*, 2015). Para esto es necesario determinar a priori cuáles son los factores de riesgo para un evento sanitario de interés, en este caso la TBB.

### **1.5.2.1. Relacionados con el animal**

La edad de los animales es un claro factor que influye en la presentación de la enfermedad. La mayor proporción de animales adultos que enferman en comparación con animales jóvenes se explica por dos aspectos, por un lado es lógico pensar que el tiempo de exposición al patógeno va en aumento con la edad. Por otra parte, la cronicidad de esta enfermedad y la capacidad del patógeno de permanecer latente en el hospedador por un largo período, determinan que animales infectados a temprana edad expresen clínicamente la enfermedad en la edad adulta (Humblet *et al.*, 2009).

Las características genéticas y su relación con el nivel de resistencia a la TBB aún no están del todo claras, a pesar de que existen evidencias de que el ganado Zebú, comparado con las razas europeas, tiende a ser más resistente a las consecuencias de la enfermedad (Morris *et al.*, 1994). La conocida susceptibilidad de las razas lecheras, no tiene una base genética, sino que responde más bien a las características productivas y de manejo. Son animales con un promedio de vida mayor comparado con razas carniceras. A su vez, el procedimiento de ordeño al cual son sometidos diariamente es un momento en el cual los animales son movilizados, manipulados, mantenidos a altas densidades y con un íntimo contacto entre ellos, aumentando así la probabilidad de transmisión del bacilo tuberculoso (Casas Olascoaga, 2013).

Reforzando estas afirmaciones, en un estudio de caracterización epidemiológica de la tuberculosis bovina en mataderos, llevado a cabo por la Dra. Canal en el año 2009, se constató que la categoría más afectada por TBB fueron vacas adultas, en un 40,49%. En cuanto al sistema productivo de donde provenían los bovinos con lesiones, se constató que el *feed lot* fue el sistema más comprometido (25%) seguido por el tambo con un 19,4% (Canal, 2013). Similares resultados se encontraron en nuestro país, donde los novillos y vacas fueron las 2 categorías más afectadas con lesiones visibles compatibles a TBB (Von Gehlen, 2015).

### **1.5.2.2. Relacionados con el ambiente y manejo**

El tipo de manejo que se le dé al ganado determinará el nivel de exposición a un ambiente contaminado, así como las posibilidades de contacto con otros animales domésticos o con la fauna silvestre. Si bien las especies domésticas son susceptibles a esta micobacteria, los reportes de transmisión al ganado bovino a partir de estos animales, son escasos. Esto no quiere decir que se deba subestimar esta fuente de infección, sino que por el contrario, son animales que deberían ser monitoreados debido a las cercanías que mantienen con el ganado bovino en muchos países del mundo (Humblet *et al.*, 2009). Particularmente los suinos son considerados una de las especies doméstica con mayor susceptibilidad al *M. bovis*, tal es así que en países de Latinoamérica esta micobacteria puede llegar a ser la causa de hasta el 90 % de las

lesiones tuberculosas en los cerdos (Acha & Szyfres, 2001). Los brotes en esta especie comúnmente tienen lugar en establecimientos que cuentan con rodeos de bovinos enfermos (Casas Olascoaga, 2013) y casualmente en nuestro país son animales que mantienen un estrecho contacto con explotaciones de bovinos. Por lo tanto, debería de ser un factor a considerar para el control de la enfermedad.

La vida silvestre también tiene un rol en la epidemiología de la enfermedad, tal vez uno de los más importantes, principalmente para aquellos países donde los programas de control y erradicación han logrado reducir considerablemente la incidencia de la TBB, pero esporádicamente manifiestan nuevos casos (Aranaz *et al.*, 2004). La razón radica en que algunas especies de animales salvajes que son reservorios del *M. bovis*, debido su distribución y localización, mantienen interacciones con los animales domésticos y, por lo tanto, deben ser consideradas como una fuente de infección (Corner, 2006). La transmisión desde animales salvajes puede suceder de forma directa o indirecta, siendo esta última la más factible debido a que en algunos países comparten las fuentes de agua y la pastura, las que pueden contaminarse con excreciones de animales silvestres infectados. Es entonces crucial aumentar la vigilancia sobre la fauna silvestre, promoviendo medidas de manejo que minimicen o eviten el contacto con el ganado bovino (Humblet *et al.*, 2009).

El aumento del tamaño de los rebaños de bovinos y la intensificación de la producción lechera, en ocasiones no comparten los mismos objetivos de un programa de control, convirtiéndolos en factores que favorecen la presentación de la tuberculosis bovina. El estrés productivo que experimentan los bovinos lecheros durante el momento del ordeño, aumenta las probabilidades de transmisión e infección por *M. bovis* (Humblet *et al.*, 2009). Este riesgo se magnifica cuando hablamos de sistemas de producción intensivos, donde las densidades de stock animal son mayores y el contacto se hace más estrecho. Ésta es la razón por la cual se encuentra una mayor incidencia de TBB en regiones donde se practican sistemas intensivos de producción lechera (Cosivi *et al.*, 1998).

Otro factor de relevancia que atenta contra la erradicación de la enfermedad, es el movimiento del ganado (USDA-APHIS-VS, 2011). Trasladar animales hacia y desde remates o, entre granjas, ha determinado un aumento en el riesgo de presentación de casos o brotes de TBB. Tal es así, que la adquisición de nuevos animales provenientes de regiones o países en donde la enfermedad es endémica, se ha consolidado como una herramienta para la predicción de la ocurrencia de la enfermedad (Reilly & Courtenay, 2007). Por este motivo, es esencial la implementación de medidas para reducir el nivel de riesgo a la hora de introducir nuevos animales a un rodeo libre, como puede ser el conocimiento del estatus sanitario del rodeo de origen, la exigencia de un diagnóstico negativo a la TBB previo al ingreso, así como también la cuarentena y re-testeo antes de exponerlos a los demás animales (USDA-APHIS-VS, 2011).

Nuestro país cuenta con un sistema de trazabilidad electrónica con una identificación individual de todo el ganado bovino. Gracias al respaldo informático manejado por el Sistema Nacional de Información Ganadera (SNIG) que nos permite detectar y realizar un seguimiento sobre cada uno de sus movimientos. En una enfermedad como la TBB, donde el movimiento del ganado puede favorecer la propagación del patógeno, Uruguay corre con ventaja frente a otros países al contar con esta herramienta de gran

valor y útil en la detección y control de enfermedades de importancia para la salud animal y humana.

### **1.5.2.3. Relacionados con la sensibilidad del diagnóstico de campo**

La capacidad de detectar correctamente animales enfermos a través del uso de técnicas de diagnóstico de rutina a nivel de campo, tal vez sea de los factores más importantes para el éxito de las campañas de control de la TBB. Un error en el diagnóstico, que impida reconocer algún animal infectado, determina que éste permanecerá diseminando el *M. bovis* en el rodeo, o a otros rodeos en caso de algún movimiento, comprometiendo indudablemente el éxito de los programas de control (Álvarez *et al.*, 2012; 2014; Casal, 2016).

El test de tuberculina intradérmica simple y cervical comparativa son las técnicas de diagnóstico mundialmente utilizadas. Sin embargo, su aplicación en algunos países ha permitido únicamente reducir la prevalencia de la enfermedad, en parte debido a su falta de sensibilidad y especificidad. Son variados los factores capaces de afectar el desempeño de estas pruebas que derivan en clasificaciones equivocadas de animales infectados y sanos (Álvarez *et al.*, 2014). Específicamente la falta de sensibilidad trae aparejada graves consecuencias para la salud de los rodeos, lo que ha motivado la búsqueda de nuevas pruebas con mejores rendimientos (Humblet *et al.*, 2009). Una de las estrategias que se han implementado para minimizar este riesgo es el uso de pruebas de diagnóstico alternativas utilizadas en forma combinada. Como ejemplo de esto fue la aplicación en paralelo de las pruebas de tuberculina tradicionales con ensayos *in-vitro* como el test de detección de interferón-gamma (IFN- $\gamma$ ), para aumentar así la capacidad de detección de animales infectados (Gormley *et al.*, 2013).

## **1.6. Patogenia**

Tal como sucede en humanos, la tuberculosis en el bovino es un proceso complejo, involucrando múltiples interacciones entre el huésped y el agente causal. El mecanismo de desarrollo de la tuberculosis en estos animales involucra muchos elementos, como las fuentes de infección, vías de transmisión, factores de virulencia y dosis infectiva del patógeno y las propiedades intrínsecas del hospedador como su respuesta inmune (Neill, *et al.*, 1994). También pueden influenciar otros factores no específicos como la edad, la raza y el sistema de producción. Se considera que los animales jóvenes desarrollan lesiones más severas que los adultos, el ganado zebú es más resistente que las razas europeas, mientras que el ganado lechero es más susceptible que el ganado de carne, debido a factores como el hacinamiento, mayor período de vida y estrés productivo (Aranaz, 1996).

### 1.6.1. Dosis infectiva y factores de virulencia

A pesar de la escasa información de este parámetro *in-vivo*, se acepta que la dosis infectiva mínima del *M. bovis* es altamente dependiente de la vía que utilice el bacilo para ingresar al animal (Palmer & Waters, 2006). Comparando las 2 vías de transmisión más comunes se ha comprobado, en forma experimental, que para infectar un bovino por vía aerógena se necesita una dosis mucho menor que para producir la infección por vía digestiva (Neill *et al.*, 2001; Canal, 2013). Estudios revisados por Francis (1947) demostraron que se requiere por vía oral una dosis de  $10^6$ - $10^7$  UFC para infectar al ganado bovino y ovino, mientras que por vía aerógena entre 1 y 5 bacilos tuberculosos serían suficientes para infectar. Los trabajos citados por Palmer & Waters (2006) reportaron dosis infectivas algo mayores, equivalente a  $4 \times 10^5$  bacilos para infectar por la vía respiratoria, mientras que para infectar por la vía oral sería necesaria una concentración 1000 veces mayor.

Las micobacterias no producen ni exotoxinas ni endotoxinas, sin embargo, pueden generar extensas lesiones tisulares. Contienen en su envoltura celular glicolípidos y carbohidratos capaces de desencadenar efectos inmunosupresores en los macrófagos. Estos factores de virulencia que actúan sobre los macrófagos, inducen cambios que favorecen la supervivencia intracelular del patógeno. Pueden inhibir la capacidad microbicida de los macrófagos a diferentes niveles, como por ejemplo evitando la fusión fagosoma-lisosoma o neutralizando la acidificación del fagosoma, entre otros (Aranaz, 1996). Son dos los glicolípidos predominantes de la pared del bacilo tuberculoso que le otorgan la habilidad de manipular el sistema inmune y le permiten la persistencia dentro de los macrófagos, los lipoarabinomananos (LAM) y sus precursores biosintéticos lipomananos (LM) (Canal, 2013). El LAM se considera el miembro más antigénico de la familia de lipopolisacáridos fosforilados de las paredes celulares de algunas micobacterias. Es un potente inmunosupresor, particularmente de la respuesta inmune mediada por células, responsables de inhibir la activación de macrófagos mediada por el IFN- $\gamma$ . A su vez, bloqueando la regulación de las moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (CMH) de clase II, son capaces de afectar la presentación de los antígenos por parte de los macrófagos (Sibley *et al.*, 1988 *in* Aranaz, 1996).

### 1.6.2. Respuesta inmune

El conocimiento de la inmunidad relacionada a esta enfermedad en el ganado bovino responde a una adaptación, debido a que en su mayoría los estudios en esta temática fueron realizados en células humanas y con *M. tuberculosis* o utilizando un ratón como modelo. Las armas con las que cuentan los hospedadores para hacer frente a estos microorganismos intracelulares son la respuesta inmune innata y la adquirida. La primera está mediada, sobre todo, por fagocitos y linfocitos citolíticos naturales (NK). Sin embargo, la inmunidad innata es, en general, incapaz de erradicar estas infecciones, por lo que se necesita la contribución de la inmunidad adaptativa. Son los macrófagos activados y los linfocitos T las células responsables de brindar la principal respuesta protectora e impedir el crecimiento y diseminación del *M. bovis* (Abbas *et al.*, 2012).

La TBB estimula el desarrollo de diferentes tipos de respuesta inmune y el espectro de esta respuesta depende en gran medida de la etapa del proceso en que esté la

enfermedad. Tanto la respuesta inmune celular, mediada por células, como la respuesta inmune humoral, mediada por anticuerpos, pueden ser inducidas por las micobacterias (Neill *et al.*, 2001). Trabajos de investigación efectuados en animales infectados en forma natural y experimental con *M. bovis*, indicaron que la respuesta celular está involucrada en las primeras etapas de la enfermedad, mientras que la respuesta mediada por anticuerpos se detecta en etapas tardías (Ritacco *et al.*, 1991; Cassidy *et al.*, 2001; Palmer & Waters, 2006; McNair *et al.*, 2007).

La inmunidad celular es el tipo de defensa mediada por linfocitos T, que sirve como mecanismo específico para aquellos patógenos que sobreviven y se multiplican dentro de las células fagocíticas y no fagocíticas, como es el caso del *M. bovis*. Estos linfocitos, tienen la capacidad de reconocer los antígenos proteínicos de los microorganismos que se muestran en las superficies de las células infectadas en forma de péptidos unidos a moléculas del CMH (Abbas *et al.*, 2012). Existen 2 tipos de linfocitos T: (1) linfocitos T CD4+, que reclutan fagocitos y los activan a través de citoquinas como el IFN- $\gamma$  para inducir la muerte de los patógenos; (2) linfocitos T CD8+ citotóxicos, quienes provocan la lisis de las células infectadas. Ambos tipos de linfocitos son de importancia para la protección frente a bacterias intracelulares (Liébana *et al.*, 2000). Por esta razón, aquellas personas o animales con una inmunidad celular deficiente, como sucede en pacientes con inmunodeficiencia adquirida (VIH), son sumamente susceptibles a las infecciones por bacterias intracelulares como las micobacterias (Abbas *et al.*, 2012).

La respuesta celular específica que se desencadena frente a los antígenos del *M. bovis* es principalmente una respuesta de linfocitos T CD4+, los que se diferencian en efectores Th1 (linfocitos T colaboradores o “helpers”) bajo la influencia de la IL-12 producida por macrófagos. Estos linfocitos liberan por un lado IL-1 con la capacidad de expandir la población de células T antígeno-específico. Por otra parte, producen IFN- $\gamma$  y otras citoquinas que atraen más macrófagos al foco inicial y activan sus mecanismos micobactericidas (Neill, *et al.*, 1994; Pollock *et al.*, 2005). Dichos macrófagos activados aumentan la concentración de enzimas lisosomales y metabolitos que potencian su capacidad de destrucción del patógeno, aunque este mecanismo también puede provocar la necrosis en el tejido que los rodea (Lüchter, 2004). Los órganos más afectados serán aquellos que opongan menor resistencia al ingreso del patógeno. En general, el bacilo de la tuberculosis crece mejor en los pulmones donde la tensión de oxígeno es alta, pero también son capaces de multiplicarse en otros órganos, como el hígado por ejemplo (Dannenberg, 2001).

El IFN- $\gamma$ , encargado de la activación de los macrófagos, es una citoquina pro-inflamatoria fundamental en la infección tuberculosa, producida principalmente por los linfocitos Th1 ya sensibilizados. Tal es su importancia que en la actualidad una de las pruebas para el diagnóstico de esta enfermedad en el ganado bovino se basa en su detección *in-vitro*, tras la estimulación previa de la sangre con antígenos específicos (Rothel *et al.*, 1992). Está presente de manera basal en el organismo y su producción puede aumentar también en infecciones distintas a la TBB, aunque en animales infectados o sensibilizados con antígenos del complejo MTBC provoca un incremento de su producción en forma específica (Gormley *et al.*, 2006).

Claramente los macrófagos son células del sistema inmune que cumplen un rol vital en las reacciones del hospedador cuando se enfrentan al bacilo tuberculoso. Sirven de

primera barrera en la defensa del hospedador, aunque su activación e interacción con el *M. bovis* llevan a una serie de eventos inmuno-patológicos que resultan en la generación de una inflamación granulomatosa característica, capaz de causar lesiones tisulares (Neill *et al.*, 2001). Este tipo de reacción inflamatoria, denominada hipersensibilidad del tipo retardada o de tipo IV (HTR), es el principal mecanismo inmune que tienen los animales para detener la multiplicación del bacilo e intentar localizar la infección. Pero por otra parte puede determinar un deterioro funcional causado por la necrosis tisular y la fibrosis, como comúnmente sucede en el tejido pulmonar (Dannenberg, 2001). La TBB es un buen ejemplo de una enfermedad infecciosa en la que la lesión tisular se debe, sobre todo, a la propia respuesta inmunitaria del huésped (Abbas *et al.*, 2012). La hipersensibilidad del tipo retardada puede considerarse como una forma especializada de inflamación dirigida frente a microorganismos que son resistentes a la eliminación por los procesos inflamatorios convencionales (Tizard, 2009). El *M. bovis* puede multiplicarse en forma logarítmica dentro de los macrófagos no activados, por lo tanto, para controlar dicha multiplicación los macrófagos que contienen al patógeno deben ser destruidos. Este daño tisular provocado por la HTR es el causante de la necrosis caseosa en el centro de los tubérculos en desarrollo, así como de la mayor parte del daño pulmonar que se encuentra en esta enfermedad. Sin embargo, sin la existencia de este mecanismo inmunológico, la necrosis tal vez sea mínima, pero el crecimiento del bacilo no será controlado y el hospedador podría morir rápidamente por la enfermedad (Dannenberg, 2001).

En cuanto a la respuesta inmune de base humoral, ésta no es de relevancia en las primeras fases tras la infección, debido a que se trata de una bacteria intracelular y el acceso de los anticuerpos difícilmente ocurra, imposibilitando su acción destructora. A medida que la infección avanza y la inmunidad celular disminuye, se produce un cambio en la predominancia de la población de linfocitos, pasando de linfocitos Th1 a Th2. Esto determina la inmunidad humoral adquiera mayor protagonismo (Casal, 2016), con un incremento de anticuerpos específicos anti-*M. bovis* producidos por células plasmáticas (Ritacco *et al.*, 1991; McNair *et al.*, 2007). A pesar de que no se han definido con exactitud la duración de ambos tipos de respuesta inmune, estudios experimentales citados por Casal (2016) estimaron que el título de anticuerpos en animales infectados es detectable entre 2 y 6 meses tras la infección y duran hasta 2 años. Mientras que en otra investigación se observó que la respuesta inmune mediada por células se manifestaba entre 15 y 29 días *post*-infección (Waters *et al.*, 2012). Comparando las técnicas de diagnóstico aplicadas para esta enfermedad, la respuesta celular podrá ser detectada aproximadamente entre las 3 y 6 semanas *post*-infección cuando se utiliza el test de tuberculina intradérmica y entre 2 y 5 semanas por el test de IFN- $\gamma$  (de la Rúa-Domenech *et al.*, 2006).

Si bien es generalmente aceptado que la inmunidad celular ocupa el rol principal en el desarrollo temprano de la inmunidad contra la tuberculosis bovina (Neill, *et al.*, 1994), la respuesta de anticuerpos es de gran importancia en ciertas circunstancias. Por ejemplo, en países donde la enfermedad está presente pero en ausencia de programas de control basados en prueba-sacrificio, es probable que la infección se encuentre en etapas más avanzadas. En esas situaciones resulta más adecuado el uso de diagnósticos serológicos en busca de anticuerpos para la detección de animales infectados (Pollock *et al.*, 2001).

La mayoría de los estudios de interés veterinario que tienen como objetivo comprender el funcionamiento de la respuesta inmune de los animales frente a infecciones por micobacterias, están focalizados en el valor diagnóstico que esta posee. Particularmente, la inmunidad mediada por células es el tipo de respuesta que se desencadena durante la aplicación de los test de diagnóstico de campo y pruebas *in-vitro* como el test de IFN- $\gamma$  (Neill *et al.*, 2001). Por lo tanto, incrementar los conocimientos relacionados a la inmunidad específica brinda más y mejores herramientas para el combate de la enfermedad.

### **1.6.3. Formación de las lesiones. Características y distribución**

La tuberculosis bovina es un ejemplo de infección en donde coexisten una inmunidad protectora y una hipersensibilidad patológica, en la que la respuesta del anfitrión contribuye significativamente al trastorno. La respuesta de los linfocitos T es adecuada para controlar la propagación bacteriana, aunque su activación lleva a la formación de granulomas, que si bien intentan aislar a las bacterias, se acompañan a menudo de una necrosis tisular (Abbas *et al.*, 2012).

Luego de la interacción del patógeno con el huésped se desarrolla una lesión primaria o foco de infección. Los macrófagos fagocitan al bacilo y al ser activados por los linfocitos Th1, a través de la acción específica del IFN- $\gamma$ , comienzan a destruirlos. Dentro del foco infeccioso los macrófagos adoptan una apariencia distintiva, denominadas células epitelioides, que al fusionarse entre sí dan lugar a la formación de células gigantes multinucleadas o células de Langhans. Estos tipos celulares que conforman el centro de los tubérculos jóvenes se rodea de una zona con linfocitos, células plasmáticas y monocitos. A medida que la lesión progresa, el tubérculo desarrolla una fibroplasia periférica y una necrosis caseosa central, resultante de la reacción de hipersensibilidad del tipo retardada. Macroscópicamente el tubérculo desarrollado se visualiza como un nódulo firme con el centro blanco amarillento, donde en ocasiones puede evidenciarse zonas de calcificación (Neill, *et al.*, 1994; Neill *et al.*, 2001). Esta primera etapa del proceso que presenta una reacción localizada en el punto de entrada, en conjunto con la lesión en los ganglios linfáticos regionales y la puesta en marcha de la respuesta inmune, se define como “Complejo Tuberculoso Primario” (Lüchter, 2004).

Las rutas de infección, en conjunto con la respuesta inmune del huésped y la virulencia del microorganismo, determinan el lugar y la forma en que se manifiesta esta enfermedad. Los complejos primarios más frecuentes en el bovino son el respiratorio y el digestivo (Canal, 2013). Tal como se mencionó, la mayoría de los casos de tuberculosis en bovinos se adquieren por inhalación del *M. bovis*, presente en el núcleo de gotas liberadas por tos o estornudos de animales infectados. En este caso, el complejo primario será usualmente encontrado en pulmón y sus ganglios linfáticos asociados, con mayor frecuencia en estos últimos, salvo en casos de neumonía crónica donde los ganglios pueden no verse afectados y sí el tejido pulmonar (Neill, *et al.*, 2001).

Las lesiones primarias pueden ser simples o múltiples, uni o bilateral y, particularmente en el pulmón, ocurren predominantemente en el tercio distal de los lóbulos caudales, comenzando por las uniones bronquio-alveolares para luego

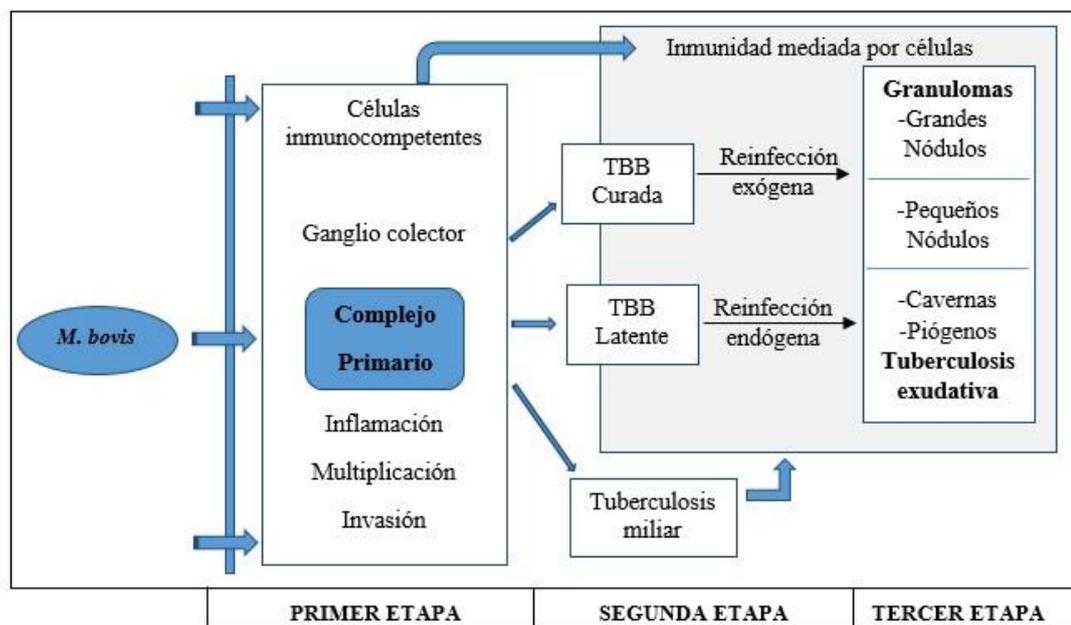
extenderse dentro de los alvéolos. Los ganglios más frecuentemente afectados son los bronquiales y mediastínicos, que drenan directamente a esa zona del pulmón primariamente afectado (Neill, *et al.*, 1994). En cuanto a los ganglios linfáticos mesentéricos, las lesiones suelen establecerse secundariamente a una infección a partir de la ingestión de esputos regurgitados contaminados o por la ingestión de leche contaminada, como sucede en terneros (Neill, *et al.*, 1994; Aranaz, 1996). El *M. bovis* al ingresar por la vía oral penetra a través de la mucosa intestinal, principalmente a nivel de formaciones linfoides o “placas de Peyer”, para luego alcanzar los tejidos y órganos regionales (Perdomo & Paullier, 1986). Si bien la lesión puede localizarse en cualquier parte del tracto digestivo, es común que solo se encuentre en los ganglios mesentéricos (Casal, 2016). Cabe destacar que el hallazgo de lesiones a nivel digestivo es poco frecuente en países donde la pasteurización de la leche y los programas de erradicación permiten la eliminación de los animales tuberculosos antes de la diseminación del microorganismo (Pollock & Neill, 2002).

Otra puerta de entrada, poco frecuente pero de importancia epidemiológica, es la vía congénita. En este caso la infección llega al feto a través de las venas umbilicales, a partir de una endometritis tuberculosa. El complejo primario suele instalarse en el hígado y en los ganglios linfáticos portales, en cuyo caso la diseminación de la enfermedad es rápida y la muerte del ternero sobreviene en semanas por una infección generalizada (Neill, *et al.*, 1994).

En el bovino, las lesiones del complejo primario pueden sanar completamente, persistir sin progresión o progresar (Neill *et al.*, 2001), tal como se describe en la figura 1.

**Figura 1.**

Representación esquemática del proceso tuberculoso. Adoptado de Lüchter (2004).

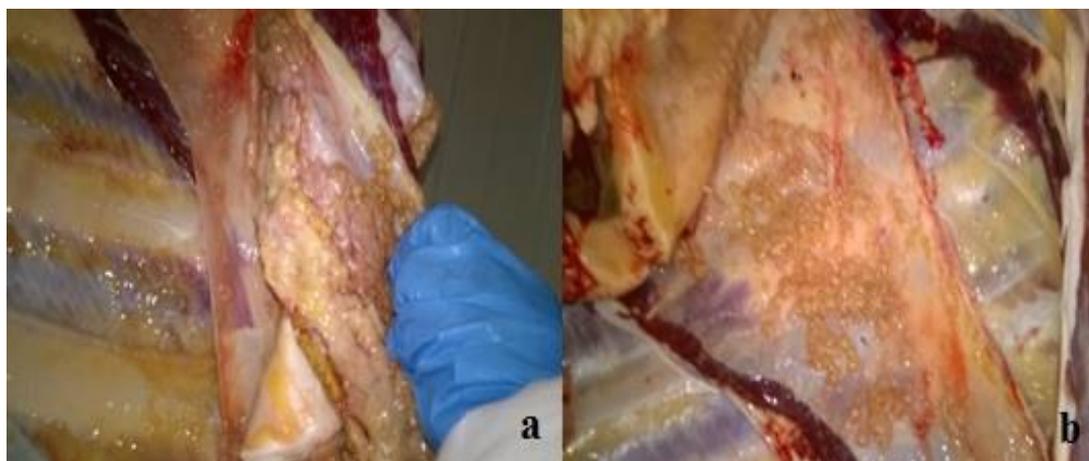


En una segunda etapa, luego de formado el complejo primario, la infección puede tener tres diferentes destinos: (1) Tuberculosis curada: destrucción de los bacilos con cicatrización de la lesión, dejando instalada la capacidad de respuesta inmune. (2) Tuberculosis latente: donde el patógeno queda “secuestrado” pero vivo, localizado en

el tejido donde se formó el complejo primario y sin causar mayores trastornos. En cualquiera de estos casos los animales pueden sobrevivir sin presentar manifestación clínica, siendo tuberculino positivos de por vida. (3) Otro destino es la progresión de la infección, donde el bacilo tuberculoso se disemina por vía hematógica o linfática, dando lugar a una generalización precoz, cuya presentación más frecuente es la tuberculosis miliar o perlada (Lüchter, 2004). La diseminación puede limitarse sólo a los pulmones o, si es intensa, se produce generalización sistémica con lesiones del tipo miliar en distintos órganos como el hígado, ubres, meninges y riñones (Neill *et al.*, 2001). La tuberculosis perlada es una presentación de la enfermedad típica en los bovinos, caracterizada por la formación de múltiples y pequeñas lesiones del tipo nodular, de un tamaño equivalente entre una lenteja y una ciruela, que se encuentran esparcidas en las membranas serosas. Con mayor frecuencia se localizan en pleura visceral o parietal (Imagen 1), con un aspecto nacarado y con tendencia a la calcificación (Neill, *et al.*, 1994; Domingo *et al.*, 2014).

### **Imagen 1.**

Lesiones características de tuberculosis perlada en pulmones de bovino.



*a: Tuberculosis perlada localizada en pleura visceral. b: Tuberculosis perlada localizada en pleura parietal. (Fuente: M. J. Vázquez, 2015).*

Cualquiera de estas 3 formas de presentación de la TBB puede evolucionar a una presentación secundaria generada por una reactivación de un proceso primario aparentemente curado o inactivo (latente), que presupone la rotura del equilibrio hospedador-*M. bovis*. Las micobacterias si bien son incapaces de multiplicarse dentro del tejido caseoso, debido al pH bajo y disponibilidad de oxígeno (Tizard, 2009), pueden sobrevivir durante muchos años dentro de las células inmune sin ninguna consecuencia patológica para el hospedador. A partir de esta forma latente tienen la capacidad de reactivarse en cualquier momento, especialmente si la respuesta inmunitaria resulta incapaz de controlar la infección, tal como sucede en situaciones de inmunosupresión (reinfección endógena) (Abbas *et al.*, 2012). Ya sea que se produzca una generalización precoz de la enfermedad o una tuberculosis secundaria, con diseminación de la bacteria vía linfática o hemática, es frecuente observar lesiones granulomatosas en las membranas serosas o en órganos diferentes al sitio donde se conforma el Complejo Tuberculoso Primario (Domingo *et al.*, 2014).

Microscópicamente las que puede ser de dos tipos, productiva o exudativa. La lesión productiva se constituye por células epitelioides, macrófagos y en menor número

células gigantes de Langhans, quedando circunscripta por linfocitos y plasmocitos. En cuanto a la lesión exudativa, se observa en casos muy agudos con amplia difusión del *M. bovis*, con predominancia de un exudado fibrinoso acompañado de abundantes neutrófilos, además de los otros tipos celulares (Canal, 2013). De todas formas, el desarrollo de las lesiones tuberculosas no es un proceso estático, sino que dinámico. Para un mayor entendimiento, Wangoo *et al.* (2005) describieron cuatro estados evolutivos en el proceso patológico de la TBB. En un orden cronológico, inicialmente se observan células epitelioides, macrófagos y neutrófilos que se van agregando en el foco primario. A medida que avanza la lesión, se evidencia una necrosis caseosa con mineralización central. Finalmente, se puede observar la presencia de grandes, irregulares y multicéntricos granulomas, conformados por una prominente necrosis caseosa central rodeada de una densa cápsula fibrosa, células epitelioides, células gigantes de Langhans y una mineralización manifiesta en la mayor parte de la lesión.

En cuanto a las características macroscópicas, los tubérculos también varían con el paso del tiempo. Inicialmente el granuloma presenta un color gris amarillento y de consistencia firme. A medida que pasan los días se transforma en un granuloma amarillo con necrosis caseosa central, que da un aspecto de “ricota”. Posteriormente pueden suceder tres cambios: (1) reblandecimiento del contenido caseoso; (2) enquistamiento o encapsulamiento por hiperplasia del tejido contenido formando una cápsula blanca y firme que rodea al tejido caseoso; (3) calcificación evidenciada por la presencia de pequeñas arenillas en el foco. Teniendo en cuenta las puertas de entrada de este agente y la patogenia de la enfermedad, se podrán reconocer diferentes formas de presentación durante la inspección de las carcasas en faena, lo que brinda una herramienta de gran valor para el diagnóstico *post-mortem* (Canal, 2013).

