

**UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA**

**FACULTAD DE VETERINARIA**

**ESTANDARIZACIÓN Y VALIDACIÓN DE NUEVAS TÉCNICAS PARA EL  
DIAGNÓSTICO DE *MYCOBACTERIUM BOVIS***

**Por**

LLUBERAS VALCHEFF, Ignacio Gabriel

TESIS DE GRADO presentada como uno de  
los requisitos para obtener el título de Doctor  
en Ciencias Veterinarias  
Orientación: Producción Animal

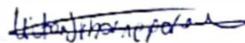
MODALIDAD: Ensayo Experimental

**MONTEVIDEO  
URUGUAY  
2023**

## PÁGINA DE APROBACIÓN

Tesis de grado aprobada por:

Presidente de mesa:



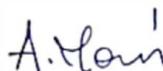
Lic. Victoria Iribarnegaray

Segundo miembro (Tutor):



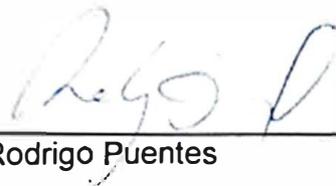
Dra. Laureana De Brun

Tercer miembro:



Dra. Adriana Marin

Cuarto miembro:



Dr. Rodrigo Puentes

Fecha:

31/10/2023

Autor:



Ignacio L. Utreras

## **AGRADECIMIENTOS**

A mi tutora, Dra. Laureana de Brun, por las incontables horas dedicadas a este trabajo, su continuo apoyo, voluntad y disposición para llegar al mejor resultado posible durante los años que dedicamos a este proyecto.

A mi co-tutor, Dr. Rodrigo Puentes, por los consejos dados, el tiempo dedicado y la disposición que siempre tuvo hacia este trabajo.

A todo el personal de la Unidad de Microbiología- Departamento de Patobiología de la Facultad de Veterinaria, por permitirme utilizar sus instalaciones y hacerme parte del equipo demostrando siempre su apoyo y disposición.

A mi familia, por todo el apoyo brindado, por darme la oportunidad de perseguir mis sueños y porque sé que la felicidad será compartida.

A mis amigos y compañeros, por acompañarme durante todos estos años.

## TABLA DE CONTENIDO

<b>PÁGINA DE APROBACIÓN</b>	<b>2</b>
<b>AGRADECIMIENTOS</b>	<b>3</b>
<b>TABLA DE CONTENIDO</b>	<b>4</b>
<b>LISTA DE CUADROS Y FIGURAS</b>	<b>6</b>
<b>1. RESUMEN</b>	<b>7</b>
<b>2. SUMMARY</b>	<b>8</b>
<b>3. INTRODUCCIÓN</b>	<b>9</b>
<b>4. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA</b>	<b>11</b>
4.1 Definición	11
4.2 Etiología	11
4.3 Epidemiología	12
4.4 Patogenia	13
4.5 Respuesta inmune	15
4.5.1 Anergia	17
4.6 Signos clínicos	19
4.7 Diagnóstico	19
4.7.1 Detección directa del agente etiológico	20
4.7.1.1 Examen microscópico	20
4.7.1.2 Cultivo bacteriológico	20
4.7.1.3 Histopatología	21
4.7.1.4 Método de reconocimiento de ácidos nucleicos	21
4.7.2 Detección de la respuesta inmune del hospedador	22
4.7.2.1 Intradermotuberculinización	22
4.7.2.2 Prueba del Interferón-Gamma	23
4.7.2.3 ELISA	23
4.8 Legislación Nacional	25
4.9 Tuberculosis bovina como zoonosis	27
4.10 Importancia económica	28
<b>5. HIPÓTESIS</b>	<b>30</b>
<b>6. OBJETIVOS</b>	<b>30</b>
6.1 Objetivo general	30
6.2 Objetivos específicos	30
<b>7. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>31</b>
7.1 Caracterización del establecimiento	31
7.2 Obtención de muestras	31
7.3 Cultivo bacteriológico de cepa de referencia	32
7.4 Extracción de ADN bacteriano de diferentes tipos de muestras	32
7.5 PCR convencional para <i>Mycobacterium bovis</i>	32
7.6 Estandarización de la <i>Droplet digital</i> PCR para <i>Mycobacterium bovis</i>	32

7.7 Sensibilidad y especificidad analítica y diagnóstica de la PCR y <i>Droplet digital</i> PCR para <i>Mycobacterium bovis</i>	33
7.8 Estandarización de los ELISAs indirectos	34
7.9 Procesamiento de muestras por <i>Droplet digital</i> PCR	34
7.10 Análisis de resultados	34
<b>8. RESULTADOS</b>	<b>35</b>
8.1 Puesta a punto de la técnica PCR convencional	35
8.2 Puesta a punto de la técnica “ <i>Droplet digital</i> PCR” (ddPCR)	36
8.3 ELISAs indirectos	38
8.4 <i>Droplet digital</i> PCR (ddPCR)	39
<b>9. DISCUSIÓN</b>	<b>40</b>
<b>10. CONCLUSIONES</b>	<b>41</b>
<b>11. BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>46</b>
<b>12. ANEXOS</b>	<b>56</b>

## LISTA DE CUADROS Y FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Representación de la respuesta inmune frente a <i>Mycobacterium bovis</i> .....	17
<b>Figura 2.</b> Técnica PCR convencional utilizando diluciones de la cepa de referencia de <i>Mycobacterium bovis</i> .....	35
<b>Figura 3.</b> Determinación de las condiciones óptimas para la validación de la técnica utilizando la cepa de referencia.....	36
<b>Figura 4.</b> Límite de detección de la técnica <i>Droplet Digital</i> PCR utilizando diluciones seriadas en base 10 de la cepa de referencia.....	36
<b>Figura 5.</b> Límite de detección de la técnica <i>Droplet Digital</i> PCR utilizando diluciones seriadas en base 10 desde sangre entera inoculada.....	37
<b>Figura 6.</b> Resultados obtenidos por <i>Droplet Digital</i> PCR para una muestra de campo.....	39
<b>Tabla 1.</b> Estatus serológico contra la tuberculosis bovina comparando los antígenos P22 (P22+/P22-) y PPD (PPD+/PPD-) en relación al estatus de reacción a la prueba anocaudal (PAC+/PAC-) expresado en valores absolutos y porcentajes.....	38
<b>Tabla 2.</b> Valores de sensibilidad, especificidad y estimación de los valores predictivos para ambos ELISAs comparándolo con la PAC expresados en porcentaje.....	38

## 1. RESUMEN

La tuberculosis bovina (TBB) es una enfermedad bacteriana crónica de los animales causada por el complejo de *Mycobacterium tuberculosis*, principalmente por *M. bovis*. El ganado es considerado como el principal reservorio de *M. bovis* y constituye la primera fuente de infección de esta especie para los seres humanos, siendo considerada en estos casos como una zoonosis. Debido a su importancia es que desde hace años existen campañas para control y erradicación a nivel mundial, con resultados parcialmente satisfactorios. Los programas de control implementados se basan en pruebas, sacrificios de animales positivos y certificación de establecimientos libres de TBB. Desde el punto de vista diagnóstico, el desarrollo de nuevas pruebas que busquen corregir las falencias presentes y brindar alternativas resulta crucial para contribuir a las campañas sanitarias de esta enfermedad. En este sentido, el objetivo del presente trabajo fue la estandarización de diferentes pruebas para el diagnóstico de esta enfermedad, comparándolas con los métodos clásicos utilizados en nuestro país (intradermotuberculinización). Para esto se desarrollaron dos pruebas diagnósticas, de las cuales una de ellas (ELISA), permite la detección de anticuerpos circulantes, técnica ya descrita por otros autores pero que brinda datos alentadores al utilizar el antígeno P22, más específico con respecto a los probados anteriormente. Por otra parte, el desarrollo de la *Droplet digital* PCR (ddPCR), técnica de última generación, que ha sido utilizada previamente para el diagnóstico de tuberculosis en pacientes humanos, demostrando una elevada sensibilidad y especificidad en comparación con otras técnicas moleculares. Los resultados de las técnicas serológicas desarrolladas presentaron una gran variabilidad, demostrando ser útiles para la detección de animales no reaccionantes a las pruebas rutinarias. Fueron 38 (25%) los animales negativos a la prueba intradérmica (PAC) que presentaron anticuerpos circulantes frente a las proteínas P22 y/o PPD de *M. bovis*, por lo que se sugiere que podrían ser animales en anergia. Por su parte, la estandarización de la técnica de ddPCR permitió la detección de menores números de bacilos en comparación con la técnica de PCR a tiempo final. Se logró la detección de *M. bovis* en bovinos de un rodeo comercial a partir de muestras de sangre entera, demostrando que la técnica resulta de utilidad para el diagnóstico de la infección por dicho agente. Los resultados obtenidos muestran el desarrollo de dos técnicas diagnósticas para la tuberculosis bovina que podrían ser de utilidad para brindar apoyo a los programas de control en nuestro país.

## 2. SUMMARY

Bovine tuberculosis (TBB) is a chronic bacterial disease of animals caused by the *Mycobacterium tuberculosis* complex, mainly *M. bovis*. Cattle are considered the main reservoir of *M. bovis* and constitute the first source of infection of this species for humans, being considered in these cases as a zoonosis. Due to its importance, there have been campaigns for control and eradication worldwide for years, with partially satisfactory results. The control programs implemented are based on tests, sacrifices of positive animals, and certification of establishments free of TBB. From the diagnostic point of view, developing new tests that seek to correct the present shortcomings and provide alternatives is crucial to contribute to the health campaigns of this disease. In this sense, this work's goal was to standardize different tests for the diagnosis of this disease, comparing them with the classic methods used in our country (Caudal fold tuberculin test). For this, two diagnostic tests were developed, one of which (ELISA) allows the detection of circulating antibodies, a technique already described by other authors but which provides encouraging data when using the P22 antigen, more specific than those previously tested. On the other hand, the development of the *Droplet digital* PCR, a state-of-the-art technique previously used for diagnosing tuberculosis in human patients, demonstrates high sensitivity and specificity compared to other molecular techniques. The results of the developed serological techniques presented significant variability, proving helpful in detecting non-reactive animals to routine tests. There were 38 (25%) negative animals to the intradermal test (PAC) that presented circulating antibodies against the P22 and/or PPD proteins of *M. bovis*, which suggests that they could be anergic animals. For its part, the standardization of the ddPCR technique allowed the detection of lower numbers of bacilli compared to the end-time PCR technique. The detection of *M. bovis* was achieved in cattle from a commercial herd from whole blood samples, demonstrating that the technique is useful for the diagnosis of infection by said agent. The results show the development of two diagnostic techniques for bovine tuberculosis that could support control programs in our country.

### 3. INTRODUCCIÓN

La tuberculosis continúa siendo una enfermedad de importancia tanto en el hombre como en los animales. *Mycobacterium bovis* es el agente causal de la tuberculosis en animales, principalmente en el ganado bovino, aunque otros animales domésticos o salvajes, en cautiverio o vida libre, pueden ser afectados. El hombre puede infectarse y enfermar de tuberculosis por *M. bovis* (TBB), considerada en estos casos como una zoonosis (Rivas et al. 2012). Se calcula que hasta un 10% de los casos de tuberculosis humana son debidos a *M. bovis* (OMSA 2021). La enfermedad es contagiosa y se transmite directamente por contacto con animales domésticos o silvestres infectados o, de forma indirecta, por ingestión de alimentos contaminados.

Debido a su implicancia como zoonosis es que desde hace años existen campañas para control y erradicación a nivel mundial, con resultados parcialmente satisfactorios. Los programas de control implementados se basan en pruebas, sacrificios de animales positivos y certificación de establecimientos libres de TBB (Kantor y Ritacco 2006), basándose en lo dispuesto por la Organización Mundial de Sanidad Animal (OMSA, 2021).

En Uruguay se ha restringido la importancia de la TBB a la ganadería lechera, existiendo una baja frecuencia histórica de decomisos por tuberculosis en bovinos de carne (Kantor y Ritacco, 2006). El programa actual de control de TBB de Uruguay se basa en la prueba de tuberculina anocaudal (PAC), que consta en una prueba de hipersensibilidad tardía basada en la medición de la inflamación dérmica causada principalmente por la respuesta inmune celular, siendo la única prueba oficial aprobada dentro de nuestro país. Para confirmar a los animales como positivos se debe identificar al animal y se notifica al Ministerio de Ganadería Agricultura y Pesca (MGAP), el cual, mediante los Veterinarios Oficiales de División de Sanidad Animal, procede a realizar la prueba de tuberculina cervical comparada (PCC) para confirmar y marcar a los animales positivos con una T en la quijada, quienes serán aislados y enviados directo a faena sanitaria (Irureta, 2016). Sin embargo, desde hace tiempo, se cuestiona la sensibilidad de la misma para la detección precoz de la infección en los establecimientos focos (Meyer 2012). Además, el comportamiento epidemiológico de la prueba rutinaria ha sido una preocupación constante por sus parámetros irregulares de sensibilidad (74 a 94%) y especificidad (96 a 99%), lo que predispone a la presencia de resultados falsos positivos y falsos negativos (Gil 2012).

La implementación del programa nacional de control ha dado como resultado una disminución gradual de la prevalencia de la tuberculosis bovina en el país, aunque teniendo falencias para eliminar la enfermedad en los rodeos en donde se establece. El comportamiento de la prueba diagnóstica de rutina, el gran tamaño de los rebaños, los movimientos de animales y el posible papel como reservorio de la fauna silvestre, han sido probablemente los factores principales que han dificultado el saneamiento de predios focos, ocasionando que los mismos tarden mucho tiempo en eliminar por completo la enfermedad del rodeo (en algunos casos hasta 10 años), con todo lo que ello conlleva (Moreira 2021).

En base a esto, el desarrollo de métodos diagnósticos alternativos a los utilizados por la campaña oficial servirán de apoyo para lograr un diagnóstico precoz de la enfermedad. En este sentido, las pruebas de amplificación de ácidos nucleicos (PCR y sus variantes) podrían ser técnicas rápidas, sensibles y específicas para la detección

precoz de *Mycobacterium spp.* (Wei et al. 2019) y de hecho se han utilizado desde hace mucho tiempo para el diagnóstico de tuberculosis en humanos (MacGregor-Fairlie, Wilkinson, Besra, y Goldberg. 2020). Una técnica innovadora es la *Droplet digital* PCR (ddPCR), técnica ya probada para *M. tuberculosis* con resultados alentadores. Esta técnica ha demostrado ser capaz de detectar menores concentraciones de ADN circulante en sangre de *M. tuberculosis*, en comparación a la PCR cuantitativa existente (*Real time* PCR) (Yang et al. 2017) y por lo tanto es de esperar que sea de utilidad para *M. bovis*, logrando así una detección temprana *in vivo*. Actualmente la técnica de la PCR a tiempo final se utiliza principalmente sólo para el diagnóstico post-mortem de los animales (Schiller et al. 2010), mientras que la técnica de Real-Time PCR ha sido probada con fines investigativo para el diagnóstico desde tejido de animales faenados (Moura et al. 2016), y la ddPCR solo ha sido utilizada para el diagnóstico en humanos (Yang et al. 2017).

Otra técnica que se ha probado para el diagnóstico de TBB, es el ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA), el cual ha sido utilizado en varios trabajos con resultados alentadores para detectar animales infectados en el rodeo, principalmente aquellos que se vuelven anérgicos (Souza et al. 2022, 2019; Farias et al. 2012). Esto se debe a que los bovinos en ciertas circunstancias de la enfermedad (tuberculosis avanzada y posiblemente diseminada) pueden volverse incapaces de reaccionar frente a un antígeno administrado. Se han encontrado algunos animales con la enfermedad típica en el momento del sacrificio sin haber respondido nunca a la prueba cutánea de la tuberculina. Estos animales anérgicos al no reaccionar a la prueba intradérmica permanecen en el rodeo, constituyendo así una fuente potencial de infección (Lilenbaum y Fonseca 2006).