Al ser la vía respiratoria la principal puerta de entrada por este bacilo, se ha constatado que la mayoría de las lesiones se alojan en la cavidad torácica (Casal, 2016). En un estudio *post-mortem* llevado a cabo en EEUU sobre vacas provenientes de un rodeo lechero considerado foco de TBB, se constató que las lesiones se localizaban con mayor frecuencia en ganglios linfáticos de la región torácica (60%) y de la cabeza (26,7%), siendo los ganglios traqueobronquiales, mediastinales, y retrofaríngeos los más afectados (Whipple *et al.*, 1996). De forma similar, Liébana *et al.* (2008) en un estudio realizado en ganado bovino naturalmente infectado de Inglaterra y Gales, constataron que las lesiones tuberculosas se localizaban mayormente en ganglios linfáticos del tórax, seguido por los de la cabeza y el abdomen, particularmente los mediastinales, retrofaríngeos y traqueobronquiales. A nivel regional, en un estudio macroscópico de lesiones tuberculosas realizado en mataderos de la provincia de Santa Fe (Argentina), se evaluaron un total de 51 bovinos (vacas y novillos) con lesiones, localizadas con mayor frecuencia en ganglios mediastínicos (36,8%), retrofaríngeos (20%) y en tejido pulmonar (19,8%), principalmente en lóbulos diafragmáticos (Canal, 2013). En Uruguay, en el año 2013, de un total de casi 3000 bovinos positivos a la prueba de diagnóstico confirmatoria (test de tuberculina cervical comparativa) evaluados en faena, se registró que un 24,5% presentaron al menos una lesión compatible con TBB. En este estudio se constató que los ganglios linfáticos mediastínicos, retrofaríngeos y traqueobronquiales fueron los tejidos más afectados, seguido por pulmones y pleura (von Gehlen, 2015), similar a lo encontrado por los investigadores regionales e internacionales anteriormente mencionados.

## 2. ANTECEDENTES ESPECÍFICOS

### 2.1. Diagnóstico

En la antigüedad, previo al descubrimiento de la tuberculina antigua de Koch, el diagnóstico de la tuberculosis en el ganado bovino se enfocaba en el análisis clínico. Sin embargo, la auscultación, percusión, medición de temperatura corporal y la palpación de la glándula mamaria y ganglios linfáticos superficiales, resultaron ser herramientas ineficientes al ver que las eliminaciones de los animales sintomatológicamente enfermos no reducían significativamente la prevalencia de la enfermedad (Monahgan *et al.*, 1994).

La complejidad que caracteriza a la tuberculosis bovina hace que su diagnóstico también lo sea. Los bovinos infectados que presentan sintomatología son, en esta enfermedad crónica, verdaderamente la punta del iceberg. Debido al amplio período de incubación que puede llegar a tener la infección por *M. bovis*, la mayor proporción de animales infectados permanecerán asintomáticos diseminando el patógeno en el rodeo si es que no son detectados a tiempo (CFSPH-IICAB, 2009). Esto hace que la tuberculosis sea difícil de diagnosticar únicamente a través de una inspección visual, debiendo recurrir a otros métodos más efectivos.

Debido a la ausencia de vacunas efectivas, los programas de control y erradicación desarrollados a nivel mundial se focalizan en una detección temprana de la mayor cantidad posible de animales infectados. Para cumplir con este objetivo se aplican pruebas de diagnóstico indirectas que evalúan la respuesta inmune y una posterior faena de los animales positivos, sumado a una vigilancia epidemiológica en establecimientos frigoríficos (Kaneene *et al* 2006; Buddle *et al.*, 2013). A pesar de que mundialmente se aplican estas medidas de control, la TBB sigue biológicamente presente, aún en aquellos países considerados oficialmente libres de la enfermedad (Aagaard *et al.*, 2010). Una explicación para esta realidad es que el rendimiento de las técnicas de diagnóstico, sensibilidad y especificidad, nunca es el ideal. Es decir, que resulta infrecuente que una prueba tenga una máxima capacidad para diagnosticar correctamente como positivos aquellos animales enfermos y como negativos aquellos que estén sanos, más aun teniendo en cuenta que el aumento de cualquiera de estos parámetros determina el descenso del otro (de la Rua-Domonech *et al.*, 2006).

A su vez, la habilidad de una prueba diagnóstica para detectar la presencia o ausencia de una enfermedad no sólo depende de factores como la sensibilidad y especificidad, sino que también de la prevalencia de tuberculosis en la población testeada. Así, cuanto mayor es la prevalencia, será más factible que un test sea predictivo de la enfermedad. El valor predictivo positivo (VPP) y el valor predictivo negativo (VPN) son otros parámetros para evaluar la eficacia de la prueba, parámetros que se encuentran fuertemente influenciados por la propia sensibilidad y especificidad de la técnica, así como por la prevalencia de la enfermedad. Particularmente el VPP de un test, tomado como probabilidad de que un animal con resultado positivo se encuentre verdaderamente infectado, tiende a ser alto al comienzo de los programas de erradicación y bajo en etapas finales cuando la prevalencia de la enfermedad es baja (Monahgan *et al.*, 1994). Esto trae la interrogante de cual parámetro debemos priorizar a la hora del diagnóstico. Desde una mirada epidemiológica, cuando se presenta un foco de TBB, el objetivo es detectar la mayor proporción de animales infectados, lo

que se logra priorizando la sensibilidad de las pruebas. Por el contrario, si la enfermedad está ausente, conviene dar mayor importancia a la especificidad para reducir al máximo el sacrificio innecesario de animales que estén sanos (Casal, 2016).

### **2.1.1. Diagnóstico directo**

Dentro de este grupo se encuentran las pruebas de diagnóstico que se basan en la identificación del *Mycobacterium bovis* a partir de muestras obtenidas de los animales o la observación directa de lesiones características.

#### **2.1.1.1. Cultivo bacteriológico**

El aislamiento a través de medios de cultivos selectivos y la posterior identificación de la micobacteria se considera la prueba “*gold standard*”, reconocida por la OIE como el método de diagnóstico de referencia para la confirmación de la enfermedad (OIE, 2009). De modo tal que, si un animal es positivo a esta prueba, se asumirá como verdaderamente infectado. Apoyándose en los resultados obtenidos con esta prueba es posible determinar la sensibilidad de otras técnicas de diagnóstico, como pueden ser aquellas basadas en la respuesta inmune. Sin embargo, esta ventaja no se presenta a la hora de evaluar la especificidad, debido a que la propia sensibilidad del cultivo bacteriológico no es del 100% y no se podrá descartar la infección por *M. bovis* frente a un resultado negativo. En este caso particular, será necesario trabajar con animales en los que se conozca su estatus sanitario de libres de TBB (Casal, 2016). Por otra parte, la identificación de cepas de micobacterias aisladas a partir de diferentes fuentes, colaboran a determinar la causa de algunos falsos positivos a las pruebas de tuberculina, específicamente aquellos derivados de reacciones cruzadas por infección con otras micobacterias diferentes al *M. bovis*. Contribuye de esta manera a la identificación del origen de las infecciones tuberculosas, tanto en animales como en el hombre (Errico & Paullier, 1986).

Para llevar a cabo esta técnica se puede partir de muestras tomadas *in-vivo* o por medio de la extracción de tejidos luego del sacrificio del animal. En cuanto a este último método, para obtener una mayor confiabilidad en los resultados a la hora de cultivar y aislar el *M. bovis*, es fundamental mantener la muestra de tejidos obtenidos en plantas de faena bajo las mejores condiciones hasta su llegada al laboratorio. Según Corner (1994), el método de elección sugerido para detectar la mayor cantidad de micobacterias viables es a través de la refrigeración de la muestra, manteniéndola a una temperatura entre 4 y 6°C, seguido de un cultivo dentro de las 24-48 horas posteriores al muestreo. De no ser posible este procedimiento por motivos de logística o largas distancias para el transporte, se debería congelar y mantener a -20°C hasta su llegada al laboratorio.

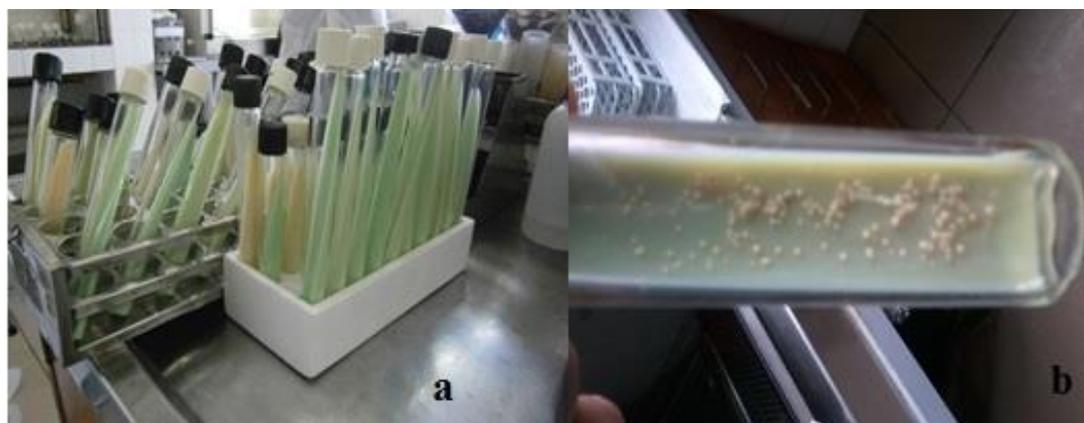
El laboratorio seleccionado para procesar la muestra y realizar el cultivo de cualquiera de las micobacterias pertenecientes al complejo MTBC debe cumplir con los requerimientos necesarios para un laboratorio con nivel 3 de bioseguridad, debido a que se trata de una enfermedad que afecta al ser humano (OMS, 2012). El medio de cultivo utilizado y las condiciones dadas para la incubación son de los factores que más influyen en el éxito de los resultados. El *M. bovis* es un microorganismo aerobio obligado que para el aislamiento primario a partir de una muestra de tejido se puede seleccionar un medio con una base de huevo, como es el caso del medio *Stonebrink* o

*Löwestein-Jensen* (Corner, 1994). Otra opción puede ser un medio con una base de agar enriquecido con suero o sangre, como lo es el *Middlebrook* (Gasqué Gómez, 2008). La diferencia entre estos tipos de medios de cultivo es el tiempo en que se pueden evidenciar colonias. En un estudio realizado con este objetivo se observó que el medio con agar permite un crecimiento bacteriano más rápido, en el entorno de los 30 días, comparado con los 42 días que se necesitan para el crecimiento en el medio *Stonebrink* (Corner, 1994).

Al ser un microorganismo mesófilo, para favorecer su crecimiento la incubación se realiza a 37°C en una atmósfera que contenga entre 5 y 10% de CO<sub>2</sub> (Gasqué Gómez, 2008). Luego del cultivo y aislamiento, se puede recurrir a diferentes técnicas para confirmar la presencia del *M. bovis*. En este aspecto, el uso en combinación de las características bioquímicas con los aspectos físicos de las colonias aisladas brinda buenos resultados para diferenciarlo de las otras micobacterias pertenecientes al complejo MTBC (Kubica *et al.*, 2006). Particularmente las características fenotípicas de las colonias de *M. bovis* tienen algunas diferencias dependiendo del medio utilizado. En los medios *Stonebrink* y *Löwestein-Jensen*, las colonias típicas se presentan pequeñas, redondeadas, de color amarillo pálido y con una superficie granular. Mientras que en aquellos medios con agar las colonias desarrolladas se aprecian finas, planas, de color blanco y aspecto áspero (Corner, 1994).

## Imagen 2.

Medios de cultivo utilizados para el cultivo de *M. bovis* y características fenotípicas de las colonias.



**a.** Preparación de medios *Stonebrink* y *Löwestein-Jensen* para el cultivo de *M. bovis*.  
**b.** Colonias típicas de *M. bovis* en el medio de cultivo *Stonebrink*.

Dentro de las pruebas bioquímicas utilizadas para diferenciar *M. bovis* de *M. tuberculosis* se encuentra la prueba de reducción de nitratos. Ésta se basa en la detección de la enzima nitrato-reductasa, la cual no está presente en el bacilo tuberculoso bovino. En términos generales, luego del agregado de una solución estéril de nitratos y una incubación por 2 horas a 37°C, la evidencia de un color rojo-violeta indica positividad a *M. tuberculosis* y un color más pálido (rosado claro) indica presencia de *M. bovis* (Aranaz, 1996). La prueba de niacina es otra técnica bioquímica de rigor para diferenciar *M. bovis* de *M. tuberculosis hominis*, realizada de rutina en Uruguay (Castro Ramos, comunicación personal).

### 2.1.1.2. Técnicas de biología molecular

A partir de la identificación de un integrante del complejo MTBC mediante el uso de los diferentes medios de cultivo, se puede realizar la confirmación de TBB al detectar fragmentos específicos del ADN, a través de la conocida reacción en cadena de la polimerasa (*polymerase chain reaction*: PCR). Mediante una previa lisis de celular y liberación de su ADN, permite amplificar secuencias específicas de ADN, generando millones de copias a partir de una sola molécula. Considerada una prueba de diagnóstico con alta sensibilidad, similar al cultivo bacteriológico (Aranaz, 1996).

Además del cultivo puro de *M. bovis*, existen otro tipo de muestras a partir de las cuales se puede realizar esta técnica, siempre que contengan células. Por ejemplo, tejidos o líquidos biológicos, ya sea colectados *in-vivo* o luego de una necropsia o faena de animales. La principal ventaja que ofrece este tipo de pruebas moleculares, es la celeridad con la que se obtienen resultados, sin la necesidad de esperar el período de crecimiento en los medios de cultivos tradicionales (Casal, 2016). Por este motivo, es de gran utilidad para la confirmación de infecciones por microorganismos de crecimiento lento como es el caso del *M. bovis* (Aranaz, 1996).

Es posible a su vez, diferenciar cepas dentro de una misma especie, al aplicar técnicas moleculares basadas en la presencia o ausencia de regiones concretas de su genoma, como es el denominado *direct variable repeat spacer oligonucleotide typing (DVR-spoligotyping)* (Casal, 2016). Este tipo de métodos moleculares han permitido detectar una gran variedad de espoligotipos de *M. bovis* en bovinos de países latinoamericanos como Argentina, Uruguay y Brasil. Estudios en los que se ha mencionado como una posible causa de esta diversidad al movimiento del ganado bovino en ausencia de un control adecuado (Zumárraga *et al.*, 2013).

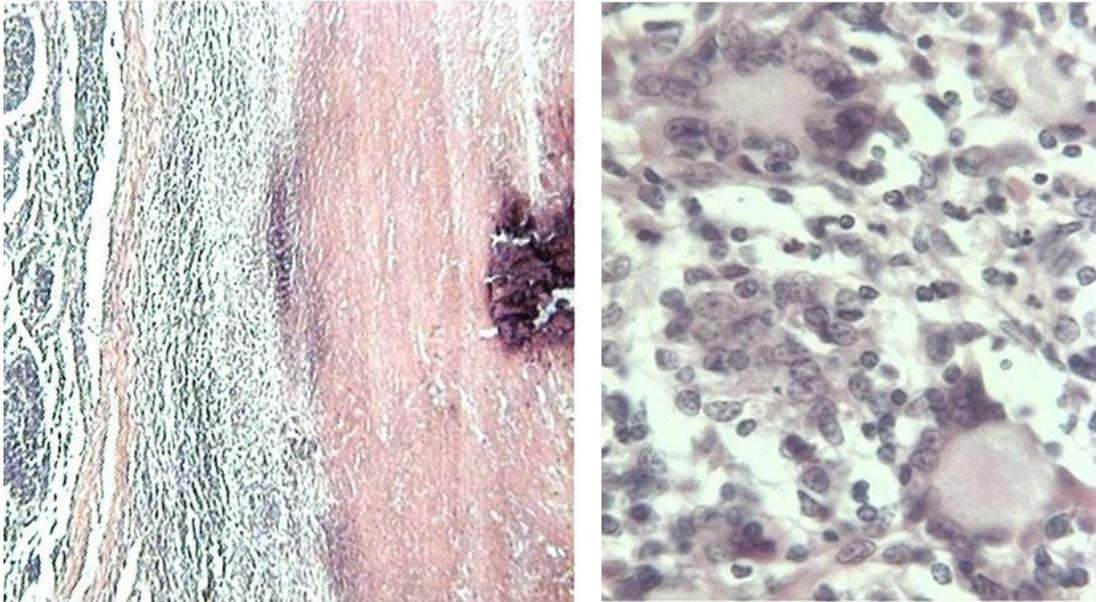
### 2.1.1.3. Diagnóstico histopatológico

Durante la inspección *post-mortem* se toman muestras de órganos con o sin lesiones, como pueden ser los ganglios linfáticos, con el fin de realizar un análisis anatomopatológico sobre las muestras. Para la identificación de lesiones granulomatosas compatibles con tuberculosis bovina y del propio bacilo ácido-alcohol resistente, se pueden llevar a cabo tinciones, mencionando la técnica de Hematoxilina-Eosina (H-E) y la de Ziehl Neelsen (ZN) como las más comúnmente utilizadas (Estrada *et al.*, 2004).

En el marco de la campaña de control y erradicación de la tuberculosis bovina en Uruguay se llevan a cabo estudios histopatológicos de rutina, a partir de muestras de lesiones granulomatosas compatibles con tuberculosis y de animales sacrificados con resultados positivos al diagnóstico confirmatorio oficial (TTCC). Inicialmente con las muestras remitidas al laboratorio de histopatología de la Dirección de Laboratorios Veterinarios (DILAVE-MGAP) se realiza un examen macroscópico, donde se describen diferentes características como el tamaño, forma, color y consistencia de las lesiones encontradas. En una siguiente etapa se incluyen en parafina para así poder efectuar cortes de 4 micras, los que serán coloreados con Hematoxilina y Eosina y posteriormente visualizados en microscopio (Imagen 3).

### Imagen 3.

Corte histológico de granuloma tuberculoso (Fuente: Paolicchi F., 2017).

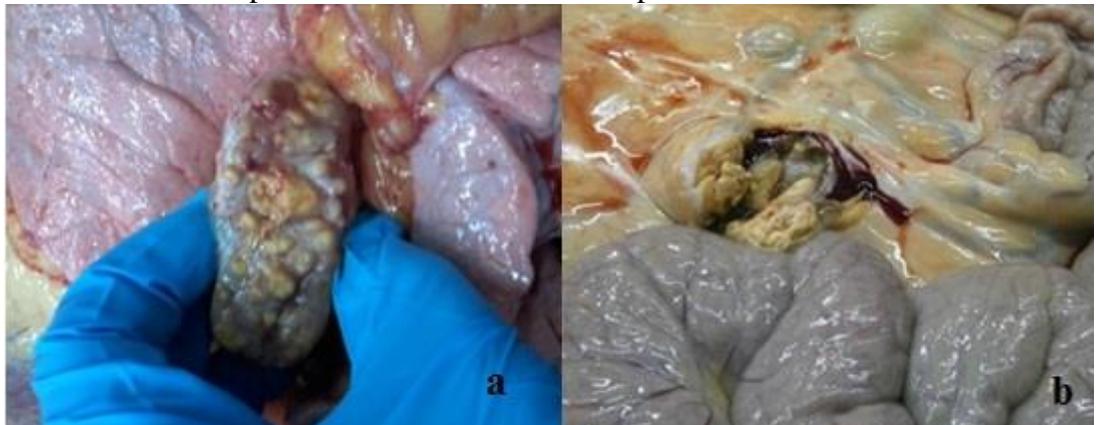


#### 2.1.1.4. Inspección *post-mortem*

Para una implementación exitosa de un sistema de vigilancia epidemiológica en faena, es esencial que los veterinarios oficiales y particulares actuantes cuenten con conocimiento sobre la patogenia de la enfermedad, particularmente en los que refiere a las características y distribución en la carcasa de las lesiones típicas de TBB. Teniendo en cuenta que la vía respiratoria es la puerta de entrada que más utilizada por el *M. bovis*, la mayor proporción de lesiones tuberculosas tendrán lugar en la región torácica y craneal, afectando principalmente a los ganglios traqueobronquiales, mediastinales, retrofaríngeos y submaxilares (Neill *et al.*, 1994; Whipple *et al.*, 1996; Liébana *et al.*, 2008; Canal, 2013; von Gehlen, 2015).

### Imagen 4.

Lesiones macroscópicas detectadas en faena compatibles con tuberculosis bovina.



*a. Ganglio linfático mediastínico con lesiones granulomatosas encapsuladas*

*b. Lesión granulomatosa en ganglio linfático mesentérico. Presencia de necrosis caseosa central.*

El hallazgo de lesiones compatibles con TBB en carcasas de bovinos a nivel de faena permite, junto con un sistema de trazabilidad correctamente implementado, identificar el rodeo de origen del que proviene el animal infectado, así como también localizar aquellos animales que hayan estado potencialmente expuestos (Olea-Popelka *et al.*, 2008). Esta herramienta brinda la posibilidad de definir focos de tuberculosis y aplicar restricciones en el movimiento del ganado, de manera de prevenir la diseminación del patógeno.

Se debe considerar que no siempre es posible determinar animales infectados a través de una inspección *post-mortem*. El complejo primario puede pasar inadvertido a la inspección si esta no es detallada y minuciosa (Canal, 2013). Las lesiones en pulmones pueden ser del tipo simple y extremadamente pequeñas (diámetro <1cm), siendo indetectables durante inspecciones de rutina (Neill *et al.*, 2001). Liébana *et al.* (2008), hallaron que dentro del grupo de bovinos reaccionantes a las pruebas de tuberculina poco más de la mitad (55,5%) presentaron lesiones visibles en la carcasa. Datos algo más alarmantes se encontraron años después en nuestro país, donde luego de evaluar 2.987 bovinos positivos al test de tuberculina cervical comparada, se constató que un alto porcentaje de las carcasas (75,5%) no presentaron lesiones visibles a la inspección *post-mortem* (von Gehlen, 2015).

En términos generales, la sensibilidad de la detección de lesiones macroscópicas en faena es muy baja, en el entorno del 28,5% (Schiller *et al.*, 2010b), lo que implica que existe un riesgo de clasificar erróneamente como negativo animales infectados. La vigilancia *post-mortem*, si bien forma parte de los pilares de la campaña de control y erradicación de la TBB en Uruguay, debe considerarse como un complemento a todo el sistema. Se trata de un método que por sí solo, cuenta con una baja capacidad para detectar en forma temprana animales enfermos (Kaneene *et al.*, 2006). El lapso de tiempo que transcurre desde que un bovino se infecta hasta que se logra detectar en faena es muy largo. Por lo tanto, no resulta efectivo como único método de diagnóstico para prevenir la propagación de la enfermedad a otros animales (Wells *et al.*, 2015).

### **2.1.2. Diagnóstico Indirecto**

En este grupo se encuentran las pruebas que evalúan la respuesta inmune de los animales, con base celular o humoral, para detectar en forma indirecta la infección por *M. bovis*.

#### **2.1.2.1. Test de Tuberculina Intradérmica**

Los primeros intentos de diagnóstico utilizando el derivado proteico purificado (PPD) en bovinos comenzaron en el año 1891, inoculada en forma subcutánea. A partir de este método los animales que se encontraban infectados reaccionaban con un estado febril, diferenciándolos de aquellos animales sanos. Sin embargo, este procedimiento resultaba trabajoso e insumía demasiado tiempo, debido a la necesidad de mediciones repetidas de temperatura en los animales. Por lo cual, se adoptó posteriormente la vía intradérmica como de elección para la inoculación de la tuberculina o PPD (Monaghan *et al.*, 1994).

La tuberculina antigua de Koch (OT) elaborada a partir del crecimiento del bacilo tuberculoso, era una compleja mezcla que variaba considerablemente de un medio de cultivo (caldo) a otro. Con el correr de los años se llevaron a cabo mejoras en el mismo, a fin de lograr un producto más estandarizado. Pasando de métodos de concentración por calor hasta precipitación de proteína con sulfato de amonio o ácido tricloroacético. Proteína con la cual se elabora la tuberculina (PPD), actualmente utilizada en el mundo (Monaghan *et al.*, 1994; de la Rúa-Domenech *et al.*, 2006). La tuberculina bovina (PPD bovino) se produce a partir de cepa AN5 o Vallee del *M. bovis*, mientras que el PPD aviar se obtiene en base a las cepas D4ER de *M. avium* subsp. *avium* (OIE, 2009).

La elaboración de las tuberculinas para ser empleada en las campañas de control y erradicación de la TBB deberá estar sujeta a una evaluación de su potencia biológica. Según especificaciones de la OIE (2009), esta evaluación se debe llevar a cabo a través de métodos biológicos, comparando con tuberculinas estándar. Es necesario que las tuberculinas aseguren al menos una potencia equivalente a 2.000 UI/ml ( $\pm 25\%$ ) por inoculación. En situaciones que se sospeche que la reactividad de los bovinos a la tuberculina ha disminuido, se recomienda una potencia de hasta 5.000 UI, sin superar el volumen máximo de inóculo de 0,2ml. Es necesario el empleo a nivel de campo de tuberculinas con una adecuada potencia biológica, para asegurar niveles adecuados de sensibilidad y especificidad de las pruebas. Una baja potencia puede generar una menor respuesta celular del hospedador y consecuentemente la aparición de resultados falsos negativos. Por el contrario, una potencia demasiado elevada tiende a aumentar la proporción de falsos positivos por reacciones cruzadas con otras micobacterias (Casal, 2016).

Uruguay desde el año 1932 es productor de su propia tuberculina, tanto mamífera como aviar. En 1979 se incorporó la cepa bovina, gracias al suministro de cepas por parte del Central Siegeneskundig Institut de Holanda y el Centro Panamericano de Zoonosis (OPS/OMS) (CPZ). La elaboración tiene lugar en el Laboratorio de Tuberculosis de DILAVE “Miguel C. Rubino” (MGAP), utilizando como cepas patrones la *M. bovis* AN5 Rotterdam y *M. avium avium* D4ER de Weybridge, siempre siguiendo los lineamientos establecidos por el CPZ y la OIE. Para mantener un nivel de efectividad adecuado, las tuberculinas producidas son sometidas obligatoriamente a diferentes controles de calidad, tales como la determinación de la potencia biológica, esterilidad, inocuidad, entre otros. En la actualidad existen laboratorios privados autorizados por DILAVE para la producción y comercialización de PPD.

Tal como se mencionó, la prueba de oro (“*gold standard*”) para el diagnóstico confirmatorio de la TBB, tal y como sucede en la mayoría de las enfermedades infecto-contagiosas, es el aislamiento e identificación directa del microorganismo (o su ADN) en medios de cultivo (o PCR) (Medeiros *et al.*, 2010). Sin embargo, las pruebas indirectas, por su facilidad de aplicación y resultados obtenidos en menor tiempo, son utilizadas de rutina para el diagnóstico de campo. Particularmente, el test de tuberculina intradérmica, se aplica como método de “*screening*” a nivel mundial y en el Uruguay. Reconocido por la OIE como único test de referencia para el comercio internacional de animales (OIE, 2009), debido a que se toma como evidencia indirecta de la infección (Thom *et al.*, 2004).

Este tipo de diagnóstico se basa principalmente en la detección de la respuesta inmune del tipo celular, liderada fundamentalmente por linfocitos Th1 (de la Rúa-Domenech

*et al.*, 2006), la cual es predominante en etapas iniciales e intermedias luego de la infección por *M. bovis* (Pollock *et al.*, 2005). Por esta razón, es que las pruebas de tuberculina son utilizadas actualmente en los programas de erradicación de esta enfermedad con el objetivo de identificar animales infectados en forma temprana (Casal *et al.*, 2015).

La base inmunológica de estas pruebas es la reacción cutánea de hipersensibilidad de tipo IV o retardada, que se desencadena en respuesta a la inoculación de PPD. Los animales que han sido previamente sensibilizados con el patógeno (expuestos), desarrollan una reacción inflamatoria localizada en el punto de inoculación, tomada como indicador de infección (Thom *et al.*, 2004). La misma se inicia entre las 12 y 24 horas posteriores a la inoculación, alcanzando su máxima intensidad a las 48-72 horas, para posteriormente disminuir (Francis *et al.*, 1978; Tizard, 2009). Aunque puede considerarse que hasta el cuarto día *post*-inoculación la técnica no perdería sensibilidad (Schneider *et al.*, 2007). El proceso inflamatorio que se desarrolla en este animal sensibilizado (previamente expuesto a *M. bovis*), se caracteriza por la aparición local de un edema, induración, enrojecimiento y aumento de temperatura, evidenciable a la inspección visual y palpación. Puede presentarse a su vez con dolor, exudado, necrosis y en ocasiones con infiltración de los ganglios linfáticos regionales (Schiller *et al.*, 2010a; Casal, 2016).

Existen tres formas de aplicación del test de tuberculina intradérmica mundialmente utilizadas: (a) Test de Tuberculina Ano-Caudal Simple (TTACS); (b) Test de Tuberculina Cervical Simple (TTCS); Test de Tuberculina Cervical Comparativa (TTCC).

### **2.1.2.1.1. Test de Tuberculina Simple**

La prueba simple intradérmica (SIT en inglés) consiste en la inoculación intradérmica del derivado proteico purificado en el centro del pliegue ano-caudal (ano-caudal simple) o en la tabla del cuello (cervical simple), seguida de su posterior evaluación a las 72 horas ( $\pm$  6 horas) *post*-inoculación de PPD. Para el caso particular del TTCS esta evaluación se realiza a través de la medición del espesor de piel por medio de un instrumento de medida como el cutímetro (Francis *et al.*, 1978). En ambos casos se debe prestar especial atención en inocular el volumen recomendado, debido a que dosis mayores o menores tienden a ser un factor contraproducente para la respuesta al test (Monaghan *et al.*, 1994).

El Test de Tuberculina Ano-Caudal Simple (TTACS), se describió por primera vez en el ganado bovino en el año 1908 por Moussu y Mantoux (Monaghan *et al.*, 1994). Consiste en la inoculación en forma intradérmica de 0,1ml (1 mg/ml) de PPD bovino a nivel del tercio posterior del pliegue ano-caudal, aproximadamente a unos 6cm de la base de la cola. Se debe procurar una adecuada higiene de la zona a inocular y que la misma se encuentre sin lesiones ni cicatrices que puedan falsear el posterior resultado (Errico, 1986).

Por su parte, el Test de Tuberculina Cervical Simple (TTCS), sigue los mismos principios que la prueba ano-caudal salvo que el punto de inoculación es en el tercio medio anterior del cuello. Previamente se deberá cortar el pelo en la zona (aproximadamente 5cm de diámetro), medir y registrar el espesor de la piel utilizando

un calibre adecuado. Si se constatan heridas o cicatrices luego de afeitada la zona, se aconseja seleccionar otra zona cercana que cuente con la piel sana para realizar la técnica (Casal, 2016). Esta prueba cervical simple puede ser utilizada cuando la intención es detectar una mayor proporción de animales positivos en un rodeo, debido a que presenta una mayor sensibilidad que el TTACS (Francis *et al.*, 1978; Schiller *et al.*, 2010b; Farnham *et al.*, 2012). Incluso ha sido utilizada como diagnóstico de rutina de campo en algunos países de Europa (de la Rúa-Domenech *et al.*, 2006), a pesar de poseer una menor especificidad y desventajas desde un punto de vista operativo y económico cuando se compara con el TTACS (Errico *et al.*, 1989).

La interpretación de los resultados a estas pruebas comúnmente está sujeta a la situación epidemiológica de cada rodeo en particular. Cuando en una explotación se constata TBB, se puede aplicar una interpretación más estricta, disminuyendo el punto de corte para así identificar una mayor proporción de animales positivos. Sin embargo, esta metodología no debería utilizarse como test de *screening* debido a que determina una caída de la especificidad de la prueba y la eliminación innecesaria de animales sanos (de la Rúa-Domenech *et al.*, 2006). Por el contrario, cuando nos enfrentamos a un rodeo libre de la enfermedad, corresponde efectuar la interpretación más específica definida en el país, de manera de minimizar la proporción de animales falsos positivos (Casal, 2016). En Uruguay la interpretación estándar de la TTACS es que cualquier reacción visible o palpable en el sitio de inoculación se considera como resultado positivo.

A raíz de la lectura, los animales reactivos comúnmente se los somete a la prueba comparativa (TTCC) como método de confirmación de la infección, a partir de la cual los animales que resulten positivos deberán faenarse bajo supervisión veterinaria oficial (Monaghan *et al.*, 1994). Este procedimiento es utilizado en Uruguay como estrategia del programa nacional de control de la TBB, basado en la identificación y posterior eliminación de animales infectados.