En base a estos antecedentes, es razonable pensar que el uso combinado de métodos diagnósticos alternativos junto con las pruebas tradicionales de tuberculina, podrán mejorar el diagnóstico de la tuberculosis bovina, logrando resultados más confiables (Otero et al. 2003), al mismo tiempo que reduciendo los tiempos para el saneamiento de los rodeos.

Con esta tesis de grado se busca desarrollar técnicas diagnósticas alternativas, una de ellas de última generación, para contribuir al diagnóstico *in vivo* de la tuberculosis en el ganado bovino.

## 4. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

### 4.1 Definición

La tuberculosis bovina (TBB) es la infección del ganado bovino producida por cualquier miembro del complejo *Mycobacterium tuberculosis*. Es una enfermedad bacteriana crónica de los animales causada por el complejo de *Mycobacterium tuberculosis*, principalmente por *M. bovis*, pero también por *M. caprae* y, en menor medida, por *M. tuberculosis* (OMSA, 2021). Actualmente *Mycobacterium bovis* es conocida por ser el principal agente causante de la tuberculosis bovina, sin embargo, este bacilo tuberculoso tiene el rango de hospedadores más amplio de todos los miembros del complejo.

Es una importante enfermedad infecciosa del ganado bovino que afecta a un amplio rango de mamíferos, incluyendo el humano (zoonosis), creando tanto problemas de salud pública como pérdidas económicas debido a factores como la disminución de la producción de leche, decomisos durante la evaluación post mortem en la planta de faena y costos de campañas de control y erradicación. Se caracteriza por un proceso inflamatorio crónico, que afecta principalmente a los pulmones y ganglios linfáticos asociados al sistema respiratorio, caracterizado por la formación de granulomas caseosos y necrosantes (Carrisoza-Urbina et al. 2019).

### 4.2 Etiología

El género *Mycobacterium* está encuadrado en el phylum *Actinobacteria*, clase *Actinobacteria*, orden *Actinomycelates*, suborden *Corynebacterineae*, familia *Mycobacteriaceae*. Este género comprende más de 120 especies y se encuentran descritas bacterias saprofitas, patógenos oportunistas y patógenos estrictos del hombre y los animales (Brenner 2005). Las características fundamentales compartidas por todos los miembros de este género son su forma bacilar, la dependencia de oxígeno, la inmovilidad, la imposibilidad para formar esporas y la ácido-alcohol resistencia. Esta última propiedad se debe al elevado contenido en lípidos en su pared celular, entre los que se incluyen los característicos ácidos micólicos (Luchter 2004). La gran cantidad de lípidos concentrados en la pared celular le brindan resistencia frente a determinados fármacos, desinfectantes y contra factores adversos en el medio ambiente tales como la desecación. Son bacterias que poseen gran resistencia al calor aunque las radiaciones ultravioletas y la pasteurización (exposición a 72°C durante 15 segundos) son capaces de inactivarlas (Biberstein y Hirsch 1999).

La clasificación de este género divide las micobacterias en dos grupos: micobacterias no cultivables o difícilmente cultivables (*M. leprae* y *M. lepraemurium*) y cultivables. Dentro de esta última se establece una subdivisión en micobacterias de crecimiento rápido (aquellas que dan lugar a colonias visibles en medios de cultivo sólidos en menos de 7 días), y las de crecimiento lento (las que tardan más de 7 días en producir colonias visibles en medio sólido). El grupo de micobacterias de crecimiento lento engloba las micobacterias de mayor importancia veterinaria y de Salud Pública. En este grupo se encuadra el complejo *Mycobacterium tuberculosis* (*Mycobacterium tuberculosis complex*), que incluye todas las especies causantes de la tuberculosis humana y en mamíferos; así como también a el complejo *Mycobacterium avium* (*Mycobacterium avium complex*) (Romero Martínez 2010).

El complejo *Mycobacterium tuberculosis* se caracteriza por causar tuberculosis en humanos y animales e incluye varias especies tales como *M. tuberculosis* (Koch

1882), *M. bovis* (Karlson yLessel 1970), *M. bovis* BCG (bacilo Calmette-Guérin), *M. africanum* (Castets, Rist, yBoisvert 1969), *M. microti* (Reed 1957), *M. caprae* (Aranaz, Alicia, Debby Cousins, Ana Mateos, y Lucas Domínguez. 2003), *M. pinnipedii* (Cousins et al. 2003), entre otras. A pesar de que los bacilos tuberculosos humanos y bovinos pueden diferenciarse por rango de hospedadores, virulencia y características fisiológicas, la diferencia genómica es mínima (Garnier et al. 2003), ya que los miembros de este complejo comparten 99,95% de identidad a nivel de ADN (Rodríguez, García, Restrepo, y Zambrano. 2010).

### 4.3 Epidemiología

Como ya fue mencionado, *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, los cuales al actuar de reservorio juegan un papel importante en la epidemiología. Estas características hacen de la tuberculosis bovina una enfermedad con un patrón epidemiológico complejo, principalmente en lo que refiere a las vías de transmisión al bovino.

A pesar de ser una bacteria intracelular, tiene la capacidad de sobrevivir en el medio ambiente si las condiciones son favorables, variando su supervivencia según la estacionalidad y el sustrato en el cual se encuentre, siendo más frecuente encontrarla en el agua, materia fecal o pasturas (Fine, Carole, Gardiner, y Kaneene. 2011). Sin embargo, el propio ganado bovino enfermo sigue siendo la principal fuente de infección para el mantenimiento de la tuberculosis (Neill, Bryson, yPollock 2001).

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, Boschioli, y Saegerman 2009).

La enfermedad se disemina entre rodeos principalmente por el desplazamiento de animales domésticos infectados asintomáticos y el contacto con animales salvajes infectados. Un solo animal puede transmitir la enfermedad a muchos otros antes de manifestar los primeros signos clínicos. En muchos casos, el curso de la infección es crónico y puede no haber signos clínicos, ni siquiera en casos avanzados, en los que puede haber muchos órganos afectados (Guaman 2012).

La TBB tiene una distribución mundial, presentando grandes variaciones en su prevalencia entre los distintos países. Aunque en los países más desarrollados está erradicada o se encuentra en una fase avanzada de erradicación, en los países en desarrollo sigue siendo en muchos casos una enfermedad endémica (Romero Martínez 2010). En Europa occidental, Canadá y Estados Unidos, la infección se ha reducido a niveles inferiores al 0,1 % (Reviriego Gordejo y Vermeersch 2006; Palmer yWaters 2011). Centroamérica, con excepción de Nicaragua y el Caribe, tiene porcentajes de animales afectados muy bajos (menos del 1%) (De Kantor et al. 2008; Abalos y Retamal 2004). Los mayores niveles de infección se encuentran en América del Sur (De Kantor y Ritacco, 2006), en buena parte del territorio de África y ciertas

partes de Asia, con prevalencias del 1% o superiores, siendo las cuencas lecheras las más afectadas (Cosivi et al. 1998).

En Uruguay se ha restringido la importancia de la TBB a la ganadería lechera; existe una baja frecuencia histórica de decomisos por tuberculosis en bovinos de carne, la cual está asociada a las condiciones de producción extensiva con un bovino cada 1.35 hectáreas y a las vías principales de transmisión de la enfermedad (aerógena y digestiva) que respaldan la situación constatada (De Kantor et al. 2008).

Los esfuerzos del programa nacional de control han dado como resultado una disminución gradual de la prevalencia de la tuberculosis bovina en el país durante los últimos 50 años, con menos de 11 brotes notificados cada año entre 2003 y 2010. Sin embargo, en 2011-2013 el número medio de brotes anuales aumentó, con más de 15 brotes de TBB reportados cada año, principalmente en rodeos lecheros, sin causa aparente de este cambio en la tendencia a largo plazo (Picasso et al., 2017). El rápido crecimiento y desarrollo de la lechería junto a la creación de mega emprendimientos, de mayor dimensión a los habituales, lleva directamente a una mayor cantidad y concentración de animales; conjuntamente el manejo intensivo de alimentación, las plazas de comida y el stress productivo de animales que han aumentado su producción en muy poco tiempo, son factores que inciden en el contagio de la enfermedad (Irureta 2016).

En el 2020 se registraron 38 rodeos intervenidos en saneamiento y 11 en rastreo de su situación. Si se categorizan, el 76% son tambos, 19% son predios destinados a la producción de carne y 5% abocados a la recría/engorde. La prevalencia aparente de la enfermedad en el país se estima en base a los establecimientos y los animales positivos a las pruebas oficiales realizadas a bovinos mayores del año de edad, donde a nivel de establecimiento en rodeos lecheros representa el 2,7%, y 0,01% en rodeos de carne. A nivel animal en rodeos lecheros representa el 0,12%, mientras que la prevalencia intra rodeo (en focos) es del 0,7%, con diferencias según el tipo de producción. De los focos abiertos, el 50% llevan más de 3 años en proceso de saneamiento, pero mostrando una gran dispersión, con predios con más de 8 años en saneamiento. En cuanto a la reincidencia de focos, un 10% reinciden por segunda vez, y un 2 % por tercera vez (Moreira 2021). Esto muestra y justifica claramente por qué el Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca (MGAP) basa sus principales esfuerzos en controlar los establecimientos lecheros.

#### **4.4 Patogenia**

La enfermedad es contagiosa y se transmite directamente por contacto con animales domésticos o silvestres infectados, o de forma indirecta, por ingestión de alimentos contaminados. Las vías de infección se determinan post-mortem según la localización del complejo primario, en donde se entiende como tal, la lesión en el foco inicial y los ganglios linfáticos regionales afectados. La vía de contagio más importante en el bovino es la respiratoria (80%), que ocurre mediante inhalación de partículas de polvo contaminadas por la propia bacteria (Paullier et al. 1986; De Kantor et al. 2008). Esta vía de transmisión se ve facilitada por el comportamiento natural del bovino, especialmente en rodeos lecheros con altas densidades de animales como ocurre durante el ordeño, en feed lots, remates de feria y maniobras de transporte (Crosi 2017).

La vía digestiva (20%), ocurre ya sea por ingestión accidental de saliva u otras

secreciones de animales enfermos, contaminación de comederos o bebederos y el ambiente. Esta última es una vía muy importante de contagio para los terneros lactantes (Canal 2012). En adultos, aunque con menos frecuencia, la infección por la vía digestiva puede presentarse cuando las condiciones ambientales son favorables para la supervivencia de *M. bovis*, presente en las pasturas o agua de bebederos. 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, Pfeiffer, y Jackson 1994).

La infección cutánea es rara en animales y se debe a la contaminación de lesiones primarias con las micobacterias, y suele limitarse al punto de entrada y al ganglio linfático regional (Rodríguez et al. 2010). Otras vías de transmisión conocidas, aunque menos frecuentes, son la infección congénita, a través de vasos umbilicales, transmisión venérea e infección intramamaria (Neill et al. 1994).

La dosis infectiva del *M. bovis* depende de la vía de entrada del bacilo al organismo del animal, es así que para infectar un bovino por vía digestiva se necesita una dosis mucho mayor que para producir la infección por vía aerógena (Palmer y Ray Waters 2006). Se ha demostrado experimentalmente que dosis bajas de 1-5 bacilos pueden producir infección mediante la vía respiratoria (Neill, O'Brien, y Hanna 1991; Johnson et al. 2007), mientras que se necesitan del orden de 10<sup>6</sup> bacilos para producir la enfermedad por vía oral (Francis 1947).

Primariamente, las bacterias se multiplican en el sitio de ingreso y se desencadena una respuesta inmunitaria del huésped. Los macrófagos fagocitan al agente y lo tratan de destruir, pero las micobacterias presentan un mecanismo de evasión de lisis celular y pueden sobrevivir dentro de estas células. Estos, con el agente fagocitado, llegan a los linfonodos de drenaje y activan a los linfocitos T, donde la activación continua de los linfocitos lleva a la formación de los granulomas tratando de aislar a los bacilos (Rodríguez et al. 2010).

El bacilo tuberculoso una vez dentro del animal, puede diseminarse en dos etapas: una tuberculosis primaria y, posteriormente, una tuberculosis secundaria (período de diseminación post-primaria). La tuberculosis primaria comprende la lesión inicial en el órgano que actúa como puerta de entrada siendo éste el foco primario. Posteriormente o simultáneamente los bacilos drenan por vía linfática a los ganglios linfáticos regionales donde se origina el mismo tipo de lesión. La combinación de lesiones en el órgano de entrada y en el ganglio linfático regional constituye el complejo primario. La tuberculosis secundaria incluye el periodo de diseminación post-primario. Al verse afectado el sistema inmunológico del animal, los bacilos dan origen a granulomas en los órganos donde se detienen; la diseminación de las lesiones se puede realizar por vía linfática, sanguínea o por contacto seroso (Rodríguez et al. 2010). La diseminación de la bacteria por sangre al resto del organismo, genera múltiples granulomas en el parénquima de órganos tales como pulmón, hígado, riñón, testículo, glándula mamaria, médula ósea y meninges, cuadro que se denomina tuberculosis miliar. Si la diseminación es por la linfa y en forma retrógrada, se afectan las serosas como pericardio, pleuras y peritoneo, dando origen al cuadro conocido como tuberculosis perlada. Si el sistema inmune no detiene la multiplicación de la bacteria a este nivel, la infección se propaga por los canalículos de los órganos y puede llegar a formar cavidades en ellos, llegándose al cuadro conocido como tuberculosis

cavitaria, donde la micobacteria además puede ser eliminada al medio ambiente (Gazquez 1991).

El granuloma específico de la TBB, el tubérculo, se encuentra en forma nodular bien delimitado y de tamaño variable. Existe en ellos una disposición celular concéntrica alrededor del agente patógeno, predominando desde adentro hacia fuera por macrófagos activados y modificados (células epitelioides y de Langhans), linfocitos T y fibroblastos. Pasado algunos días, se observa al centro del granuloma un proceso de necrosis de caseificación determinado por la muerte sucesiva de células inflamatorias. Al cabo de algunas semanas, la lesión es encapsulada por tejido conectivo que más tarde se calcifica (Gehlen Thiessen 2015). Debido a que la vía respiratoria es la principal vía de infección en la TBB, se ha descrito que la mayor parte de las lesiones observadas en esta especie se localizan en la cavidad torácica. En un estudio realizado por (Corner et al. 1990), en donde examinó las ubicaciones de las lesiones tuberculosas en los órganos de bovinos con una sola lesión, encontró que el órgano afectado con mayor frecuencia era el linfonodo retrofaríngeo medial (29,4%), seguido del linfonodo mediastínico (28,2%), el linfonodo traqueobronquial (18,0%) y los pulmones (8,0%).

Otros factores como la edad del animal o su comportamiento, así como el sistema de producción influyen en la patogénesis de la enfermedad. En general, los animales jóvenes desarrollan lesiones más severas que los adultos (Martín-Hernando et al. 2007). Además, la enfermedad es más frecuente en vacas lecheras debido al hacinamiento, y un mayor periodo de vida y estrés productivo (Ramírez-Villaescusa et al. 2010).

#### **4.5 Respuesta inmune**

Para hacer frente a estos microorganismos intracelulares el hospedador cuenta con la respuesta inmune innata, mediada sobre todo por fagocitos y células Natural Killers, y con la respuesta inmune adaptativa. La inmunidad innata, generalmente, no puede erradicar estas infecciones por lo que se necesita la contribución de la inmunidad adaptativa, la cual está compuesta en este caso principalmente por los macrófagos activados y los linfocitos T, células responsables de brindar la principal respuesta protectora e impedir el crecimiento y diseminación del *M. bovis* (Abbas, Lichtman, y Pillai 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. La primera está involucrada en las primeras etapas de la enfermedad, mientras que la respuesta mediada por anticuerpos se detecta en etapas tardías (Neill, Bryson, y Pollock 2001). La inmunidad celular es el tipo de defensa mediada por linfocitos T, de los que existen dos tipos: los linfocitos T CD4+, que reclutan fagocitos y los activan a través de citoquinas como el IFN- $\gamma$  para inducir la muerte de los patógenos; y los 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 (Crosi 2017).

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

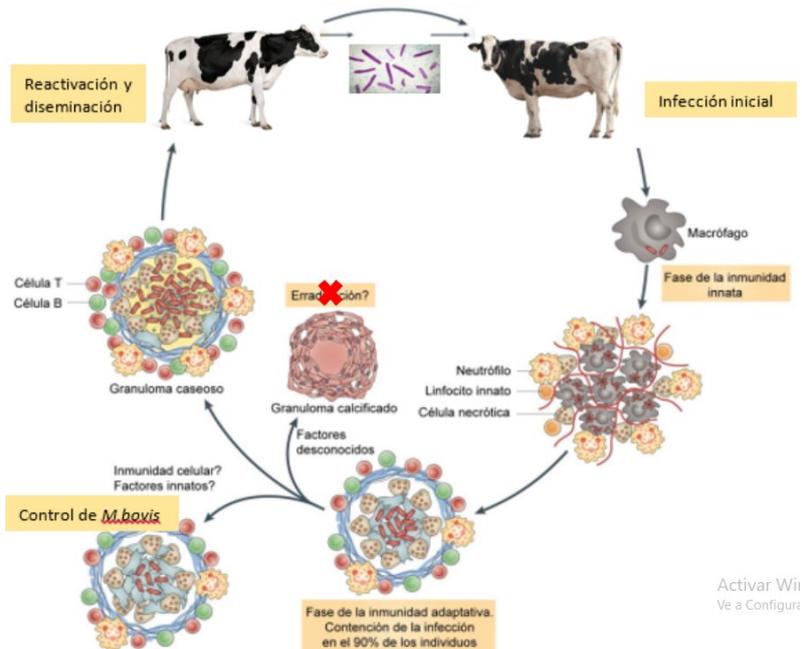
producida por macrófagos. Estos linfocitos liberan por un lado IL-1 con la capacidad de expandir la población de células T antígeno-específicas, y por otra parte, producen IFN- $\gamma$  y otras citoquinas que atraen más macrófagos al foco inicial y activan sus mecanismos micobactericidas (Neill et al. 1994; Pollock, Welsh, y McNair 2005). Los macrófagos son células del sistema inmune que cumplen un rol vital en las reacciones del hospedador cuando se enfrentan al bacilo tuberculoso, sin embargo, su papel tiene un rol antagónico; por un lado es la célula huésped de la micobacteria; y por el otro, es la célula efectora para el control y destrucción de dicho patógeno (Cooper y Khader 2008). Sirven de primera barrera en la defensa del hospedador, aunque su activación e interacción con el *M. bovis* llevan a una serie de eventos inmunopatológicos que resultan en la generación de una inflamación granulomatosa característica, capaz de causar lesiones tisulares (Neill, Bryson, y Pollock 2001). Este tipo de reacción inflamatoria, denominada hipersensibilidad de tipo retardada o de tipo IV, 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), siendo 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 pulmón, al ser un tejido que opone baja resistencia y por su alta tensión de oxígeno (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, Lichtman, y Pillai 2012). 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 respuesta inmune es el causante de la necrosis caseosa en el centro de los tubérculos en desarrollo, 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 (Crosi 2017; Dannenberg 2001)

En cuanto a la respuesta inmune de base humoral, ésta no resulta 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 que la inmunidad humoral adquiera mayor protagonismo (Casal 2015), con un incremento de anticuerpos específicos anti-*M. bovis* producidos por células plasmáticas (McNair, Welsh, y Pollock 2007).

A pesar de que no se han definido con exactitud la duración de ambos tipos de respuesta inmune, estudios experimentales 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 se observó que la respuesta inmune mediada por células se manifestaba entre 15 y 29 días post-infección (Palmer y Waters 2011; Casal 2015). Está demostrado que existe una fuerte correlación entre la reactividad de la prueba cutánea y las respuestas de los linfocitos, como se demostró en un seguimiento de 19 años de 22 reactores a la tuberculina en donde tan sólo tres individuos mostraron una reversión de la prueba cutánea a negativo (Toossi y Ellner 1996).

La importancia de comprender la forma en que se desencadena la respuesta inmune frente a *M.bovis* radica 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 (Neill, Bryson, y Pollock 2001), pero explorar otras alternativas resultará de interés para una mejor comprensión de la enfermedad.

Es importante resaltar los conceptos de animal infectado y animal enfermo. Un animal infectado es aquel que ha estado en contacto en algún momento con las micobacterias incluidas en complejo *Mycobacterium tuberculosis* y que, debido a ello, su sistema inmunológico responde frente a los antígenos de estos patógenos en una segunda exposición, por ejemplo, al realizar la intradermotuberculinización. Un animal enfermo es aquel que presenta sintomatología y/o lesiones compatibles con la tuberculosis y, por lo tanto, puede estar excretando el bacilo y transmitiendo la infección a otros animales. La reacción de un animal a las pruebas inmunológicas indica infección y no necesariamente desarrollo de la enfermedad (Rodríguez et al. 2010).



**Figura 1.** Representación de la respuesta inmune frente a *Mycobacterium bovis*. Adaptado de Nunes-Alves, C. et al (2014).

#### 4.5.1 Anergia

La anergia se define como la falta de reacción a un antígeno en un animal sensibilizado; es una forma de tolerancia inmunológica (Tizard 2009).

Se considera que la anergia es un mecanismo de tolerancia, por el cual los linfocitos T permanecen inactivos funcionalmente durante periodos prolongados. Si bien la sobrevivencia de las células que entran en anergia no es la normal, es mucho mayor que la de células que han iniciado el proceso de apoptosis. El mantenimiento del estado de anergia puede requerir o no la persistencia del antígeno y puede ser o no reversible con el agregado de IL-2. En sentido amplio, la anergia de células T puede ser de dos categorías: detención del crecimiento o anergia clonal e inhibición generalizada de la función proliferativa y efectora que algunos grupos denominan tolerancia adaptativa (Schwartz et al. 2004).

Es un mecanismo de tolerancia en el que el linfocito se inactiva intrínsecamente desde el punto de vista funcional después de un encuentro con el antígeno, pero permanece vivo durante un período prolongado de tiempo en el estado hiporreactivo. La supervivencia de la célula anérgica no es necesariamente el período de vida normal de la célula, pero debe ser mayor que el período estándar de 8 a 24 h observado para las células que han iniciado un proceso de muerte apoptótica. Una variedad de limitaciones funcionales caracterizan el estado anérgico, incluida la división celular, la diferenciación celular y la producción de citoquinas. La única característica acordada es que el estado en sí debe ser autónomo celular, distinguiéndose de la inmunorregulación mediada por otras células de la población (células reguladoras), aunque la inducción podría involucrar a dichas células (Schwartz et al. 2004).

La hiporreactividad inmunológica (anergia) es concomitante de enfermedades debidas a patógenos intracelulares y está bien demostrada en la tuberculosis. La expresión de anergia en la tuberculosis abarca la depresión de la hipersensibilidad de tipo retardado, que se manifiesta como una reacción deprimida a la prueba cutánea de la tuberculina. La evidencia de inmunosupresión, que parece limitarse principalmente a antígenos micobacterianos, se ha documentado en diferentes poblaciones humanas con tuberculosis activa en todo el mundo, independientemente del estado previo de vacunación con la cepa BCG. No se sabe si la atenuación de las respuestas del huésped a los antígenos de *Mycobacterium spp* que estimulan o mantienen la inmunidad protectora es un factor en el desarrollo de la tuberculosis o contribuye a la cronicidad de la enfermedad. Sin embargo, parece que la anergia en la tuberculosis activa está mediada en gran parte por monocitos que muestran signos de activación, posiblemente por exposición a antígenos micobacterianos o citocinas in situ. *Mycobacterium spp* y sus constituyentes son potentes en la estimulación de los monocitos para producir una serie de citocinas, en particular el factor de crecimiento transformante  $\beta$  (TGF- $\beta$ ), que es supresor de los linfocitos, desactiva las funciones efectoras de los macrófagos y promueve la fibrosis (Wahl 1992). Los circuitos inmunosupresores se activan in situ cuando los monocitos recién reclutados se encuentran con antígenos micobacterianos y sus productos; en el sitio de infección estos circuitos pueden contribuir a la inmunopatogénesis, mientras que en sitios locales de exposición a antígenos (prueba cutánea) pueden modular la expresión (Friedman 2000).

Tanto la anergia de la prueba cutánea como las respuestas de los linfocitos a la PPD varían según la carga micobacteriana y/o la extensión de la patología en el sitio de la enfermedad (Friedman 2000). Por ejemplo, entre los pacientes con tuberculosis pulmonar, aquellos con enfermedad muy avanzada no solo tienen una mayor frecuencia de pruebas cutáneas negativas (hasta un 50%), sino que el tamaño de su reacción es significativamente menor que en pacientes con tuberculosis pulmonar moderada o mínima. Por el contrario, el 100% de los pacientes con enfermedad mínima dan positivo en la prueba cutánea de PPD y demuestran reacciones sólidas (Toossi y Ellner 1996).

En cuanto al ganado bovino, (Lepper, Pearson, y Corner 1977) definieron la anergia como "el fracaso de un animal con evidencia visible de tuberculosis para mostrar una respuesta de hipersensibilidad retardada a la tuberculina" y se sabe que ocurre en animales con infección avanzada o generalizada. La ausencia de respuesta a la prueba de rutina en animales infectados ocurre particularmente cuando la carga bacteriana es alta (Medeiros, Marassi, Figueiredo, y Lilenbaum. 2010). Los complejos

mecanismos inmunológicos que subyacen a su desarrollo implican una interacción entre las micobacterias y las células fagocíticas, que luego interactúan con poblaciones específicas de células T.

Se han descrito signos clínicos inusuales de TBB asociados con la infección por el virus de la diarrea viral bovina (BVDV) en terneros, y se sospecha que el BVDV y posiblemente otros virus pueden interferir con la respuesta inmune de algunos animales a la TBB y otras infecciones, y pueden estar asociados con la anergia (Monies yHead 1999). Sin embargo, estudios realizados en nuestro país no encontraron asociación entre la respuesta a la PAC con la presencia de este virus, pero demostraron una asociación positiva entre la presencia de linfocitosis en animales positivos al virus de la leucosis bovina (de conocido efecto inmunosupresor) y la reacción positiva a la PAC (Giordano Fabre yTristant Lema 2020). También se menciona que las parasitosis así como la infección por Paratuberculosis puede interferir negativamente en la reacción a la prueba intradérmica (Salgado 2022).

#### **4.6 Signos clínicos**

Las manifestaciones clínicas de la enfermedad, natural o producida experimentalmente, están influenciadas por varios factores como son la ruta de infección o inoculación, los factores derivados del hospedador (principalmente la calidad de la respuesta inmune), la virulencia de la cepa de microorganismo, y la dosis recibida (Neill et al. 1994). De este modo, si la infección se ha producido por vía aerógena estarán principalmente afectados los órganos y linfonodos asociados al aparato respiratorio; mientras que si la vía es oral las lesiones se producirán en localizaciones extrapulmonares.

En el caso de que las lesiones se encuentren en el pulmón, se manifiesta con tos seca intermitente que podría estar inducida por cambios de temperatura o la presión en la tráquea, así como neumonía. En estados avanzados de la enfermedad existe un engrosamiento de los linfonodos que podrían obstruir el paso del aire, el tracto alimentario u oprimir los vasos sanguíneos. Otros síntomas habituales son la debilidad, pérdida de apetito y de peso, fiebre fluctuante, tos seca intermitente, diarrea y ganglios linfáticos grandes y prominentes (Neill, Bryson, y Pollock 2001).

En los países sometidos a los programas de erradicación de la tuberculosis bovina, como lo es Uruguay, la sintomatología clínica se encuentra rara vez en la ganadería bovina ya que el uso del test de la intradermotuberculinización permite un diagnóstico presuntivo y elimina los animales infectados antes de la aparición de signos clínicos. En los años previos a la implantación de los programas de erradicación, era frecuente observar la sintomatología asociada con la tuberculosis (Vestal 1977).

En la necropsia los granulomas se consideran lesiones patognomónicas de la tuberculosis. La apariencia de un granuloma tuberculoso suele ser amarillenta y caseosa, calcificada o presentar una combinación de ambas. El tamaño de las lesiones varía desde un tamaño imperceptible al ojo humano y la implicación de una gran parte del órgano (Carrisoza-Urbina et al. 2019).

#### **4.7 Diagnóstico**

El diagnóstico actual de la tuberculosis se basa fundamentalmente en la detección directa del agente etiológico, y la detección indirecta mediante la determinación de la respuesta inmune desencadenada por la infección.

## 4.7.1 Detección directa del agente etiológico

### 4.7.1.1 Examen microscópico

La observación en frotis de micobacterias se manifiesta por la resistencia al ácido de *M. bovis* que suele demostrarse mediante la tinción clásica de Ziehl-Neelsen, pero también puede utilizarse una tinción acidorresistente fluorescente. La ácido-alcohol resistencia es la propiedad que tienen las micobacterias de captar en su pared fucsina fenicada (de color fucsia) o auramina (amarillo fluorescente) y retenerla aun con la acción de decolorantes, como la mezcla de ácido y alcohol. Esta característica se debe al alto contenido en lípidos, particularmente a los ácidos micólicos, que poseen en la pared celular. Así, utilizando una técnica adecuada es posible identificar al bacilo de la tuberculosis en la muestra como un bastoncito rojo fucsia o fluorescente sobre una coloración de fondo que facilita su visualización. Esta propiedad no es específica del bacilo de la tuberculosis, sino que la tienen todos los bacilos del género *Mycobacterium*, aun las micobacterias ambientales y otros pocos microorganismos. Las principales limitaciones de este método diagnóstico es que requiere de una elevada carga bacteriana (entre 5.000 y 10.000 bacilos por mililitro de muestra) y que es poco específica (Latini y Barrera 2014).

### 4.7.1.2 Cultivo bacteriológico

El diagnóstico bacteriológico se considera la prueba de referencia (gold standard) y debe emplearse siempre para la confirmación de la infección en un rebaño. Para el aislamiento de las micobacterias pertenecientes al complejo MTC debe tenerse en cuenta que se trata de microorganismos con un crecimiento lento. Por ello, es necesario seguir un protocolo que permita la recuperación selectiva de estos microorganismos, ya que la mayoría de las muestras contienen también otras bacterias de crecimiento rápido que pueden alterar el pH, modificar con sus enzimas la composición de los medios y enmascarar con su crecimiento el de las micobacterias. Además, no todas poseen los mismos requerimientos nutritivos y, por ende, es necesario el uso de medios específicos. Los medios de cultivo sólido más empleados contienen una base de yema de huevo como lo son el Lowenstein-Jensen (Stonebrink 1958) y el Stonebrink (Rüsch-Gerdes, Schröder, y Fetting 1985; Goh y Rastogi 1991; Carbonnelle et al. 1995). Estos medios incluyen glicerol, compuesto requerido para el crecimiento de *M. tuberculosis* pero que *M. bovis* no puede usar para su crecimiento (Hines, Payeur, y Hoffman 2006). Para suplir esta deficiencia enzimática y favorecer el crecimiento de *M. bovis*, el piruvato sódico ha sido incorporado a los medios de cultivo (Keating et al. 2005).

Los cultivos se incuban durante un mínimo de 8 semanas (y preferiblemente durante 10–12 semanas) a 37°C con o sin CO<sub>2</sub>. Los medios deben estar en tubos bien cerrados para evitar la desecación. Se comprueba si en las superficies inclinadas hay crecimiento macroscópico a intervalos periódicos durante el período de incubación. Las colonias son pequeñas, secas y con aspecto escamoso. Cuando hay crecimiento, se debe preparar y teñir frotis mediante la técnica de Ziehl-Neelsen. El crecimiento de *M. bovis* en general tiene lugar en un plazo de 3– 6 semanas de incubación en función de los medios utilizados (OMSA 2021).

La principal limitación que presenta esta técnica es que la probabilidad de obtener un cultivo positivo de un animal infectado es mayor si se parte de muestras con lesiones compatibles, llegando hasta el 85%, pero su sensibilidad es muy limitada en las fases tempranas de la infección, siendo difícil confirmar la enfermedad (OMSA 2021).