#### **2.1.2.1.2. Test de Tuberculina Cervical Comparativa (TTCC)**

Es una prueba que utiliza en forma simultánea PPD bovino y PPD aviar, ambas inoculadas en forma intradérmica en la tabla del cuello, a una dosis de 0,1ml. La tuberculina aviar es inoculada aproximadamente a 10cm debajo de la cresta del cuello, mientras que la tuberculina bovina a unos 12cm por debajo de esta última. Al igual que la prueba cervical simple, se deberá cortar el pelo, higienizar y medir el espesor de cada zona a inocular para comparar posteriormente con la medida efectuada luego de transcurridas 72 horas (Errico, 1986; Monaghan *et al.*, 1994).

Aquel animal infectado con *M. bovis* tendrá una respuesta inflamatoria mayor en el sitio de inoculación de PPD bovino en comparación con el aviar (Francis *et al.*, 1978). Para considerar un animal como positivo, el aumento del espesor de la piel en el sitio de inoculación de PPD bovino deberá ser > 4mm al espesor de piel en el punto donde se inculó la tuberculina aviar, no concluyente cuando la diferencia no supera los 4mm y negativo cuando el espesor de piel donde se inoculó PPD bovino es igual o menor al de PPD aviar. Este esquema de interpretación es el que aplican los países de la Unión Europea en cumplimiento con la Directiva Europea 64/432/CEE (Casal, 2016).

La prueba de tuberculina comparativa tiene la ventaja que permite discriminar entre las reacciones dadas efectivamente por el *M. bovis* de aquellas dadas por *M. avium* u otras micobacterias ambientales, minimizando de esta forma las reacciones cruzadas que no eran detectadas por las pruebas simples. Es por esta razón, que se considera al TTCC como el método de diagnóstico con mayor especificidad entre las pruebas de tuberculina y es utilizado para confirmar la enfermedad a nivel de campo (Monaghan *et al.*, 1994; de la Rua-Domenech *et al.*, 2006).

### **2.1.2.1.3. Sensibilidad y especificidad de las pruebas de tuberculina**

El éxito de las campañas de control y erradicación ha sido muy variable entre países, ya que depende de numerosos factores, como el tipo de explotación, el ambiente al cual se enfrentan los animales (incluyendo la presencia de fauna silvestre), el compromiso de los agentes involucrados (profesionales y productores), así como la sensibilidad y especificidad del método de diagnóstico utilizado (Farnham *et al* 2012). Definiendo la sensibilidad como la habilidad que presenta una prueba diagnóstica para detectar animales positivos en una población enferma y la especificidad de la misma como la habilidad para detectar animales negativos en una población sana (de la Rua-Domenech *et al.*, 2006), es correcto pensar que estas características pueden influir en gran medida en el éxito del control de la enfermedad.

Son variadas las investigaciones científicas realizadas con la finalidad de evaluar el rendimiento de las técnicas de diagnóstico que utilizan la tuberculina. En base a revisiones publicadas en los últimos años, para el caso particular del TTCS, se han descrito valores de sensibilidad que varían entre 65 y 100%, mientras que la especificidad se ha registrado entre 75 y 99%. Por su parte, el test simple aplicado en el pliegue ano-caudal puede presentar una sensibilidad entre 63,2 y 96,8% y una especificidad entre 96 y 98,8% (Monaghan *et al.*, 1994; de la Rua-Domenech *et al.*, 2006; Vordermeier *et al.*, 2008). Con el objetivo de englobar la información disponible en EEUU sobre el diagnóstico de la TBB, Farnham *et al.* (2012), llevaron a cabo un meta-análisis que incluyó las estimaciones de sensibilidad y especificidad del TTACS. Observaron que la sensibilidad de esta prueba varió entre 80,4 y 93% y la especificidad entre 89,2 y 95,2%. En este mismo estudio se evaluaron a su vez los resultados de una interpretación en serie del TTACS seguido de la prueba comparativa (TTCC), observando que se podía minimizar la proporción de animales falsos positivos al aumentar la especificidad del diagnóstico global, alcanzando valores promedio de 98%. En cuanto al TTCC interpretado en forma individual, los rendimientos encontrados por diferentes investigadores rondan entre 55,1-100% de sensibilidad y 88,8–100% de especificidad (de la Rua-Domenech *et al.*, 2006; Vordermeier *et al.*, 2008).

### **2.1.2.2. Test de interferón-gamma (IFN- $\gamma$ )**

Un sistema de vigilancia para ser efectivo necesariamente debe tener la capacidad de identificar la enfermedad en forma temprana y remover animales infectados, a fin de reducir su diseminación y minimizar costos derivados del control y erradicación (Wells *et al.*, 2015). Si bien la prueba de tuberculina simple es mundialmente utilizada, se ha reportado una falta de sensibilidad y especificidad, con evidencia de reacciones cruzadas con otras micobacterias (Francis *et al.*, 1978; Wood *et al.*, 1991; Schiller *et*

*al.*, 2011). Esto indudablemente atenta contra el éxito de los programas de control y erradicación de la tuberculosis bovina (Wood & Jones, 2001). Los países, regiones o rodeos que declaran su estatus sanitario únicamente a través de las pruebas de tuberculina intradérmica se enfrentan entonces a un riesgo de diseminación o reintroducción de la enfermedad durante las prácticas de comercio de animales (Schiller *et al.*, 2011).

En países como EEUU la implementación de los programas de control basados en test de tuberculina y posterior sacrificio, determinaron que en el año 1941 se redujera la prevalencia de la TBB hasta <0,5%. Sin embargo, a pesar de los continuos esfuerzos dirigidos a erradicar esta enfermedad, cada vez se hacía más evidente la ineficiencia del test individual de rutina en rodeos para cumplir con el objetivo, en gran parte debido a su incapacidad para detectar la enfermedad en forma temprana (Wells *et al.*, 2015).

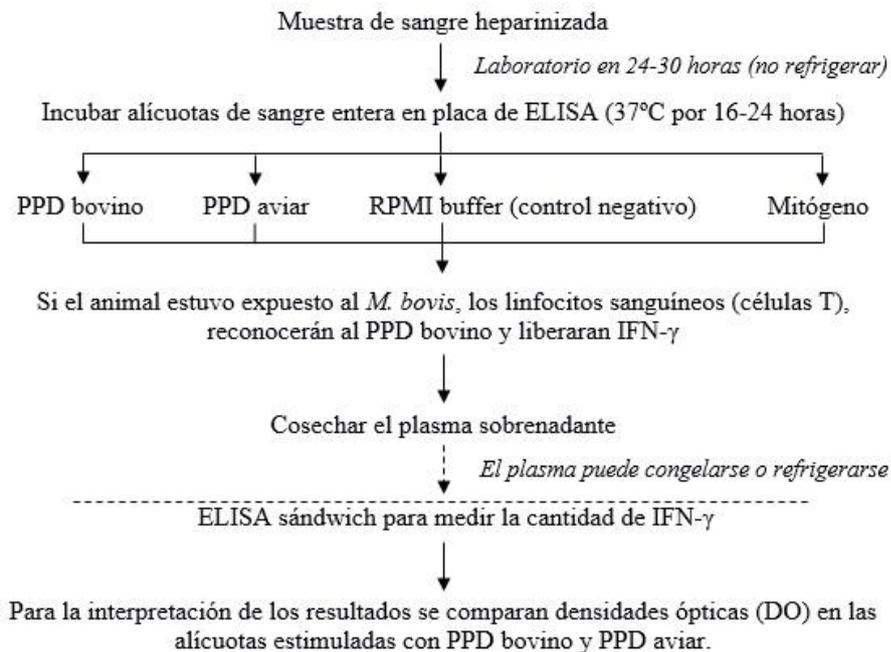
El test de interferón-gamma (IFN- $\gamma$ ) es hoy en día una prueba alternativa aprobada por la OIE para su uso en el diagnóstico *ante-mortem* de la TBB (Schiller *et al.*, 2010b). El test Bovigam® (Prionics) ha sido incorporado en los programas sanitarios de países como Australia (Wood & Rothel, 1994), EEUU (Wells *et al.*, 2015) y países de la Unión Europea (de la Rúa-Domenech *et al.*, 2006). Los objetivos de su aplicación son claros, maximizar la detección de animales infectados por *M. bovis* o priorizar la especificidad del diagnóstico, dependiendo de la prevalencia de la enfermedad y de la etapa en que se encuentre la campaña de control.

Inicialmente esta prueba *in-vitro* se desarrolló en Australia, a finales de los años 80, con el objetivo principal de ser utilizada en combinación con la prueba de tuberculina ano-caudal simple (Wood *et al.*, 1991; Wood & Rothel, 1994; Wood & Jones 2001). Se trata de una prueba que, al igual que las técnicas de intradermorreacción, evalúa la respuesta de inmunidad celular de los animales. Mide la concentración de IFN- $\gamma$ , producido principalmente por linfocitos T, en cultivos de sangre entera (*in-vitro*), luego de una estimulación con PPD bovino y PPD aviar (Wood & Rothel, 1994).

Esta prueba se constituye por dos etapas bien definidas (Figura 2): en una primera instancia se colecta una muestra de sangre de los animales con anticoagulante. Dicha muestra deberá ser remitida lo más rápido posible al laboratorio (24-30 horas), para ser estimulada con antígenos específicos (PPD bovino y aviar). Luego de una incubación a 37°C durante 16-24 horas, se centrifuga y se cosecha el plasma sobrenadante, el que podrá almacenarse refrigerado o congelado hasta la realización de la siguiente fase. La segunda etapa consiste básicamente en la detección y cuantificación del IFN- $\gamma$  producido por los linfocitos T, medido a través de un ELISA (*enzyme-linked ImmunoSorbent assay*) tipo sándwich y representado en valores de densidad óptica (DO) (Wood *et al.*, 1990).

**Figura 2.**

Representación esquemática del protocolo para la realización del test de IFN- $\gamma$  en el laboratorio (test Bovigam®). Adaptado de R. de la Rúa-Domenech *et al.* (2006).



Una de las limitantes que tienen las pruebas de tuberculina simples es que los antígenos utilizados para elaborar PPD bovino se encuentran también presentes en otras especies de micobacterias diferentes al *M. bovis*, afectando así la especificidad de la técnica (Francis *et al.*, 1978). Para minimizar este error, tanto en la prueba de tuberculina comparativa como en el test de IFN- $\gamma$ , se incluyen antígenos del *Mycobacterium avium*. Otra estrategia implementada para reducir las potenciales reacciones cruzadas, es el uso de antígenos purificados específicos, como es el caso de los antígenos inmuno-dominante ESAT-6 y CFP-10. Los genes que codifican para estas proteínas estarían presentes en el *M. bovis*, pero ausente en la cepa *M. bovis* BCG y en la mayoría de las micobacterias ambientales no tuberculosas. De esta forma se logra mejorar la especificidad de la técnica (Wood & Jones, 2001; Vordermeier *et al.*, 2002; Palmer & Waters, 2006; Gormley *et al.*, 2006; Schiller *et al.*, 2010b). Buddle *et al.* (2001) evaluaron el rendimiento del test de IFN- $\gamma$  cuando se utiliza el antígeno ESAT-6 sobre bovinos naturalmente infectados que habían reaccionado al TTACS, y bovinos provenientes de rodeos libres de TBB. Constataron que el test basado en ESAT-6 contaba con una mayor especificidad (100%) que el test basado únicamente en PPD, aunque con una menor sensibilidad (84%). A su vez, cuando utilizaron una interpretación de los resultados más severa, bajando el punto de corte, se logró un aumento en la sensibilidad hasta un 88%, sin afectar significativamente la especificidad (99%). Concluyeron entonces que el test de IFN- $\gamma$ , utilizando ESAT-6, puede aplicarse para re-testear animales reactivos a las pruebas de *screening* con grandes beneficios en la reducción de falsos positivos. Sin embargo, hay quienes consideran que para obtener resultados exitosos en mejorar la especificidad de esta prueba *in-vitro*, se requiere necesariamente del uso de cócteles compuestos por más de

un antígeno, como ESAT-6, MPB64, MPB83, MPB70 y CFP-10 (Vordermeier *et al.*, 2001).

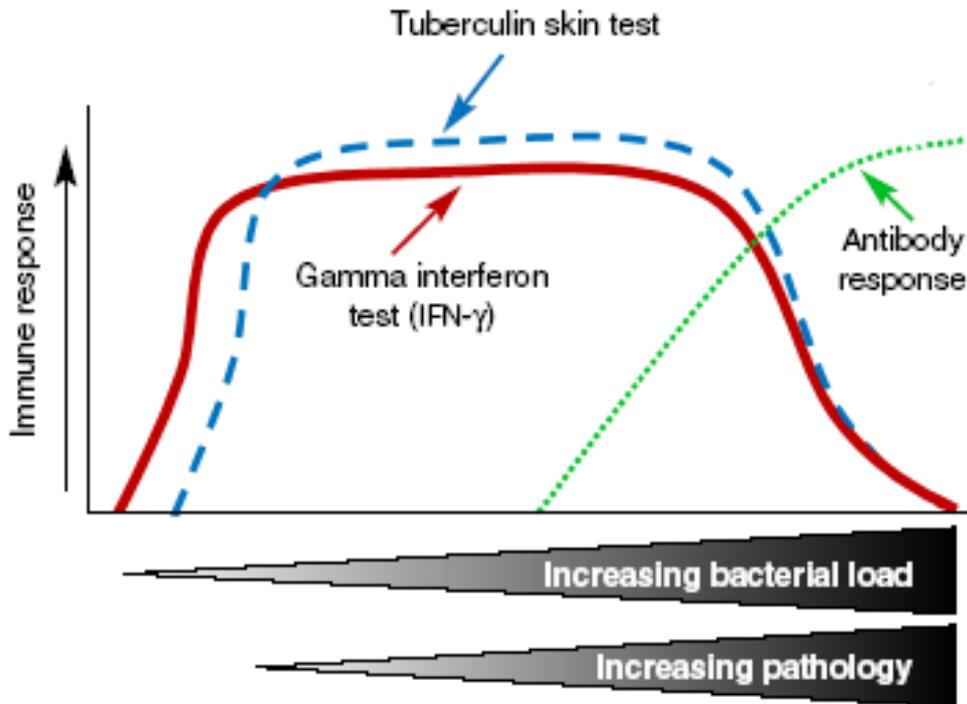
Las pruebas de campo a gran escala probando este test fueron efectuadas inicialmente en Australia entre los años 1989 y 1990. Wood *et al.* (1991), en un estudio con más de 6000 bovinos sanos provenientes de rodeos sin historia de TBB, registraron una especificidad para el test de IFN- $\gamma$  que varió entre 96,2% y 98,1%, según el punto de corte utilizado. La sensibilidad del diagnóstico fue otro de los objetivos de esta investigación, constatando un mayor rendimiento del test de IFN- $\gamma$  frente a la prueba de tuberculina simple ano-caudal, con valores máximos de 93,6% y 65,6%, respectivamente. Adicionalmente, se observó que se mejoraba la sensibilidad en forma significativa cuando se aplicaban ambas técnicas en paralelo, alcanzando valores máximos de 95,2%. A punto de partida de este estudio científico, se han llevado a cabo diversas investigaciones internacionales, las que han sido destacadas por de la Rua-Domenech *et al.* (2006). En cuanto a la sensibilidad, los registros variaron entre 73% y 100% con una media de 87,6%, mientras que la especificidad se encontró entre 85% y 99,6%, con un promedio de 96,6%, siempre dependiendo del punto de corte utilizado para la interpretación de los resultados.

En términos generales el test de IFN- $\gamma$ , en forma individual, se considera que cuenta con una mayor especificidad y una sensibilidad igual o mayor que la prueba de tuberculina simple (Wood *et al.*, 1992; González Llamazares *et al.*, 1999; de la Rua-Domenech *et al.*, 2006; Gormley *et al.*, 2006; Schiller *et al.*, 2010b). Sin embargo, según la opinión de científicos europeos, la prueba de tuberculina cervical comparativa se identificó como la más específica para el diagnóstico de TBB (EFSA, 2012).

Tal como se muestra en la figura 3, una ventaja con la que cuenta este test *in-vitro* de gran importancia para los programas de control y erradicación, es su capacidad para diagnosticar la enfermedad en forma más temprana que el test de tuberculina intradérmica. Entre 1 y 5 semanas *post*-infección para el test de IFN- $\gamma$  y entre 3 a 6 semanas para la prueba de tuberculina aplicada *in-vivo* (de la Rua-Domenech *et al.*, 2006). Esta característica podría estar explicando los resultados de algunas investigaciones en donde se encontró una proporción de animales infectados que no reaccionaron a las pruebas de tuberculina utilizadas de rutina, pero que sí se detectaron con el test de IFN- $\gamma$  (Neill, *et al.*, 1994; Lilenbaum *et al.*, 1999; Wood & Jones, 2001; Pollock *et al.*, 2005; Rangen *et al.*, 2009; Marassi *et al.*, 2013).

**Figura 3.**

Representación esquemática del espectro de respuesta del sistema inmune bovino frente a diferentes pruebas de diagnóstico para la tuberculosis bovina. Adaptado de Vordermeier *et al.* (2004) in de la Rua-Domenech *et al.* (2006).



El test de IFN- $\gamma$  es una técnica que al realizarse *in-vitro* presenta algunas ventajas. No es necesaria una segunda visita al establecimiento para llevar a cabo la lectura del test, ya que la misma se realiza en el propio laboratorio, lo que resulta beneficioso cuando se trata de animales difíciles de manejar (Wood & Jones, 2001). Los resultados se obtienen en menor tiempo (1-2 días), con interpretaciones estandarizadas y que, por lo tanto, son resultados más objetivos (de la Rua-Domenech *et al.*, 2006). A su vez, al no inocular el derivado proteico al animal, su estatus inmunitario no se verá afectado. Por lo cual, en casos de resultados inconclusos, esta técnica permite realizar repeticiones sin necesidad de un tiempo de espera, ya que el fenómeno de desensibilización presente en las pruebas de tuberculina intradérmica no se manifiesta con este test (Wood *et al.*, 1990; 1992; Wood & Jones, 2001; Schiller *et al.*, 2010b; Marassi *et al.*, 2013).

A pesar de estas ventajas, si se quiere obtener resultados confiables es vital que cada etapa de la técnica se realice de manera correcta. La forma en que se colecta la sangre, así como su posterior almacenamiento y transporte, tiene gran influencia sobre la calidad final de la muestra que llega al laboratorio para ser procesada. Por tal motivo, la primera fase se debe considerar como crítica. Un factor a tener en cuenta es el tiempo transcurrido entre la extracción de la muestra y la estimulación de la sangre con antígenos en el laboratorio. Whipple *et al.* (2001) observaron que luego de transcurridas 24 horas, la cantidad de IFN- $\gamma$  producido disminuye, aunque en este estudio la sensibilidad del test no se vio afectada. Por su parte, Ryan *et al.* (2000), indicaron que no se afecta la sensibilidad ni la especificidad del test cuando la muestra

es procesada hasta 28 horas posterior a su extracción. Sin embargo, un estudio posterior concluyó que la sensibilidad sí disminuye luego de transcurrido este mismo período (Gormley *et al.*, 2004).

Otro factor a tener en cuenta en el rendimiento de este test es el tiempo transcurrido entre su aplicación y la realización del último test de tuberculina intradérmica, donde también existen controversias entre investigadores (de la Rúa-Domenech *et al.*, 2006). Rothel *et al.* (1992) constataron un incremento en los valores de DO de IFN- $\gamma$  entre los días 7 y 59 posteriores al test de tuberculina intradérmica, determinando una marcada disminución de la especificidad del test. Contrariamente, Ryan *et al.* (2000), al evaluar el test de IFN- $\gamma$  en animales naturalmente infectados, obtuvieron altos niveles de sensibilidad y especificidad cuando el mismo se aplica entre 8 y 28 días posteriores al test de tuberculina. Por su parte, Whipple *et al.* (2001) en un estudio llevado a cabo en EEUU, observaron que los valores de DO del IFN- $\gamma$  fueron mayores durante los 3 y 28 días posteriores a la realización de la prueba ano-caudal simple, cuando se compara con aquellas muestras colectadas antes de realizar el test de tuberculina. Concluyeron que dicho estímulo, lejos de ser una desventaja, mejoró la capacidad de detección de animales infectados con *M. bovis*. Estos trabajos científicos fueron la base para el desarrollo del protocolo de diagnóstico en EEUU, donde se aprobó el uso del test *in-vitro* (Bovigam<sup>®</sup>) entre los días 3 y 30 posteriores al TTACS (Schiller *et al.*, 2010a). Años más tarde, Gormley *et al.* (2004), partiendo de animales naturalmente infectados, aplicaron repeticiones del test de IFN- $\gamma$  dentro de un periodo de 65 días posteriores a la prueba de tuberculina comparativa. La sensibilidad del test no se afectó durante las repeticiones, confirmando así su utilidad como test complementario a las pruebas de tuberculina. De forma similar, en estudios donde se utilizaron animales naturalmente infectados a los cuales se les aplicó la prueba simple ano-caudal y posteriormente el test de tuberculina comparativa, no se observaron efectos significativos sobre los valores de DO registrados en el test de IFN- $\gamma$ , con muestras de sangre extraídas antes o después del TTCC (Rangen *et al.*, 2009; Coad *et al.*, 2010).

Schiller *et al.* (2010a), quienes efectuaron un análisis sobre los diferentes trabajos científicos en esta temática, concluyeron que dependiendo de que prueba de tuberculina se utilice puede, o no, influir sobre la respuesta al PPD *in-vitro* del test de IFN- $\gamma$ . En este sentido, es aceptado que el TTCC no modifica la respuesta del test de IFN- $\gamma$ , mientras que el uso previo del TTACS tiene un claro efecto de booster sobre la liberación de IFN- $\gamma$  por parte de las células T, evidenciado a los pocos días de la inoculación de la tuberculina.

Como inconvenientes asociados al test de IFN- $\gamma$ , se puede mencionar que la logística para aplicar el mismo es un tanto compleja (Marassi *et al.*, 2013). Por otra parte, se ha observado que no es capaz de detectar por igual a todos los animales infectados que reaccionaron al test de tuberculina (Pollock *et al.*, 2005). Sumado a esto, es una técnica que cuando se la evalúa en forma individual, el costo que implica por animal es alto (Wood & Jones, 2001; Marassi *et al.*, 2013). Sin embargo, analizada desde un punto de vista global, las pruebas de tuberculina pueden implicar otro tipo de pérdidas. Por ejemplo, aquellas generadas por un mayor movimiento, manipulación y estrés de los animales cuando se realiza la maniobra de inoculación de PPD y la posterior lectura, los honorarios de profesionales veterinarios involucrados, así como también los

retrasos en el diagnóstico del rodeo que se presentan debido a eventuales re-testeos, lo que a su vez aumenta el riesgo de diseminación del patógeno en caso de estar presente.

Teniendo en cuenta que la producción de IFN- $\gamma$  no se ve influenciada por la aplicación sucesiva de los test de tuberculina (Thom *et al.*, 2004; Rangen *et al.*, 2009), es posible aplicar ambas técnicas en conjunto para el diagnóstico de la enfermedad. En situaciones donde la eliminación de un pequeño número de animales falsos positivos no sería un problema grave, como sucede en rodeos persistentemente infectados o que han presentado la enfermedad en forma explosiva con una alta prevalencia (de la Rua-Domenech *et al.*, 2006), resulta beneficioso el uso combinado y en paralelo del test de IFN- $\gamma$  con las pruebas de tuberculina, ya que esto permitiría aumentar la sensibilidad global del diagnóstico. De esta forma se detecta una mayor cantidad de animales infectados que pueden retirarse del establecimiento en menor tiempo, reduciendo a su vez la presentación de falsos negativos (Wood *et al.*, 1991; González Llamazares *et al.*, 1999; Gormley *et al.*, 2006; Álvarez *et al.*, 2014).

Se han descrito dos estrategias para el uso del test de IFN- $\gamma$  en combinación con las pruebas de tuberculina y que han sido aplicados en algunos países para el diagnóstico *ante-mortem* de la TBB en el marco de sus programas de control y erradicación: (a) con una interpretación en serie, se aplica el TTACS como *screening* y posteriormente los animales reactivos son sometidos al TTCC o IFN- $\gamma$  como test confirmatorio. Esta estrategia integra las políticas sanitarias de países como EEUU y Nueva Zelanda, con el objetivo de mejorar la especificidad global del diagnóstico. A su vez, Nueva Zelanda aplica una interpretación en paralelo con TTACS e IFN- $\gamma$  para detectar mayor proporción de animales infectados, aumentando la sensibilidad. (b) TTCS o TTCC en forma individual o combinada con IFN- $\gamma$  con una interpretación en paralelo, de manera de aumentar la sensibilidad global. Estrategia que aplican la mayoría de los países de la Unión Europea que cuentan con TBB endémica (Schiller *et al.*, 2010a).

Otra situación en la cual se recomienda el uso de esta prueba *in-vitro*, se presenta cuando el interés es importar animales desde regiones libres de TBB. En este caso se debe evaluar el valor predictivo negativo de la técnica utilizada para el diagnóstico. La probabilidad de que un animal con resultado negativo se encuentre verdaderamente sano es mayor con el uso del test de IFN- $\gamma$  que con el test de tuberculina simple (EFSA, 2012).

### **2.1.2.3. Factores que influyen en la presentación de falsos negativos**

Desde un punto de vista epidemiológico, la presencia de animales enfermos clasificados erróneamente como negativos durante el diagnóstico de campo (falsos negativos) son el grupo de riesgo que compromete el éxito de los programas de control, por la sencilla razón de que estos animales se mantienen en el establecimiento diseminando el patógeno en todo el rodeo. Por lo tanto, se deben tener en cuenta aquellos factores que afectan negativamente la sensibilidad de estas pruebas.

### 2.1.2.3.1. Relacionados con el animal

La edad es un factor de influencia en la presentación de reacciones inespecíficas durante el diagnóstico de campo. Los animales jóvenes, menores de 6 semanas, que aún no han desarrollado completamente sus sistemas inmunológicos tienen una alta probabilidad de no reaccionar a la tuberculina, a pesar de haber estado expuestos al bacilo tuberculoso (Casal, 2016). Para el caso de la prueba de IFN- $\gamma$ , este período puede extenderse hasta los 6 meses de vida (Gormley *et al.*, 2013). A su vez, la edad avanzada de los animales también tiene su efecto en la respuesta inmune de los individuos. Animales viejos infectados tienen mayor probabilidad de resultar negativos a las pruebas simples de tuberculina. Efecto que también se presenta al realizar el test de IFN- $\gamma$ , aunque con menor magnitud (Gormley *et al.*, 2013; Álvarez *et al.*, 2014). Por esta razón, se recomienda que aquellos rodeos que presenten la enfermedad en forma crónica retiren los bovinos mayores de 8 años, con el fin de reducir la probabilidad de mantener en el establecimiento animales infectados no detectables (Álvarez *et al.*, 2014).

Bovinos que han sido recientemente infectados por el *M. bovis* fallan en reaccionar a la tuberculina. Tal como se mencionó anteriormente, la respuesta de hipersensibilidad de los animales suele desarrollarse entre 3 y 6 semanas *post*-infección, dependiendo de cada individuo (de la Rúa-Domenech *et al.*, 2006). Mientras que en animales que presentan una infección latente con posibles lesiones tuberculosas encapsuladas y con la bacteria contenida en el hospedador, el estímulo antigénico puede ser insuficiente, determinando una respuesta negativa al diagnóstico (Olea-Popelka *et al.*, 2008).

Debido a que estas pruebas de diagnóstico evalúan la respuesta inmune celular del hospedador, toda situación en la vida del animal que afecte su sistema inmunológico puede comprometer el rendimiento de las pruebas (Snider, 1982). Bajo este concepto, resulta acertado pensar que si los animales son sometidos a situaciones estresantes en forma frecuente o prolongada, como sucede durante un manejo y transporte inadecuado, determinará una caída en el nivel de respuesta del sistema inmune durante el diagnóstico (Casal, 2016). A su vez, la administración tópica o sistémica de glucocorticoides lleva a un detrimento en la respuesta inmune, con una posible reducción de la respuesta intradérmica a la PPD (Doherty *et al.*, 1995a) y una disminución de los valores de DO registrados durante la prueba de IFN- $\gamma$  (Gormley *et al.*, 2006). Esto se traduce en una clasificación equivocada de animales infectados como negativos. Por otra parte, hembras que se encuentren próximas al parto y hasta 6 semanas luego del parto, se encuentran en un período de desensibilización a la tuberculina, debido a una inmunosupresión que se presenta en el periparto (Snider, 1982; Monaghan *et al.*, 1994). La condición corporal puede verse como otro factor de influencia en la respuesta a las pruebas de tuberculina intradérmica. La mal nutrición ejerce un efecto de inmunosupresión demostrada en humanos, conejos y cerdos, aunque se sugiere que también puede tener lugar en los bovinos (Francis *et al.*, 1978). Sin embargo, dicho efecto no sería un problema cuando se utiliza el test de IFN- $\gamma$  (Gormley *et al.*, 2006).

El uso repetido de las pruebas de tuberculina en cortos periodos influye directamente sobre su rendimiento. Luego de realizada la prueba de tuberculina intradérmica a un animal infectado por *M. bovis*, la capacidad de responder frente a una nueva inoculación de PPD se ve disminuida sustancialmente, determinando que el animal

trascorra por una etapa de “desensibilización” (Monaghan *et al.*, 1994). Esta capacidad de respuesta disminuida, que puede resultar en fallas en la detección de animales infectados, se hace más intensa luego de pasada una semana de la inoculación de tuberculina (Doherty *et al.*, 1995b) y desaparece luego de transcurrido un periodo de 60 días (Radunz & Lepper, 1985; Monaghan *et al.*, 1994; de la Rúa-Domenech *et al.*, 2006). Incluso se ha observado que la intensidad de la reacción a la tuberculina se ve reducida aún pasados los 60 días (Thom *et al.*, 2004). Es fundamental tener presente este fenómeno cuando se definen los protocolos de aplicación de las pruebas. Si se aplicara el test de tuberculina como *screening* o durante el saneamiento de rodeos infectados sin respetar este período, es probable que animales infectados no sean detectados por la técnica y permanezcan en el rodeo comprometiendo el éxito de las campañas sanitarias.

El fenómeno conocido como “anergia” es otra situación relacionada al sistema inmune del hospedador. La presencia de animales viejos con TBB en etapas avanzadas, donde ha transcurrido un período prolongado luego de la infección, se ve asociada con una falta de confiabilidad en el diagnóstico, ya que estos animales pueden fallar en responder a la tuberculina (Pollock & Neill, 2002; Álvarez *et al.*, 2014). Desventaja que también presenta el test de IFN- $\gamma$  (de la Rúa-Domenech *et al.*, 2006).

La presentación de TBB con forma conjunta con otras enfermedades del ganado bovino repercute negativamente en el rendimiento de las pruebas que evalúan la respuesta inmune celular. Infecciones víricas que deprimen el sistema inmune, como por ejemplo la Diarrea Viral Bovina (DBV) y posiblemente también el Virus de la Inmunodeficiencia Bovina (VIB), pueden reducir la respuesta al PPD, tanto *in-vivo* como *in-vitro* (Snider, 1982). Otro problema sanitario que puede derivar en falsos negativos se presentan en rodeos con una co-infección de *M. bovis* y otras micobacterias ambientales, incluyendo aquellas que integran el complejo *Mycobacterium avium-intracelular* (Ej. *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*). En estos casos, frente a un TTCC, puede resultar en una hipersensibilidad mayor en el punto de inoculación de PPD aviar, enmascarando la infección por *M. bovis* (de la Rúa-Domenech *et al.*, 2006). Esto podría evitarse utilizando el test de IFN- $\gamma$  modificado con la inclusión de los antígenos específicos de *M. bovis* (por ejemplo ESAT-6 y CFP-10) que permiten una correcta discriminación (Hope *et al.*, 2005). Se menciona también a la *Fasciola hepática* como un parásito con efecto inmunodepresor de su hospedador y que, por lo tanto, deberá tenerse en cuenta cuando se realicen las pruebas de tuberculina intradérmica en rodeos con esta enfermedad (Claridge *et al.*, 2012).

#### **2.1.2.3.2. Relacionados a la tuberculina (PPD) utilizada**

En este sentido es fundamental quién y cómo elaboran el PPD en los laboratorios. Si se utilizara una tuberculina con una potencia biológica menor a la recomendada a nivel internacional, disminuiría el efecto de ésta sobre el animal a testar, aumentando la probabilidad de falsos negativos (Monaghan *et al.*, 1994). A su vez, errores atribuibles al personal o profesionales encargados de la manipulación y uso de las tuberculinas, como puede ser el inadecuado almacenamiento y transporte con exposición a la luz y

altas temperaturas o la simple elección de un producto vencido, afectará negativamente en el rendimiento de las pruebas (Snider, 1982).