#### 4.7.1.3 Histopatología

Consiste en la observación anatomopatológica del granuloma tuberculoso, localizado normalmente en el pulmón y/o en los linfonodos bronquiales y mediastínicos. Los granulomas son formaciones de carácter inflamatorio productivo, por lo común de 1 a 2 mm de diámetro, formados por células de carácter inflamatorio como macrófagos, histiocitos, células gigantes de Langhans y linfocitos (Casal 2015). Se pueden detectar bacilos ácido alcohol resistentes libres en el citoplasma de los macrófagos. Se debe considerar que esta técnica proporciona resultados presuntivos (Irueta 2016).

#### 4.7.1.4 Método de reconocimiento de ácidos nucleicos

A partir del cultivo de un integrante del complejo *Mycobacterium tuberculosis* 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, esta técnica permite amplificar secuencias específicas de ADN, generando millones de copias a partir de una sola molécula. Es considerada una prueba de diagnóstico con alta sensibilidad, similar al cultivo bacteriológico (Domínguez Rodríguez, Mateos García, y Suárez Fernández 1996). Además del cultivo puro de *M. bovis*, existen otro tipo de muestras a partir de las cuales se puede realizar esta técnica, como lo son los tejidos o líquidos biológicos, ya sea colectados in-vivo o luego de una necropsia o faena de animales (Crosi 2017).

Su eficacia radica en la rápida identificación de patógenos de difícil cultivo. En ese contexto, el desarrollo de un procedimiento que identifica directamente a *Mycobacterium bovis* en muestras de tejido y secreción proveniente de animales tuberculosos debe ser el objetivo de todos los países (OMSA 2021).

La identificación mediante esta técnica puede basarse en la detección del complejo de *M. tuberculosis*, o bien detectar secuencias específicas de *M. bovis*. Lo más utilizado es la identificación específica de una cepa como *M. bovis* utilizando PCR para la detección de una mutación en las posiciones nucleotídicas 285 del gen *oxyR*, 169 del gen *pncA*, 675/756/1311/1410 y 1450 del gen *gyrB* y la presencia/ausencia de RD (Regiones de Diferencia) (Espinosa de los Monteros et al. 1998; Huard et al. 2006; Parsons et al. 2002; Romero et al. 1999).

La técnica ddPCR es la tercera generación de PCR que permite la cuantificación precisa de los ácidos nucleicos diana dentro de una muestra. La capacidad de ddPCR para detectar y cuantificar con precisión objetivos poco abundantes ha llevado a sus aplicaciones de rápido crecimiento en la detección de diferentes patógenos (Nyarubaba, Mwaliko, Kimutai, y Wei. 2019). Esta técnica ha sido utilizada para el diagnóstico de *Mycobacterium tuberculosis* en muestras tales como esputo, sangre y tejidos, con una alta sensibilidad en comparación a la PCR cuantitativa existente (Real time PCR), permitiendo detectar infecciones in vivo de manera rápida (Cao et al. 2020; Yang et al. 2017; Aung, Faksri, Sangka, Tomanakan, y Namwat. 2023.).

Otras técnicas de tipificación molecular, como la espiligotipificación, permiten identificar cepas de *M. bovis* y proporcionan cierta información de tipificación molecular sobre la cepa que tiene valor epidemiológico (Kamerbeek et al. 1997).

Se debe tener en cuenta que en la actualidad la técnica de la PCR a tiempo final se utiliza principalmente sólo para el diagnóstico post-mortem de los animales (Schiller et al. 2010), mientras que la Real-Time PCR ha sido probada con fines investigativo para el diagnóstico desde tejido de animales faenados (Moura et al. 2016), y la ddPCR solo han sido aplicada para el diagnóstico de tuberculosis en humanos.

#### **4.7.2 Detección de la respuesta inmune del hospedador**

##### **4.7.2.1 Intradermotuberculinización**

Este tipo de diagnóstico se basa principalmente en la detección de la respuesta inmune de tipo celular, liderada fundamentalmente por linfocitos Th1 (de la Rua-Domenech et al. 2006), la cual es predominante en etapas iniciales e intermedias luego de la infección por *M. bovis* (Pollock, Welsh, y McNair 2005).

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 intradérmica de un derivado proteico purificado (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 (Tizard 2009; Francis et al. 1978). 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. 2010; Casal 2015).

Existen tres formas de aplicación del test de tuberculina intradérmica mundialmente utilizadas: Test de Tuberculina Ano-Caudal Simple (PAC); Test de Tuberculina Cervical Simple (PCS); Test de Tuberculina Cervical Comparativa (PCC).

La prueba simple intradérmica consiste en la inoculación intradérmica del derivado proteico purificado en el centro del pliegue ano-caudal (PAC) o en la tabla del cuello (cervical simple-PCS), seguida de su posterior evaluación a las 72 horas ( $\pm$  6 horas) post-inoculación de PPD. Para el caso particular del PCS 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). La PAC es la prueba simple más utilizada en la actualidad por resultar de más fácil realización; consiste en la inoculación en forma intradérmica de 0,1ml (32500 UI/ml) de PPD bovino a nivel del tercio posterior del pliegue ano-caudal, aproximadamente a unos 6 cm 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 1989). En Uruguay la interpretación estándar de la PAC 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 son sometidos a la prueba comparativa como método de confirmación de la infección. El test de tuberculina cervical comparativa (PCC) 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 (32500 UI/ml). La tuberculina aviar es inoculada aproximadamente a 10 cm

debajo de la cresta del cuello, mientras que la tuberculina bovina a unos 12 cm por debajo de esta última. Para su aplicación 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 (Monaghan et al. 1994; Errico 1989).

Los animales infectados con *M. bovis* tendrán 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 inoculó 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 (Casal 2015).

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 la PCC 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 Rúa-Domenech et al. 2006).

Se han descrito valores de sensibilidad de la intradermoreacción que varían entre 65 y 100% para el caso de la PCC, mientras que la especificidad se ha registrado entre 75 y 99%. Por su parte, el test simple aplicado en el pliegue ano-caudal (PAC) puede presentar una sensibilidad entre 63,2 y 96,8% y una especificidad entre 96 y 98,8% (Monaghan et al. 1994; de la Rúa-Domenech et al. 2006; Vordermeier, Whelan, y Hewinson 2008).

#### **4.7.2.2 Prueba del Interferón-Gamma**

La prueba del ensayo de liberación del interferón-gamma (IGRA), detecta una respuesta inmunitaria mediante células frente a la infección por *M. bovis*, siendo la prueba sanguínea más utilizada. Dicho test mide la producción de IFN- $\gamma$  producida por los linfocitos estimulados con la PPD bovina in vivo, comparándola normalmente con la producción al realizar la estimulación con PPD aviar (Rothel et al. 1992). El IFN- $\gamma$  es el encargado de la activación de los macrófagos, siendo una citoquina proinflamatoria fundamental en la infección tuberculosa, producida principalmente por los linfocitos Th1 ya sensibilizados. Debido a su importancia es que esta prueba 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 provoca un incremento de su producción en forma específica (Gormley et al. 2006). Esta prueba ha demostrado una gran sensibilidad y es capaz de detectar animales infectados en fases iniciales de la enfermedad (Gormley et al., 2006) pero tiene un menor especificidad (Vordermeier, Whelan, y Hewinson 2008). En la actualidad se utiliza en algunos países como prueba diagnóstica complementaria en paralelo con la tuberculina, para la detección del máximo número de animales infectados (Romero Martínez 2010).

#### **4.7.2.3 ELISA**

La forma más común de la prueba de inmunoadsorción ligada a enzimas (ELISA) se utiliza para detectar y cuantificar anticuerpos específicos. Para realizar esta técnica,

primero se llenan los pocillos de las microplacas de poliestireno con una solución de antígeno. Debido a que las proteínas se unen firmemente a las superficies de poliestireno, los pocillos quedan recubiertos (tapizados) con una capa de antígeno después de que el antígeno sin unir se haya eliminado por un lavado. El suero a analizar se añade a los pocillos, de manera que los anticuerpos específicos del suero se unirán a la capa de antígeno. Después de incubar y lavar para eliminar los anticuerpos sin unir, la presencia de anticuerpos unidos se detecta por la adición de una solución que contiene una antiglobulina ligada químicamente a una enzima. Esta antiglobulina marcada se unirá al anticuerpo y, después de la incubación y el lavado, se detecta y se mide al añadir una solución que contiene el sustrato de la enzima. La enzima y el sustrato se seleccionan para asegurar que se desarrolla un producto coloreado en el pocillo. Por tanto, la intensidad de color que se desarrolla es proporcional a la cantidad de anticuerpos presentes en el suero analizado. La cantidad de color se puede estimar mediante un espectrofotómetro (Tizard 2009).

El uso del ELISA ha sido reportado por diversos autores desde hace varios años, con resultados parcialmente satisfactorios en comparación con la prueba de la tuberculina, lo cual se debe a la inconsistente sensibilidad (55%-87%) y especificidad (55%-90%) reportadas, concluyendo varias publicaciones de que la herramienta no sería de utilidad para el diagnóstico precoz en el ganado (Amadori et al. 1998; Sayin y Erganis 2013; Viviana Ritacco et al. 1990; Akçay y Iyğür 2002; Chávez, Mancilla, Díaz, Pérez, y Díaz. 2001). Dichos autores comparten el uso de PPD como antígeno para la sensibilización de las placas para la realización de la técnica, encontrando altos títulos de anticuerpos en animales con tuberculosis ya avanzada.

Por otra parte, diversos autores han utilizado este ensayo para detectar animales infectados en el rodeo, principalmente aquellos que se vuelven anérgicos resultando como falsos negativos a la prueba intradérmica (Souza et al. 2019, 2022; Farias et al. 2012), obteniendo resultados alentadores. Esto se explica debido a que los bovinos en ciertas circunstancias de la enfermedad (tuberculosis avanzada y posiblemente diseminada) pueden volverse incapaces de reaccionar frente a un antígeno administrado. Estos animales anérgicos al no reaccionar a la prueba intradérmica permanecen en el rodeo, constituyendo así una fuente potencial de infección (Lilenbaum y Fonseca 2006). Un ELISA recientemente desarrollado basado en el complejo proteico P22 ha mostrado un alto rendimiento en términos de sensibilidad ( $S_e$ ) y especificidad ( $S_p$ ) en cabras y bovinos de forma experimental (Javier Ortega et al. 2021; J. Ortega et al. 2022; Blanco Vázquez et al. 2021), por lo que es de esperar su aplicabilidad en rodeos lecheros comerciales. El mencionado complejo proteico tiene la particularidad de presentar menos proteínas compartidas con el PPD bovino y el PPD aviar, lo cual genera una mayor especificidad y a su vez, las proteínas que presenta son de elevada inmunogenicidad, siendo estas las principales responsables de activar a los linfocitos B y así la producción de anticuerpos, por lo que también es de esperar una mayor sensibilidad (Infantes-Lorenzo et al. 2017).

Se debe tener presente que *M. bovis* en etapas tempranas de la infección estimula en el hospedador una marcada respuesta inmune celular, pero una pobre respuesta humoral (Neill, Bryson, y Pollock 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, Welsh, y

McNair 2005). Debido a esta particularidad es que los trabajos realizados en diferentes países varían mucho entre sí, ya que los resultados obtenidos dependen en gran medida de la prevalencia de la enfermedad, así como la frecuencia de la realización de pruebas para detectar animales positivos.

A pesar de esto, se ha demostrado que la aplicación previa de PPD de manera intradérmica en los animales incrementa la sensibilidad del test serológico (Schiller et al. 2010), debido al efecto booster que tiene sobre la respuesta de anticuerpos específicos (Thom et al. 2004).

#### **4.8 Legislación Nacional**

En 1882 Robert Koch descubrió el bacilo causante de la tuberculosis y en 1890 presentó sus estudios sobre la tuberculina. En el Uruguay, el 14 de octubre de 1896 la Municipalidad de Montevideo dictó la ordenanza que impuso la intervención del Laboratorio Municipal de Bacteriología y Micrografía como requisito previo a la entrada de animales lecheros a tambos de Montevideo, y la observación clínica y tuberculinización en el Corralón Municipal. En 1902 el Ministerio de Gobierno aprobó una ordenanza y reglamento referente al servicio de tuberculinización e inspección veterinaria, estableciendo que ningún animal destinado a la explotación lechera sería admitido en tambos y lecherías de Montevideo sin contar con autorización otorgada previo examen veterinario y tuberculinización satisfactoria. Los propietarios de los animales decomisados recibían compensación (Casas Olascoaga 2013).

La TBB ya se nombró en la lista original de las enfermedades de la ley 3.606 del 13 de abril de 1910 de todas las especies, es de denuncia obligatoria para productores o encargados de animales y veterinarios la sospecha o presencia de la enfermedad, incluyéndose dentro de los vicios redhibitorios. El reglamento de tambos y lecherías de 25/11/1911 contiene normas claras sobre tuberculinización de ganado lechero y se prevé la inspección por los servicios veterinarios oficiales, además de instalar el principio de calidad de la leche (Casaux 2005). Desde 1916 es obligatoria la tuberculinización en todo el territorio nacional (Casas Olascoaga 2013). Por ley Nro. 10.045 de 10 de septiembre de 1941 sobre Indemnización al Ganado Lechero y su decreto reglamentario de 20 de febrero de 1941 se establece la identificación, sacrificio e indemnización de los animales reaccionantes a las pruebas tuberculínicas. Por decreto del 9 de septiembre de 1952 se suspendió el pago de las indemnizaciones por sacrificio de los animales reaccionantes por motivos económicos y sanitarios (Casas Olascoaga 2013).

Por decreto en 1963 se implementó el Plan de Leche Calificada, según el cual la leche-cuota con destino al abastecimiento recibió precios diferenciales: las usinas pasteurizadoras de la Cooperativa Nacional de Productores de Leche (CO.NA.PRO.LE) bonificaron con un precio estímulo a leche de predios adheridos voluntariamente, si cumplían con los requisitos higiénico – sanitarios del ambiente, de los operarios y los animales, y en el 1976 ése programa llegó a todo el país (Errico, Barriola, y Laborde 1980).

Según el decreto 79/84 del 22 de febrero de 1984 debe comunicarse de forma inmediata el servicio veterinario departamental de la División Sanidad Animal (DSA) del MGAP si se detectaron animales con resultado positivo a la prueba presuntiva de TBB. El veterinario oficial debe realizar la prueba intradermotuberculinización cervical comparativa, la prueba confirmatoria a los animales anteriormente detectados

positivos a TBB. Por decreto 90/95 de 21/2/1995 se instala el Sistema Nacional de Calidad de Leche para determinar las exigencias mínimas y obligatorias para su posterior pasteurización e industrialización. Por decreto 2/97 de 3/1/1997 se incluyen las exigencias sanitarias del personal y de los animales, habilitación de las instalaciones, y empresas receptoras de leche (Casaux 2005). En 1998 se regularizaron por ley los requisitos sanitarios para los establecimientos productores de leche, la declaración de predios oficialmente libres de Brucelosis y Tuberculosis y la vigilancia epidemiológica (Decreto 20/998 de 22/1/1998). Por ese decreto se previó que es obligatoria la sanidad del ganado completo para obtener la habilitación o refrendación de toda empresa que produzca leche con destino comercial. Referido a la TBB se estableció que la prueba de intradermotuberculinización con PPD bovina se debe realizar en un intervalo mínimo de 6 meses y máximo de 12 meses (Casaux 2005) como lo sugiere el código sanitario de la OIE. Con la trazabilidad grupal de DICOSE y con las herramientas del SNIG al detectar un foco se reconstruyen movimientos de ganado hasta 2 años para detectar predios epidemiológicamente relacionados y tomar medidas anticipadas en los predios relacionados al foco. Esa medida disminuye y eventualmente evita la diseminación de la enfermedad. Se debe realizar la prueba tuberculínica en el ganado lechero de tambos remitentes a plantas industrializadoras de lácteos como requisito para la habilitación inicial y luego la refrendación anual, obligatoria por Decreto 64/02 para la declaración de rebaño oficialmente libre, cumpliendo con los requisitos establecidos en el Decreto 20/998.