### **2.1.2.3.3. Relacionados al manejo y realización de las pruebas**

Los factores que tienen un mayor impacto en el rendimiento de las pruebas de diagnóstico son las variaciones inherentes al método y las variaciones del operador, incluyendo aquellas entre diferentes operadores y de un mismo operador. Para obtener un diagnóstico confiable es necesario estandarizar los procedimientos, capacitar a los operadores (profesionales veterinarios) y uniformizar criterios de lectura (Monaghan *et al.*, 1994). Conocer las características de esta enfermedad permite seleccionar los momentos adecuados para realizar las técnicas e identificar los posibles factores que puedan estar influenciando en los resultados. Así por ejemplo, repeticiones del test de tuberculina intradérmica sin respetar el período de desensibilización, inocular animales muy jóvenes o mantener en un rodeo enfermo animales muy viejos, puede comprometer el rendimiento de las pruebas y consecuentemente el saneamiento de un rodeo.

Una inoculación insuficiente de PPD, en dosis menores a la establecida, sea debido a un mal funcionamiento de la jeringa multidosis o por un error del operador, determina una reducción del tamaño de la respuesta intradérmica. Por otra parte, un desconocimiento del operador o un simple descuido puede llevar a que la inoculación de la tuberculina sea por vía subcutánea y no intradérmica. Esta sub-dosificación del animal puede también determinar una reducción de la respuesta (Snider, 1982).

Coad *et al.* (2010), evaluaron el rendimiento del TTCC cuando es utilizado en forma repetida en períodos cortos, respetando el período de desensibilización de 60 días. Constataron una reducción significativa de la reacción intradérmica al PPD bovino a partir de la tercera repetición, comprometiendo así la sensibilidad del test. Por este motivo es que los programas de control y erradicación comúnmente se basan en detectar animales infectados e inmediatamente retirarlo del rodeo, para evitar la presentación de falsos negativos y prevenir la diseminación del patógeno.

### **2.1.2.4. Factores que influyen en la presentación de falsos positivos**

Los eventos que afectan negativamente la especificidad de las pruebas se traducen en un aumento de resultados falsos positivos. Estos animales sanos que son clasificados erróneamente como positivos, si bien no comprometen el éxito de las campañas de control de la enfermedad desde un punto de vista epidemiológico, sí tiene consecuencias económicas. La pérdida de ese animal para un productor es una pérdida de una unidad productiva (lechera o cárnica) y una pérdida de su genética, mientras que para el estado representa mayores pagos a productores por indemnización. Por lo tanto, descuidar la especificidad de las pruebas de diagnóstico utilizadas puede determinar una campaña de control más costosa.

La presencia de reactores no específicos, es una de las evidencias que indican que los tests de tuberculina utilizados no cuentan con una especificidad ideal. Estos reactores no específicos pueden ser aquellos animales positivos a las pruebas de campo que

luego durante la inspección *post-mortem* no presentan lesiones visibles y que incluso fallan en el cultivo y aislamiento del *M. bovis* (Monaghan *et al.*, 1994). Sin embargo, la presentación en faena de animales reactivos sin lesiones visibles no solo es consecuencia de una falta de especificidad del test, sino que también se ve influenciada por otros factores como la etapa en que se encuentre la campaña de control y erradicación de la TBB, la prevalencia de la enfermedad, la minuciosidad a la hora de la inspección oficial *post-mortem*, el tiempo transcurrido luego de la infección de los animales, entre otros (Snider, 1982; Pollock & Neill, 2002). Una situación puntual con consecuencias epidemiológicas negativas de estas características sucede cuando se aplican test simples de tuberculina en animales no infectados con *M. bovis* pero que sí han estado expuestos a antígenos del *M. avium* u otras micobacterias ambientales. Son situaciones en donde se manifiestan reacciones cruzadas que se traducen en la presentación de falsos positivos (de la Rúa-Domenech *et al.*, 2006).

El examen *post-mortem* cuando se realiza en forma detallada permite reducir la presentación de animales positivos sin lesiones visibles, aunque por sí sola, la capacidad de esta técnica para detectar la enfermedad es muy baja, en el entorno del 28,5% (Schiller *et al.*, 2010b). En el Reino Unido, Irlanda y otros países en los que se han llevado a cabo investigaciones en esta temática específica, se ha constatado que entre 50 y 80% del ganado bovino reaccionante al test de tuberculina no manifiesta lesiones al momento de la faena (Goodchild & Clifton-Hadley, 2001; de la Rúa-Domenech *et al.*, 2006; Liébana *et al.*, 2008). En Uruguay es también una problemática presente en la actualidad, ya que se maneja un porcentaje de reactivos sin lesiones visibles considerablemente alto, en el orden del 75% (von Gehlen, 2015). A medida que avanza la campaña de erradicación, la prevalencia de la enfermedad disminuye y en consecuencia el valor predictivo positivo, tanto del test de tuberculina como del test de IFN- $\gamma$ , determinando una mayor proporción de reactivos no específicos (de la Rúa-Domenech *et al.*, 2006). En este sentido, los datos nacionales encontrados sobre reactivos sin lesiones visibles se deben de tener muy en cuenta a la hora de desarrollar nuevas estrategias para el control de la tuberculosis bovina.

### **2.1.2.5. Test de ELISA**

Este test de diagnóstico serológico se basa en la detección de anticuerpos producidos por el hospedador en respuesta a la infección de *M. bovis*. La evolución natural que tiene la respuesta inmune frente a este patógeno determina que el test de ELISA será capaz de detectar animales infectados únicamente en etapas avanzadas de la enfermedad (Schiller *et al.*, 2010b), limitando esto su utilidad en los programas de control y erradicación de TBB.

El *M. bovis* en etapas tempranas de la infección estimula en el hospedador una marcada respuesta inmune celular, pero una pobre respuesta humoral (Pollock *et al.*, 2001). A medida que la infección progresa se manifiesta un cambio en el perfil de la respuesta inmune del animal, la respuesta celular decrece al tiempo que la respuesta basada en anticuerpos se hace más fuerte (Marassi *et al.*, 2013). Este efecto genera un estado de anergia en los animales frente a las pruebas de diagnóstico que evalúan la inmunidad celular (Pollock *et al.*, 2005).

Estratégicamente las pruebas de base humoral pueden ser utilizadas con buenos resultados en situaciones particulares. En aquellos animales anérgicos, que

constantemente fallan en responder a las pruebas de base celular a pesar de estar infectados, las pruebas serológicas se reconocen como una herramienta alternativa (Rothel *et al.*, 1992; Pollock *et al.*, 2005). Adicionalmente, se ha demostrado que la aplicación previa de PPD en los animales incrementa la sensibilidad del test serológico (Schiller *et al.*, 2010b), debido al efecto booster que tiene sobre la respuesta de anticuerpos específicos (Thom *et al.*, 2004),

## **2.2. Normativa nacional**

### **2.2.1. Antecedentes**

El primer hallazgo de tuberculosis bovina registrado en el año 1888, por el Dr. Visaires, sirvió de punta pie inicial para los cambios en materia sanitaria que posteriormente tuvieron lugar en Uruguay referente a esta enfermedad. Con el objetivo de poner en marcha análisis bacteriológicos de leches extraídas en tambos urbanos, se creó en febrero de 1889 el Laboratorio Municipal Químico y Bacteriológico, el cual contaba con un servicio de vigilancia en tambos. El evento normativo inicial, relacionado específicamente a la tuberculosis bovina en el país, fue el dictamen de la ordenanza del año 1896 por parte de la Municipalidad de Montevideo. A través de ésta se impuso como requisito la previa observación clínica y tuberculinización de los animales lecheros para permitir su entrada a tambos ubicados en Montevideo. Sumado a esto, una Comisión creada por la Asociación Rural, que contaba con una clara mirada hacia la salud pública, resaltó que además de la necesidad del diagnóstico de tuberculosis era fundamental llevar a cabo una pasteurización de la leche. Esto derivó en la aprobación en el año 1901 de la “higienización obligatoria de la leche”, que consistía básicamente en la obligatoriedad de pasteurizar la leche proveniente de tambos rurales, siendo Uruguay un pionero mundial en este aspecto de inocuidad alimentaria (Casas Olascoaga, 2013). Al año siguiente, en enero de 1902, se aprobó una ordenanza y reglamento sobre la tuberculinización e inspección veterinaria, reforzando aún más las estrategias dirigidas a controlar la TBB en el país. El objetivo principal fue prohibir el ingreso a tambos y lecherías de Montevideo a aquellos animales destinados a la producción lechera que no contaran con un previo examen veterinario y un resultado negativo a la tuberculina, acompañado del correspondiente certificado sanitario. A su vez, los animales reaccionantes y con síntomas clínicos de tuberculosis debían ser sacrificados en forma obligatoria, siendo el productor indemnizado. Por otra parte, los animales reaccionantes al test de tuberculina, pero sin síntomas, debían ser marcados a fuego, mantenidos en lugares alejados de tambos y quedando fuera del aprovechamiento lechero (Magallanes, 1998).

Transcurridos 8 años de la ordenanza, se promulgó la Ley N° 3.606 del 13 de abril de 1910, referente a la Policía Sanitaria de los Animales, uno de los mayores reconocimientos a la profesión veterinaria. La misma estableció la aplicación de medidas sanitarias para la tuberculosis en todas las especies, así como también incluyó esta enfermedad dentro del principio de indemnización y los vicios redhibitorios. En 1918 se estableció por decreto la obligatoriedad de la prueba de tuberculina, realizada por veterinarios particulares, a todos los animales lecheros de tambos urbanos y a aquellos que provengan de establecimientos que remitieran leche certificada (Casas Olascoaga, 2013).

Con el objetivo de estimular a los productores de leche la aplicación de buenas prácticas para mantener la sanidad de los animales, se instrumentó por decreto en el año 1963 el denominado Plan de Leche Calificada. La adhesión de productores lecheros a este plan era de carácter voluntario, teniendo éstos un beneficio económico por litro de leche-cuota remitida a la planta pasteurizadora. Para poder acceder a este pago de estímulo debían cumplir con requisitos higiénico-sanitarios en el establecimiento, dentro de los cuales se exigía la tuberculinización a todo bovino lechero mayor de un año. En caso de existir algún animal positivo al diagnóstico, éste debía identificarse por medio de una marca a fuego y enviarse a faena obligatoria. Para asegurarse que dichos productores cumplieran con estas disposiciones sanitarias, se estableció por decreto en 1964 la participación de un veterinario particular con la función de refrendar anualmente la declaración del propietario del tambo (Casas Olascoaga, 2013). Posteriormente, este procedimiento voluntario que le daba un valor agregado a la leche calificada, tomó carácter de obligatorio para los establecimientos productores de leche con destino comercial en todo el territorio nacional. Estos eventos históricos han sido la prueba de los esfuerzos que realiza Uruguay para el control de esta enfermedad desde hace muchos años y hasta la actualidad.

### **2.2.2. Programa nacional de control y erradicación de la TBB**

Siguiendo las recomendaciones específicas sobre tuberculosis bovina, establecidas por la Organización Mundial de Sanidad Animal, Uruguay se propuso erradicar la enfermedad a través de la clasificación, declaración y certificación de Rebaños Oficialmente libres de Tuberculosis Bovina, según el decreto del Poder Ejecutivo N° 20/998, del 22 enero de 1998. Como estrategia de esta campaña nacional se lleva a cabo una vigilancia epidemiológica a nivel de campo por medio del test de tuberculina intradérmica a todo el rodeo lechero, aplicando un plan de prueba-sacrificio. Sumado a esto, se realiza una vigilancia en los establecimientos de faena por parte de la inspección veterinaria oficial.

#### **2.2.2.1. Vigilancia epidemiológica a nivel de predios**

Desde el año 1979 el PPD bovino se elabora en el Laboratorio de Tuberculosis de la División de Laboratorios Veterinarios “Miguel C. Rubino” (DILAVE-MGAP), a partir de la cepa patrón AN5 Rotterdam (*M. bovis*) y el PPD aviar con la cepa D4ER de Weybridge (*M. avium avium*), utilizando las técnicas estandarizadas del Centro Panamericano de Zoonosis (CPZ) y la OIE. En 1998 la producción y comercialización de PPD bovino deja de ser oficial para pasar a los laboratorios privados habilitados, aunque siempre bajo el control oficial.

Las pruebas de diagnóstico de campo aplicadas actualmente siguen las disposiciones del decreto 79/984 del 22 de febrero de 1984 y el decreto 20/998 del 22 de enero de 1998:

- a. Prueba presuntiva: Test de Tuberculina Ano-Caudal Simple (TTACS): única prueba permitida como *screening* para el diagnóstico presuntivo de la TBB. Deberá ser realizada por el veterinario particular de libre ejercicio, habilitado a tal fin por la Dirección General de Servicios Ganaderos (DGSG), a todo el ganado bovino mayor de un año presente en el territorio nacional (art.11 del decreto 20/998, de enero de 1998).

El procedimiento utilizado para la misma se basa en las directivas del decreto 79/984 del 22 de febrero de 1984 y en las recomendaciones del Manual de Pruebas de Diagnóstico y Vacunas para los Animales Terrestres (OIE, 2009). Se inocula 0,1ml de PPD bovino en el pliegue ano-caudal, por vía intradérmica, para posteriormente realizar la lectura luego de transcurridas 72 horas ( $\pm$  6 horas), mediante observación y palpación. Se realiza una interpretación estándar donde cualquier cambio (engrosamiento, fibrosis, calor, rubor u otra) detectable se debe considerar positivo.

- b. Prueba confirmatoria: Test de Tuberculina Cervical Comparativa (TTCC): Autorizada como prueba confirmatoria y efectuada únicamente por veterinarios oficiales de la División de Sanidad Animal (DSA-MGAP). La inoculación de 0,1ml de PPD bovino y PPD aviar se realiza por vía intradérmica en la tabla del cuello. Para la interpretación, se considera positivo si el aumento del grosor de la piel en el sitio de inoculación de PPD bovino supera en 5mm o más a la reacción en el punto de inoculación de PPD aviar (decreto 79/984 del 22 de febrero de 1984).

Otra de las técnicas de diagnóstico que se puede aplicar, aunque no incluida dentro del programa nacional, es el Test de Tuberculina Cervical Simple (TTCS). En esta prueba se inocula 0,1ml de PPD bovino en forma intradérmica en la tabla del cuello. Según lineamientos de la OIE (2009), la reacción se considera positiva cuando se evidencia un aumento en el espesor de la piel de 4mm o más, medido a las 72 horas ( $\pm$  6 horas) *post*-inoculación de la tuberculina.

Cuando sean necesarios análisis de laboratorio para confirmar la presencia del agente etiológico de TBB, los materiales deberán ser procesados por los Laboratorios Oficiales de diagnóstico especializados del DILAVE.

Los resultados de las pruebas de diagnóstico de campo, de la inspección en establecimientos de faena y de los análisis bacteriológicos e histopatológicos, deberán comunicarse en forma inmediata a los Servicios Veterinarios Oficiales regionales de la DSA, así como también a los propietarios de los animales (art.11 del decreto 20/998, de enero de 1998).

Para la declaración de “Predio Oficialmente Libre de Tuberculosis Bovina”, todos los bovinos mayores de un año deben contar con dos resultados negativos consecutivos a la prueba ano-caudal simple, con un intervalo mínimo de 6 meses y máximo de 12 meses (inc.1º, art 7º, decreto 20/998 del 22 de enero de 1998). Para mantener este estatus sanitario, el rodeo deberá introducir únicamente animales negativos a la TBB, verificado por el TTACS dentro de los treinta (30) días previos al ingreso (inc. 2º, art.7º, decreto 20/998 de 22 de enero de 1998). No podrán ingresar animales procedentes de campos de cría infectados o con una condición sanitaria desconocida, de lo contrario perderán su condición de libre de TBB (inc. 3º Art. 7º del decreto 20/998, del 22/01/998) (Chans, 2009).

Si se constata la presencia de un animal positivo al TTACS, deberá ser comunicado inmediatamente al Servicio Veterinario Oficial más cercano de la DSA, de manera que se proceda a la realización de la prueba comparativa confirmatoria, por parte de un

veterinario oficial. El tiempo establecido para efectuar el TTCC no debe exceder los 10 días posteriores al TTACS, de lo contrario se deberá esperar 60 días hasta que transcurra el período de desensibilización. Si dicho animal resultara positivo a la prueba confirmatoria será aislado de inmediato e identificado por el veterinario oficial con una marca a fuego en la quijada derecha en forma de “T”, de 8cm de largo, para posteriormente ser enviado a faena en un plazo no mayor a los treinta (30) días a partir del diagnóstico confirmatorio (decreto 79/984, de 22 de febrero de 1984 y el art. 4º del decreto 20/998, de 22 de enero de 1998).

La faena sanitaria obligatoria de los bovinos positivos al diagnóstico de campo deberá realizarse previa coordinación con el frigorífico, ya que durante la misma deberán faenarse únicamente estos animales, aplicando las correspondientes medidas higiénico-sanitarias. Dando cumplimiento a lo estipulado por el Decreto 369/983, la inspección veterinaria oficial (IVO) en faena será la responsable de una minuciosa inspección *post-mortem*, a fin de registrar las lesiones tuberculosas que se presenten en los diferentes órganos y tejidos. También serán responsables de la toma de muestras y su posterior envío al laboratorio oficial para el correspondiente cultivo e identificación del *M. bovis*.

Todo establecimiento que cuente con animales reaccionantes a la prueba de tuberculina, será categorizado como foco, quedando interdicto (en cuarentena) durante el período y condiciones que establezca el Servicio Veterinario Oficial. Serán sujeto de investigación oficial tanto el predio foco, así como también los establecimientos linderos y todos aquellos que, luego de un análisis retrospectivo de 2 años sobre los registros de movimiento animal, hayan estado relacionados epidemiológicamente con el predio foco. Se inicia un Plan de Saneamiento del predio donde se debe aplicar el test de tuberculina a todos los bovinos presentes en el rodeo. Para lograr ser clasificado nuevamente como “Predio Oficialmente Libre de Tuberculosis Bovina” todos los animales testados deben contar con dos resultados negativos consecutivos, con un intervalo mínimo de 4 meses entre pruebas (Chans, 2009).

#### **2.2.2.2. Vigilancia epidemiológica en establecimientos de faena**

A nivel de establecimientos de faena se lleva a cabo la correspondiente inspección oficial *ante-mortem* y *post-mortem*, según lo dispone el Reglamento Oficial de Inspección Veterinaria de Productos de Origen Animal (Decreto 369/983). Si durante la inspección *ante-mortem* se constatan animales sospechosos de TBB, éstos deberán ser debidamente identificados (art. 324) y faenados separadamente del resto en el momento y condiciones que disponga el veterinario oficial actuante (art. 28).

En el caso que se detecten lesiones compatibles con tuberculosis durante la inspección *post-mortem* en animales que se encontraban aparentemente sanos, se debe proceder a la extracción y envío de las mismas al laboratorio para un diagnóstico confirmatorio.

Para el dictamen *post-mortem* de TBB se aplicarán los criterios descriptos en el decreto 369/983. “Art. 57. *Tuberculosis: Toda carcasa proveniente de animales en los cuales se haya comprobado tuberculosis quedará excluida para la exportación. Se procederá al decomiso total de las carcasas y vísceras correspondientes en los casos que:*

- a. *Se constaten lesiones de tuberculosis generalizada, considerándose como tal, aquella en que la distribución de las lesiones sea consecuencia del ingreso del agente etiológico al sistema circulatorio.*
- b. *Se constaten lesiones de tuberculosis activa, concomitantemente con estado febril en la inspección ante-mortem.*
- c. *Se constaten lesiones de tuberculosis asociadas con un estado de caquexia. Se procederá al decomiso parcial en los casos que se constaten lesiones de tuberculosis localizada en un órgano, parte de la carcasa o ganglio linfático correspondiente, siempre que no se observen signos de generalización.”*

Toda la carne y subproductos que resulten decomisados deberán someterse a un tratamiento térmico adecuado para garantizar la destrucción del bacilo tuberculoso.

Luego de efectuada una faena de animales infectados se deberá proceder a una adecuada limpieza y desinfección de utensilios, equipos e instalaciones, a través del uso de desinfectantes efectivos como fenol al 5% o una solución de cresol al 3%. Para las manos de operarios que hayan tenido contacto directo o indirecto se recomienda una desinfección con alcohol etílico al 80% combinado con benceno (nafta) y glicerol (Serna & Inderkum, 1986).

### 3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Como sucede en otros países del mundo, en Uruguay se lleva a cabo una campaña para el control y erradicación de la TBB aplicada con esfuerzos conjuntos del sector público y privado, con el objetivo principal de disminuir la prevalencia de la enfermedad hasta su erradicación, minimizando el riesgo que implica dicha enfermedad para la salud de los animales y de las personas.

Estos programas requieren de un fuerte apoyo económico para indemnizar a los productores afectados como forma de evitar la tentación de ocultar la situación sanitaria y de esa forma perpetuar su diseminación. Conscientes de esta situación, en Uruguay se incluyó en el artículo 378 de la Ley 18.719 del 27 diciembre del 2010 (Presupuesto quinquenal 2011 – 2015) las disposiciones que crean un fondo para pagar al productor por la faena obligatoria de animales positivos a la TBB y otras enfermedades zoonóticas y emergentes. El pago equivalente al total del animal eliminado es una característica poco común en el mundo, por lo que se considera una fortaleza de este programa nacional.

Estas medidas aplicadas sistemáticamente llevaron a que se lograra un buen control de la enfermedad, lo que se verificó a través de lo reportado a la Organización Mundial de Sanidad Animal OIE. En el período 2001-2008 se reportaron 54 focos de la enfermedad y se detectaron 265 reactores (A. Gil, comunicación personal). Esta situación de bajo endemismo de TBB comenzó a cambiar a partir del 2010 donde se detectaron 191 animales reaccionantes y 6 nuevos focos, pasando a ser de corte epidémico en el 2011, con 1.950 reaccionantes y 19 nuevos focos, lo que continuó en el primer semestre del 2012 con 1.916 reaccionantes y 4 nuevos focos (Fernández, 2012). Del año 2011 al 2016, se han registrado 95 nuevos focos, con un total de 40 focos abiertos a noviembre del 2016 (DSA-MGAP, comunicación personal).

Algunos especialistas asociaron estas modificaciones en el comportamiento de la enfermedad y su presencia en el rodeo lechero del Uruguay a los profundos cambios productivos que ha tenido este sector en la última década. Es un sector que ha transcurrido por una intensificación, con mayor productividad, concentración de animales y establecimientos de mayor tamaño poblacional. La ausencia inicial de protocolos sanitarios en la adquisición de animales, la desensibilización de otros animales por las pruebas de tuberculina repetidas en plazos no adecuados (Schneider *et al.*, 2007) y la no disponibilidad de pruebas alternativas a nivel nacional, tanto para el saneamiento como para la prevención, probablemente han sido factores que favorecieron la difusión de la infección entre rodeos lecheros. Como forma de acelerar los procesos de saneamiento.

La proporción de animales reaccionantes que normalmente han presentado lesiones macroscópicas durante la inspección *post-mortem* ha oscilado entre el 40 y 60%. Se ha observado en algunos establecimientos que han aplicado la prueba de tuberculina cervical simple (TTCS) en cortos períodos, que ese número de animales con lesiones visibles cayeron a valores inferiores al 10%. Una explicación plausible es que al utilizar una prueba más sensible y al acortar los períodos entre las pruebas se esté identificando y refugando animales en los primeros estadios de la enfermedad, antes de que tengan tiempo de desarrollar lesiones. Si esta fuera la situación tendría un impacto favorable en el saneamiento y se debería observar una caída importante en la

prevalencia de reactores, lo cual no ha acontecido. De esa misma población, a una muestra de 15 animales con las mayores reacciones al TTCS, se le realizó la prueba de IFN- $\gamma$ , resultando 10 de ellos negativos. Teniendo en cuenta que el test de IFN- $\gamma$  tiene alta especificidad (de la Rúa-Domenech *et al.*, 2006), una hipótesis plausible es que la utilización en forma reiterada del TTCS en cortos plazos puede determinar un efecto de “sensibilización” de los animales a la tuberculina con una consecuente caída de especificidad de la prueba. Si se tiene presente que la mayoría de las vacunas que se han desarrollado tienen el inconveniente de que esos animales se hagan positivos a las pruebas de tuberculina y que la vía cervical es muy sensible, el uso reiterado de las pruebas por esta vía podría generar reacciones inespecíficas. La sucesiva exposición del sistema inmune del animal al derivado proteico purificado (PPD), puede llevar a la diferenciación de linfocitos T a linfocitos Th1 con memoria frente a esa molécula antigénica y a la presentación de resultados falsos positivos posteriores.

En la actual situación sanitaria del Uruguay existe la necesidad de conocer cómo el uso repetido de las pruebas de tuberculina puede afectar la sensibilidad y especificidad de las mismas. Conocer estas propiedades permitirá evaluar las consecuencias y optimizar su manejo al minimizar los costos y el tiempo de los saneamientos que son trascendentales. La eliminación de las vacas lecheras de alta producción origina un gasto importante por indemnización para el estado uruguayo, sumado a las pérdidas productivas y de genética que tienen los productores lecheros.

El presente estudio tiene como objetivo estimar como las pruebas que actualmente se utilizan (pruebas de tuberculina) y, las potencialmente a utilizar (test de gamma-interferón), se ven afectadas en sus propiedades (sensibilidad y especificidad) por las estrategias de saneamiento y vigilancia. Como el uso reiterado de estas técnicas puede afectar su capacidad para reconocer bovinos infectados y bovinos sanos. A su vez, resulta necesario identificar la combinación más certera y estratégica de las mismas que eviten costos innecesarios.

## **4. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS GENERALES DE LA TESIS.**

### **4.1. Hipótesis**

El uso reiterado de las pruebas de tuberculina simple afecta negativamente su rendimiento en el diagnóstico de la enfermedad. Sobre bovinos sanos, disminuye su especificidad, mientras que el uso reiterado y en plazos cortos sobre bovinos infectados, disminuye su sensibilidad. Por su parte, el test de interferón-gamma no ve afectadas sus propiedades cuando es utilizado en forma repetida sobre animales que se encuentren desensibilizados a las pruebas de tuberculina.

### **4.2. Objetivo general**

Evaluar del efecto de los plazos de repetición de las pruebas de tuberculina y del test de interferón-gamma sobre sus propiedades para el diagnóstico de la tuberculosis bovina, a fin de optimizar su manejo en los programas de control prueba-sacrificio.

### **4.3. Objetivos específicos**

Evaluar el efecto sobre la especificidad de las pruebas de la tuberculina cuando son utilizadas reiteradamente en una población libre de TBB.

Evaluar la especificidad de la prueba de interferón-gamma en una población de bovinos libres de TBB.

Evaluar la desensibilización provocada por el uso de plazos inadecuados en la realización de la prueba de tuberculina cervical simple sobre bovinos infectados en forma natural.

Evaluar el comportamiento de la prueba de IFN- $\gamma$  en animales desensibilizados por no respetar los plazos adecuados entre las pruebas de tuberculina.

## 5. ESTRATEGIA DE LA INVESTIGACIÓN

Para cumplir con los objetivos generales de esta tesis se realizaron 2 experimentos:

**Experimento I.** EVALUACIÓN DE LA ESPECIFICIDAD DEL TEST DE TUBERCULINA ANO-CAUDAL SIMPLE Y TEST DE TUBERCULINA CERVICAL SIMPLE CUANDO SE UTILIZAN EN FORMA REPETIDA.

En este experimento se evaluó el efecto sobre la especificidad de las pruebas de la tuberculina simple cuando son utilizadas reiteradamente en una población libre de TBB. Por otra parte, se evaluó la especificidad de la prueba de interferón-gamma en una población de bovinos libres de TBB.

Para las evaluaciones de la especificidad de las pruebas se recurrió a un ensayo clínico, pero por el alto costo que un ensayo de este tipo tendría sobre la producción lechera, no fue posible realizarlo en un establecimiento comercial. Esta limitante derivó a que esta parte del estudio se llevara a cabo sobre animales de carne (raza Hereford) mantenidos en un establecimiento propiedad del Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca, ubicado en la localidad de Cardozo, departamento de Tacuarembó.

**Experimento II.** EVALUACIÓN DE LA SENSIBILIDAD DEL TEST DE INTERFERON-GAMMA Y DEL TEST DE TUBERCULINA CERVICAL SIMPLE CUANDO SE UTILIZAN EN FORMA REPETIDA Y EN PLAZOS CORTOS SOBRE BOVINOS INFECTADOS EN FORMA NATURAL.

Para esta etapa del trabajo se evaluó la desensibilización provocada por el uso de plazos inadecuados en la realización de la prueba de tuberculina cervical simple. A su vez, se evaluó el comportamiento de la prueba de IFN- $\gamma$  con animales desensibilizados por no respetar los plazos adecuados entre las pruebas de tuberculina.

El camino más confiable para responder las interrogantes planteadas sería a través de un ensayo clínico, donde se podrían controlar todos los factores intervinientes que pudieran afectar las propiedades de las pruebas evaluadas. De esta forma se podría obtener una respuesta no contaminada por factores que no son manejables en estudios de tipo observacional. Sin embargo, esta alternativa no fue posible plantearla para las evaluaciones de sensibilidad porque Uruguay no cuenta con instalaciones con la bioseguridad necesaria como para hacer desafíos y mantener aislados los bovinos infectados. Considerando esto, la única estrategia viable fue a través de un estudio de tipo observacional sobre animales infectados naturalmente en establecimientos cuarentenados por el Servicio Veterinario Oficial de Uruguay. Por tal motivo, fue clave contar con la colaboración de la División Sanidad Animal (DSA-MGAP), División de Laboratorios Veterinarios “Miguel C. Rubino” (DILAVE-MGAP), así como también el apoyo por parte de los productores que se involucraron.

Cabe destacar que la presente investigación no interfirió con los plazos que normalmente se dan en el país para la eliminación de los animales reaccionantes, así como tampoco con los protocolos de bioseguridad que se emplean en los establecimientos infectados. En este sentido se trató de minimizar el número de animales positivos y los plazos evaluados en el estudio.

## **6. EXPERIMENTO I. EVALUACIÓN DE LA ESPECIFICIDAD DEL TEST DE TUBERCULINA ANO-CAUDAL SIMPLE Y TEST DE TUBERCULINA CERVICAL SIMPLE CUANDO SE UTILIZAN EN FORMA REPETIDA.**

### **6.1. Hipótesis**

El uso repetido de las pruebas de tuberculina (TTACS y TTCS) con intervalos de 60 días entre pruebas, disminuye la especificidad de las mismas.

### **6.2. Objetivos**

- 6.2.1.** Evaluar el efecto sobre la especificidad de las pruebas de la tuberculina cuando son utilizadas reiteradamente en una población libre de TBB.
- 6.2.2.** Evaluar la especificidad de la prueba de interferón-gamma en una población de bovinos libres de TBB.

### **6.3. Materiales y Métodos**

#### **6.3.1. Selección de animales**

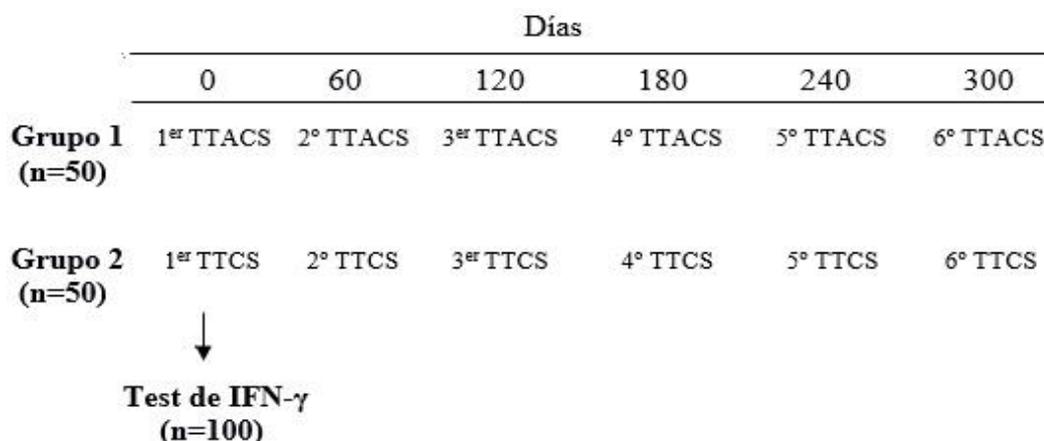
Para esta parte del estudio se seleccionaron bovinos sanos, sin historia de TBB, provenientes de un establecimiento ubicado en la localidad de Cardozo, departamento de Tacuarembó, propiedad del Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca (MGAP). Sobre esta población se realizó un muestreo aleatorio simple para seleccionar un total de 100 bovinos hembras adultas (mayores de 2 años) de raza Hereford, no gestantes, sin registro de parto reciente y sin tratamiento con corticoides, de manera de no afectar el rendimiento de las pruebas evaluadas (test de tuberculina y test de IFN- $\gamma$ ).