Según Decreto 79/984 la prueba tuberculínica ano-caudal (PAC), realizado por un veterinario habilitado, consta de la inoculación intradérmica de 0,1ml de la tuberculina, el derivado proteico purificado de *M. bovis* (PPD bovina) en el pliegue ano-caudal. La lectura se realiza  $72 \pm 6$  horas luego de inocular el reactivo mediante la palpación del lugar de inoculación. Cualquier reacción (engrosamiento, fibrosis, calor, rubor u otra) significa que el animal ha estado en contacto con algún antígeno de *Mycobacterium* y requiere la realización de la prueba cervical comparativa (PCC) como prueba confirmatoria. Esta prueba se aplica para diferenciar una infección por *M. bovis* de una reacción cruzada por *M. paratuberculosis spp. avium* u otra especie del género *Mycobacterium*. Por ello se inoculan PPD aviar y PPD bovina en la tabla del cuello del animal positivo a la PAC. La lectura de la PCC también se debe realizar a las  $72 \pm 6$  hs y se realiza midiendo los dos sitios de inoculación con un calibre (cutímetro). Es positiva cuando hay una diferencia de 5 o más mm del pliegue a favor de la PPD bovina con respecto a la PPD aviar. La PCC se debe realizar dentro de los 10 días o 60 días posteriores a la PAC por veterinarios oficiales ya que el animal puede encontrarse temporalmente desensibilizado luego de inocular PPD. La estrategia del programa sanitario se basa en el principio prueba-sacrificio. Los animales reaccionantes son marcados a fuego con una "T" de 8 cm en la quijada derecha y deben ser enviados a faena dentro de un plazo de 30 días, se interdicta (cuarentena) el predio y se investiga el predio foco, los linderos y los relacionados epidemiológicamente entre los cuales se registraron movimientos de ganado en los 2 años previos a la detección. La faena sanitaria de animales necesita previa coordinación con el frigorífico, ya que las carcasas se deben inspeccionar minuciosamente y someter la carne a un tratamiento térmico específico para destruir el agente. En Uruguay se realiza un tratamiento de garantía que consta de un tratamiento térmico de seguridad que garantice la inactivación del agente antes de liberarlo al consumo establecido por normativa legal.

El sistema de indemnización por la eliminación de animales con tuberculosis fue previsto nuevamente con la aprobación en la rendición de cuentas del 2011, donde hay un artículo que habilita a indemnizar en el caso de zoonosis emergentes o reemergentes. Por ley 19.300 de 26/12/2014 se creó la comisión administradora del seguro para el control de enfermedades prevalentes en bovinos que establece la complementación del pago por animal faenado del frigorífico al productor (Casas Olascoaga 2013).

La interdicción de los predios finaliza cuando el establecimiento cuente con dos rondas de tuberculización sucesivas negativas (sin considerar ronda inicial diagnóstica del rastreo), donde todos los animales susceptibles del establecimiento hayan sido enfrentados a la prueba dentro de los plazos estipulados; que efectivamente se han eliminado del campo todos los animales positivos (previo a estas 2 rondas negativas finales); que no existan reportes de lesiones compatibles con tuberculosis bovina, tanto en planta de faena como en necropsias en el campo a partir de esas 2 rondas finales; y que no exista ingreso de animales de otro DICOSE foco de TB en los últimos 12 meses.

En el año 2022 se comenzó con la realización de un curso de acreditación para veterinarios de libre ejercicio que trabajen en dicha campaña sanitaria, sumado a un manual de procedimiento de rastreo y atención de focos de TBB. Esta acreditación trata de esclarecer conceptos, unificar criterios y adaptar las actividades y procedimientos a realizar en cada caso. Dicho plan fue realizado por el MGAP, pretendiendo ser una obligación para los veterinarios de libre ejercicio para poder trabajar en esta campaña de erradicación. El manual incluye nuevos alcances como lo son la realización de la prueba intradérmica a todos los animales lecheros remitentes a plantas industrializadoras mayores a 4 meses de edad, con un intervalo entre rondas de saneamiento de 4 meses para el caso de los predios considerados como focos (MGAP 2021).

#### **4.9 Tuberculosis bovina como zoonosis**

La tuberculosis tiene una incidencia creciente a nivel mundial y representa un severo problema de salud pública. Se estimaron que 9,9 millones de personas en el año 2020 enfermaron de tuberculosis, con un estimado de 1.5 millones de muertes por esta infección, de las cuales un 14% tenían VIH. En las Américas, en 2020, se estimaron 291.000 casos de tuberculosis (PAHO 2020).

En Uruguay, la tuberculosis alcanzó una tasa de incidencia de 26,8 casos /100.000 habitantes, cifra que corresponde a 951 casos (nuevos y recaídas), estando la incidencia por encima del promedio de las Américas según estimación de la OMS (Rodríguez 2022). Se debe tener presente que el principal agente etiológico de la TBC en humanos es el *M. tuberculosis*.

Es una enfermedad tratable en humanos, sin embargo, está lejos de ser erradicada. Hay un aumento preocupante de personas con tuberculosis que abandonan el tratamiento correspondiente. En Uruguay está establecido en el plan de vacunas la vacunación con B.C.G. a los recién nacidos (bacilo Calmette-Guérin, bacteria viva atenuada que es eficaz contra formas graves de la enfermedad).

A nivel mundial, la mayor parte de los casos de tuberculosis zoonótica se deben a *M. bovis* siendo el ganado el principal reservorio. Según estudios (Aguirre et al. 2017; De Kantor et al. 2008; OMSA 2021) entre el 1-10% de los casos de tuberculosis en

humanos se debe a *M. bovis*, existiendo una correlación entre la erradicación de la tuberculosis en el ganado y la prevalencia en humanos (Schlüter 2006). La transmisión zoonótica de *Mycobacterium bovis* ocurre principalmente por el contacto estrecho con ganado y el consumo de productos de estos animales, tales como leche no pasteurizada. Es una zoonosis directa u ortozoonosis, lo cual significa que la transmisión tiene lugar directo a partir del animal infectado o indirectamente a partir de productos de origen animal que contengan al antígeno, donde las micobacterias prácticamente no sufren multiplicación ni cambios evolutivos. Es una de las zoonosis más antiguas conocidas por la humanidad.

Las vías de contagio más importantes a los humanos son la vía respiratoria, y la digestiva que tiene como principal fuente leche y productos lácteos crudos. El consumo de carne insuficientemente cocida es otra fuente de infección por vía digestiva. En el tratamiento de esta zoonosis se debe excluir la pirazinamida por la resistencia de *M. bovis* a este antibiótico que es el antimicobacteriano de primera elección en el tratamiento cuando la enfermedad es causada por *M. tuberculosis* (Rivas et al. 2012).

En estudios de Argentina y Uruguay sobre los antecedentes laborales de los infectados por *M. bovis* se demostró que personas con trabajos de riesgo son empleados de frigoríficos y trabajadores rurales (especialmente empleados de tambo) (Rivas et al. 2012; Latini, Latini, Lopez, y Ceconi. 1990) y habitantes rurales (especialmente niños) (Gil y Samartino 2001; De Kantor et al. 2008) o que por otro motivo tengan acceso a productos lácteos crudos. Hoy en día está establecida la pasteurización de la leche de consumo, sin embargo, el consumo de productos lácteos crudos sigue siendo un factor de riesgo en el país.

Respecto a la carne se aconseja que en el centro térmico debe llegar a una temperatura de 70°C que se mantenga por 2 min, en otros productos cárnicos la sobrevivencia del agente depende de tiempo de maduración, contenido de sal y pH. Los animales con lesiones generalizadas deben ser clasificados como no aptos para consumo humano y la canal se decomisa totalmente. La carne de animales diagnosticados como tuberculosos recibe un tratamiento térmico de seguridad que garantice la inactivación del agente, sin embargo, se considera que la carne y músculo esquelético de animales raramente contienen micobacterias (Cressey, Lake, y Hudson 2006).

En Uruguay hasta el año 2011 no se habían reportado casos confirmados de tuberculosis en humanos causadas por *Mycobacterium bovis*, 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. En el 2011 se detectaron en el país los primeros tres casos de tuberculosis humana con *Mycobacterium bovis* como agente etiológico causal, confirmándose 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 (Crosi 2017).

#### **4.10 Importancia económica**

La TBB se extiende a nivel mundial, y adquiere una gran importancia en el rubro lechero. En la mayoría de los países desarrollados se controla la enfermedad, pero

sigue siendo una causa importante de pérdidas en muchos países menos reglamentados.

Las pérdidas económicas a nivel mundial que genera la tuberculosis en su totalidad, ya sea pérdidas de producción, gastos de sanidad y de campañas sanitarias, se estiman en 3 mil millones de dólares anuales (Schiller et al. 2010). Las pérdidas de producción están vinculadas con la disminución de la producción de leche, los decomisos de animales en mataderos, la prohibición del libre movimiento de los animales y los gastos que conllevan las campañas de control y erradicación.

La TBB origina perjuicios económicos al ganadero y reduce la eficiencia productiva de sus animales. Esas pérdidas por la TBB son causadas por una disminución de la fertilidad de hasta un 6%, las vacas en ordeño disminuyen la producción láctea en un 10-25% del total de la producción lechera, la duración de las lactancias disminuye a la mitad en la séptima lactancia y se pierde en promedio el 15% del peso normal. Como efectos secundarios se reporta una reducción de la inmunidad, aumento de la susceptibilidad a otras enfermedades, y entre un 5 y 10% de esterilidad, entre otras pérdidas (Senasa 2007; Kantor y Ritacco 2006).

## **5. HIPÓTESIS**

La implementación conjunta de la *Droplet digital* PCR (ddPCR), ELISAs in house y las pruebas rutinarias de tuberculinización, permiten mejorar sustancialmente el diagnóstico a campo de la tuberculosis bovina.

## **6. OBJETIVOS**

### **6.1 Objetivo general**

Estandarizar una nueva técnica molecular y una técnica serológica (ELISA) para el diagnóstico de Tuberculosis Bovina y comparar las mismas con los métodos clásicos utilizados en el país.

### **6.2 Objetivos específicos**

- Determinar la sensibilidad y especificidad analítica y diagnóstica de la prueba ddPCR a partir de cultivos puros de *M. bovis* y muestras de sangre de animales sospechosos.
- Estandarizar ELISAs indirectos con los antígenos P22 y PPD de *M. bovis* para la detección de bovinos infectados con *Mycobacterium bovis*.
- Comparar y analizar el resultado diagnóstico integral a partir de las pruebas realizadas (ddPCR y ELISA) frente a la prueba oficial (PAC).

## **7. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **7.1 Caracterización del establecimiento**

Las muestras utilizadas en esta tesis son pertenecientes a un establecimiento lechero ubicado en el departamento de Florida. La empresa cuenta con distintas unidades de alta producción; en el caso de estos bovinos se encontraban en un sistema de producción de base pastoril. Este predio en particular se encuentra interdicho, tal como lo exige la reglamentación vigente en la lucha por la erradicación de la Tuberculosis, ya que es un predio foco. Actualmente se realiza un plan sanitario para el control de la enfermedad, con la realización de screening por PAC (recría y hembras adultas) cada 4 o 6 meses, segregación de rodeo positivo y eliminación de los mismos y la pasteurización de la leche con que se alimenta a los terneros de la guachera. Además, se realiza un seguimiento en planta de faena y cultivos bacteriológicos e histopatología en el laboratorio oficial (DILAVE) a partir de muestras de animales que presentan lesiones. Se partió de una prevalencia inicial de un 2,6% de animales reaccionantes positivos a la PAC en todo el rodeo al inicio del proyecto, siendo este número significativamente mayor al promedio nacional en rodeos lecheros de 0,24% (Moreira 2021).

### **7.2 Obtención de muestras**

Se trabajó con un banco de muestras del Laboratorio de la Unidad de Microbiología de la Facultad de Veterinaria-UdelaR, previamente obtenidas bajo el protocolo aprobado por Comisión Honoraria de Experimentación animal (CHEA)-Universidad de la República Oriental del Uruguay (número de aprobación 1007; número de expediente 111900-001225-19).

Se utilizaron muestras de sangre y suero extraídas de la vena coccígea de un total de 329 bovinos hembra de raza Holando, seleccionadas por muestreo dirigido (no probabilístico), de las cuales 150 fueron positivas a la PAC y posteriormente sacrificadas (sin haberse realizado la PCC) y 179 fueron muestras negativas a las PAC en sucesivas rondas de tuberculinización. Las muestras fueron obtenidas en tubos con y sin anticoagulante (EDTA), se refrigeraron y se almacenaron a -20°C respectivamente.

Por otro lado, se utilizó como control positivo una cepa de referencia de *Mycobacterium bovis* (AN5 Lelystad) gentilmente cedida por la Dirección de Laboratorios Veterinarios (DILAVE) "Miguel C. Rubino" - MGAP.

### **7.3 Cultivo bacteriológico de cepa de referencia**

Se utilizó el medio de cultivo específico Stonebrink para el cultivo bacteriano. Se incubó aproximadamente 0,5 mL de la cepa por tubo sobre la superficie del medio de cultivo, incubado en aerobiosis a 35-37°C. Las siembras se realizaron por duplicado y se observaron dos veces por semana, registrando el tiempo de aparición de las colonias. Si no se observaba desarrollo de las colonias, se mantenían los cultivos por 8 semanas en las mismas condiciones. La aparición de colonias color crema amarillento, de aspecto rugoso o cremoso, se consideró indicativo de cultivos positivos, lo cual se confirmó realizando la coloración de Ziehl-Neelsen a un extendido del mismo para determinar la presencia de bacilos ácido-alcohol resistentes. Los cultivos se consideraron negativos cuando no presentaron desarrollo luego de la

inspección de la octava semana de incubación (Barrera, Sequeira, Baldrano, y Velazco. 2008).

El descarte de los tubos con medios inoculados, con o sin desarrollo, se realizó en bolsas autoclavables donde se sometieron a autoclave durante 1 hora a 121 °C, para luego poder ser desechadas.

#### **7.4 Extracción de ADN bacteriano de diferentes tipos de muestras**

Se compararon dos métodos de extracción de ADN descritos por De Almeida et al. (2013) y Hosek et al. (2006).

Se utilizó el protocolo descrito anteriormente por De Almeida et al. (2013). Las muestras se inactivaron con 400 µl de buffer TE (10mM Tris-HCl; 1mM EDTA•Na<sub>2</sub>) a 80°C por 20 minutos. Luego se resuspendieron en 50µl de solución de lisozima (10mg/ml) incubando 2 hora a 37°C. Posteriormente se añadió 70µl de SDS 10% y 10µl de solución de Proteinasa K (10mg/ml), incubando a 65°C durante 10 minutos. Luego se añadió 100µl de NaCl (5M), incubándose a 65°C durante 10 minutos. La extracción de ADN propiamente dicha, se realizó por el método de fenol-cloroformo-etanol, incorporando 400 µl de fenol cloroformo y mezclando vigorosamente mediante vortex. Luego se centrifugó 12000 rpm durante 15 minutos y el sobrenadante se transfirió a otro tubo donde se le agrega 0,6 ml de isopropanol. Se homogeneizó hasta desaparecer el color blanco. La solución obtenida se almacenó a -20°C durante 30 minutos, luego de ese tiempo se centrifugó a 12000 rpm durante 10 min. El sobrenadante se descartó y el pellet se lavó con 500 µl de etanol 70%. Por último, se resuspendió con 20 µl de buffer TE o agua DEPC y se conservó el ADN a -20°C. Se realizó la cuantificación de los ácidos nucleicos (ng/µl) mediante Espectrofotómetro NanoDrop® ND-1000UV-vis (NanoDrop Technologies, Inc., Wilmington, DE) y se visualizó la calidad en geles de agarosa.

#### **7.5 PCR convencional para *Mycobacterium bovis***

Se utilizaron los *primers* descritos por Sposito et al. (2014), específicos para *M. bovis* (amplicón de 186pb) (0.4 pmol/µL). Los primers utilizados fueron los mismos tanto para la PCR convencional como ddPCR utilizando las siguientes secuencias de *primers*: pncATB-1.2: 5'-ATGCGGGCGTTGATCATCGTC-3' (*Forward*), y pncAMB-2: 5'-CGGTGTGCCGGAAGCCG-3' (*Reverse*).

La reacción PCR se realizó en un volumen final de 25 µl mezclando 12,5 µl de MangoMix™ Bioline; 1µl *primer Forward* pncATB-1.2 (10µM); 1 µl de *primer Reverse* pncAMB-2; 9,5 agua DEPC y 1 µl de ADN molde.

Las condiciones de termociclado de la PCR consistieron en un paso a 94°C durante 1 min, seguido de 35 ciclos a 94 °C durante 1 min, 68°C durante 1 min y 72°C durante 1 min, con la duración del ciclo de lectura (Sposito et al. 2014).

Los productos de PCR fueron visualizados en geles de agarosa al 2% en buffer TAE 1X, teñido con Good View Nucleic Acid Stain. Se sembró también como referente de corrida un marcador de peso molecular de 100 pb. La corrida fue realizada durante 40 min a 100 voltios (V). Por último, los geles se visualizaron en un transiluminador de geles con luz ultravioleta.

#### **7.6 Estandarización de la *Droplet digital PCR* para *Mycobacterium bovis***

Se utilizó el equipo *Droplet digital PCR* QX200 (Bio-Rad) de la Unidad de Microbiología. El volumen final de 20 µl para la ddPCR, estuvo compuesta por 10 µl

de 2 × ddPCR Supermix (Bio-Rad, CA, EE. UU.), 0,33 µl de *primers Forward y Reverse* 10 µM (Sposito et al. 2014), 2 µl de 100 ng/µl ADN genómico de sangre completa o ADN de cultivo de referencia y agua libre de ARNasa/ADNasa. Para establecer la concentración óptima de *primers* a utilizar se probaron la concentración de 1µl, 0,55µl y 0,33µl (10 µM).

La mezcla se colocó en el cartucho DG8 con 70 µl de aceite generador de gotas (Bio-Rad, CA, EE. UU.) y las gotas (droplets) se formaron en el generador de gotas (Bio-Rad, CA, EE. UU.). Posteriormente, las gotitas se transfirieron a una placa de PCR de 96 pocillos (Eppendorf, Hamburgo, Alemania) y se realizó la amplificación por PCR en un termociclador (Bio-Rad, CA, EE. UU.)

Para establecer la temperatura óptima de “annealing” se utilizó un gradiente de temperatura de 55,7 – 60°C, utilizando la cepa de referencia de *Mycobacterium bovis* (control positivo) en la dilución 6 (1,80 ng/µl) y agua DEPC (control negativo).

Las condiciones de ciclado para la ddPCR fueron las siguientes: pre-desnaturalización a 95°C por 5 min y 40 ciclos de 95°C por 30 seg y 55,7°C por 1 min con una retención final durante 10 min a 98°C. Después de la amplificación, las placas se cargaron en el lector de gotas (Bio-Rad, CA, EE. UU.), donde se realizaron las lecturas automáticamente y se analizaron los resultados utilizando el software QuantaSoft 1.7.

### **7.7 Sensibilidad y especificidad analítica y diagnóstica de la PCR y Droplet digital PCR para *Mycobacterium bovis***

Para la sensibilidad y especificidad analítica se partió del cultivo de referencia y se determinó el número de bacterias por mililitro mediante el uso de la escala de McFarlyn <sup>2</sup> (6x10<sup>8</sup> bacterias por mL) (Zanini et al. 1998), determinado mediante el uso de un espectrofotómetro con una absorbancia de 560 nm. Se realizó la extracción de ADN de dicha escala de turbidez ((De Almeida et al. 2013) y mediante diluciones seriadas del ADN en base 10 desde 180,2ng/µl, se determinó el límite de detección de la prueba.

El mismo procedimiento se realizó para estandarizar la extracción desde muestras de sangre, donde para este caso se inoculó la escala de turbidez realizada en 200 µl de sangre entera.

Por otra parte, el análisis de la sensibilidad y especificidad diagnóstica se realizó a partir de las muestras de campo previamente descritas, comparando con la técnica de tuberculinización y PCR convencional.

### **7.8 Estandarización de los ELISAs indirectos**

Se sensibilizaron las placas con el antígeno purificado P22, gentilmente cedido por el laboratorio del Instituto de Investigación en Recursos Cinegéticos (IREC) de la Universidad de Castilla La Mancha, España. El control positivo y negativo utilizados como referencia fueron cedidos por el mismo laboratorio. Los sueros de los animales y controles, se analizaron por duplicados en pocillos adyacentes (100µL/pocillo) diluidos en 1:10. Se incubaron durante una hora a 37°C y se agregó el conjugado específico (Anti IgG/HRP – conjugated). Se utilizó el sustrato TMB (100µL/pocillo) y finalmente se realizó cuantificación de absorbancia en un espectrofotómetro de 450 nm. Los resultados se consideraron válidos sólo si la densidad óptica media (DO) de el control positivos y el negativo (realizados por duplicado) fueron  $\geq 0,300$  y  $\leq 0,200$ , respectivamente. El resultado para cada muestra se calculó de acuerdo con la siguiente ecuación:  $M=(DO_{450} \text{ media de la muestra} \times 100) / (DO_{450} \text{ del control negativo medio})$ . Una muestra se consideró como positiva si  $MP \geq 0,30$ .

Se realizó la comparación de los resultados con un ELISA sensibilizando las placas con el antígeno PPD comercial (Microsules), siendo el mismo que se utiliza para la realización de la PAC. Se siguió el protocolo descrito por otros autores (Amadori et al. 1998; Sayin y Erganis 2013; Viviana Ritacco et al. 1990; Akçay y İzgür 2002), tomándose los mismos criterios mencionados para el análisis de los resultados con el ELISA P22 desarrollado. El control positivo y el control negativo utilizados fueron los mismos ya mencionados.

### **7.9 Procesamiento de muestras por *Droplet digital* PCR**

A partir de los resultados obtenidos en los ELISAs se realizó el procesamiento de muestras de sangre entera mediante la técnica de ddPCR a un total de n=28 animales. Las muestras de sangre fueron sometidas a la extracción de ADN descrita por De Almeida et al. (2013) y se realizó la cuantificación de los ácidos nucleicos (ng/μl) mediante Espectrofotómetro (Anexo 1). Se siguieron las condiciones mencionadas anteriormente para la realización de la técnica de ddPCR. Las lecturas se realizaron automáticamente y se analizaron los resultados utilizando el software QuantaSoft 1.7.

### **7.10 Análisis de resultados**

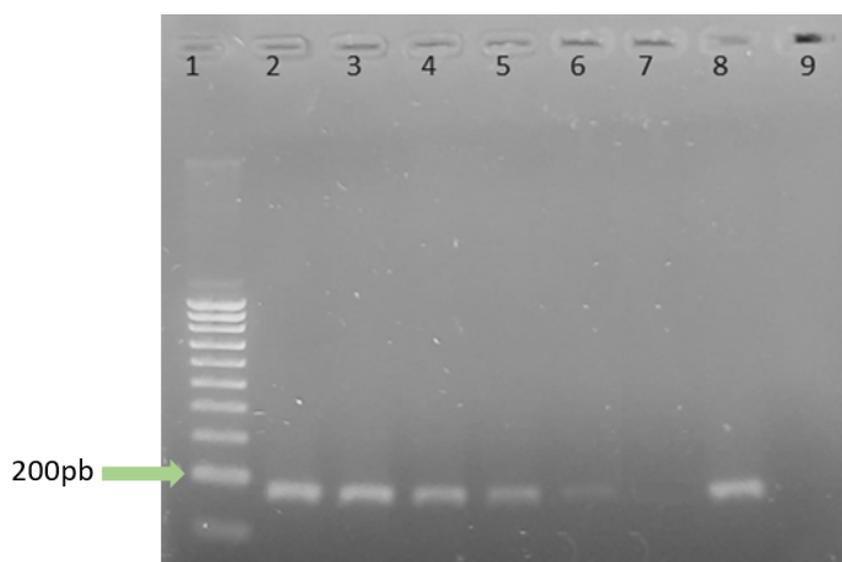
Se realizaron planillas en Microsoft Excel con el registro de muestras individualizadas y sus resultados a la prueba de tuberculinización, ELISA, PCR convencional y ddPCR. Mediante WINEPI (Working IN EPIdemiology) se determinó la sensibilidad, especificidad y valores predictivos de ambos ELISA en comparación con la PAC. Los resultados de la ddPCR fueron analizados utilizando el software QuantaSoft 1.7.

## 8. RESULTADOS

### 8.1 Puesta a punto de la técnica PCR convencional

Partiendo desde un cultivo con crecimiento compatible para la cepa de referencia de *M.bovis* se realizó la escala de McFarlyN<sup>o</sup>2 ( $6 \times 10^8$  bacterias por mL) para posteriormente realizar la extracción de ADN mediante el protocolo descrito por (De Almeida et al. 2013). Se partió desde una concentración de ADN de  $180,2 \text{ ng}/\mu\text{l}$ , y mediante diluciones seriadas en base 10 se determinó el límite de detección en  $6 \times 10^4$  bacterias por mL de muestra ( $0,018 \text{ ng}/\mu\text{l}$ ), observado en el carril 6 (Figura 1).

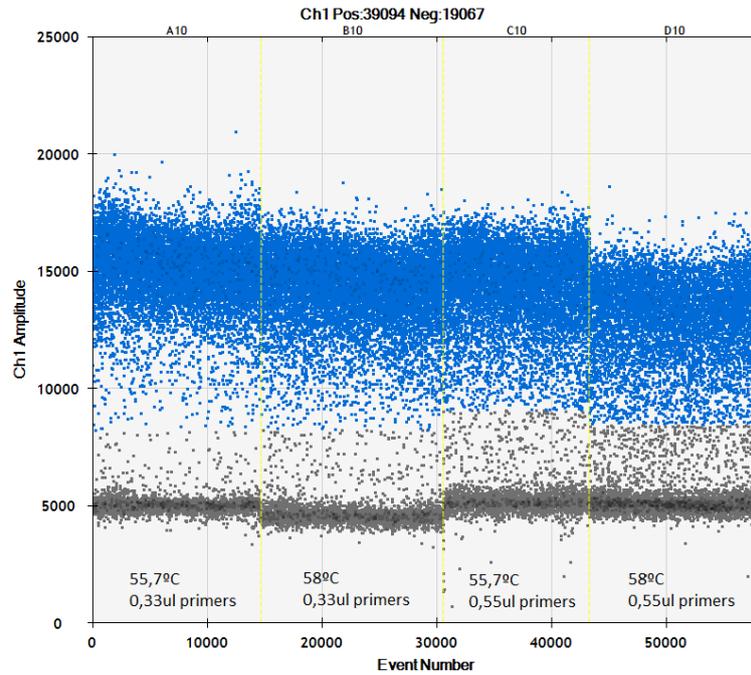
El mismo procedimiento se realizó para estandarizar la extracción desde muestras de sangre, donde para este caso se partió de  $124 \text{ ng}/\mu\text{l}$ , determinando el límite de detección de la PCR convencional en  $5 \times 10^6$  bacterias por mL ( $1,24 \text{ ng}/\mu\text{l}$ ).



**Figura 2.** Técnica PCR convencional utilizando diluciones de la cepa de referencia de *Mycobacterium bovis*. De izquierda a derecha: carril 1: MPM (100pb), carril 2:  $6 \times 10^8$  bacterias/mL, carril 3:  $6 \times 10^7$  bacterias/mL, carril 4:  $6 \times 10^6$  bacterias/mL, carril 5:  $6 \times 10^5$  bacterias/mL, carril 6:  $6 \times 10^4$  bacterias/mL, carril 7:  $6 \times 10^3$  bacterias/mL, carril 8: control positivo cepa de referencia, carril 9: NTC (no template control). La banda esperada es de 186 pb.

### 8.2 Puesta a punto de la técnica “*Droplet digital PCR*” (ddPCR)

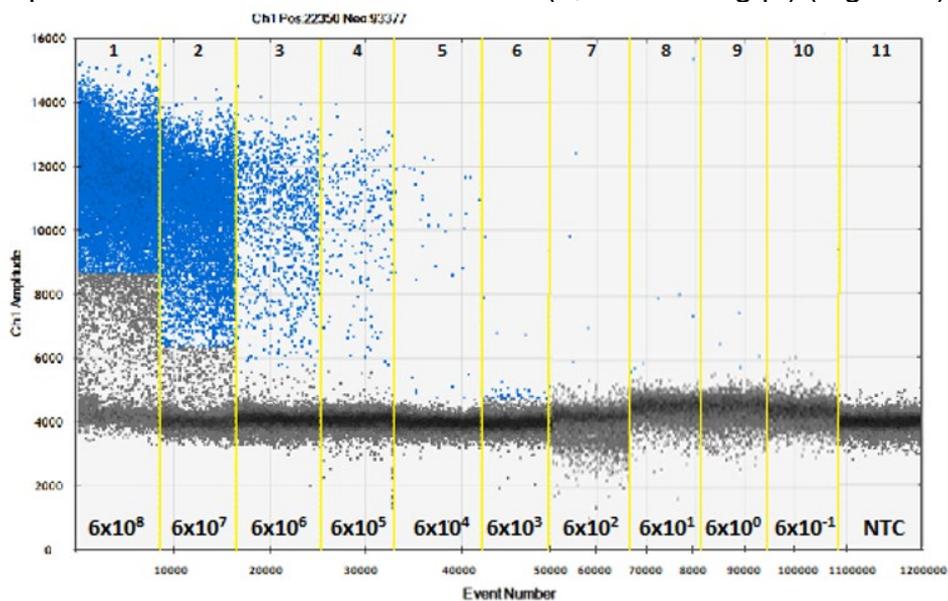
El límite de detección para la técnica ddPCR, análogamente a las realizadas para la técnica PCR convencional fueron con la cepa de referencia de *Mycobacterium bovis* (amplicón de 186 pb). Para esto, previamente se probó diferentes concentraciones de primers y se realizó un gradiente de temperatura de reconocimiento (*annealing*) (Figura 2); así se determinó que las condiciones óptimas para la validación de la técnica para *M. bovis* fueron utilizando una concentración de  $0,33 \mu\text{l}$  de primers forward y reverse, mientras que la temperatura óptima de reconocimiento fue de  $55,7^\circ\text{C}$ .



**Figura 3.** Determinación de las condiciones óptimas para la validación de la técnica utilizando la cepa de referencia ( $6 \times 10^6$  bacterias/mL). Gotas negras= eventos negativos y gotas azules= eventos positivos.

La elección de la temperatura se debe a la mayor separación del cluster de las gotas positivas (azules) con respecto a las gotas negativas (negras), y la menor presencia de gotas entre estos clusters (“lluvia”). En el carril uno se visualiza la mejor separación entre las gotas positivas y las gotas negativas.

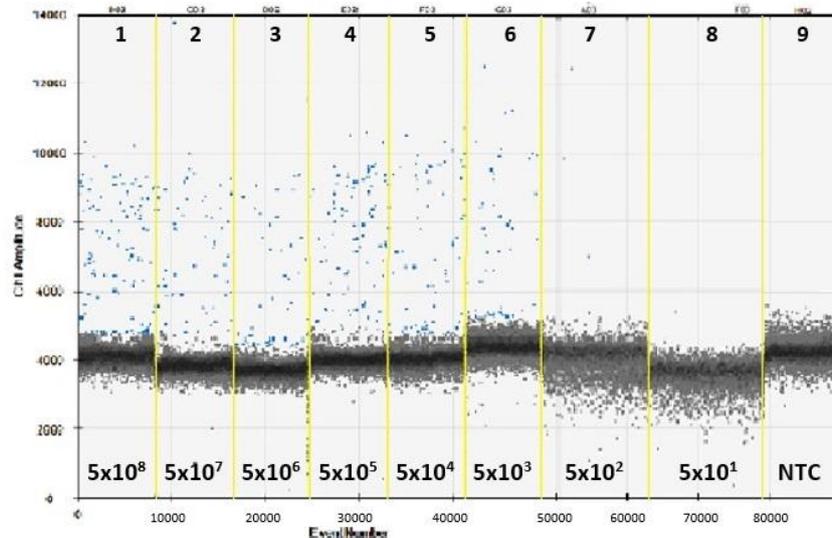
A partir de esta estandarización se determinó el límite de detección de la prueba mediante el mismo procedimiento descrito para la PCR convencional. El límite de detección de la prueba fue determinado en 6 ( $6 \times 10^0$ ) bacterias por mL de muestras cuando se partió desde el cultivo de referencia (0,0000018 ng/ $\mu$ l) (Figura 3).