Durante la conformación de la muestra se seleccionó un grupo de animales que fueron mantenidos en calidad de sustitutos frente a eventuales pérdidas de individuos, a los que se les aplicaron los mismos procedimientos que a los demás. La cantidad de animales sustitutos fueron el equivalente al 10% del total de la muestra (n=10).

Para evaluar la especificidad de las pruebas y detectar un efecto de sensibilización a la tuberculina, los animales se clasificaron aleatoriamente en 2 grupos de 50 animales cada uno (incluyendo 5 animales sustitutos en cada grupo). Se aplicó en forma repetida el Test de Tuberculina Ano-Caudal Simple (TTACS) y el Test de Tuberculina Cervical Simple (TTCS) con intervalos de 60 días entre pruebas. Cada animal recibió en total 6 inoculaciones de PPD bovino (Figura 4).

**Figura 4.**

Representación esquemática del protocolo utilizado en las pruebas de campo para evaluar la especificidad de los test de diagnóstico.



A los 50 animales del grupo 1 se les aplicó el TTACS en forma repetida con intervalos de 60 días entre pruebas. Mientras que los animales que conformaban el grupo 2 se les aplicó el TTCS con el mismo intervalo.

Por otra parte, el día 0 previo a la inoculación de PPD bovino (PPDb) se tomaron muestras de sangre con anticoagulante (litio heparina) a la totalidad de los animales para para posteriormente ser remitidas al laboratorio de DILAVE, donde se realizó el test de IFN- $\gamma$ .

Este experimento se llevó a cabo durante los meses de diciembre del 2015 y noviembre de 2016.

### 6.3.2. Test de Tuberculina Ano-Caudal Simple (TTACS)

Para la realización de la prueba de tuberculina ano-caudal simple y la interpretación de sus resultados se siguieron los lineamientos nacionales y las recomendaciones del Manual de Pruebas de Diagnóstico y Vacunas para los Animales Terrestres (OIE, 2009). Se inoculó a los animales del grupo 1 (n=50) 0,1 ml de PPDb por vía intradérmica a nivel del tercio posterior del pliegue ano-caudal, aproximadamente a unos 6cm de la base de la cola. Previo a la inoculación, se efectuó una adecuada higiene de la zona y se verificó que dicha región no contaba con heridas o cicatrices en la piel que puedan afectar el rendimiento del test. La tuberculina utilizada durante todo el estudio, fue elaborada por el laboratorio de tuberculosis de DILAVE-MGAP, a partir de la cepa patrón AN5 Rotterdam (*M. bovis*).

La lectura se realizó luego de transcurridas 72 horas ( $\pm$  6 horas) *post*-inoculación de PPDb, mediante observación y palpación. Se aplicó una interpretación estándar donde aquel animal que presentara cualquier cambio visible o palpable en el sitio de inoculación (engrosamiento, fibrosis, calor, rubor u otra) se consideró como positivo a tuberculosis bovina.

### 6.3.3. Test de Tuberculina Cervical Simple (TTCS)

El TTCS se llevó a cabo a través de la inoculación de 0,1 ml de PPD<sub>b</sub> por vía intradérmica a nivel de la tabla del cuello. La tuberculina utilizada fue elaborada por el laboratorio de tuberculosis de DILAVE-MGAP, a partir de la cepa patrón AN5 Rotterdam (*M. bovis*). Previo a la inoculación se cortó el pelo de la zona (aproximadamente 5cm de diámetro), se desinfectó con alcohol para luego medir el espesor de la piel utilizando un cutímetro y registrar el valor en la planilla correspondiente. En situaciones en que se constataron heridas o cicatrices luego de afeitada la zona se seleccionó otra zona cercana, de piel sana, para repetir este procedimiento y poder luego realizar la técnica en forma adecuada.

El sitio de inoculación fue examinado a las 72 horas ( $\pm 6$  horas) a través de inspección, palpación y medición con cutímetro en busca de evidencia de inflamación detectada por el aumento del espesor de la piel. Para la interpretación de los resultados se siguieron los lineamientos de la OIE (2009), considerando como positivo a tuberculosis bovina aquel animal que presentó un aumento en el espesor de la piel de 4mm o más.

### 6.3.4. Test de interferón-gamma (BOVIGAM 2<sup>®</sup>)

El procedimiento para la realización de este análisis se llevó a cabo siguiendo las instrucciones de uso desarrolladas por el fabricante (Prionics<sup>®</sup>).

#### **Etapa 1: Cultivo de sangre**

##### *Colecta de sangre*

Se colectaron al menos 5ml de sangre en vacutainers conteniendo heparina como anti-coagulante (litio heparina). Para esta maniobra se utilizaron agujas con las siguientes medidas: 18G de 2,5cm. Luego de la extracción, se mezcló la sangre suavemente por inversión en forma repetida.

El transporte de las muestras se realizó en recipiente cerrado manteniendo una temperatura ambiente ( $22\pm 5^{\circ}\text{C}$ ). El tiempo transcurrido desde la colecta de la muestra hasta el arribo al laboratorio para ser procesadas no superó las 6 horas.

##### *Preparación de antígenos y mitógeno*

Se diluyó 110 $\mu\text{l}$  de tuberculina bovina (PPD 3000) y tuberculina aviar (PPD 2500) en 890 $\mu\text{l}$  de medio RPMI 1640 / PBS, logrando una concentración final de 250 IU/ml.

Para comprobar la viabilidad de las células sanguíneas (linfocitos T) se utilizó el mitógeno pokeweed.

Para facilitar un posterior traspaso a la placa de cultivo, se colocó en una placa de pocillos profundos, PPD aviar (PPDa) y PPD bovino (PPDb) previamente diluidos, antígeno control Nil conteniendo suero buffer fosfato (PBS) y mitógeno pokeweed.

### Adición de la sangre, antígenos de estimulación y mitógeno

Antes del agregado de la sangre se homogeneizó la muestra invirtiendo los tubos unas veces. Se agregó 250µl de cada muestra de sangre a una placa de cultivo de 96 pocillos.

Utilizando una pipeta multicanal se añadió 25µl de antígeno control Nil, PPD<sub>b</sub>, PPD<sub>a</sub> y mitógeno a los pocillos que contenía cada una de las muestras, evitando la formación de burbujas en la sangre. Para esta maniobra se siguió la disposición que se detalla en la figura 5. Posteriormente se mezcló el preparado durante 1 minuto utilizando un agitador de placas a una velocidad de 600rpm.

#### Figura 5.

Placas de cultivo de 96 pocillos indicando la distribución utilizada en el laboratorio para el agregado de muestras de sangre, antígenos de estimulación (PPD<sub>b</sub> y PPD<sub>a</sub>), antígeno control Nil y mitógeno pokeweed.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
<b>A</b>	PPD b M1	PPD b M2	PPD b M3	PPD b M4	PPD b M5	PPD b M6	PPD b M7	PPD b M8	PPD b M9	PPD b M10	PPD b M11	PC
<b>B</b>	PPD a M1	PPD a M2	PPD a M3	PPD a M4	PPD a M5	PPD a M6	PPD a M7	PPD a M8	PPD a M9	PPD a M10	PPD a M11	PC
<b>C</b>	NIL M1	NIL M2	NIL M3	NIL M4	NIL M5	NIL M6	NIL M7	NIL M8	NIL M9	NIL M10	NIL M11	PC
<b>D</b>	PW M1	PW M2	PW M3	PW M4	PW M5	PW M6	PW M7	PW M8	PW M9	PW M10	PW M11	NC
<b>E</b>	PPD b M12	PPD b M13	PPD b M14	PPD b M15	PPD b M16	PPD b M17	PPD b M18	PPD b M19	PPD b M20	PPD b M21	PPD b M22	NC
<b>F</b>	PPD a M12	PPD a M13	PPD a M14	PPD a M15	PPD a M16	PPD a M17	PPD a M18	PPD a M19	PPD a M20	PPD a M21	PPD a M22	NC
<b>G</b>	NIL M12	NIL M13	NIL M14	NIL M15	NIL M16	NIL M17	NIL M18	NIL M19	NIL M20	NIL M21	NIL M22	/
<b>H</b>	PW M12	PW M13	PW M14	PW M15	PW M16	PW M17	PW M18	PW M19	PW M20	PW M21	PW M22	

NIL= Antígeno de control Nil (PBS); PPD bovino; PPD aviar; PC=Control Positivo; NC=Control Negativo. PW=Mitogeno pokeweed; M=Muestra

Nota: Los pocillos identificados como Control Positivo y Negativo no fueron utilizados en esta primera etapa. Los controles se utilizaron en la segunda etapa durante la realización del ELISA.

#### Incubación y cosecha del plasma

Se incubaron las placas de cultivo en una estufa a 37°C en un ambiente humidificado durante 16-24 horas.

Previo a la cosecha del plasma, se retiraron las placas de la estufa y se centrifugaron a 500g durante 10 minutos a una temperatura ambiente (22±3°C). Se cosecharon alrededor de 110µl de plasma de cada muestra, cambiando los tips entre una muestra y otra para evitar contaminación cruzada. El plasma cosechado se depositó en placas de 96 pocillos con la finalidad de mantener la distribución de las muestras al momento de transferirlas a las placas de ELISA.

En situaciones en que no se pudo continuar inmediatamente con la segunda etapa de la técnica, se almacenaron las muestras en refrigeración a una temperatura de  $5\pm 3^{\circ}\text{C}$ , de manera de continuar al día siguiente.

### **Segunda etapa: “ELISA para interferón-gamma bovino”**

Como actividad preliminar, en aquellas situaciones en que se mantuvieron las muestras en refrigeración, se retiraron las mismas para que alcancen una temperatura ambiente antes del comienzo de la segunda etapa. Este mismo criterio se aplicó para el diluyente verde, el cual debe estar a temperatura ambiente para ser utilizado.

#### *Preparación de reactivos*

Los controles positivos y negativos que se encontraban liofilizados, se reconstituyeron por medio del agregado de 1ml de agua destilada.

#### *Adición de muestras, controles y diluyente*

Se añadió 50 $\mu\text{l}$  de diluyente verde en los pocillos necesarios utilizando una pipeta multicanal. Posteriormente se añadió 50 $\mu\text{l}$  de las muestras de plasma y de controles positivos y negativos en los pocillos conteniendo el diluyente verde. Se mezcló el contenido por 1 minuto realizando pipeteado (5 repeticiones). Se cubrieron las placas con tapa y se incubaron a temperatura ambiente en un agitador de placas a 600rpm durante 60 minutos ( $\pm 5$  minutos).

#### *Lavado de placas*

Utilizando una solución de lavado se llenaron todas las celdas, procurando no contaminar entre celdas y no mantener la solución de lavado en los pocillos por más de 30 segundos. Posteriormente se volteó la placa para retirar el contenido. Se realizaron 4 repeticiones de este procedimiento de lavado de placas. Luego del cuarto lavado se colocaron las placas boca abajo en un papel absorbente, golpeando varias veces con los dedos para eliminar el restante del agua de lavado.

#### *Preparación y añadido del conjugado*

El conjugado se preparó en el momento antes de ser utilizado, ya que todo el tiempo se mantuvo a una temperatura de refrigeración ( $4^{\circ}\text{C}$ ), tal como recomienda el fabricante. Se retiró únicamente para su preparación y luego se volvió a almacenar a la temperatura recomendada. Se reconstituyó con 0,75ml de agua destilada y posteriormente se diluyó con el diluyente azul según indicaciones del cuadro II, dependiendo de la cantidad de placas utilizadas.

## Cuadro II.

Fórmula de preparación para diluir de conjugado con el diluyente azul.

Número de Placas	Volumen de Conjugado- Concentrado (250X)	Volumen de diluyente azul
1	0,048 ml	12 ml
2	0,096 ml	24 ml
3	0,14 ml	35 ml
4	0,18 ml	45 ml
5	0,22 ml	55 ml
6	0,26 ml	65 ml
7	0,3 ml	75 ml
8	0,34 ml	85 ml
9	0,38 ml	95 ml
10	0,42 ml	105 ml

Se agregó 100µl del preparado de conjugado a los pocillos correspondientes. Se cubrieron las placas con tapa y se incubaron a temperatura ambiente en un agitador de placas a 600rpm durante 60 minutos ( $\pm 5$  minutos). Culminada la incubación se procedió al lavado de las placas de igual forma que se describe en el procedimiento de lavado anterior.

### *Añadido de sustrato enzimático*

Se agregó 100µl del sustrato en cada pocillo, homogeneizando a través de pipeteos. Se cubrieron las placas con tapa oscura para protegerlo de la luz solar y se incubaron a temperatura ambiente con agitador de placas a 600rpm durante 30 minutos. El registro del tiempo de incubación se inició cuando se añadió el sustrato al primer pocillo.

Culminado este período se añadió 50µl de solución de frenado en cada pocillo, respetando el mismo orden del agregado del sustrato y evitando una contaminación cruzada entre pocillos. Finalmente la absorbancia de cada pocillo se leyó dentro de los 5 minutos posteriores al frenado de la reacción, utilizando un filtro de 450nm con un filtro de referencia de entre 620 y 650nm.

### *Validación del test e interpretación de resultados*

Para la validación del test se consideraron los siguientes criterios:

**Control Negativo IFN-gamma Bovino** →  $< 0,130$  (No deben variar más de 0,040)

**Control Positivo IFN-gamma Bovino** →  $1,20 - 2$  (No deben desviarse más del 30% de su absorción).

Según lineamientos del fabricante, si alguno de estos dos criterios no se cumplió, el ELISA se considera inválido y deberá repetirse el test. Situación que no se presentó en el presente experimento.

Otro aspecto a considerar para la validez de los resultados es el valor del mitógeno pokeweed. Si éste resulta  $\leq 0,5$  estaría indicando un decrecimiento generalizado de la viabilidad de las células (linfocitos T) y, por lo tanto, la muestra debe descartarse. Por otra parte, si el valor DO del antígeno control Nil es  $\geq 0,3$  estaría indicando que el animal posiblemente presentaba una infección generalizada diferente al *M. bovis*.

Para la interpretación de los resultados, se compararon los valores del antígeno control Nil, del PPD<sub>b</sub> y PPD<sub>a</sub> de cada muestra para obtener el diagnóstico a través de las siguientes fórmulas:

**Resultado positivo:**

Densidad Óptica (DO) PPD Bovino – Antígeno Nil  $\geq 0,1$ ; y DO PPD Bovino – PPD Aviar  $\geq 0,1$

**Resultado negativo:**

DO PPD Bovino – Antígeno Nil  $< 0,1$ ; o DO PPD Bovino – PPD Aviar  $< 0,1$

### 6.3.5. Análisis estadístico

Se utilizó el paquete estadístico STATA 14 para el análisis de los datos obtenidos. Los cambios significativos generados en la intensidad de la reacción intradérmica de los animales en respuesta al uso repetido tanto del TTCS como del TTACS, se evaluaron utilizando un test de ANOVA para medidas repetidas a fin de detectar diferencias entre el número de repeticiones. Se aplicó un test de regresión lineal simple para constatar la existencia de una relación significativa entre el aumento de repeticiones de las pruebas y la reacción intradérmica a la PPD<sub>b</sub>.

## 6.4. Resultados

### 6.4.1. Evaluación de la especificidad del test de IFN- $\gamma$

Al inicio del experimento y previo a la inoculación de PPD<sub>b</sub>, correspondiente a la primera ronda de las pruebas de tuberculina, se colectó sangre de todos los animales (n=100) para llevar a cabo el test de IFN- $\gamma$ . Se utilizó un criterio estricto para la interpretación de los resultados buscando maximizar la especificidad de la prueba, aplicando el siguiente punto de corte: animal positivo = DO PPD<sub>b</sub> - DO PPD<sub>a</sub>  $\geq$  0,1 y DO PPD<sub>b</sub> - DO Nil  $\geq$  0,1. Los resultados indicaron un 97% de especificidad para este test *in-vitro*, con un total de 3 animales positivos.

### 6.4.2. Efecto del uso repetido del TTCS sobre la especificidad de la prueba.

Para demostrar cómo influye el uso repetido del TTCS sobre la especificidad de la técnica se utilizaron 50 bovinos provenientes de un rodeo sin antecedente de tuberculosis bovina. A estos animales se les aplicó un total de 6 repeticiones de este test con un intervalo de 60 días entre pruebas, conformando 6 categorías con 50 observaciones cada una. Se midió a las 72 horas el aumento de espesor de piel en respuesta a la inoculación de PPD<sub>b</sub>, obteniendo los promedios de las reacciones intradérmicas en milímetros a medida que aumentaba el número de repeticiones del test (Cuadro III).

#### Cuadro III.

Espesor de la piel en respuesta a PPD<sub>b</sub> de bovinos sometidos a repeticiones del test de tuberculina cervical simple (TTCS).

TTCS <sup>a</sup>	Espesor de piel (mm) <sup>b</sup>	Valor máx.
Ronda 1	0,67 $\pm$ 0,878	3
Ronda 2	0,86 $\pm$ 0,869	3
Ronda 3	0,61 $\pm$ 0,537	2,5
Ronda 4	0,44 $\pm$ 0,359	1,5
Ronda 5	0,52 $\pm$ 0,494	2
Ronda 6	1,15 $\pm$ 0,730	2,5

<sup>a</sup> *Test de tuberculina cervical simple*

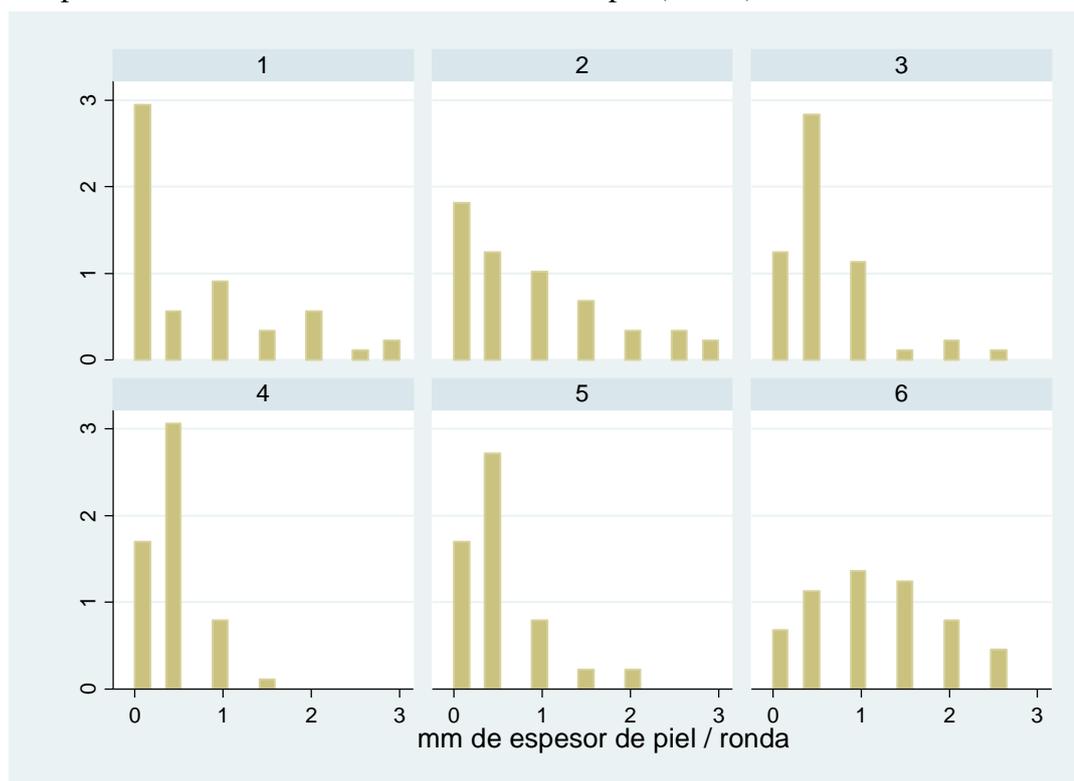
<sup>b</sup> *Media de la reacción intradérmica en milímetros medida en el sitio de inoculación de PPD bovino en un grupo de 50 bovinos de carne, provenientes de un rodeo sin historia de tuberculosis bovina, sometidos a 6 rondas del TTCS con intervalos de 60 días entre pruebas.*

Evaluando la media de los grupos (Nº de repeticiones del TTCS) no se observó una tendencia de aumento como se esperaba. Sin embargo, cuando los animales recibieron 6 inoculaciones de PPD<sub>b</sub> la media para la variable del espesor de piel (mm) fue mayor que en las demás categorías (1,15  $\pm$  0,73mm), debido a una mayor proporción de animales con altos valores en el aumento de espesor de piel (Gráfico 1). Con un enfoque en el objetivo del presente experimento, si se utilizara como punto de corte para el diagnóstico un valor de aumento de espesor de piel  $\geq$  3 mm, un total de 3 animales fueron clasificados como infectados: (a) uno positivo en las 2 primeras

rondas; (b) otro en la primera ronda y; (c) el tercero únicamente en la segunda ronda del TTCS. Tal como se muestra en el gráfico 1 la positividad de dichos animales desapareció en las 4 posteriores rondas, razón por la cual no se consideró llevar a cabo la faena de los animales para realizar el diagnóstico *post-mortem*. Por otra parte, cuando se aplicó un criterio de positividad menos estricto para el TTCS, equivalente a un aumento en el espesor de piel  $\geq 4$  mm, todos los animales se mantuvieron negativos a TBB en el transcurso del experimento.

### Gráfico 1.

Distribución de los valores registrados de aumento de espesor de piel según el número de repeticiones del test tuberculina cervical simple (TTCS).

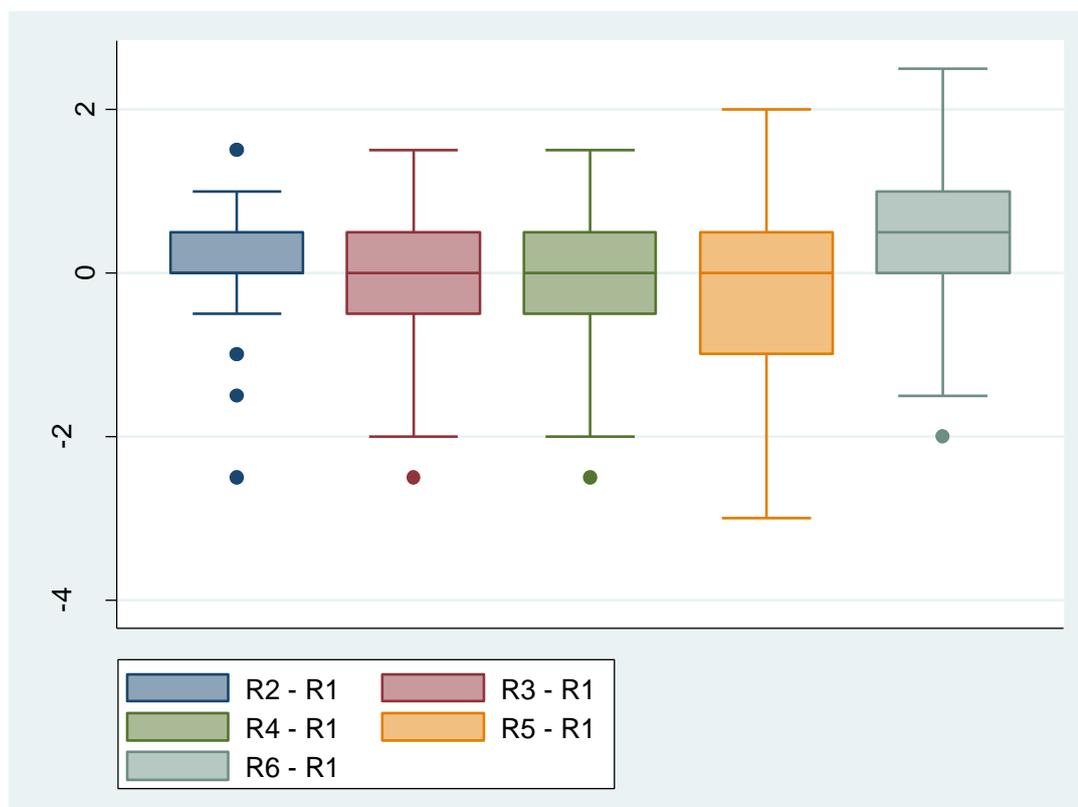


Debido a que se contaba con varias observaciones tomadas sobre los mismos animales, se corrió en STATA un análisis de varianza para medidas repetidas, con el objetivo de detectar si las sucesivas inoculaciones de tuberculina tuvieron un efecto sobre la respuesta intradérmica de los animales. Efectivamente los resultados demostraron que existieron diferencias significativas entre las repeticiones del TTCC en cuanto a la media de la reacción intradérmica a la PPD<sub>b</sub>, medida en milímetros de espesor de piel ( $p < 0,0005$ ). Al llevar a cabo un test de regresión lineal simple y comparando las medias del espesor de piel con la primera ronda de la prueba, se constató una relación positiva significativa únicamente luego de 6 inoculaciones de tuberculina. De esta forma al recibir el número máximo de repeticiones se constató un aumento significativo en la media de la reacción intradérmica a la PPD<sub>b</sub> de 0,48mm (IC 95%, 0,2396407 a 0,7203593),  $p < 0,0005$ .

El gráfico 2 permite visualizar como se diferenció la respuesta a la PPD<sub>b</sub> a medida que se aumentó el número de repeticiones del TTCS, en comparación con la primera ronda del test. Se observa que los animales cuando recibieron menos de 6 repeticiones no se diferenciaron significativamente de la ronda 1.

## Gráfico 2.

Influencia del uso repetido del test de tuberculina cervical simple aplicado cada 60 días sobre el aumento de espesor de piel en bovinos provenientes de un rodeo libre de TBB.



*Nota: Espesor de piel en milímetros en respuesta a la inoculación de PPD<sub>b</sub> a medida que aumenta el número de repeticiones del TTCS, comparado con la reacción intradérmica de los animales cuando recibieron la primera ronda del test.*

### 6.4.3. Efecto del uso repetido del test de Tuberculina Ano-Caudal Simple (TTACS) sobre la especificidad de la prueba.

Al igual que con la prueba cervical, para evaluar el efecto del uso repetido del TTACS sobre la especificidad de la técnica se utilizó una población de 50 bovinos de carne provenientes de el mismo establecimiento ganadero sin historia de TBB. Todos los animales recibieron 6 rondas del test ano-caudal con un intervalo de 60 días entre pruebas, salvo 2 individuos que recibieron 4 y 5 repeticiones del TTACS. La lectura de la reacción intradérmica se realizó a las 72 horas a través de una inspección visual y palpación en el pliegue ano-caudal donde se inoculó la tuberculina. Aquel animal que presentó cualquier tipo de reacción visible o palpable fue categorizado como positivo.

Todos los animales estudiados, excepto 1, se mantuvieron negativos al TTACS durante el transcurso del experimento, a pesar de haber aumentado el número de repeticiones. El único animal positivo se detectó en la tercera ronda, con un aumento en el espesor del pliegue ano-caudal inoculado de 2mm. Dicha positividad desapareció en las 3 restantes rondas de la prueba.

## **7. EXPERIMENTO II. EVALUACIÓN DE LA SENSIBILIDAD DEL TEST DE INTERFERON-GAMMA Y DEL TEST DE TUBERCULINA CERVICAL SIMPLE CUANDO SE UTILIZAN EN FORMA REPETIDA Y EN PLAZOS CORTOS SOBRE BOVINOS INFECTADOS EN FORMA NATURAL.**

### **7.1. Hipótesis**

La sensibilidad del TTCS disminuye cuando la prueba se repite dentro de los 60 días *post*-inoculación de PPDb. Mientras que el test de IFN- $\gamma$  puede repetirse en este período sin ver afectada su sensibilidad.

### **7.2. Objetivos**

- 7.2.1. Evaluación de la desensibilización provocada por el uso de plazos inadecuados en la realización de la prueba de tuberculina cervical simple.
- 7.2.2. Evaluación del comportamiento de la prueba de IFN- $\gamma$  con animales desensibilizados por no respetar los plazos adecuados entre las pruebas de tuberculina.

### **7.3. Materiales y métodos**

#### **7.3.1. Selección de animales**

Para esta etapa se utilizaron animales provenientes de establecimientos lecheros infectados con *M. bovis* de los departamentos de Rocha y Florida, que presentaban una prevalencia de reactivos de 3% al inicio del experimento. La población a estudiar se constituía por aquellos animales clasificados como positivos a tuberculosis bovina identificados a partir de los procedimientos de rutina de la vigilancia epidemiológica en tambos según protocolos de diagnóstico oficiales. Sobre esta población se realizó un muestreo aleatorio simple para seleccionar un total de 32 bovinos hembras adultas (mayores de 2 años), principalmente de la raza Holando y en menor cantidad Jersey. Durante la conformación de la muestra se seleccionó un grupo de animales que fueron mantenidos en calidad de sustitutos frente a eventuales pérdidas de individuos. La cantidad de animales sustitutos fueron el equivalente al 25% del total de la muestra (n=8).

De manera de no afectar el rendimiento de las pruebas evaluadas (test de tuberculina cervical simple y test de IFN- $\gamma$ ), se seleccionaron para el estudio hembras no gestantes, sin registro de parto reciente y sin tratamiento con corticoides. Este criterio de selección se consideró debido a que son factores que, según la literatura, pueden reducir la reacción intradérmica a la PPD, aumentando la probabilidad de presentación de falsos negativos (Snider, 1982; Monaghan *et al.*, 1994; Doherty *et al.*, 1995a; Gormley *et al.*, 2006).

Para evaluar el efecto de la desensibilización a la tuberculina y el rendimiento del test de IFN- $\gamma$  durante este período, se clasificaron los animales en forma aleatoria en 4 grupos de 8 animales cada uno. Durante el período comprendido entre los meses de febrero y septiembre del año 2015 se llevaron a cabo repeticiones del TTCS y IFN- $\gamma$  en diferentes intervalos de tiempo, según se describe en la figura 6.

**Figura 6.**

Esquema del protocolo aplicado en las pruebas de campo para evaluar la sensibilidad del test de TTCS y el rendimiento del test de IFN- $\gamma$ .

		Días				
		0	15	30	45	60
N=32	}	<b>Grupo 1 (n=8)</b>	<b>Grupo 2 (n=8)</b>	<b>Grupo 3 (n=8)</b>	<b>Grupo 4 (n=8)</b>	
TTCC		TTCS	TTCS	TTCS	TTCS	
+ IFN- $\gamma$		+ IFN- $\gamma$	+ IFN- $\gamma$	+ IFN- $\gamma$	+ IFN- $\gamma$	+ IFN- $\gamma$
 Inspección <i>post-mortem</i> ; Histopatología; Cultivo bacteriológico						

Se tomó como día 0 el día de inoculación de PPD durante la realización de la prueba confirmatoria efectuada por veterinarios oficiales del M.G.A.P. (TTCC). Para la realización del test de IFN- $\gamma$  se tomaron muestras de sangre a la totalidad de los animales (n=32) dentro de los 2 días posteriores a la lectura del TTCC (3-5 días *post*-inoculación de PPD).

Luego de la conformación de los 4 grupos, a los animales del grupo 1 se les aplicó el TTCS y el test IFN- $\gamma$  a los 15 días *post*-inoculación de PPD, al grupo 2 a los 30 días, al grupo 3 a los 45 días, mientras que a los animales del grupo 4 se les repitieron las pruebas a los 60 días. La extracción de sangre en cada grupo se realizó el mismo día del TTCS previo a la inoculación de PPD.

Se realizó un seguimiento a la totalidad de los animales del presente estudio hasta la faena, donde se efectuó una inspección *post-mortem* en busca de lesiones macroscópicas compatibles con TBB. A su vez, se tomaron muestras de ganglios linfáticos con y sin lesiones, las que fueron remitidas al laboratorio de DILAVE para realizar un diagnóstico histopatológico y cultivo de *M. bovis*.

### 7.3.2. Test de Tuberculina Cervical Simple (TTCS) y test de IFN- $\gamma$

El test de tuberculina cervical simple en esta etapa del estudio se llevó a cabo siguiendo la misma metodología detallada en el punto 5.3.3 y para el test de IFN- $\gamma$  la metodología planteada en el punto 5.3.4.

En base a los resultados del test de IFN- $\gamma$  del presente estudio, se descartaron las muestras de 4 animales, debido a que no cumplieron con los criterios de validación.

Estas muestras de sangre presentaron una insuficiente viabilidad de las células evidenciada por un valor de DO del mitógeno  $\leq 0,5$ .