**Figura 3.** Límite de detección de la técnica *Droplet digital* PCR utilizando diluciones seriadas en base 10 de la cepa de referencia; desde  $6 \times 10^8$  bacterias/mL hasta  $6 \times 10^{-1}$

bacterias/mL (1-10) y NTC (no template control) (11). Gotas negras= eventos negativos y gotas azules= eventos positivos. Se observa que el límite de detección es de hasta  $6 \times 10^0$  (6) bacterias/mL. Luego no se observan gotas positivas (azules).

Por otra parte, el límite de detección de la prueba cuando se partió desde la muestra de sangre fue de 500 ( $5 \times 10^2$ ) bacterias por mL (0,00012 ng/ $\mu$ l) (Figura 4).



**Figura 5.** Límite de detección de la técnica *Droplet digital* PCR utilizando diluciones seriadas en base 10 desde sangre entera inoculada; desde  $5 \times 10^8$  bacterias/mL hasta  $6 \times 10^1$  bacterias/mL (1-8) y NTC (no template control) (9). Gotas negras= eventos negativos y gotas azules= eventos positivos. Se observa que el límite de detección es de hasta  $5 \times 10^2$  (500) bacterias/mL. Luego no se observan gotas positivas (azules).

### 8.3 ELISAs indirectos

Del total de animales muestreados ( $n=329$ ), se realizaron pruebas serológicas para la detección de anticuerpos contra tuberculosis bovina en 278, debido a que algunas muestras se encontraban en mal estado o había faltantes de estas. Se compararon dos técnicas de ELISA que se diferencian por el tipo de antígeno utilizado para sensibilizar las placas.

Se obtuvo que un 3,9% ( $n=11$ ) de los animales fueron positivos al ELISA P22, mientras que un 33,4% ( $n=93$ ) fueron positivos al ELISA PPD.

Cuando se relaciona esta seropositividad al ELISA P22 con la respuesta a la prueba cutánea, se observó que del total de los animales reaccionantes a la PAC ( $n=126$ ), 6 de ellos (4,8%) presentaron anticuerpos anti P22, y de las 152 vacas no reaccionantes a la PAC, 5 (3,3%) fueron seropositivas a P22 (Tabla 1).

Con respecto a la relación entre el ELISA PPD con la prueba de la tuberculina (PAC), se observó que de los 126 animales reaccionantes a la PAC, 57 (45,2%) presentaron anticuerpos anti PPD y del total de animales no reaccionantes a la prueba cutánea ( $n=152$ ), 36 (23,7%) fueron seropositivos a PPD (Tabla 1).

Al comparar ambos ELISA empleados se determinó que el 81,8% ( $n=9$ ) de los animales positivos a P22 también resultaron positivos a PPD, de los cuales  $n=3$  eran negativos a la prueba intradérmica.

En total fueron 38 (25%) los animales negativos a la PAC que presentaron anticuerpos circulantes frente a las proteínas P22 y/o PPD de *M. bovis*.

**Tabla 1.** Estatus serológico contra la tuberculosis bovina comparando los antígenos P22 (P22+/P22-) y PPD (PPD+/PPD-) en relación al estatus de reacción a la prueba anocaudal (PAC+/PAC-) expresado en valores absolutos y porcentajes. n= 278.

	<b>P22+</b>	<b>P22-</b>	<b>PPD+</b>	<b>PPD-</b>
<b>PAC+</b>	6 (4,8%)	120 (95,2%)	57 (45,2%)	69 (54,8%)
<b>PAC-</b>	5 (3,3%)	147 (96,7%)	36 (23,7%)	116 (76,3%)

Mediante diluciones seriadas de la muestra utilizada como control positivo para la realización de estos ELISAs, se determinó el límite de detección según la densidad óptica a 450nm en 0,65 para el antígeno PPD y en 0,55 para el antígeno P22.

Además, el promedio del control positivo fue de 0,7 para el antígeno PPD y 1,66 para el antígeno P22, mientras que el promedio del control negativo fue de 0,18 y de 0,26 respectivamente.

Mediante el uso de WinEpi (Working in Epidemiology) se determinó la sensibilidad y especificidad de ambos ELISA en comparación con la PAC, estimando además los valores predictivos (Tabla 2).

**Tabla 2.** Valores de sensibilidad, especificidad y estimación de los valores predictivos para ambos ELISAs comparándolo con la PAC expresados en porcentaje.

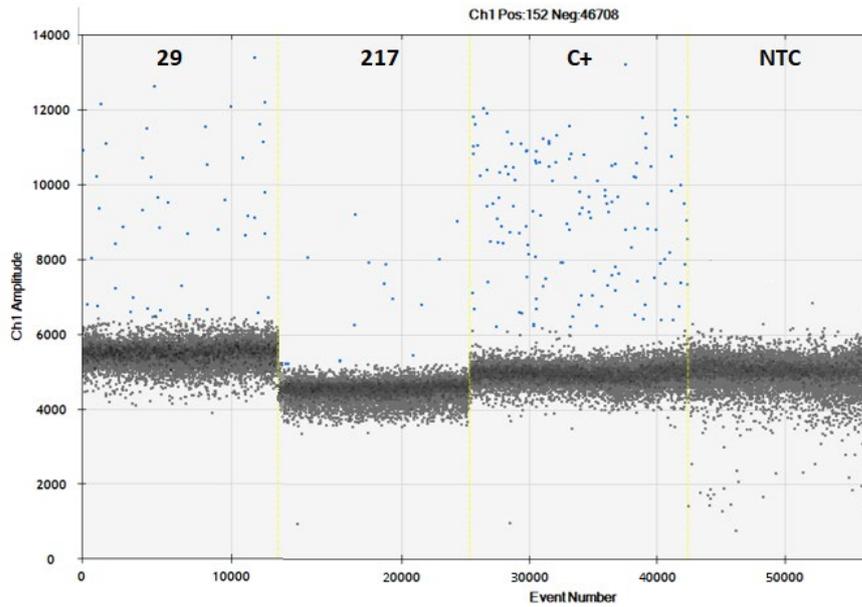
	<b>P22</b>	<b>PPD</b>
<b>Sensibilidad</b>	4,76	45,97
<b>Especificidad</b>	96,71	76,32
<b>Valor predictivo +</b>	54,55	61,29
<b>Valor predictivo -</b>	55,06	63,39

#### **8.4 Droplet digital PCR (ddPCR)**

Considerando los resultados obtenidos a las pruebas serológicas, los animales resultantes seropositivos al ELISA P22 (n=11) se les realizó, a las muestras de sangre entera, extracción de ADN y posteriormente fueron analizadas mediante ddPCR. El mismo procedimiento se siguió para los animales con altos títulos de anticuerpos al ELISA PPD (Punto de corte: densidad óptica a 450nm >0,85) (n=17).

Del total de animales a los que se les realizó la ddPCR (n=28), 14 de ellos fueron no reaccionantes a la PAC y 14 reaccionantes a la PAC.

Se obtuvieron 2/28 (7%) animales positivos (Figura 5), de los cuales ambos habrían resultado positivos al ELISA PPD, y donde uno de ellos había resultado negativo a la PAC.



**Figura 6.** Resultados obtenidos por *Droplet digital* PCR para dos muestras de campo (29 y 217). Controles de corrida: C+ (control positivo) sangre inoculada con cepa de referencia ( $6 \times 10^5$  bacterias/mL) y NTC (no template control) como control negativo. Gotas negras= eventos negativos y gotas azules= eventos positivos.

## 9. DISCUSIÓN

Se demostró que la estandarización de la técnica de ddPCR resultó útil para la detección de *M. bovis*. El límite de detección de la prueba obtenido resultó más sensible con respecto a los resultados publicados por Esquén y Tomás (2022), quienes realizaron la validación para muestras de pacientes humanos. Estos autores determinaron el límite inferior de detección (por amplificación) del ADN de *Mycobacterium tuberculosis* en  $0.80 \pm 0.07$  copias/ $\mu$ l (800 copias/mL), siendo sustancialmente menor lo obtenido en el presente trabajo en donde se logró detectar  $6 (6 \times 10^0)$  bacterias por mililitro cuando se partió desde el cultivo de referencia.

La detección de ADN bacteriano desde muestras de sangre también resultó exitosa. La menor sensibilidad, en comparación con el cultivo puro puede ser explicada por la presencia de inhibidores en este tipo de muestras, lo cual puede facilitarse cuando se realiza la extracción del material genético mediante técnicas convencionales y sin utilizar kits comerciales. Esto puede influir en la eficiencia de detección de los fragmentos de ADN de interés, determinando interferencia en los resultados obtenidos (Poma et al. 2012). A pesar de esto consideramos que la capacidad de detección de la prueba arroja resultados muy alentadores al ser capaz de detectar 500 ( $5 \times 10^2$ ) bacterias por mL de una muestra de sangre, siendo sustancialmente más sensible que la técnica de PCR a tiempo final ( $5 \times 10^6$  bacterias por mL).

Basándonos en los límites de detección obtenidos en la prueba es de pensar que sea de utilidad para su aplicación en otros tipos de muestras como leche, en donde se ha utilizado PCR a tiempo final (Zumárraga et al. 2012), o tejido de animales sospechosos, habiendo sido probado mediante Real-Time PCR (Moura et al. 2016), pudiendo contribuir como herramienta diagnóstica tanto pre como post-mortem debido a su elevada sensibilidad.

Por otra parte, los resultados obtenidos en ambos ELISA, confirman las conclusiones de diversos autores que afirman que esta técnica no es de utilidad como única prueba diagnóstica en los bovinos (Amadori et al. 1998; Sayin y Erganis 2013; Viviana Ritacco et al. 1990; Akçay y İzgür 2002; V. Ritacco et al. 1991), ya que arroja una gran proporción de falsos negativos y falsos positivos en comparación con la PAC, reportando sensibilidades y especificidades muy variables (entre 48,2-73,6% y 31,2 y 94,1% respectivamente). En esta tesis se encontró que de los animales reaccionantes a la PAC tan solo el 4,8% (n=6) fueron positivos al ELISA P22 y el 45,2% (n=57) fueron positivos al ELISA PPD. Esto puede ser explicado por la respuesta de anticuerpos, la cual generalmente surge en presencia de TBB generalizada, o bien, se desarrolla de forma más tardía que la respuesta inmune celular (McNair, Welsh, y Pollock 2007; V. Ritacco et al. 1991). Esto ha sido confirmado por infecciones experimentales de bovinos con dosis infecciosas altas y bajas de *M. bovis*, en las que las primeras provocan una respuesta de anticuerpos mucho más temprana (Neill et al. 1994). Por lo tanto, es posible que los métodos serológicos presenten una menor sensibilidad que los métodos celulares en el diagnóstico de la tuberculosis bovina en las primeras etapas de la infección (Farias et al. 2012).

Se debe considerar que como en nuestro país nunca ha existido una campaña de vacunación contra esta enfermedad, por lo que el encontrar anticuerpos frente a la enfermedad supondría que el animal está infectado, debiendo descartarse la presencia de falsos positivos a la prueba.

El estado de falso positivo de algunos animales en la prueba cutánea, puede ser debido a reacciones cruzadas con micobacterias ambientales, lo cual en este estudio

no se confirmó al no realizarse la prueba cervical comparada (PCC), la cual se considera que mejora la especificidad.

Se debe considerar que todas las micobacterias poseen ciertos antígenos comunes y los animales sensibilizados por *M. avium paratuberculosis*, o por una variedad muy grande de otras micobacterias, generalmente saprófitas, que se hallan en el medio ambiente, pueden dar también reacción tuberculínica positiva (Torres 2007), y por lo tanto también podrían interferir en el diagnóstico serológico.

Este efecto negativo de la paratuberculosis en la sensibilidad de las técnicas de diagnóstico de tuberculosis ha sido demostrado en rodeo de bovinos en animales con una doble infección (Alvarez et al. 2009), debido a una similitud importante entre ambos agentes. Debido a esto, (Alvarez et al. 2009) destacan que resulta fundamental determinar el estado sanitario de un rodeo en lo referente a paratuberculosis antes de aplicar e interpretar las pruebas diagnósticas de tuberculosis, no solo por su impacto en la especificidad, sino también por su efecto sobre la sensibilidad de las mismas. Es importante considerar que se desconoce la prevalencia de paratuberculosis en el rodeo en estudio.

Esta interferencia puede ser debida a la cantidad de proteínas que comparten los PPD bovina y aviar, lo cual fue analizado por Infantes-Lorenzo et al. (2017), concluyendo que esto puede contribuir a la aparición de una mayor cantidad de animales falsos positivos por una reactividad cruzada con otras micobacterias. Esta especificidad, según el autor, puede ser corregida mediante el uso del ELISA P22. Basándonos en los resultados obtenidos, y en comparación con el ELISA PPD, el ELISA P22 presenta una marcada menor cantidad de animales seropositivos, por lo que sería esperable que estos animales sean realmente positivos y hayan estado expuestos a *M. bovis*, mientras que cierto porcentaje de los animales seropositivos al ELISA PPD es de esperar que hayan sido falsos positivos.

A pesar de esto, los ELISAs realizados demostraron un resultado alentador en cuanto a la detección de anticuerpos circulantes tanto para P22 como para PPD en animales que resultaron negativos a la PAC (25%), y por lo tanto podrían ser animales en anergia.

La expresión de anergia en la tuberculosis abarca la depresión de la hipersensibilidad de tipo retardado, que se manifiesta como una reacción deprimida a la prueba cutánea de la tuberculina, dando un resultado negativo a la prueba. El estado de anergia es frecuente que se presente en animales de rebaños infectados crónicamente. Un animal puede no reaccionar a la prueba pero estar realmente infectado en casos en donde la infección sea muy reciente y no ha permitido el adecuado desarrollo del proceso inmunológico; cuando un fuerte shock de estrés bloquea su sistema inmune; o cuando en bovinos, como en humanos, la sensibilidad tuberculínica tiende a disminuir a medida que las lesiones progresan (Souza et al. 2019). Otras causas de anergia son por motivos fisiológicos como la preñez avanzada, así como las enfermedades virales, inmunodeficiencias y esteroides administrados, fenómenos que también disminuyen la capacidad del animal infectado para responder a la tuberculina. También se debe recordar que la anergia puede presentarse producto de una desensibilización local y sistémica, debida a una inoculación tuberculínica previa (Torres 2007).

Los animales tuberculosos anérgicos generan dificultades importantes en el saneamiento de predios, ya que muchos de ellos se hallan en las últimas etapas de la enfermedad, con lesiones abiertas diseminadoras de bacilos. Dichos animales dejan de responder a la prueba, pero continúan propagando la enfermedad, lo cual se puede

observar por la aparición de nuevos casos de infección en el rodeo a una tasa bastante constante, ocasionando una falta en el control de la enfermedad (Torres 2007).

Según los resultados obtenidos, fueron 5 (3,3%) los animales negativos a la PAC y positivos a la P22, de los cuales 3 (2%) resultaron también positivos a la PPD, lo cual puede deberse a las diferencias en las proteínas antigénicas presentes en los antígenos utilizados para sensibilizar las placas de ELISA, como ya fue mencionado anteriormente.