### 7.3.3. Inspección *post-mortem*

La inspección *post-mortem* se realizó sobre todos los animales del estudio siguiendo los protocolos establecidos por el decreto 369/983, donde se evaluaron ganglios linfáticos y órganos a través de inspección, palpación y por medio de cortes efectuados para observar el interior de los mismos en busca de lesiones. Los tejidos seleccionados para una evaluación minuciosa fueron aquellos de mayor presentación de lesiones tuberculosas según la literatura: pulmón, pleura, hígado, ganglios linfáticos de la cabeza (retrofaríngeos, sub-mandibular, parotídeo), ganglios linfáticos traqueo-bronquiales, mediastínicos y mesentéricos (Neill *et al.*, 1994; Whipple *et al.*, 1996; Liébana *et al.*, 2008; Canal, 2013; von Gehlen, 2015).

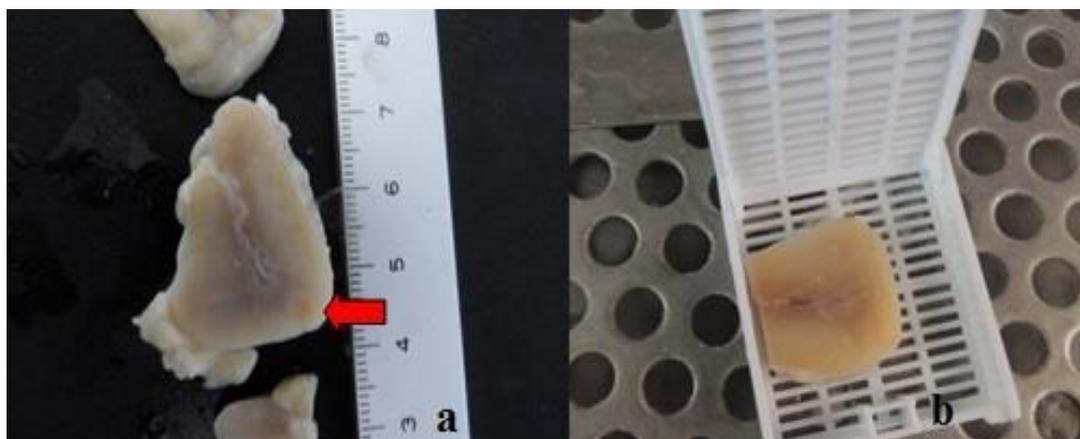
Se tomaron muestras de los ganglios linfáticos mencionados, con y sin lesiones, los que fueron remitidos al laboratorio en caja isotérmica con refrigerantes, de manera de mantener las condiciones necesarias para poder ser procesadas.

### 7.3.4. Diagnóstico histopatológico

Todas las fracciones (muestras) extraídas durante la faena de los animales y remitidas a la sección de histopatología del DILAVE, fueron mantenidas en formol bufferado al 10% por una semana. Posteriormente se revisaron con especial cuidado para que estén contempladas en ellas las lesiones observadas macroscópicamente (Imagen 5). Se identifican y se incluyen en parafina. Una vez que la muestra es incluida en parafina se realizan el corte de la misma a 4 micras. Posteriormente se colorean con hematoxilina y eosina para ser observada al microscopio en busca de evidencia de TBB.

#### **Imagen 5.**

Muestras de ganglios linfáticos con lesiones luego de ser mantenidas en formol y posteriormente reducidas según protocolos de laboratorio (Easton, C. - MGAP).



*a. Muestra de ganglio donde se observa una lesión en el ángulo inferior derecho de la muestra. b. Muestra para proceder a su inclusión en parafina.*

### 7.3.5. Cultivo e identificación de *Mycobacterium bovis*

El cultivo bacteriológico, considerado en el presente estudio como diagnóstico confirmatorio de tuberculosis bovina, fue efectuado en el Laboratorio de Tuberculosis de DILAVE por profesionales especializados en la temática.

#### *Descontaminación de la muestra*

La descontaminación de la muestra se efectuó siguiendo el método del ácido oxálico al 5% (Tacquet *et al.*, 1967), para la cual se utilizaron partes iguales de muestra y descontaminante más una incubación a 37°C durante 15 minutos. Luego de macerada la muestra a través de un medio mecánico de trituración (Stomacher 400), se centrifugó a 2800rpm durante 30 minutos.

#### *Siembra en medios de cultivo*

El sedimento obtenido se sembró en medios selectivos convencionales (*Löwenstein-Jensen* y *Stonebrink*) para el aislamiento de micobacterias. Medios elaborados a base de huevo, glicerina y piruvato de sodio, siguiendo las recomendaciones del Centro Panamericano de Zoonosis, OPS/OMS. Posteriormente las siembras fueron incubadas durante ocho semanas en estufa de cultivo a 37°C, efectuándose una lectura semanal durante ese período para la detección de colonias típicas de *M. bovis*.

#### *Identificación*

La caracterización del microorganismo aislado se implementó teniendo en cuenta las siguientes características: selectividad de medios sembrados, morfología de las colonias, tiempo y temperatura de desarrollo, y cromogenicidad de las mismas. El diagnóstico se complementó a su vez con pruebas bioquímicas, tales como: prueba de niacina, reducción de nitrato, catalasas a temperatura ambiente y a 68°C, telurito de potasio al 0,2 %, hidrólisis de Tween 80 (a los 5 y 10 días), pirazinamidasas y ureasa (Centro Panamericano de Zoonosis OPS/OMS, 1979; Runyon *et al.*, 1980; OIE, 2009).

### 7.3.6. Análisis estadístico

Se utilizó el paquete estadístico STATA 14 para el análisis de los datos obtenidos. Para detectar la existencia de un efecto significativo del uso repetido del test de tuberculina sobre la intensidad de respuesta intradérmica de los animales a la PPD se aplicó un análisis de covarianza. Utilizando un test de regresión lineal se evaluó la variación de la intensidad de la reacción intradérmica en el tiempo cuando el TTCS se aplicó en diferentes periodos.

A su vez, se corrió un test exacto de Fisher con el objetivo de detectar con significancia estadística la existencia de un efecto tiempo (entre repeticiones) sobre el rendimiento del diagnóstico. Utilizado para la prueba de tuberculina y para el test de IFN- $\gamma$ .

## 7.4. Resultados

### 7.4.1. Efecto del uso repetido de las pruebas de tuberculina en cortos períodos sobre la sensibilidad de la técnica.

Luego de seleccionado los animales positivos al TTCC y realizado el test de IFN- $\gamma$ , se conformaron 4 grupos (n=8) a los cuales se les aplicó el TTCS en diferentes períodos, a los 15; 30; 45 y 60 días posteriores al TTCC. De esta forma todos los animales recibieron una segunda inoculación de PPD<sub>b</sub> en diferentes momentos dentro del período de 60 días. Los resultados se muestran en el cuadro IV.

#### Cuadro IV.

Aumento del espesor de piel de bovinos provenientes de rodeos infectados con TBB a los que se les repitió el test de tuberculina intradérmica en diferentes momentos dentro del periodo de desensibilización.

Grupo (n=8)	Primer test <sup>a</sup>		Segundo test <sup>b</sup>	
	PPD <sub>b</sub> (mm)	Positivos <sup>c</sup> (%)	PPD <sub>b</sub> (mm)	Positivos <sup>c</sup> (%)
15 días	6,25 ± 1,30	100 (8/8)	2,00 ± 1,13	12,5 (1/8)
30 días	8,75 ± 7,34	100 (8/8)	6,69 ± 7,84	37,5 (3/8)
45 días	8,50 ± 3,51	100 (8/8)	8,00 ± 4,75	87,5 (7/8)
60 días	16,00 ± 4,90	100 (8/8)	19,50 ± 7,73	100,0 (8/8)

PPD<sub>b</sub>=Derivado proteico purificado bovino

mm=milímetros de espesor de piel medida a las 72 horas post-inoculación de PPD<sub>b</sub>.

<sup>a</sup> Media del grupo en respuesta a PPD<sub>b</sub> del test de tuberculina cervical comparada.

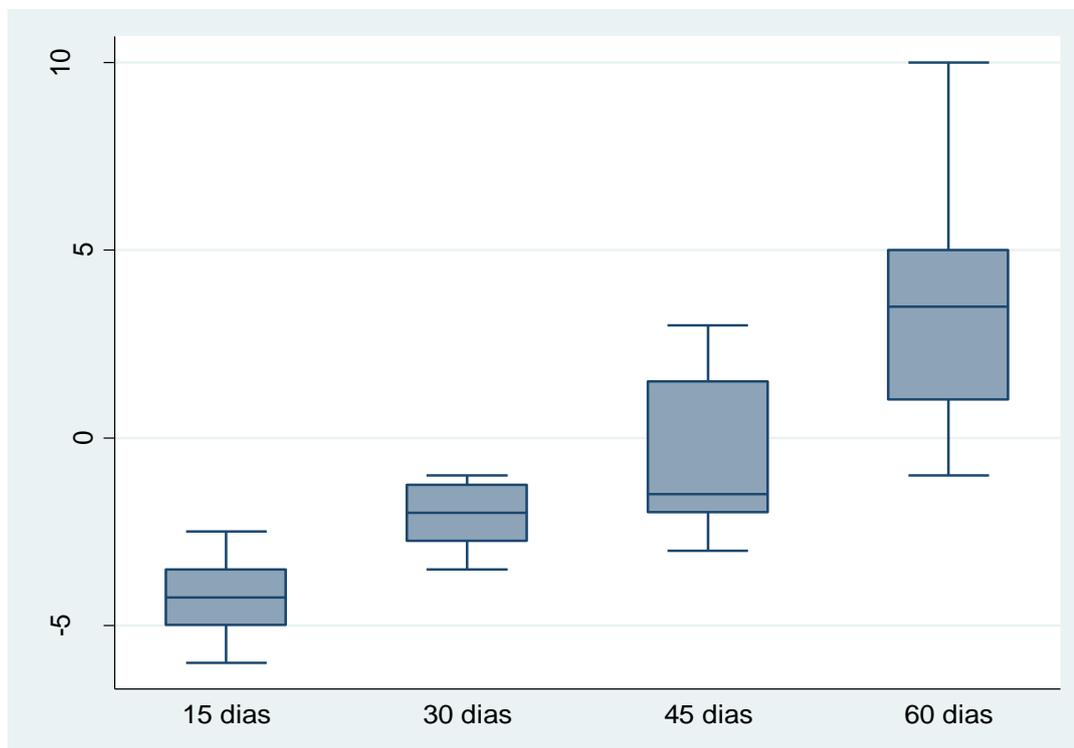
<sup>b</sup> Media del grupo en respuesta a PPD<sub>b</sub> del test de tuberculina cervical simple.

<sup>c</sup> Punto de corte utilizado: Positivo=aumento de espesor de piel  $\geq 4$ mm. Número de animales en paréntesis.

Se observó una reducción en la media de los valores de espesor de piel cuando el test de tuberculina se repitió dentro de los 15, 30 y 45 días, en comparación con la respuesta obtenida en el primer test. Debido a que en la primera inoculación de tuberculina (día 0) existieron diferencias significativas entre los grupos en cuanto a la reacción intradérmica a la PPD, se corrió un test de covarianza utilizando como covariable continua para los grupos la medición del espesor del piel al día 0, para corregir el error y ajustar por las diferencias iniciales. Se constató así que la repetición del test de tuberculina en periodos cortos afectó significativamente la respuesta a la PPD ( $p = 0,0006$ ). La reducción del espesor de piel fue significativa cuando el segundo test se aplicó a los 15 y 30 días. Tal como muestra el cuadro IV, en el grupo de animales donde el test se repitió a los 15 días, la media del espesor de piel disminuyó 4,25mm en comparación al primer test. Cuando se comparó la reacción intradérmica al día 15 con las respuestas obtenidas cuando el TTCS se aplicaba en plazos cada vez más largos, se observó que en la medida que nos alejamos del día de la primera inoculación de PPD<sub>b</sub>, la reacción va en aumento. Esta tendencia se ve reflejada en el gráfico 3.

### Gráfico 3.

Influencia del uso repetido del test de tuberculina sobre la intensidad de respuesta a la PPD<sub>b</sub> en bovinos provenientes de rodeos naturalmente infectados.



*Diferencia en la intensidad de la respuesta intradérmica (mm) a la PPD<sub>b</sub> obtenida cuando se comparan las medias de los valores del segundo test con el primero. La prueba de tuberculina se repitió, según el grupo (n=8), luego de transcurridos 15, 30, 45 y 60 días del primer test.*

Esta reducción significativa en la intensidad de respuesta a la tuberculina que se constató hasta los 30 días, determinó que algunos animales que inicialmente se clasificaron como positivos, fueron negativos frente a un segundo test. Tal como lo muestra el cuadro IV, cuando la prueba de tuberculina se repitió en plazos cortos y se utilizó un punto de corte  $\geq 4$ mm de aumento de espesor de piel, la reducción en la respuesta a la PPD<sub>b</sub> determinó que la proporción de individuos positivos disminuyera, con valores de 12,5%, 37,5% y 87,5%, para las repeticiones a los 15, 30 y 45 días, respectivamente. Utilizando el test exacto de Fisher se determinó con una significancia estadística ( $p=0,001$ ) que el diagnóstico se vio afectado por el tiempo transcurrido entre el primer y el segundo test. Así, cuanto más corto fue el plazo entre ambas pruebas, menor fue la capacidad del test para detectar animales positivos.

En base a los resultados del cultivo, donde se confirmó la infección en 21 bovinos, se observó que la repetición de la prueba de tuberculina a los 15 días determinó la aparición de 7 resultados falsos negativos, a los 30 días un total de 2 falsos negativos, mientras que cuando se repite la técnica a los 45 días, solo un animal negativo se encontraba verdaderamente infectado.

### 7.4.2. Rendimiento del primer test de IFN- $\gamma$

Los animales en estudio fueron seleccionados debido a que resultaron positivos a un diagnóstico en serie con el TTACS y TTCC. Sobre esta población de bovinos aparentemente infectados (n=32) se tomaron muestras de sangre luego de la lectura del TTCC (3-5 días post-inoculación de PPD) para realizar el test de IFN- $\gamma$  a la totalidad de los animales en estudio. En el cuadro V se muestra el rendimiento que se obtuvo con esta técnica *in-vitro*.

#### Cuadro V.

Resultados de diagnóstico *in-vitro* y *post-mortem* en bovinos positivos (n=32) al test de tuberculina cervical comparativa.

	Cultivo		Histopatología		Lesiones (faena)		
	(+)	(-)	(+)	(-) <sup>b</sup>	(+) <sup>c</sup>	(-)	
IFN- $\gamma$ <sup>a</sup>	(+)	20	4	18	6	19	5
	(-)	1	7	1	7	4	4

<sup>a</sup> Punto de corte utilizado: Positivo=DO PPD<sub>b</sub>-DO PPD<sub>a</sub>≥0,1 y DO PPD<sub>b</sub>-DO Nil≥0,1

<sup>b</sup> 4 de las muestras analizadas fueron abscesos inespecíficos, los que se consideraron como negativos.

<sup>c</sup> 4 animales con lesiones en faena fueron diagnosticados por histopatología como abscesos inespecíficos.

Un total de 24 animales fueron positivos al test de IFN- $\gamma$ , resultando en una coincidencia de 75% con el TTCC. Con el objetivo de mejorar la capacidad de detección de animales positivos con esta prueba *in-vitro* se utilizó el siguiente punto de corte para los valores de DO de IFN- $\gamma$  obtenidos: positivo=DO PPD<sub>b</sub> > DO PPD<sub>a</sub> y DO PPD<sub>b</sub> > DO Nil. Este criterio permitió aumentar el número de animales reaccionantes, con un total de 27 resultados positivos. La razón por la cual los 5 animales restantes mantuvieron los resultados negativos es que registraron valores altos de DO de IFN- $\gamma$  en la sangre estimulada con PPD<sub>a</sub>, mayores que en la sangre estimulada con PPD<sub>b</sub>. A su vez, a pesar de haber utilizado puntos de corte para aumentar la sensibilidad de la técnica, se constató igualmente la presencia de un animal negativo, en el cual posteriormente se aisló el *M. bovis* (falso negativo).

En función de las pruebas de diagnóstico *post-mortem* se encontró que de los 32 animales positivos a las pruebas de tuberculina (TTACS y TTCC en serie), 9 (28,1%) no presentaron lesiones visibles compatibles con TBB durante la inspección en faena. Sobre los resultados del cultivo bacteriológico, se confirmó la infección por *M. bovis* en 21 animales (65,6%) y en los 11 restantes (34,4%) no se logró aislar el agente. Esto permitió evaluar el rendimiento de la inspección en faena y del estudio histopatológico de las muestras remitidas al laboratorio, donde se detectaron 2 animales verdaderamente infectados (cultivo positivo) que obtuvieron resultados negativos a ambas pruebas de diagnóstico *post-mortem*.

En este experimento al utilizar animales provenientes de predios infectados, con resultados positivos a las pruebas de tuberculina, no podemos descartar la enfermedad en aquellos individuos en los que no se logró aislar el *M. bovis*. Sin embargo, a los

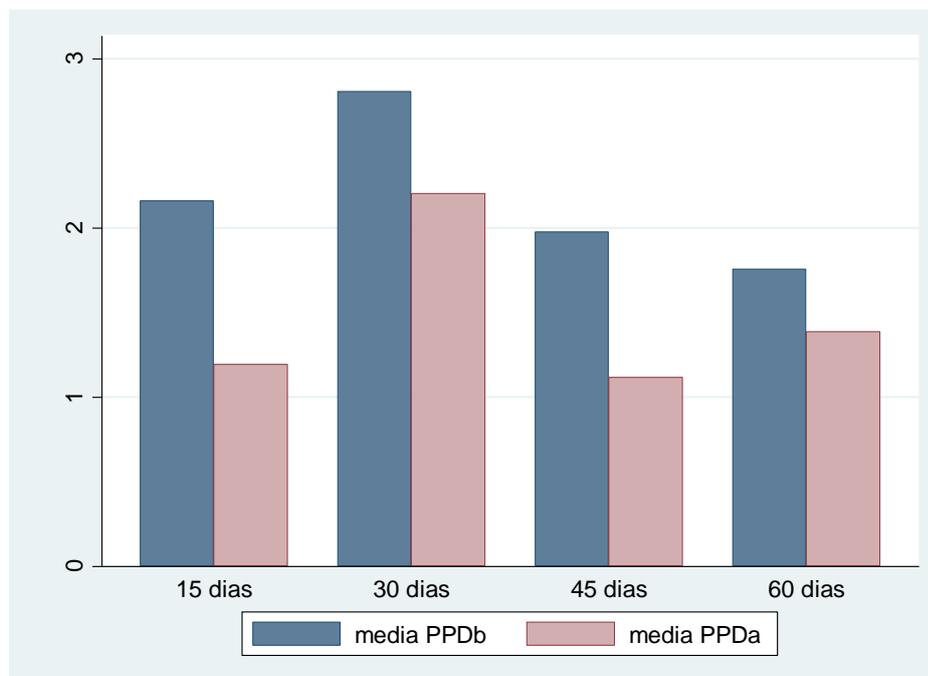
efectos de evaluar el rendimiento obtenido con las pruebas de campo tradicionales en comparación con el test de IFN- $\gamma$ , se utilizó el siguiente criterio de diagnóstico: (a) animal infectado fue aquel en el cual se aisló el *Mycobacterium bovis* a través del cultivo bacteriológico; (b) animal sano fue aquel que dio negativo al cultivo bacteriológico, negativo a histopatología y no presentó lesiones específicas de tuberculosis durante la inspección *post-mortem*. Considerando como negativos a los 4 animales con abscesos inespecíficos en faena (confirmado por histopatología), los resultados mostraron un total de 21 animales enfermos y 11 sanos. En este sentido, el test de IFN- $\gamma$  obtuvo una sensibilidad y especificidad de 95,2% y 63,6%, respectivamente ( $p=0,001$ ), con un solo animal clasificado erróneamente como negativo. A su vez, un total de 7 animales que se encontraban sanos fueron correctamente clasificados como negativos con el test *in-vitro*, pero fueron diagnosticados como infectados con las pruebas de tuberculina (falsos positivos).

### 7.4.3. Rendimiento del segundo test de IFN- $\gamma$ utilizado en diferentes plazos dentro de los 60 días posteriores al test de tuberculina.

Luego de la aplicación del TTCC y test de IFN- $\gamma$  el día 0, se colectó una segunda muestra de sangre a cada animal para la medición del IFN- $\gamma$  en 4 momentos diferentes según el grupo de animales ( $n=8$ ): 15 días; 30 días; 45 días y 60 días *post*-inoculación de tuberculina. El gráfico 4 indica como varió la producción de IFN- $\gamma$  en el tiempo luego de aplicado el TTCC sobre muestras de sangre estimuladas con tuberculina bovina (PPDb) y aviar (PPDa).

#### Gráfico 4.

Producción de IFN- $\gamma$  en respuesta a la PPDb y PPDa registrado durante la repetición del test *in-vitro* en diferentes momentos dentro de los 60 días *post*-TTCC.



*DO* = Densidad óptica de IFN- $\gamma$ .

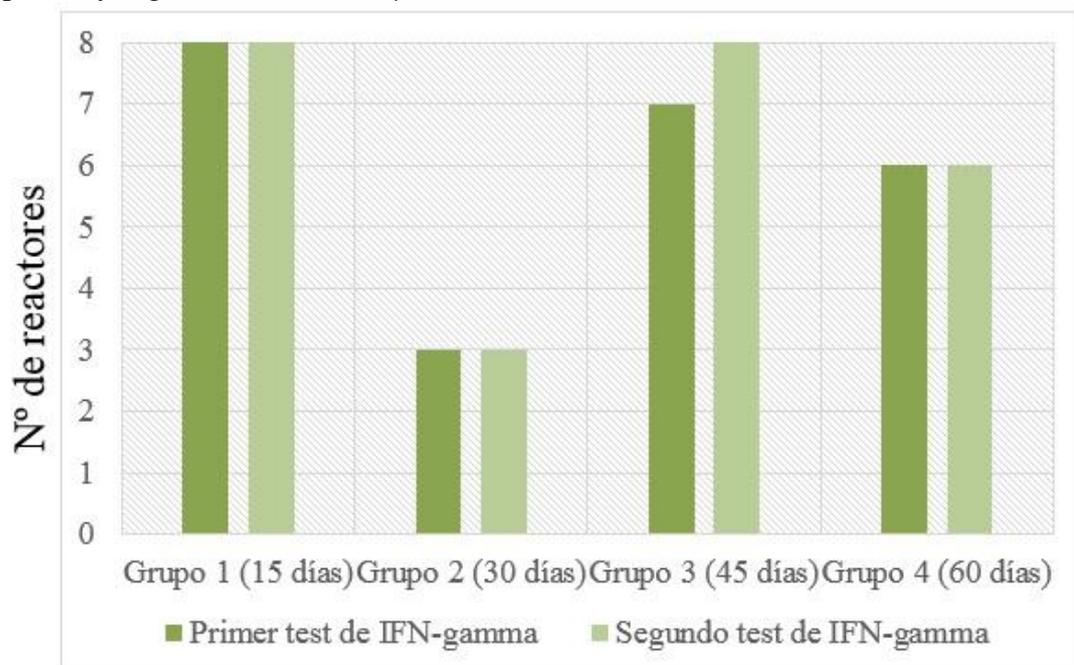
*PPDb* = Derivado proteico purificado bovino.

*PPDa* = Derivado proteico purificado aviar.

Al comparar las medias entre los grupos, se registraron diferencias en los valores de DO IFN- $\gamma$ . Los animales a los cuales se les realizó una segunda prueba de IFN- $\gamma$  a los 30 días *post*-TTCC presentaron la mayor concentración de IFN- $\gamma$  (DO PPDb:  $2,806 \pm 1,087$  y DO PPDa:  $2,203 \pm 1,352$ ). A su vez, la producción de IFN- $\gamma$  varió de forma similar en el tiempo, tanto en la sangre estimulada con PPDb como con PPDa, manifestando un pico al día 30 seguido por una caída a los 45 y 60 días *post*-TTCC. Cabe destacar que la media de IFN- $\gamma$  en todos los grupos se mantuvo, a lo largo de los diferentes puntos de muestreo, en un valor de DO PPDb - DO PPDa  $> 0,1$ . Sin embargo, al aplicar un test de ANOVA de una vía no se detectaron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos. Tampoco se encontraron diferencias significativas cuando se corrió, en cada grupo de animales, un test de Student para muestras pareadas con el objetivo de comparar las medias de los valores de DO obtenidos en el primer y segundo test de IFN- $\gamma$ .

Para detectar un efecto del tiempo sobre el rendimiento del segundo test de IFN- $\gamma$  se utilizó el test exacto de Fisher. A diferencia de la prueba de tuberculina, la repetición de la prueba *in-vitro* en los diferentes intervalos de tiempo evaluados no disminuyó su capacidad para detectar animales positivos ( $p=0,006$ ), tal como se muestra en el gráfico 5. A pesar de la variabilidad que presentó la producción de IFN- $\gamma$  en diferentes puntos de muestreo, el diagnóstico inicial que se obtuvo al día 0 fue el mismo en un segundo test para todos los animales, excepto en uno, el cual revirtió su diagnóstico de negativo a positivo cuando se repitió la prueba a los 45 días *post*-TTCC. Destacando que en dicho animal se confirmó posteriormente la infección por cultivo bacteriológico.

**Gráfico 5.** Comparación de la capacidad de detección de animales infectados entre el primer y segundo test de IFN- $\gamma$ .



## 8. DISCUSIÓN

### 8.1. Evaluación de la especificidad de las pruebas de diagnóstico para la tuberculosis bovina.

Uno de los objetivos del presente estudio fue evaluar la aplicabilidad del test de detección y medición *in-vitro* de IFN- $\gamma$  como una técnica alternativa a las pruebas de tuberculina utilizadas tradicionalmente en el diagnóstico de la TBB. En cuanto al rendimiento individual es aceptado a nivel internacional que el test de IFN- $\gamma$  cuenta con una mayor especificidad y una sensibilidad al menos similar que la prueba de tuberculina simple (Wood *et al.*, 1992; González Llamazares *et al.*, 1999; de la Rúa-Domenech *et al.*, 2006; Gormley *et al.*, 2006; Schiller *et al.*, 2010b).

Wood *et al.* (1991), en una extensa investigación evaluaron y compararon la sensibilidad y especificidad del TTACS y del test de IFN- $\gamma$  sobre más de 6000 bovinos provenientes de rodeos infectados y de rodeos sin historia de TBB. Los datos obtenidos en rodeos libres de TBB, utilizando diferentes puntos de corte, revelaron valores de especificidad entre 96,2% y 98,1%, con un porcentaje de resultados falsos positivos entre 1,9% y 3,8%. Por su parte, Ryan *et al.* (2000), utilizando el mismo punto de corte que se aplicó en la actual investigación (positivo = DO PPD<sub>b</sub> - DO PPD<sub>a</sub>  $\geq$  0,1 y DO PPD<sub>b</sub> - DO Nil  $\geq$  0,1), encontraron un valor de especificidad para el test de IFN- $\gamma$  de 93%. Aunque con un tamaño de muestra mayor, estos resultados van en línea con la especificidad encontrada para esta prueba *in-vitro* en el presente experimento, la cual si bien no es la ideal, sí se consideró como una especificidad alta. Sin embargo,

En referencia a las pruebas simples de tuberculina existen variadas investigaciones científicas que evaluaron su rendimiento para el diagnóstico de TBB. En particular para el TTCS, se han descrito valores de especificidad entre 75 y 99%. Mientras que el test simple ano-caudal registró valores entre 96 y 98,8% (Monaghan *et al.*, 1994; de la Rúa-Domenech *et al.*, 2006; Vordermeier *et al.*, 2008). En el meta-análisis realizado por Farnham *et al.* (2012), basado en datos científicos de Estados Unidos, encontraron valores similares para el TTACS (89,2 y 95,2%). Como dato complementario, Errico *et al.* (1989), en un estudio comparativo entre ambas pruebas de tuberculina desarrollado en Uruguay, constataron que el pliegue ano-caudal como sitio de inoculación de PPD resultó ser más específico que la tabla del cuello. Los resultados encontrados en la presente investigación indicaron que aplicando cualquiera de las pruebas de tuberculina evaluadas (TTACS y TTCS) para el diagnóstico de tuberculosis bovina se logró una especificidad ideal, con un mayor rendimiento comparado con la prueba *in-vitro*. Resultado fuera de lo esperado según los reportes internacionales (Wood *et al.*, 1992; de la Rúa-Domenech *et al.*, 2006; Schiller *et al.*, 2010). Sin embargo, para confirmar estos valores, correspondería realizar pruebas confirmatorias, que debido al costo que implicaba, no se llevaron a cabo en este trabajo.

## 8.2. Influencia del uso repetido de las pruebas simples de tuberculina sobre su especificidad.

La inoculación del derivado proteico purificado en forma repetida durante el uso de las pruebas de tuberculina determina que el sistema inmune del animal se vea expuesto constantemente a esta molécula antigénica, con una posible diferenciación de linfocitos T a linfocitos Th1 con memoria. En consecuencia, es esperable la aparición de resultados falsos positivos y una disminución de la especificidad de la técnica.

En su mayoría los trabajos científicos dirigidos a evaluar el efecto del uso repetido de las pruebas de diagnóstico para la tuberculosis bovina se han enfocado sobre animales infectados con *M. bovis*, ya sea naturalmente o en forma experimental. En este sentido, ya fueron mencionados los hallazgos de diferentes investigadores que demostraron la presencia de un efecto de desensibilización a la tuberculina en animales cuando las pruebas se repiten en periodos cortos (Radunz & Lepper, 1985; Doherty *et al.*, 1995; Thom *et al.*, 2006), incluso hay quienes afirman que este efecto puede permanecer aún luego de transcurridos 60 días del último test (Schneider *et al.*, 2007; Coad *et al.*, 2010). Sin embargo, poco se sabe del comportamiento de las pruebas de tuberculina cuando son utilizadas en forma repetida sobre animales que se encuentren libres de la enfermedad. No se han encontrado estudios que evalúen el posible efecto de sensibilización de los animales a la PPD cuando es inoculada reiteradamente y en plazos cortos, hecho que motivó la realización del actual experimento.

En una investigación de similares características llevada a cabo por Thom *et al.* (2004), utilizaron 6 terneros entre 3 y 4 meses de edad provenientes de rodeos libres de tuberculosis bovina (sin historia de reaccionantes). Estos animales fueron también sometidos a sucesivas repeticiones del test de tuberculina, en este caso utilizando el test comparativo (TTCC), con intervalos de 60 días entre pruebas, semana 0, 8, 16, 24 y 32. Bajo este diseño no observaron diferencias significativas entre las respuestas a la PPD medida en milímetros de espesor de piel entre la semana 0 y la 32. En dicho estudio se desestimó la aparición de animales positivos debido a que el objetivo que perseguían era evaluar el rendimiento del diagnóstico luego de una infección experimental con *M. bovis*. Sin embargo, registraron animales con reacciones de 3 y 4mm en respuesta a la PPDb luego de cuatro repeticiones de la prueba. Con algunas diferencias como el test utilizado, la cantidad y la edad de los animales seleccionados, en el presente experimento tampoco se encontró una tendencia de aumento en la respuesta a la PPDb a medida que se aumentó el número de repeticiones. Por otra parte, sí se observaron diferencias significativas en el espesor de piel entre las repeticiones del TTCS, indicando que cuando se realizó 6 veces consecutivas este test, con intervalos de 60 días entre pruebas, los animales presentaron un aumento significativo en la reacción intradérmica a la tuberculina. Esto podría estar indicando un posible efecto de sensibilización de los animales a la PPDb. A pesar de este hallazgo, el aumento de la respuesta en los animales no implicó la aparición de resultados positivos luego de 6 repeticiones, con lo cual se puede sugerir que la especificidad de la técnica no disminuyó por esta práctica. Sin embargo, tampoco se descarta el supuesto de que este parámetro pueda disminuir si se siguen realizando más repeticiones del test. Por esta razón, serían de gran valor futuros estudios que evalúen este efecto sobre un período más prolongado, acompañado de técnicas complementarias que estudien el posible estímulo sobre la respuesta inmune, como es el caso del test de IFN- $\gamma$ .

En cuanto al otro test de tuberculina evaluado en esta investigación (TTACS) era esperable que el efecto de sensibilización de los animales a la tuberculina fuera menor, o no se presentara, ya que se asume que la prueba cervical simple tiene una mayor capacidad para detectar animales positivos (Francis *et al.*, 1978; Schiller *et al.*, 2010b; Farnham *et al.*, 2012) y una menor especificidad que el TTACS (Errico *et al.*, 1989). Tan sólo un animal reaccionó positivamente a la tuberculina luego de la tercera ronda del test, positividad que desapareció en las sucesivas rondas que recibió ese animal. Por tal motivo, se consideró este hallazgo como un error durante la maniobra de inoculación de la PPD<sub>b</sub>, donde probablemente se haya generado una reacción inflamatoria local inespecífica. Los resultados sugieren que, al igual que el TTCS, el uso repetido de la prueba ano-caudal con intervalos de 60 días entre pruebas no provocaría un estado de sensibilidad a la PPD<sub>b</sub> en los animales y, por lo tanto, no afectaría la especificidad de la prueba cuando ésta se utiliza al menos 6 veces consecutivas.

### **8.3. Rendimiento de las pruebas de tuberculina y del test de IFN- $\gamma$ utilizados en animales provenientes de rodeos naturalmente infectados.**

Para esta etapa se manejó un escenario basado en la realidad de la vigilancia epidemiológica a nivel de campo en Uruguay, partiendo de una población de bovinos positivos a la prueba presuntiva TTACS y al test confirmatorio (TTCC). Sobre estos animales provenientes de rodeos naturalmente infectados se evaluó el rendimiento del test de IFN- $\gamma$  cuando se utiliza dentro de un periodo en el cual las pruebas de tuberculina no son eficaces para detectar la infección. Buscando de esta forma constatar características beneficiosas para utilizar esta técnica *in-vitro* como alternativa para el saneamiento de predios focos en el país.

Wood *et al.* (1991), evaluando la sensibilidad de las pruebas, obtuvieron mejores rendimientos a través del test IFN- $\gamma$  comparado con el TTACS, registrando un máximo de sensibilidad de 93,6% utilizando el siguiente criterio para clasificar un animal positivo: DO PPD<sub>b</sub> > NIL y DO PPD<sub>b</sub> > PPD<sub>a</sub>. Ryan *et al.* (2000), partiendo de una población de animales positivos a las pruebas de tuberculina (n=163), encontraron una sensibilidad para el test de IFN- $\gamma$  de 85%, ya sea aplicando una interpretación estándar (DO PPD<sub>b</sub> – DO PPD<sub>a</sub>  $\geq$  0,1 y DO PPD<sub>b</sub> - NIL  $\geq$  0,1) o una más sensible (DO PPD<sub>b</sub> – DO PPD<sub>a</sub>  $\geq$  0,1). De aquí se desprende la propiedad que tiene este test *in-vitro* que permite mejorar fácilmente tanto la sensibilidad como la especificidad al modificar los criterios que definen la positividad en un animal (Wood *et al.*, 1991). Efectivamente, cuando se aplicó en el actual trabajo un punto de corte dirigido a aumentar la sensibilidad del test, se logró mejorar su capacidad para detectar animales positivos. Sin embargo, los valores altos de IFN- $\gamma$  en sangre estimulada con PPD<sub>a</sub> que presentaron algunos animales no permitió mejorar aún más la detección, a pesar de haber utilizado la interpretación más sensible de las descritas en la literatura: positivo = DO PPD<sub>b</sub> > Nil y DO PPD<sub>b</sub> > PPD<sub>a</sub> (Wood *et al.*, 1991). Esta reacción mayor a la PPD<sub>a</sub> que presentaron algunos animales pudo deberse a la presencia de una co-infección de *M. bovis* con otras micobacterias ambientales, incluyendo el agente causal de la Paratuberculosis Bovina (*Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis) (de la Rúa-Domenech *et al.*, 2006), o una co-infección con enfermedades víricas que

podieran provocar una linfocitosis en los animales, como es el caso de la Leucosis Bovina. Estas enfermedades, que están presentes en el país, pueden disminuir la sensibilidad del test de IFN- $\gamma$  al clasificar animales como negativos a pesar de estar infectados con *M. bovis*. Con lo cual, se sugiere a esta asociación como una posible causa que explica la clasificación errónea de un animal verdaderamente infectado como negativo al test de IFN- $\gamma$ . En este sentido, son necesarias futuras investigaciones dirigidas a evaluar la utilidad de antígenos específicos que ya han demostrado ser capaces de diferenciar animales infectados por *M. bovis* con una mayor especificidad, como es el caso de ESAT-6; CFP-10 (Boddle *et al.*, 2001, Vordermeier *et al.*, 2002) y recientemente el Mb2845c (Eirin *et al.*, 2015).

La ventaja que posee la prueba *in-vitro* de manipular en forma sencilla el punto de corte puede ser utilizada como herramienta durante las actividades de vigilancia epidemiológica, siempre teniendo presente que cuando se maximiza la capacidad de detección de animales infectados la especificidad del test se ve comprometida por un aumento de falsos positivos, y viceversa cuando se busca mejorar la detección de animales sanos (Casal, 2016). Así, en etapas iniciales de la campaña, donde el objetivo del programa es maximizar la sensibilidad del diagnóstico, se puede elegir el criterio evaluado por Wood *et al.* (1991): DO PPD<sub>b</sub> > Nil y DO PPD<sub>b</sub> > PPD<sub>a</sub>. Por el contrario, en escenarios donde los falsos positivos pueden implicar pérdidas económicas innecesarias, se puede utilizar la prueba de tuberculina combinada con el test de IFN- $\gamma$  y aplicar un criterio de positividad más estricto, como el utilizado en el presente experimento (DO PPD<sub>b</sub> - Nil  $\geq$  0,1 y DO PPD<sub>b</sub> - PPD<sub>a</sub>  $\geq$  0,1), mejorando de esta forma la especificidad y el VPP del diagnóstico.

En cuanto al test de tuberculina comparativa los valores que se han registrado, para una interpretación individual, rondan entre 55,1-100% de sensibilidad y 88,8-100% de especificidad (de la Rúa-Domenech *et al.*, 2006; Vordermeier *et al.*, 2008). Es considerada como la técnica más específica para el diagnóstico de TBB según la opinión de científicos europeos (EFSA, 2012). A su vez, cuando se evaluó en forma combinada con el TTACS, con una interpretación en serie, se logró minimizar la proporción de animales falsos positivos, alcanzando una especificidad global de 98% (Farnham *et al.*, 2012).

En función de resultados obtenidos con las técnicas de diagnóstico *post-mortem* en el presente experimento, se observó una alta proporción de animales positivos a la prueba comparativa no presentaron lesiones visibles en faena ni se logró aislar el bacilo de la tuberculosis. Datos que fueron esperables debido a los hallazgos de investigaciones nacionales e internacionales donde se encontró que una alta proporción de animales positivos a las pruebas de tuberculina fueron luego clasificados como animales sin lesiones visibles (SLV) durante la faena, lo que a su vez disminuye la probabilidad de detectar el *M. bovis* por cultivo. Liébana *et al.* (2008), encontraron que el 44,5% de bovinos reaccionantes a las pruebas de tuberculina, no presentaron lesiones visibles en la carcasa. Mientras que en Uruguay, von Gehlen (2015), en un estudio sobre una población cercana a 3.000 bovinos aparentemente infectados (positivos al TTACS y TTCC en serie) detectó que el 75,5% fueron clasificados como SLV. Esto se debe a que está generalmente aceptado que la sensibilidad de la detección de lesiones macroscópicas en faena es muy baja, en el entorno del 28,5% (Schiller *et al.*, 2010b). Esto se debe, por un lado, a que el complejo primario en numerosas oportunidades puede pasar inadvertido a la inspección si esta no es detallada y minuciosa (Canal,

2013). Por otra parte, el tiempo transcurrido desde que un bovino se infecta hasta que se logra detectar en faena, es muy largo (Wells *et al.*, 2015), razón por la cual la inspección *post-mortem* por sí sola difícilmente sea capaz de detectar en forma temprana animales enfermos (Kaneene *et al.*, 2006). Teniendo en cuenta que el presente experimento se realizó sobre animales positivos provenientes de rodeos infectados y que las pruebas de tuberculina en el experimento 1 demostraron ser altamente específicas, se puede deducir que el TTCC permitió la detección de la infección en forma temprana, antes de que se desarrollaran lesiones en el organismo y dificultando así el aislamiento del *M. bovis* por cultivo, en cuyo caso se pueden considerar estos resultados como beneficiosos para el programa de erradicación de la TBB. Cuando se utilizó el test de IFN- $\gamma$  sobre los animales positivos al TTCC, no todos fueron clasificados como infectados. A pesar de estos resultados, el diseño de este experimento no permitió comprobar que este test *in-vitro* haya tenido una menor capacidad de detección de la enfermedad, o que el TTCC detecta la enfermedad en forma más temprana. Para ello en futuras investigaciones sería adecuado evaluar el comportamiento de ambas pruebas sobre los mismos animales.

Por otra parte, tomando como base los resultados de las pruebas de diagnóstico directo para definir un animal infectado (aquel en el cual se aisló el *M. bovis* a través del cultivo bacteriológico) y animal sano (aquel que presentó resultados negativos al cultivo bacteriológico, al análisis histopatológico y no presentó lesiones específicas de tuberculosis durante la inspección *post-mortem*), se evaluó el rendimiento del TTCC y del test de IFN- $\gamma$  utilizando un enfoque diferente. Bajo este supuesto la prueba de tuberculina comparativa presentó una alta proporción de resultados falsos positivos comprometiendo así la especificidad del test, contrario a lo informado por Farnham *et al.* (2012). Por su parte, el test IFN- $\gamma$  evaluado en forma individual resultó ser más específico que el TTCC, con un menor número de falsos positivos y una mayor capacidad de detección de animales verdaderamente sanos, a diferencia de lo comunicado por EFSA (2012). Sin embargo, a pesar de este mayor rendimiento, ya fue mencionado que la prueba *in-vitro* clasificó como negativo a un animal que se encontraba infectado, confirmado por cultivo bacteriológico. Por lo tanto, teniendo presente el objetivo del programa de control y erradicación de la TBB, se debe tomar este hallazgo como no deseado.

#### **8.4. Influencia del uso repetido del test de tuberculina en cortos períodos sobre la sensibilidad de la técnica.**

Cuando evaluamos el uso repetido de las pruebas de tuberculina en cortos períodos es bien conocido el efecto de desensibilización a la PPD que ocurre dentro de los 60 días seguidos a una primera inoculación. Los primeros en detectar este fenómeno fueron los investigadores Radunz & Lepper (1985), quienes demostraron que animales infectados en forma experimental con *M. bovis* y TTACS-positivos, desarrollaban una reacción intradérmica inferior frente a un segundo test (TTCC) efectuado a los 4 y 7 días posteriores. Cuando estos animales fueron re-testados transcurridos 60 días en la mayoría este efecto negativo desapareció, volviendo a la sensibilidad original. Una década más tarde, el efecto de desensibilización vuelve a demostrarse por Doherty *et al.* (1995), en este caso sobre bovinos infectados en forma natural, TTACS-positivos. Constataron que la práctica de repetir el TTCC con un intervalo de 7 días disminuyó la respuesta de los animales a la PPD<sub>b</sub> y PPD<sub>a</sub> frente al segundo test, reduciendo significativamente la sensibilidad de la prueba. En dicho experimento los

investigadores asociaron dicha disminución con una menor capacidad proliferativa de los linfocitos T, demostrada *in-vitro*, aunque observaron que la producción de IFN- $\gamma$  *in-vitro* no se vio afectada. Los hallazgos sugieren que el uso repetido de estas pruebas de campo en cortos periodos reduciría su capacidad para detectar efectivamente la infección por *M. bovis*. Reafirmando estos conceptos, Thom *et al.* (2006), luego de aplicar 2 repeticiones del TTCC, con intervalos de 60 días entre pruebas, constataron que todos los animales que fueron positivos en el primer test también lo fueron durante el segundo. Demostrando así que la sensibilidad del TTCC se mantiene si la prueba se repite luego de 2 meses.

Por otra parte, Coad *et al.* (2010), respetando el periodo de desensibilización, evaluaron el efecto del uso repetido del TTCC en animales naturalmente infectados aplicado a intervalos de 60 días entre pruebas. Bajo este diseño observaron que luego de 4 repeticiones del test se generaba un aumento progresivo del efecto de desensibilización, con reacciones a la PPD cada vez menores. Destacaron este hallazgo como de importancia en aquellas situaciones donde se generan resultados inconclusos luego del TTCC y se procede a repetir la prueba luego de 60 días, lo que favorecería a la presentación de falsos negativos. Estos resultados coinciden con lo encontrado años antes por Thom *et al.* (2004), quienes observaron en terneros experimentalmente infectados que un segundo TTCC a los 2 meses de aplicado el primero disminuía la respuesta a la PPD en forma significativa. La sensibilidad de la técnica se vio reducida con la aparición de animales falsos negativos. A nivel regional, Schneider *et al.* (2007), llevaron a cabo una investigación en Argentina con animales naturalmente infectados donde, a diferencia de los anteriores investigadores, evaluaron el efecto del uso repetido del TTACS con intervalos de 60 días entre pruebas. Si bien la sensibilidad del diagnóstico no se vio afectada luego de 3 repeticiones, observaron sí que el tamaño de las reacciones intradérmicas en el pliegue ano-caudal fue cada vez menor con la sucesión de las pruebas. Estos trabajos sugirieron que el período de desensibilización, indicado por Radunz & Lepper (1985), podría ser algo más extenso que los 60 días.

En el presente experimento se seleccionaron animales naturalmente infectados que fueron detectados por las pruebas de campo de rutina del programa nacional para el control y la erradicación de la TBB. Sobre estos animales se evaluó el rendimiento de la prueba de tuberculina en diferentes puntos dentro del periodo de desensibilización descrito anteriormente. En este caso se evaluó la sensibilidad del test de tuberculina cervical simple (TTCS) cuando la misma se utiliza en plazos inadecuados. La reacción intradérmica de los animales frente a una segunda inoculación de PPD<sub>b</sub> disminuyó a partir del día 15 y describió en los sucesivos días estudiados una tendencia de aumento de dicha respuesta. Se demostró la existencia de un efecto de desensibilización a la tuberculina que fue significativo hasta los 30 días *post*-inoculación de la primera PPD. Mientras que la sensibilidad se vio afectada incluso cuando el TTCS se aplicó luego de 45 días, con la presentación de un animal falso negativo.

La sensibilidad inicial de los animales a la tuberculina retornó transcurridos 60 días, coincidiendo con el período reportado por Radunz & Lepper (1985) y Doherty *et al.* (1995). Cuando la prueba se aplicó a los 60 días, la media del espesor de piel en respuesta a la PPD<sub>b</sub> fue mayor que en el primer test. La explicación puede estar en que este grupo de animales registró al día 0 una media para la reacción intradérmica de 16mm, aproximadamente el doble de lo registrado en los demás grupos. Esto podría estar indicando que los animales que conformaban dicho grupo presentaban una

infección más intensa que los demás o una enfermedad en etapas más avanzadas. Otra explicación plausible es el tipo de prueba utilizada. La primera inoculación de tuberculina fue a través de la prueba comparativa, al inicio del experimento. En ese momento se expuso a los animales, no solo a la PPD<sub>b</sub>, sino que también a PPD<sub>a</sub>, provocando una posible dilución de la respuesta intradérmica. En tal sentido, al utilizar en una segunda instancia el TTCS, que a su vez ha demostrado ser más sensible (Schiller *et al.*, 2010b; Farnham *et al.*, 2012), los animales fueron inoculados únicamente con PPD<sub>b</sub>, lo que pudo permitirles presentar una respuesta más intensa y con registros más altos en los aumentos del espesor de piel.

En base a los resultados del cultivo bacteriológico y la consecuente identificación de animales verdaderamente infectados con *M. bovis*, se evaluó si esta disminución significativa de la respuesta a la PPD constatada hasta los 30 días tuvo influencia sobre la sensibilidad de la técnica. Efectivamente, como también lo indicaron investigadores internacionales (por Doherty *et al.*, 1995; Thom *et al.*, 2004), la reducción en la intensidad de respuesta a la tuberculina determinó la aparición de resultados falsos negativos frente a un segundo test. La sensibilidad resultó afectada incluso hasta el día 45 con la aparición de un resultado falso negativo. En este sentido, si bien la desensibilización a la tuberculina fue significativa hasta el día 30, no se debería de utilizar este test antes de los 45 días, debido al riesgo de presentación de algún falso negativo.

### **8.5. Rendimiento del segundo test de IFN- $\gamma$ utilizado en diferentes plazos dentro de los 60 días posteriores al test de tuberculina.**

El tiempo transcurrido entre la aplicación de este test *in-vitro* y la última prueba de tuberculina realizada, ha sido motivo de numerosos estudios internacionales con el fin de evaluar el efecto que tienen las pruebas de campo tradicionalmente utilizadas sobre la liberación *in-vitro* de IFN- $\gamma$ . Poco después que la técnica fuera desarrollada, Rothel *et al.* (1992), utilizando 4 bovinos experimentalmente infectados con *M. bovis* aplicaron el TTACS y tomaron muestras de sangre para el test de IFN- $\gamma$  antes de la prueba de tuberculina y luego de la misma, 2 veces por semana durante 8,5 semanas. Inmediatamente luego del TTACS se observó una caída en los valores de DO de IFN- $\gamma$  en sangre estimulada con PPD<sub>b</sub>. Al día 7 *post*-inoculación de tuberculina se observó un aumento gradual de los valores de DO de IFN- $\gamma$ , tanto en la sangre estimulada con PPD<sub>b</sub> como con PPD<sub>a</sub>, con picos entre las 3 y 5 semanas. La respuesta frente a PPD<sub>b</sub> versus PPD<sub>a</sub> no varió en el tiempo y que estos animales se mantuvieron positivos a tuberculosis bovina durante el transcurso del experimento. Destacaron, sin embargo, que este efecto estimulante podría determinar una reducción en la especificidad de la prueba por la aparición de falsos positivos. En otra investigación, también utilizando animales infectados en forma experimental, Whipple *et al.* (2001) en EEUU aplicaron el TTACS y re-testaron los animales con el TTCC a los 7 y 63 días posteriores. Paralelamente realizaron el test *in-vitro* en diferentes momentos para evaluar el efecto de estas pruebas sobre la producción de IFN- $\gamma$ . Observaron que los valores de DO del IFN- $\gamma$  fueron significativamente mayores durante el periodo comprendido entre los 3 y 28 días posteriores al TTACS, en comparación con animales que no recibieron el test intradérmico. Luego de la aplicación del TTCC, también se evidenció un aumento en los registros de IFN- $\gamma$ , aunque con un pico menor que con el test simple ano-caudal. Observaron que el efecto booster de IFN- $\gamma$  se generaba principalmente a partir con el

uso previo del TTACS. Concluyeron que dicho estímulo, lejos de ser una desventaja, aumentó la sensibilidad de la técnica, mejorando así su capacidad de detección de animales infectados con *M. bovis*. En un diseño similar al anterior, salvo que utilizando animales naturalmente infectados, Coad *et al.* (2010) evaluaron el efecto de la aplicación del TTACS y TTCC sobre la producción de IFN- $\gamma$  medido en tres momentos: pre-TTCC y TTACS, 3 y 10 días *post*-TTCC y TTACS. No observaron influencia alguna del uso repetido TTCC sobre los resultados del test de IFN- $\gamma$ , aunque sí constató nuevamente el efecto booster del TTACS sobre la producción de IFN- $\gamma$  pasados 3 días de la prueba. Gormley *et al.* (2004), utilizando animales provenientes de rodeos con infección crónica, reactivos a las pruebas de tuberculina durante la vigilancia epidemiológica, no observaron diferencias significativas en los valores de DO de IFN- $\gamma$  entre muestras tomadas previo al uso de la prueba de tuberculina comparativa y muestras tomadas dentro de los 65 días *post*-TTCC. Demostraron que la sensibilidad del test de IFN- $\gamma$  en animales reactivos no se afectó durante las repeticiones, confirmando así su utilidad como test complementario a las pruebas de tuberculina.

Schiller *et al.* (2010b), en una revisión analizaron y compararon los resultados encontrados por diferentes investigadores que evaluaron el supuesto de que el uso de las pruebas de tuberculina afecta el rendimiento de sucesivos test de IFN- $\gamma$ . Concluyeron que el efecto sobre el test *in-vitro* se presenta según si se emplea previamente la prueba comparativa o el test simple ano-caudal. Esto se debe a que la mayoría de los estudios indicaron que el TTCC no influye, ni estimula ni deprime, sobre la respuesta a la PPD durante la realización del test *in-vitro*. Por el contrario, se demostró la existencia de un efecto booster sobre la liberación de IFN- $\gamma$  luego de utilizado el TTACS. Este efecto estimulante podría aparecer en un período corto, 3 días *post*-TTACS (Coad *et al.*, 2010) o en un período más largo, ya sea entre los 3 y 28 días *post*-TTACS (Whipple *et al.*, 2001) o entre las 3 y 5 semanas (Rothel *et al.*, 1992). A pesar de la alta coincidencia entre investigadores respecto de este concepto, hay quienes obtuvieron resultados algo contradictorios en animales experimentalmente infectados. Thom *et al.* (2006) reportaron un transitorio aumento de la producción y liberación de IFN- $\gamma$  frente a PPD<sub>b</sub> y PPD<sub>a</sub>, registrado a los 7 días posteriores a la aplicación del TTCC. Aunque en este estudio la inoculación del toxoide tetánico a los animales previo a la infección experimental con *M. bovis* pudo haber generado un pequeño aumento en la liberación de IFN- $\gamma$ . En forma similar, Buddle *et al.* (2002), constataron un ligero estímulo en la liberación de IFN- $\gamma$  luego de 10 días de aplicado el TTCC. Sin embargo, estos resultados no pudieron ser verificados en animales infectados en forma natural. Lo que quedaría incierto es si este estímulo sobre la producción de IFN- $\gamma$  determinaría un aumento de la sensibilidad del test (debido a un estímulo selectivo de la respuesta a la PPD<sub>b</sub> *in-vitro*), o si aumenta en forma indiscriminada en respuesta tanto a PPD<sub>b</sub> como a PPD<sub>a</sub>. Para lo cual se necesitarían más estudios sobre animales naturalmente infectados (Schiller *et al.*, 2010b).

En la presente investigación, todos los animales recibieron la prueba de tuberculina ano-caudal simple y fueron re-testados con la prueba comparativa dentro de los 3 a 10 días posteriores, según el protocolo sanitario de Uruguay. Los resultados indicaron que los animales que fueron evaluados a los 30 días *post*-TTCC (aproximadamente 5 semanas *post*-TTACS) presentaron una media de los valores de DO de IFN- $\gamma$  mayor que los demás grupos. Si bien esto podría coincidir con el período en que Rothel *et al.*

(1992) y Whipple *et al.* (2001) quienes demostraron el efecto booster a causa del uso del TTACS, dicho aumento de IFN- $\gamma$  no tuvo significancia estadística en comparación con los demás grupos. De todas formas, este experimento no fue diseñado para detectar un efecto booster, debido a que no se tomaron muestras de sangre antes de realizar cada una de las pruebas, para de esta forma comparar con los registros de IFN- $\gamma$  en los animales cuando no han sido inoculados con PPD. A pesar de que las diferencias entre grupos no fueron significativas, el aumento en la respuesta a PPD<sub>b</sub> registrada el día 45, determinó que un animal infectado revirtiera su clasificación de negativo a positivo, mejorando así la sensibilidad del test, coincidiendo con los conceptos de Whipple *et al.* (2001).

El test de IFN- $\gamma$  posee singulares características de interés para la detección y erradicación de la TBB. Tiene la particularidad de que puede combinarse con las pruebas de campo tradicionales para obtener ventajas en el diagnóstico de la enfermedad. Según la estrategia utilizada se podrá mejorar la sensibilidad (Wood *et al.*, 1992; Domingo *et al.*, 1995; González Llamazares *et al.*, 1999; Rangen *et al.*, 2009) o la especificidad (Schiller *et al.*, 2010a) del diagnóstico global. Claramente los beneficios del uso de esta técnica como prueba alternativa y en combinación con las pruebas de tuberculina, han sido extensamente demostrados. No en vano el test de IFN- $\gamma$  ha sido integrado a los protocolos sanitarios de diferentes países como EEUU, Nueva Zelanda y países de la Unión Europea, utilizado como complemento de las pruebas de tuberculina a fin de mejorar el rendimiento del diagnóstico de TBB (Schiller *et al.*, 2010a). Los resultados encontrados en este experimento permitieron, bajo las particularidades de la enfermedad en nuestro país, comprobar esas ventajas que tiene el uso de la prueba de detección de IFN- $\gamma$ . Se ratifica la propiedad de repetibilidad ya demostrada que tiene este test para ser re-utilizado en cortos periodos (Wood *et al.*, 1990; 1992; Doherty *et al.*, 1995; Wood & Jones, 2001; Schiller *et al.*, 2010b; Marassi *et al.*, 2013), debido a que no se encontraron diferencias significativas en la liberación de IFN- $\gamma$  entre el primer y segundo test. Esto determinó que la sensibilidad de la prueba se mantuvo, o incluso aumentó, cuando la misma se repitió en los diferentes intervalos evaluados.

Si bien el test de IFN- $\gamma$  no reconoció todos los animales TTCC-positivos, sí fue capaz de reconocer aquellos en los que se confirmó la infección por pruebas *post-mortem*. En base a los actuales resultados se puede sugerir que la sensibilidad de este test *in-vitro* no disminuyó por la aplicación previa de las pruebas de tuberculina y que, a diferencia de estas pruebas *in-vivo*, puede ser utilizado para el diagnóstico de TBB en animales que se encuentren desensibilizados. Sugerencia que va en línea con lo reportado por Rangen *et al.* (2009), quienes en un experimento de similares características al actual, demostraron que la aplicación del TTACS seguido de la prueba cervical comparativa, no influyó en la clasificación de animales positivos por el test IFN- $\gamma$ . Destacando a su vez, que el uso del test *in-vitro* tuvo una mayor tasa de positivos que el TTCC cuando ambas pruebas fueron utilizadas para re-testar animales TTACS-positivos. Ryan *et al.* (2000), llegaron a conclusiones similares en su investigación al demostrar que el test de IFN- $\gamma$  puede ser utilizado en animales dentro de los 8 y 28 días posteriores al test de tuberculina con altos valores de sensibilidad y especificidad.

## 9. CONCLUSIONES

El test de tuberculina simple ano-caudal, tradicionalmente utilizado en Uruguay para el diagnóstico de la enfermedad, puede aplicarse en forma reiterada en animales sanos con intervalos de al menos 60 días, sin que esto afecte su especificidad. En cuanto al test de tuberculina cervical simple, si bien no se demostró una disminución de su especificidad cuando es utilizado en forma repetida, el aumento de la respuesta de los animales a la PPD detectada en la última ronda, sugiere la necesidad de futuros estudios donde se evalúe este protocolo sobre un período más prolongado.

La sensibilidad del TTCS disminuyó cuando se utilizó en animales naturalmente infectados entre 15 y 45 días posteriores a la inoculación de PPD. Por su parte, el test de medición *in-vitro* de IFN- $\gamma$  puede aplicarse en forma reiterada sobre animales desensibilizados a la tuberculina, sin que se afecte su capacidad para detectar la infección. En base a este experimento se sugiere considerar prueba *in-vitro* técnica alternativa dentro del programa nacional para el control y erradicación de la tuberculosis bovina.

Como estrategia, podría utilizarse durante el saneamiento de un predio foco, en forma combinada con el TTCC y con una interpretación en paralelo. Esto permitiría aumentar la capacidad de detección de animales infectados, mejorando la sensibilidad del diagnóstico confirmatorio y posiblemente reducir el tiempo de saneamiento. Otra posible utilidad puede ser durante la compra de bovinos. Aplicado previo al ingreso de nuevos animales al rodeo, a fin de confirmar el diagnóstico presuntivo, sin la necesidad de esperar ese período de desensibilización de 60 días.

## 10. BIBLIOGRAFÍA CONSULTADA

1. Aagaard C., Govaerts M., Meikle V., Gutiérrez-Pabello J.A., McNair J., Andersen P., Suárez-Güemes F., Pollock J., Espitia C., Cataldi A. (2010). Detection of bovine tuberculosis in herds with different disease prevalence and influence of paratuberculosis infection on PPDB and ESAT-6/CFP10 specificity. *Preventive Veterinary Medicine*: 96; 161-169.
2. Abbas A. K., Lichtman A. H., Pillai S. (2012). *Inmunología celular y molecular*. 6ª edición. Elsevier España, S.L. Barcelona, España.
3. Acha P. N. & Szyfres B. (2001). *Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales*. Volumen 1. 3ª edición. Organización Panamericana de la Salud. Washington, DC.
4. Alvarez J., Pérez A., Bezos J., Marqués S., Grau A., Saez J. L., Mínguez O., de Juan L., Domínguez L. (2012). Evaluation of the sensitivity and specificity of bovine tuberculosis diagnostic tests in naturally infected cattle herds using a Bayesian approach. *Veterinary Microbiology*, 155(1), 38–43.
5. Álvarez J., Perez A., Marqués S., Bezos J., Grau A., de la Cruz M. L., Romero B., Saez J. L., del Esquivel M., del Martínez M., Minués O., de Juan L., Domínguez L. (2014) Risk factors associated with negative in-vivo diagnostic results in bovine tuberculosis-infected cattle in Spain. *BMC Veterinary Research*, 10:14.
6. Aranaz, A. (1996). *Aplicación de la técnica PCR (reacción en cadena de la polimerasa) en el diagnóstico y epidemiología de la tuberculosis en animales*. Tesis Doctoral. Facultad de Veterinaria de la Universidad Complutense de Madrid, España.
7. Aranaz A., De Juan L., Monetero N., Sánchez C., Galka M., Delso C., Álvarez J., Romero B., Bezos J., Vela A. I., Boriones V., Mateos A., Domínguez L. (2004). Bovine Tuberculosis (*Mycobacterium bovis*) in wildlife in Spain. *Journal of Clinical Microbiology*, 42: 2602-2608.
8. Aranaz A. (2013). “Tuberculosis bovina: generalidades de la enfermedad, situación en el contexto mundial y relevancia para el comercio internacional. Características generales de las micobacterias”. in Seminario: “Diagnóstico y control de enfermedades producidas por micobacterias: Tuberculosis y Paratuberculosis”. 10-13 de septiembre de 2013. Centro de Buenos Aires para la Capacitación de los Servicios Veterinarios (CEBASEV). Buenos Aires, Argentina.
9. Armus D. (2007). *La ciudad impura, salud, tuberculosis y cultura en Buenos Aires, 1870-1950*. Editorial Edhasa. , Buenos Aires, Argentina.
10. Buddle B. M., Ryan T. J., Pollock J. M., Andersen P., de Lisle G. W. (2001). Use of ESAT-6 in the interferon-gamma test for diagnosis of bovine tuberculosis following skin testing. *Vet Microbiol*, 80: 37-46.
11. Buddle B. M., Parlane N. A., Wedlock D. N., Heiser A. (2013). Overview of vaccination trials for control of tuberculosis in cattle, wildlife and humans. *Transbound Emerg Dis*, 1: 136–146.
12. Canal A. M. (2013). *Tuberculosis bovina: vigilancia epidemiológica en mataderos de la Provincia de Santa Fe (Argentina) y evaluación de la respuesta inmune en lesiones granulomatosas de animales infectados*. Tesis Doctoral. Facultad de Veterinaria de la Universidad Complutense de Madrid, Departamento de Medicina y Cirugía Animal. Madrid, España.

13. Canto Alarcon G. J., Rubio Venegas Y., Bojorquez Narvaez L., Pizano Martínez O. E., García Casanova L., Sosa Gallegos S., Nava Vargas A., Olvera Ramírez A. M., Milian Suazo F. (2013). Efficacy of a Vaccine Formula against Tuberculosis in Cattle. *PloS one*, 8: 1-7.
14. Carbonetti A. (2012). La ciudad de la peste blanca, historia epidemiológica, política y cultural de la tuberculosis en la ciudad de Córdoba, Argentina, 1895-1914. *ESTUDIOS - N° ESPECIAL -ISSN 0328-185X*, pp 37-52.
15. Casal C., Alvarez J., Bezos J., Quick H., Díez-Guerrier A., Romero., Saez J. L., Liandris E., Navarro A., Perez A. Domínguez L., de Juan L. (2015). Effect of the inoculation site of bovine purified protein derivative (PPD) on the skin fold thickness increase in cattle from officially tuberculosis free and tuberculosis-infected herds. *Prev Vet Med*, 121: 86–92.
16. Casal C. (2016). Diagnóstico de tuberculosis en rumiantes y camélidos: optimización de pruebas de base celular y humoral. Tesis Doctoral. Facultad de Veterinaria de la Universidad Complutense de Madrid, Departamento de Sanidad Animal. Madrid, España.
17. Casas Olascoaga R. (2013). Antecedentes de la tuberculosis bovina en Uruguay, período marzo 1888 – enero 1998. *Veterinaria*, 49 (189): 14-30.
18. Cassidy J. P., Bryson D. G. Cancela M. M. G., Forster F., Pollock J. M., Neill S. D. (2001). Lymphocyte subtypes in experimentally induced early-stage bovine tuberculous lesions. *J. Comp. Pathol.*, 124: 46–51.
19. Castro Ramos M., Ayala M., Errico F., Silvera F.V. (1998). Aislamiento de *Mycobacterium bovis* en pinnípedos *Otaria byronia* (Lobo marino común) en Uruguay. *Revista de Medicina Veterinaria*, 79 (3): 197-200.
20. Castro Ramos M., Errico F., Trelles A., Curbelo R., Laborde M. (2000). *Mycobacterias* aisladas de fuentes hídricas en la Cuenca Lechera de Uruguay. *Veterinaria*, 35 (141): 21-23.
21. Castro Ramos M., Katz H., Moraña A., Tiscornia M. I., Morgades D., Castro O. (2006). Tuberculosis en pinnípedos (*Arctocephalus australis* y *Otaria flavescens*) de Uruguay. Bases para la conservación y el manejo de la costa uruguaya. *Vida Silvestre Uruguay*, 315-320.
22. Center for Food Security & Public Health (CFSPH) - Institute for International Cooperation in Animal Biologics (IICAB) (2009). Bovine Tuberculosis. College of Veterinary Medicine, Iowa State University. 6p. Disponible en: <http://www.cfsph.iastate.edu/>. Fecha de consulta: 23 de julio del 2016.
23. Centro Panamericano de Zoonosis, OPS/OMS. (1979). Bacteriología de la tuberculosis humana y animal. (Dra. I. N de Kantor). Serie de Monografías Científicas y Técnicas, CPZ-11, 63pp.
24. Chans L.E. (2009) Fichas teóricas de Legislación Sanitaria, Volumen C, Departamento de Legislación Sanitaria de la Facultad de Veterinaria (UdelaR). Montevideo, Uruguay.
25. Claridge J., Diggle P., McCann C. M., Mulcahy G., Flynn R., McNair J., Strain S., Welsh M., Baylis M., Williams D. J. (2012). *Fasciola hepatica* is associated with the failure to detect bovine tuberculosis in dairy cattle. *Nature communications*, 3 (853): 1-8.
26. Coad M., Clifford D., Rhodes S. G., Hewinson R. G., Vordermeier H. M., Whelan A. O. (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 responses. *Vet Res*, 41:14.

27. Collins D. M. (2001). Virulence factors of *Mycobacterium bovis*. *Tuberculosis*, 81 (1/2): 97-102.
28. Comisión Honoraria para la Lucha Antituberculosa y Enfermedades Prevalentes (CHELA-EP) (2011). Memoria de la CHELA-EP – Ejercicio 2011. Disponible en: <http://www.chlaep.org.uy/institucional.php>. Fecha de consulta: 05 de agosto de 2015.
29. Comisión Honoraria para la Lucha Antituberculosa y Enfermedades Prevalentes (CHLA-EP) (2013). Informe epidemiológico año 2013. pp 8. Disponible en <http://www.chlaep.org.uy/descargas/informe-epidemiologico-2013-cifras-provisorias.pdf>. Fecha de consulta: 27 de agosto de 2016.
30. Corner L. A. (1994). Post mortem diagnosis of *Mycobacterium bovis* infection in cattle. *Vet Microbiol*, 40: 53-63.
31. Corner L. A. L. (2006). The role of wild animal populations in the epidemiology of tuberculosis in domestic animals: How to assess the risk. *Vet Microbiol*, 112: 303–312.
32. Cosivi O., Grange J. M., Daborn C. J., Raviglione M. C., Fujikura T., Cousins D. (1998). Zoonotic tuberculosis due to *Mycobacterium bovis* in developing countries. *Emerg. Infect. Dis.*, 4: 59-70.
33. Cressey P., Lake R., Hudson A. (2006). Risk profile: *Mycobacterium bovis* in Red Meat. Report of the Institute of Environmental Science & Research Limited. 44p.
34. Dannenberg A. M. (2001). Pathogenesis of pulmonary *Mycobacterium bovis* infection: basic principles established by the rabbit model. *Tuberculosis*, 81 (1/2): 87-96.
35. de Kantor I. N., Ambroggi M., Poggi S., Morcillo N., Da Silva Telles M. A., Osório Ribeiro M., *et al.* (2008a). Human *Mycobacterium bovis* infection in ten Latin America countries. *Tuberculosis (Edinb)*, 88 (4): 358-65.
36. de Kantor I. N., Paolicchi F., Bernardelli A., Torres P. M., Canal A., Lobo J. R., Zollin de Almeida M. A., Paredes Noack L. A., López J. F., Garín A., López Insaurralde A., Boschioli-Cara M. L., Cataldi A., Ambroggi M. (2008b). Bovine Tuberculosis in Latin American Countries: current situation and recommendations. Workshop sponsored by OIE, 3rd Latin American Congress on Zoonoses. Buenos Aires, Argentina. Disponible en: <http://www.rramericas.oie.int>. Fecha de Consulta: 18 de abril de 2016.
37. de Kantor I. N., Torres P. M., Morcillo N., Imaz M. S., Sequeiro M. D. (2012). La Tuberculosis Zoonótica en Argentina. *Medicina*, 72: 514-520.
38. de la Rua-Domenech R., Goodchild A. T., Vordermeier H. M., Hewinson R. G., Christiansen K. H., Clifton-Hadley R. S. (2006). Ante mortem diagnosis of tuberculosis in cattle: a review of the tuberculin tests, gamma-interferon assay and other ancillary diagnostic techniques. *Res Vet. Sci.*, 81 (2): 190-210.
39. Doherty M. L., Basset H. F., Quinn P. J., Davis W. C., Monaghan M. L. (1995a). Effects of dexamethasone on cell-mediated immune responses in cattle sensitised to *Mycobacterium bovis*. *American Journal of Veterinary Research*, 56 (10): 1300-1306.
40. Doherty M. L., Monaghan M. L., Basset H. F., Quinn P. J. (1995b). Effect of a recent injection of purified protein derivative on diagnostic tests of tuberculosis in cattle infected with *Mycobacterium bovis*. *Research in Veterinary Science*, 58: 211-217.
41. Domingo M., Liébana E., Vilafranca M., Aranaz A., Vidal D., Prats N., Mateos A. Casal J., Domínguez L., 1995. A field evaluation of the interferon-g assay

- and the intradermal tuberculin test in dairy cattle in Spain. Proceedings of the Second International Conference on *Mycobacterium bovis*. Dunedin, New Zealand, 304-306.
42. Domingo M., Vidal E., Marco A. (2014). Pathology of bovine tuberculosis. *Research in veterinary science*, 97: 520-529.
  43. Eirin M.E., Macias A., Magnano G., Morcella C., Mendez L., Blanco F. C., Bianco M. V., Severina W., Alito A., de los Angeles Pando M., Singh M., Spallek R., Paolicchi F. A., Bigi F., Cataldi A. A. (2015). Identification and evaluation of new *Mycobacterium bovis* antigens in the in vitro interferon gamma release assay for bovine tuberculosis diagnosis. *Tuberculosis*, 95: 795-801.
  44. Errico F. (1986). Guía técnica de métodos y criterios de interpretación de la prueba tuberculínica en bovinos. *In: Tuberculosis y Brucelosis Bovina en el Uruguay*. Instituto Iberoamericano de Cooperación para la Agricultura (IICA)-Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca (MGAP). P 28-35.
  45. Errico F. & Paullier C. (1986). Diagnóstico de Laboratorio de la Tuberculosis Animal. *In: Tuberculosis y Brucelosis Bovina en el Uruguay*. Instituto Iberoamericano de Cooperación para la Agricultura (IICA)-Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca (MGAP). P 23-27.
  46. Errico F., Castro Ramos M., Silvera F. V. (1988) Identificación de cepas aisladas en el Centro de Investigaciones Veterinarias “Miguel C. Rubino” (CIVET) entre 1981-1986. *Veterinaria*, 24 (99): 1-6.
  47. Errico F., de Kantor I. N., Baltar J., Silva M., Millán A. (1989). Comparación de la especificidad de las pruebas tuberculínicas cervical y caudal en bovinos de Uruguay. *Rev sci tech Off Int Epiz*, 8 (4): 1021-1029.
  48. Estrada Chávez C., Díaz F., Arriaga C., Villegas N., Pérez R., González D. (2004). Concordancia de la PCR y métodos rutinarios para el diagnóstico de tuberculosis bovina. *Veterinaria México*, 35 (3): 225-236.
  49. European Food Safety Authority (EFSA) (2003). Opinion of the Scientific Panel on Biological Hazards on a request from the Commission related on “Tuberculosis in Bovine Animals: Risks for human health and control strategies”. *EFSA Journal*, 13: 1-53.
  50. European Food Safety Authority, Panel on Animal Health and Welfare (EFSA) (2012). Scientific Opinion on the use of a gamma interferon test for the diagnosis of bovine tuberculosis. *EFSA Journal*, 10 (12): 2975, 63pp. Disponible en: [www.efsa.europa.eu/efsajournal](http://www.efsa.europa.eu/efsajournal).
  51. European Food Safety Authority, Panel on Animal Health and Welfare (EFSA) (2013). Scientific Opinion on field trials for bovine tuberculosis vaccination. *EFSA Journal*, 11 (12): 3475, 35pp. Disponible en: [www.efsa.europa.eu/efsajournal](http://www.efsa.europa.eu/efsajournal).
  52. European Food Safety Authority (EFSA) & European Centre for Disease Prevention and Control (ECDPC) (2015). The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2014. *EFSA Journal*, 13 (12): 4329, 191pp. Disponible en: [www.efsa.europa.eu/efsajournal](http://www.efsa.europa.eu/efsajournal).
  53. European Food Safety Authority (EFSA) (2015). Scientific Opinion on the public health risks related to the consumption of raw drinking milk. *EFSA Journal*, 13 (1): 3940, 95pp. Disponible en: [www.efsa.europa.eu/efsajournal](http://www.efsa.europa.eu/efsajournal).

54. Farnham M. W., Norby B., Goldsmith T. J., Wells S. J. (2012). Meta-analysis of field studies on bovine tuberculosis skin tests in United States cattle herds. *Prev. Vet Med.*, 103 (2-3): 234-42.
55. Fernández F. (2015). International Workshop on Human and Bovine Tuberculosis. 28 y 29 de septiembre de 2015. Instituto Pasteur de Montevideo. Montevideo, Uruguay.
56. Fine A. E., Bolin C. A., Gardiner J. C., Kaneene J. B. (2011). A Study of the Persistence of *Mycobacterium bovis* in the Environment under Natural Weather Conditions in Michigan, USA. *Veterinary Medicine International*, 12pp.
57. Food and Drug Administration (FDA) (2012). *Bad Bug Book, Foodborne Pathogenic Microorganisms and Natural Toxins*. 2ª edición.
58. Francis J. (1947). *Bovine Tuberculosis, Including a Contrast with Human Tuberculosis*. Staples Press Ltd., London, 86-87.
59. Francis J., Seiler R. S., Wilkie I. W., O'Boyle D., Lumsden M. J., Frost A. J. (1978). The sensitivity and specificity of various tuberculin tests using bovine PPD and other tuberculins. *Vet. Rec.*, 103: 420-425.
60. Gasque Gómez, R. (2008). *Enciclopedia Bovina*. Primera edición. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Universidad Nacional Autónoma de México.
61. González Llamazares O. R., Gutiérrez Martín C. B., Alvarez Nistal D., de la Puente Redondo V. A., Domínguez Rodríguez L., Rodríguez Ferri E. F. (1999). Field evaluation of the single intradermal cervical tuberculin test and the interferon-gamma assay for detection and eradication of bovine tuberculosis in Spain. *Vet. Microbiol.*, 70 (1-2): 55-66.
62. Goodchild A. V. & Clifton-Hadley R. S. (2001). Cattle-to-cattle transmission of *Mycobacterium bovis*. *Tuberculosis*, 81 (1/2): 23-41.
63. Gormley E., Doyle M. B., McGill K., Costello E., Good M., Collins J. D. (2004). The effect of the tuberculin test and the consequences of a delay in blood culture on the sensitivity of a gamma-interferon assay for the detection of *Mycobacterium bovis* infection in cattle. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 102: 413-420.
64. Gormley E., Doyle M. B., Fitzsimons T., McGill K., Collins J. D. (2006). Diagnosis of *Mycobacterium bovis* infection in cattle by use of the gamma-interferon (Bovigam) assay. *Vet. Microbiol.*, 25: 171-179.
65. Gormley E., Doyle M., Duignan A., Good M., More S. J., Clegg T. A. (2013). Identification of risk factors associated with disclosure of false positive bovine tuberculosis reactors using the gamma-interferon (IFN $\gamma$ ) assay. *Veterinary Research*, 44:117.
66. Harris B., Payeur J., Bravo D., Osorio R., Stuber T., Farrell D., Paulson D., Treviso S., Mikolon A., Rodriguez-Lainz A., Cernek-Hoskins S., Rast R., Ginsberg M., Kinde H. (2007). Recovery of *Mycobacterium bovis* from Soft Fresh Cheese Originating in Mexico. *Applied and Environmental Microbiology*, 1025-1028.
67. Hope J. C., Thom M. L., Villareal-Ramos B., Vordermeier H. M., Hewinson R. G., Howard C. J. (2005). Exposure to *Mycobacterium avium* induces low-level protection from *Mycobacterium bovis* infection but compromises diagnosis of disease in cattle. *Clinical and Experimental Immunology*, 141: 432-439.

68. Humblet M. F., Boschiroli M. L., Saegerman C. (2009). Classification of worldwide bovine tuberculosis risk factors in cattle: a stratified approach. *Vet. Res.*, 40:50.
69. Joklik W. K., Willett H. P., Amos D. B., Wilfert C. M. (1997). *Zinsser Microbiología*. 20ª edición. Editorial Médica Panamericana S.A. Buenos Aires, Argentina.
70. Kaneene J. B., Miller R., Meyer R. M. (2006). Abattoir surveillance: the U.S. experience. *Vet Microbiol*, 112: 273-282.
71. Kubica T., Agzamova R., Wright A., Rakishev G., Rüsç-Gerdes S., Niemann S. (2006) *Mycobacterium bovis* Isolates with *M. tuberculosis*. Specific Characteristics. *Emerging Infectious Diseases*, 12 (5): 763-765.
72. Liébana E., Aranaz A., Francis B., Cousins D. (1996). Assessment of Genetic Markers for Species Differentiation within the *Mycobacterium tuberculosis* Complex. *Journal of Clinical Microbiology*, 933-938.
73. Liébana E., Aranaz A., Aldwell F. E., McNair J., Neill S. D., Smyth A. J., Pollock J. M. (2000). Cellular interactions in bovine tuberculosis: release of active mycobacteria from infected macrophages by antigen-stimulated T cells. *Immunology*, 99: 23-29.
74. Liébana E., Johnson L., Gough J., Durr P., Jahans K., Clifton-Hadley R., Spencer Y., Hewinson R.G., Downs S.H. (2008). Pathology of naturally occurring bovine tuberculosis in England and Wales. *Vet J*, 176: 354-360.
75. Lilenbaum W., Schettini J. C., Souza G. N., Ribeiro E. R., Moreira E. C., Fonseca L. S. (1999). Comparison between a gamma-IFN assay and intradermal tuberculin test for the diagnosis of bovine tuberculosis in field trials in Brazil. *J Vet Med Series B*, 46: 353-358.
76. Lüchter, F. J. (2004). *Introducción al Estudio de las Enfermedades Infecciosas: Enfermedades Infecciosas de los Rumiantes*. 1ª ed. Edición del autor. Buenos Aires, Argentina.
77. Magallanes N. (1998). *Tambos y Tuberculosis bovina en Uruguay (1834-1963)*. Academia Nacional de Veterinaria, Montevideo. 36pp.
78. Marassi C., Medeiros L., Figueiredo E., Fonseca L. S., Duarte R., Paschoalini V., Oelemann W., Lilenbaum W. (2013). A multidisciplinary approach to diagnose naturally occurring bovine tuberculosis in Brazil. *Revista Veterinaria Brasileira*, 33 (1): 15-20.
79. McNair J., Welsh M., Pollock J. M. (2007). The immunology of bovine tuberculosis and progression towards improved disease control strategies. *Vaccine*, 25: 5504-5511.
80. Medeiros L., Marassi C. D., Figueredo E. E., Lilenbaum W. (2010). Potential application of new diagnostic methods for controlling bovine tuberculosis in Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology*, 1-11.
81. Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca. Ley N° 3.606 del 13 de abril de 1910. *Legislación Sanitaria Animal, Tomo I. Cap. II-Normas Específicas para Enfermedades infecciosas*. pp 45-116. Disponible en: [http://www.mgap.gub.uy/sites/default/files/cap1\\_ley3606.pdf](http://www.mgap.gub.uy/sites/default/files/cap1_ley3606.pdf). Fecha de consulta: 13 de diciembre de 2016.
82. Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca (MGAP), Estadísticas Agropecuarias (DIEA) (2016). *Anuario estadístico agropecuario 2016*. 198p. Disponible en: <http://www.mgap.gub.uy/>. Fecha de consulta: 13 de agosto de 2017.

83. Monaghan M. L., Doherty M. L., Collins J. D., Kazda J. F., Quinn P. J. (1994). The tuberculin test. *Vet Microbiol*, 40: 111-124.
84. Morris R. S., Pfeiffer D. U., Jackson R. (1994). The epidemiology of *Mycobacterium bovis* infections. *Vet Microbiol*, 40: 153-177.
85. Müller B., Dürr S., Alonso S., Hattendorf J., Laisse C., Parsons S, van Helden P.D., Zinsstag J. (2013). Zoonotic *Mycobacterium bovis* induced Tuberculosis in Humans. *Emerging Infectious Diseases*, 19 (6): 899-908.
86. Neill S. D., Pollock J. M., Bryson D. B., Hanna J. (1994). Pathogenesis of *Mycobacterium bovis* infection in cattle. *Vet Microbiol*, 40: 41-52.
87. Neill S. D., Bryson D. G., Pollock J. M. (2001). Pathogenesis of tuberculosis in cattle. *Tuberculosis*, 81(1/2): 79-86.
88. Olea-Popelka F. J., Costello E., White P., McGrath G., Collins J. D., O’Keeffe J., Kelton D. F., Berke O., More S., Martin S. W. (2008) Risk factors for disclosure of additional tuberculous cattle in attested-clear herds that had one animal with a confirmed lesion of tuberculosis at slaughter during 2003 in Ireland. *Prev Vet Med*, 85: 81–91.
89. Organización Internacional de Sanidad Animal (OIE) (2009). Manual de las Pruebas de Diagnóstico y de las Vacunas para los Animales Terrestres. [www.oie.int/es/normas-internacionales/manual-terrestre](http://www.oie.int/es/normas-internacionales/manual-terrestre) Fecha de consulta: 13 de Abril de 2015.
90. Organización Internacional de Sanidad Animal (OIE) (2016). Enfermedades, infecciones e infestaciones de la Lista de la OIE en vigor en 2016. Disponible en: <http://www.oie.int/es/sanidad-animal-en-el-mundo/oie-listed-diseases-2016>. Fecha de consulta: 11 de agosto de 2016.
91. Organización Mundial de la Salud (2012). Tuberculosis laboratory biosafety manual. 50p. Disponible en: [apps.who.int/iris/bitstream/10665/77949/1/9789241504638\\_eng.pdf](http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/77949/1/9789241504638_eng.pdf).
92. Organización Mundial de la Salud (OMS) (2016). Informe mundial sobre la tuberculosis. Disponible en [http://www.who.int/tb/publications/global\\_report/en/](http://www.who.int/tb/publications/global_report/en/). Fecha de consulta: 11 de junio de 2017.
93. Palmer M. V. & Waters W. R. (2006). Advances in bovine tuberculosis diagnosis and pathogenesis: What policy makers need to know. *Vet Microbiol*, 112: 181-190.
94. Perdomo E. & Paullier C. (1986). Patología de la Tuberculosis Bovina. In: Tuberculosis y Brucelosis Bovina en el Uruguay. Instituto Iberoamericano de Cooperación para la Agricultura (IICA)-Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca (MGAP). P 11-16.
95. Pollock J. M., McNair J., Welsh M. D., Girvin R. M., Kennedy H. E., Mackie D. P., Neill S. D. (2001). Immune responses in bovine tuberculosis. *Tuberculosis*, 81 (1/2), 103-107.
96. Pollock J. M. & Neill S. D. (2002). *Mycobacterium bovis* infection and tuberculosis in cattle. *Vet J*, 163: 115–127.
97. Pollock J. M., Welsh M. D., McNair J. (2005). Immune responses in bovine tuberculosis: Towards new strategies for the diagnosis and control of disease. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 108: 37–43.
98. Radostits O. M., Gay C. C., Blood D. C., Hinchcliff K. W. (2002). Medicina Veterinaria: Tratado de las enfermedades del ganado bovino, ovino, porcino, caprino y equino. Volumen I, 9ª edición. Edición en español McGraw-Hill-Interamericana de España.

99. Radunz, B. & Lepper, A. 1985. Suppression of skin reactivity to bovine tuberculin in repeat tests. *Aust Vet J*, 62 (6): 191-194.
100. Rangen S. A., Surujballi O. P., Lutze-Wallace C., Wayne Lees V. (2009). Is the gamma interferon assay in cattle influenced by multiple tuberculin injections? *Can Vet J*, 50: 270-274.
101. Reichman L. B. & Hershfield E. S. (2005). Tuberculosis: A Comprehensive International Approach. 2ª edición. Lung Biology in Health and Disease, 144: 840pp.
102. Reilly L. A. & Courtenay O. (2007). Husbandry practices, badger sett density and habitat composition as risk factors for transient and persistent bovine tuberculosis on UK cattle farms. *Preventive Veterinary Medicine*, 80: 129–142.
103. Ritacco V., Lopez B., De Kantor I. N., Barrera L., Errico F., Nader A. (1991). Reciprocal cellular and humoral immune responses in bovine tuberculosis. *Research in veterinary science*, 50: 365-367.
104. Rivas C., Greif G., Coitinho C., Araújo L., Laserra P., Robello C. (2012). Primeros casos de tuberculosis pulmonar por *Mycobacterium bovis*. Una zoonosis reemergente en Uruguay. *Revista Médica Urug*, 28 (3): 209-214.
105. Rodríguez-Campos S., Smith N. H., Boniotti M. B., Aranaz, A. (2014). Overview and phylogeny of *Mycobacterium tuberculosis* complex organisms: Implications for diagnostics and legislation of bovine tuberculosis. *Research in Veterinary Science*, 97: S5–S19.
106. Rodríguez de Marco J., Sánchez D., Alvarez Goya M. (2007) El Control de la tuberculosis en Uruguay: 25 años de la implantación del Programa Nacional de Control de la Tuberculosis. Montevideo: OPS; 2007 (HDM/CD/459-07), 16pp.
107. Rothel J. S., Jones S. L., Corner L. A., Cox J. C., Wood P. R. (1992). The gamma-interferon assay for diagnosis of bovine tuberculosis in cattle: condition affecting the production of gamma-interferon in whole blood culture. *Australian Veterinary Journal*, 69: 1-4.
108. Runyon, E. H.; Karlson, A. G.; Kubica, G. P.; Wayne, L. G. (1980). *Mycobacterium In* Lennette E. H. ed. *Manual of Clinical Microbiology* 3er Ed. Washington D.C. American Society for Microbiology: 150-179.
109. Ryan T. J., Buddle B. M., de Lisle G. W. (2000). An evaluation of the gamma interferon test for detecting bovine tuberculosis in cattle 8 to 28 days after tuberculin skin testing. *Research in Veterinary Science*, 69: 57–61.
110. Schiller I., Vordermeier H. M., Waters W. R., Whelan A. O., Coad M., Gormley E., Buddle B. M., Palmer M., Thacker T. McNair J., Welsh M., Hewinson R. G., Oesch B. (2010a) Bovine tuberculosis: Effect of the tuberculin skin test on in vitro interferon gamma responses. Mini review. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 136: 1–11
111. Schiller I., Oesch B., Vordermeier H. M., Palmer M. V., Harris B. N., Orloski K. A., Buddle B. M., Thacker T. C., Lyashchenko K. P., Waters W. R. (2010b). 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: 205–220.
112. Schiller I., Waters W. R., Vordermeier H. M., Jemmi T., Welsh M., Keck N., Whelan A., Gormley E., Boschioli M. L., Moyon J. L., Vela C., Cagiola M., Buddle B. M., Palmer M., Thacker T., Oesch B. (2011) Bovine tuberculosis

- in Europe from the perspective of an officially tuberculosis free country: Trade, surveillance and diagnostics. *Vet Microbiol*, 151: 153–159.
113. 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. *InVet*, 9 (1): 27-33.
  114. Serna M. & Inderkum R. (1986). Manual de manejo de animales sospechosos de tuberculosis en establecimientos de faena. *In: Tuberculosis y Brucelosis Bovina en el Uruguay*. Instituto Iberoamericano de Cooperación para la Agricultura (IICA)-Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca (MGAP). P 65-69.
  115. Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria (SENASA) (2000). Actualización en Tuberculosis Bovina. Subcomisión Nacional de Tuberculosis Bovina. 76p.
  116. Smith T. (1898). A comparative study of bovine tubercle bacilli in man in relation to infection in animals. *Exp Med*, 3: 451-11.
  117. Snider D. E. (1982). The tuberculin skin test. *American Review of Respiratory Diseases*, 125 (3): 108-118.
  118. Tacquet A., Tison F., Devulder B., Roos P. (1967) Techniques for decontamination pathological specimens for culturing Mycobacteria. *Bull. Union against. Tuberc*, 39: 21-24.
  119. Thoen C. O., Steele J. H., Gilsdorf M. J. (2006). *Mycobacterium bovis* Infection in Animals and Humans. 2ª ed. Blackwell Publishing. Iowa, Estados Unidos.
  120. Thom M., Morgan I. H., Hope J. C., Villarreal-Ramos B., Martin M., Howard C. J. (2004). The effect of repeated tuberculin skin testing of cattle on immune responses and disease following experimental infection with *Mycobacterium bovis*. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 102: 399-412.
  121. Tizard I. R. (2009). Introducción a la Inmunología Veterinaria. 8ª edición. Elsevier España, S.L. Barcelona, España.
  122. United States Department of Agriculture (USDA)-Animal and Plant Health Inspection Service (APHIS)-Veterinary Service (VS) (2011). Assessment of Pathways for the Introduction and Spread of *Mycobacterium bovis* in the United States. 131p. Disponible en [https://www.aphis.usda.gov/animal\\_health/emergingissues/](https://www.aphis.usda.gov/animal_health/emergingissues/). Fecha de consulta: 6 de septiembre de 2016.
  123. United States Department of Agriculture (USDA)-Animal and Plant Health Inspection Service (APHIS) (2014). Questions and Answers: Bovine Tuberculosis. pp 2. Disponible en [https://www.aphis.usda.gov/publications/animal\\_health/content/printable\\_version/faq\\_bovine\\_tb.pdf](https://www.aphis.usda.gov/publications/animal_health/content/printable_version/faq_bovine_tb.pdf). Fecha de consulta: 12 de agosto del 2016.
  124. van Soolingen D, Hoogenboezem T, de Haas P.E., Hermans P. W., Koedam M. A. (1997). A novel pathogenic taxon of the *Mycobacterium tuberculosis* complex, *Canettii*: characterization of an exceptional isolate from Africa. *Int J Syst Bacteriol*, 47: 1236-45.
  125. von Gehlen A. (2015). Descripción de datos de ganado lechero enviado a faena sanitaria por Tuberculosis Bovina en el 2013 en Uruguay. Tesis de Grado. Facultad de Veterinaria. Universidad de la República. Montevideo, Uruguay.

126. Vordermeier H. M., Whelan A., Cockle P. J., Farrant L., Palmer N., Hewinson R. G. (2001). Use of Synthetic Peptides Derived from the Antigens ESAT-6 and CFP-10 for Differential Diagnosis of Bovine Tuberculosis in Cattle. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, 8 (3): 571-578.
127. Vordermeier H. M., Chambers M. A., Cockle P. J., Whelan A. O., Simmons J., Hewinson R. G. (2002). Correlation of ESAT-6-Specific Gamma Interferon Production with Pathology in Cattle following *Mycobacterium bovis* BCG Vaccination against Experimental Bovine Tuberculosis. *Infection and Immunity*, 70 (6): 3026-3032.
128. Vordermeier H. M., Whelan A. O., Hewinson R.G. (2008). The scientific case for the gamma-interferon Bovigam assay. *Gov Vet J*, 19: 38–43.
129. Vordermeier H. M., Pérez de Val B., Buddle B. M., Villareal-Ramos B., Jones G. J., Hewinson R. G., Domingo M. (2014). Vaccination of domestic animals against tuberculosis: review of progress and contributions to the field of the TBSTEP project. *Research in veterinary science*, 97: 53-60.
130. 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, gd (WC1+) T cells and CD 68+ cells. *J Comp Pathol*, 133: 223-234.
131. Waters W.R., Palmer M.V., Buddle B.M., Vordermeier H.M. (2012). Bovine tuberculosis vaccine research: historical perspectives and recent advances. *Vaccine*, 30: 2611-2622.
132. Wells S. J., VanderWaal K. L., Picasso C., Ribeiro Lima J., Craft M., Alvarez J., Perez A. (2015). Epidemiología y sistemas de vigilancia basados en riesgo para la detección de Tuberculosis Bovina. *In XLIII Jornadas Uruguayas Buiatría 2015 “Dr. Recaredo Ugarte”*. 11 y 12 de Junio de 2015. Paysandú, Uruguay. p 52-58.
133. Whipple D. L., Bolin C. A., Miller J. M. (1996). Distribution of lesions in cattle infected with *Mycobacterium bovis*. *J Vet Diagn Invest*, 8: 351-54.
134. Whipple D. L., Palmer M. V., Slaughter R. E., Jones S. L. (2001). Comparison of purified protein derivatives and effect of skin testing on results of a commercial gamma interferon assay for diagnosis of tuberculosis in cattle. *J Vet Diagn Invest*, 13: 117-122.
135. Williams R. S. & Hoy W. A. (1930), “The viability of *B. tuberculosis* (bovinus) on pasture land, in stored faeces and in liquid manure,” *Journal of Hygiene*, 30: 413–419.
136. Wood P. R., Corner L. A., Plackett P. (1990). Development of a simple, rapid in vitro cellular assay for bovine tuberculosis based on the production of  $\gamma$  interferón. *Res Vet Sci*, 49: 46-49.
137. Wood P. R., Corner L. A., Rothel J. S., Baldock C., Jones S. L., Cousins D. B., McCormic., Francis B. R., Creeper J., Tweddle N. E. (1991) Field comparison of the interferon-gamma assay and the intradermal tuberculin test for the diagnosis of bovine tuberculosis. *Australian Veterinary Journal*. 68 (9): 286-290.
138. Wood P., Corner L., Rothel J., Ripper J., Fifis T., McCorimck B., Francis B., Melville L., Small K., de Witte K., Tolson J., Ryan T., de Lisle G., Cox J., Jones S. (1992). A field evaluation of serological and cellular diagnostic tests for bovine tuberculosis. *Vet Microbiol*, 31: 71-79.

139. Wood P. R. & Rothel J. S. (1994). In vitro immunodiagnostic assay for bovine tuberculosis. *Vet Microbiol*, 40: 125-135.
140. Wood P. R. & Jones S. L. (2001). BOVIGAM™: an in vitro cellular diagnostic test for bovine tuberculosis. *Tuberculosis*, 81 (1/2): 147-155.
141. Zumárraga M. J., Arriaga C., Barandiaran S., Cobos-Marín L., de Waard J., Estrada-García I., Figueiredo T., Figueroa A., Jiménez F., Gomes H. M., González-y-Merchand J. A., Macías A., Milián-Suazo F., Rodríguez C. A. R., Santillán M. A., Suffys P. N., Trangoni M. D., Zárraga A. M., Cataldi A. (2013). Understanding the relationship between *Mycobacterium bovis* spoligotypes from cattle in Latin American Countries. *Research in Veterinary Science*, 94: 9–21.
142. <http://www.inale.org/>
143. <http://www.mgap.gub.uy/dgsg/InformacionEpidemiologica/InformesSemanalesZoonoticas/InformesSemanalesZoonoticas.htm>
144. <http://www.mgap.gub.uy/dgsg/Legislacion/LegislacionSanitariaAnimal.htm>
145. <http://www.senasa.gov.ar/Archivos/File/File1008-5.pdf>
146. [www.oie.int](http://www.oie.int) fecha de consulta: 10 de Abril de 2015
147. Decreto N° 20/998 del 22 de enero de 1998. disponible en: <https://www.impo.com.uy/bases/decretos/20-1998>. Fecha de consulta: 13 de diciembre de 2016.