En cuanto a la detección de animales con anticuerpos anti PPD y negativos a la PAC, se encontraron 36 animales, considerándose un número importante de animales, que merece ser estudiado en profundidad. Esto puede deberse a la presencia de mayores resultados falsos positivos a este antígeno, o bien a la inoculación previa de la PPD al realizar la prueba anocaudal, la cual puede haber generado un incremento de los títulos de anticuerpos circulantes para este antígeno como mencionan ciertos autores (Schiller et al. 2010; Thom et al. 2004).

La detección de animales en anergia mediante el uso de ELISA ha sido mencionado en diversos trabajos científicos (Soares Filho et al. 2020; Houlihan, Dixon, y Page 2008; Medeiros et al. 2010; Chávez et al. 2001; Giménez, Rivera, y Deward 2009), variando sus resultados según el grado de infección del rodeo así como la frecuencia de realización de la prueba de la tuberculina, detectando entre un 5,8-10% de animales en este estado inmunitario. En muchas de las publicaciones se concuerda de que es una herramienta útil para la detección de estos animales infectados que no responden a la prueba intradérmica, lo cual concuerda con el resultado obtenido en el presente estudio, donde se encontraron anticuerpos circulantes contra *M.bovis* en un 25% de los animales muestreados que eran negativos a la PAC.

Es por esto que, si bien la herramienta del ELISA no puede ser utilizada en sustitución a la tuberculinización, podría ser de utilidad, sobre todo en aquellos establecimientos focos en que quieran eliminar rápidamente a los animales positivos, permitiendo identificar animales no reaccionantes a la prueba intradérmica pero que resultan infectados, pudiendo lograr así acortar los periodos de saneamiento al eliminar de forma más rápida a los animales con tuberculosis.

Un buen ejemplo de esta prueba llevada a campo es el caso de España (MAPA 2018), en donde señalan el uso del ELISA a aplicar sobre los animales de mayor edad en los rodeos infectados (>5 años), de forma que se incremente la probabilidad de eliminar animales con predominio de respuesta inmune de base humoral que puedan no estar respondiendo a las pruebas oficiales de base celular. A su vez, recomiendan el uso de la técnica de ELISA aprovechando la respuesta anamnésica desencadenada en los animales por la inoculación previa de las PPDs durante la prueba cutánea. Para tal fin se recogen sueros a los 15-30 días después de la realización de la prueba intradérmica sobre dichos animales. Diversos estudios sugieren que la sensibilidad de las pruebas de diagnóstico de tuberculosis basadas en la detección de anticuerpos específicos puede incrementarse mediante esta metodología sin que se afecte la especificidad de forma significativa (MAPA 2018). Las principales ventajas que brinda la técnica de ELISA es el manejo único de los animales, que los muestreos pueden repetirse las veces que se desean y que la sangre muestreada puede ser utilizada para la detección de otras enfermedades.

Una dificultad planteada en este estudio es que los animales no fueron sometidos a la prueba considerada confirmatoria (PCC), por lo que el estimar los valores de sensibilidad y especificidad de los ELISAs utilizados debe ser tomado con mesura, al

ser comparados con la PAC, la cual por sí misma presenta valores de sensibilidad y especificidad muy variables (63,2-96,8% y 96-98,8% respectivamente) (Gil 2012). A pesar de esto, los resultados obtenidos indican que las pruebas de ELISA pueden ser una herramienta complementaria a las pruebas intradérmicas utilizadas como métodos diagnósticos en la actualidad, debido a que puede existir en la población de animales testeados una proporción que no responden a esta prueba, pero sí tienen presencia de anticuerpos circulantes. De esta manera se logra complementar ambas pruebas y permitir así detectar una mayor proporción de animales positivos por dos diferentes métodos indirectos.

En lo que refiere a estos animales seropositivos y no reaccionantes a la prueba intradérmica, hubiese resultado interesante su confirmación de estar realmente infectados por otro medio como puede ser la inspección y cultivo bacteriológicos post-mortem que son métodos que contemplan diversos estudios, aunque también se debe considerar que no todo animal infectado tiene lesiones visibles ni brinda resultados positivos al cultivo. En un estudio realizado por (Pestana 2022) se concluyó que un 87,1% de los bovinos no mostraron lesiones visibles macroscópicamente de tuberculosis, sugiriendo que a medida que avanza la campaña de erradicación, son observadas menos las formas clínicas de la enfermedad, disminuyen los hallazgos del proceso generalizado y las lesiones son más bien localizadas, con poca tendencia a la extensión.

Las muestras de bovinos que fueron procesados por ddPCR (n=28), tan solo 2 (7%) resultaron positivos a la prueba, donde uno de ellos había resultado negativo a la PAC. Dicho dato obtenido brinda resultados alentadores en cuanto al uso de la prueba para la detección de animales infectados, siendo el primer trabajo en haber logrado la detección del bacilo en sangre de bovinos pre mortem. Del total de animales procesados 14 de ellos fueron negativos a la PAC y 14 positivos a la PAC. La prueba no permite detectar a la totalidad de animales que resultan reaccionantes a la PAC, lo cual puede explicarse porque estos animales realmente no sean positivos, pues no se les realizó la PCC, o bien, porque en el momento del muestreo los animales no presentaban bacterias circulantes en sangre. Esto ha sido mencionado por ciertos autores en los que indica que *M. bovis* se presenta en sangre solo por tiempos acotados y únicamente cuando ésta se encuentra diseminado por esta vía (Domingo, Vidal, y Marco 2014); además, está bien estudiado en humanos que el estado de inmunosupresión genera una mayor probabilidad de detección del bacilo en sangre (Hosek et al. 2006; Nakatani et al. 2004), lo cual puede haber sido la explicación de la detección únicamente en dos animales. Estos animales habían sido analizados por otro trabajo experimental realizado con estas muestras, en donde se obtuvo que ambos presentaron anticuerpos frente al virus de la Diarrea Viral Bovina (DVB) y al virus de la Leucosis Bovina Enzoótica (BLV), ambos de reconocida característica inmunosupresora (Giordano Fabre y Tristant Lema 2020). Es de esperar que al aumentar el número de animales negativos a la prueba anocaudal procesados por esta técnica se mejore sustancialmente su sensibilidad, debido a que estos animales tienen sucesivas rondas resultantes negativos a la prueba de tuberculinización, descartando la posibilidad de que sean falsos negativos a esta prueba.

Como se mencionó anteriormente, uno de los animales positivos a la ddPCR fue no reaccionante a la PAC. Este animal podría encontrarse en anergia y por ende no respondió a la prueba intradérmica, pero teniendo tanto anticuerpos como bacilos

circulantes en sangre. Es de destacar que la presencia de agentes inmunosupresores puede influir en el resultado de la prueba, y este fenómeno ha sido bien demostrado en pacientes humanos, los cuales con dicha condición no responden de forma adecuado a la prueba de tuberculinización pero presentan bacteriemia constante y por lo tanto las muestras de sangre serían de mayor importancia en estos casos (Montiel et al. 2002; Esquén y Tomás 2022).

Para comprobar que realmente la sangre sea una muestra eficaz para la detección de *M.bovis* se requieren de otros estudios en donde se realicen muestreos seriados de estos animales que pueden infectarse de manera experimental, o bien, ser animales confirmados como positivos a las pruebas oficiales, complementando con su inspección y cultivo post-mortem. De esta manera se podría determinar si realmente la bacteriemia es un evento de importancia diagnóstica o tan solo se asocia a periodos concretos de la enfermedad.

Se debe aclarar que hubiese mostrado un resultado más representativo la realización de la técnica de ddPCR a la totalidad de los animales a los que se les realizó el ELISA, lo cual no se pudo realizar por diferentes circunstancias surgidas durante el proceso del trabajo. Debido a esto, los animales que se seleccionaron para ser analizados por esta técnica fue aquellos positivos al ELISA P22 y los que mostraron títulos de anticuerpos altos para el ELISA PPD (Punto de corte: densidad óptica a 450nm >0,85), considerando que altos niveles de anticuerpos circulantes a menudo se correlacionan con la falla del sistema inmunitario para contener la proliferación bacteriana y el progreso de la enfermedad (Lenzini, Rottoli, y Rottoli 1977). Además, (Medeiros et al. 2010) afirman que los animales con altos títulos de anticuerpos son animales con tuberculosis generalizada que presentan altas cargas bacterianas, por lo que sería más probable encontrar micobacterias en la sangre, lo cual pudo ser comprobado en al menos dos muestras, lo que representa el 7% de los animales seropositivos analizados. Los dos animales positivos presentaban una densidad óptica a 450 nm de 0,94 y 0,85, comprobando que las muestras de sangre para la técnica de ddPCR, así como la detección mediante ELISA, son herramientas complementarias a la tuberculinización que pueden detectar animales infectados que no responden a las pruebas convencionales.

## 10. CONCLUSIONES

En este trabajo de investigación, se estandarizó y se compararon nuevas pruebas para el diagnóstico de la tuberculosis bovina. Se determinó que la técnica *Droplet digital* PCR es una herramienta molecular con mayor sensibilidad que las técnicas moleculares convencionales que han sido probadas para *Mycobacterium bovis*, permitiendo la detección de una marcada menor concentración de bacterias circulantes en sangre. Se logró estandarizar una técnica molecular que detecta 6 bacterias por mililitro cuando se parte desde un cultivo, mientras que cuando se parte de una muestra de sangre la técnica logró detectar 500 bacterias por mililitro, comparando su sensibilidad con la PCR a tiempo final.

A su vez, se desarrolló un ELISA con el antígeno P22, comparando sus resultados tanto con la PAC como con un ELISA con el antígeno PPD publicado anteriormente por diversos autores. Se determinó que es una herramienta importante para la detección de animales no reaccionantes a las pruebas intradérmicas pero que resultan infectados y son una fuente potencial de infección en el rodeo.

Además, se logró la detección de la bacteria desde muestras de sangre de animales seropositivos al ELISA.

En conclusión, el presente trabajo muestra los resultados de técnicas diagnósticas desarrolladas y comparadas con el resultado de la PAC en un rodeo comercial representativo de nuestro país. Se sugiere la utilización de estas pruebas desarrolladas de manera complementaria con la utilización de las pruebas rutinarias. Los resultados brindan datos alentadores sobre los cuales se deberá continuar realizando estudios de investigación para mayores avances en el control de esta enfermedad. Sería relevante contar con mayores herramientas e información generada para lograr acortar los periodos de saneamiento de los predios interdictos por esta enfermedad.

## 11. BIBLIOGRAFÍA

- Abalos y Retamal, P. 2004. "Tuberculosis: a re-emerging zoonosis?" *Revue scientifique et technique* 23 (2): 583–94.
- Abbas, Abul K., Andrew H. Lichtman, y Shiv Pillai. 2012. *Inmunología Celular y Molecular*. Harcourt Brace de España, S.A.
- Aguirre, Sarita, Celia Martínez Cuellar, María Belén Herrero, Gustavo Chamorro Cortesi, Nilda Gimenez de Romero, Mirian Alvarez, y Jose Ueleres Braga. 2017. "Prevalence of Tuberculosis Respiratory Symptoms yAssociated Factors in the Indigenous Populations of Paraguay (2012)." *Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz* 112 (7): 474–84.
- Akçay, Erhan, yMüjgan İzgür. 2002. "Sığır Tüberkülozunun Teşhisinde Kullanılan Gamma İnterferon Testi İle Elısa'nın Karşılaştırmalı Değerlendirmesi." *Etlik Veteriner Mikrobiyoloji Dergisi [The Journal of Etlik Veterinary Microbiology]* 13 (2): 7–15.
- Alvarez, Julio, Lucía de Juan, Javier Bezos, Beatriz Romero, Jose Luis Sáez, Sergio Marqués, Concepción Domínguez, et al. 2009. "Effect of Paratuberculosis on the Diagnosis of Bovine Tuberculosis in a Cattle Herd with a Mixed Infection Using Interferon-Gamma Detection Assay." *Veterinary Microbiology* 135 (3-4): 389–93.
- Amadori, M., S. Tameni, P. Scaccaglia, S. Cavarani, I. L. Archetti, yR. Q. Giandomenico. 1998. "Antibody Tests for Identification of Mycobacterium Bovis-Infected Bovine Herds." *Journal of Clinical Microbiology* 36 (2): 566–68.
- Aranaz, Alicia, Debby Cousins, Ana Mateos, y Lucas Domínguez. 2003. "Elevation of Mycobacterium Tuberculosis Subsp. Caprae Aranaz et Al. 1999 to Species Rank as Mycobacterium Caprae Comb. Nov., Sp. Nov." *International Journal of Systematic yEvolutionary Microbiology* 53 (Pt 6): 1785–89.
- Aung, Ye Win, Kiaticchai Faksri, Arunnee Sangka, Kanchana Tomanakan, y Wiset Namwat. 2023. "Detection of Mycobacterium Tuberculosis Complex in Sputum Samples Using Droplet Digital PCR Targeting mpt64." *Pathogens* 12 (2). <https://doi.org/10.3390/pathogens12020345>.
- Barrera, L., M. Sequeíra, S. Baldrano, y M. Velazco. 2008. "Manual Para El Diagnóstico Bacteriológico de La Tuberculosis." *Normas Y Guía Teórica. Parte II*.
- Biberstein y Hirsch, D. 1999. *Mycobacterium Species: The Agents of Animal Tuberculosis*. Edited by Veterinary Microbiology, Blackwell Science Ltd, p 158-164.
- Blanco Vázquez, Cristina, Thiago Doria Barral, Beatriz Romero, Manuel Queipo, Isabel Merediz, Pablo Quirós, José Ángel Armenteros, et al. 2021. "Spatial yTemporal Distribution of Mycobacterium Tuberculosis Complex Infection in Eurasian Badger (Meles Meles) yCattle in Asturias, Spain." *Animals : An Open Access Journal from MDPI* 11 (5). <https://doi.org/10.3390/ani11051294>.
- Brenner, Don J. 2005. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology: Volume Two: The Proteobacteria, Part A Introductory Essays*. PDF. Edited by Don J. Brenner, Noel R. Krieg, James T. Staley, yGeorge M. Garrity. 2nd ed. New York, NY: Springer. <https://doi.org/10.1007/0-387-28021-9>.
- Canal, A. M. 2012. *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.

- Cao, Ziyang, Wei Wu, Haiting Wei, Caixia Gao, Liping Zhang, Chunyan Wu, yLikun Hou. 2020. "Using Droplet Digital PCR in the Detection of Mycobacterium Tuberculosis DNA in FFPE Samples." *International Journal of Infectious Diseases: IJID: Official Publication of the International Society for Infectious Diseases* 99 (October): 77–83.
- Carbonnelle, B., E. Carpentier, R. Bauriaud, M. Castets, C. Chippaux, M. F. Danjoux, I. Fisher, M. J. Gevaudan, C. Martin, yD. Moinard. 1995. "[Use of the Bactec TB 460 method for the bacteriological diagnosis of tuberculosis. Results of a multicenter study]." *Pathologie-biologie* 43 (5): 401–6.
- Carrisoza-Urbina, Jacobo, Elizabeth Morales-Salinas, Mario A. Bedolla-Alva, Rogelio Hernández-Pando, yJosé A. Gutiérrez-Pabello. 2019. "Atypical Granuloma Formation in Mycobacterium Bovis-Infected Calves." *PloS One* 14 (7): e0218547.
- Casal, C. 2015. "Diagnóstico de Tuberculosis En Rumiantes Y Camélidos: Optimización de Pruebas de Base Celular Y Humoral." UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID.
- Casas Olascoaga, R. 2013. "Antecedentes de La Tuberculosis Bovina En El Uruguay." Seminario sobre Sanidad Animal. DILAVE "Miguel C. Rubino."
- Casaux, G. 2005. "Tambos: Manual de Legislación Láctea." Montevideo Oficina de Publicaciones de la Facultad de Veterinaria.
- Castets, M., N. Rist, yH. Boisvert. 1969. "La Variété Africaine Du Bacille Tuberculeux Humain." *Medecine d'Afrique Noire*.
- Chávez, Ciro Estrada, Raúl Mancilla, Camila Arriaga Díaz, Rafael Pérez González, y Fernando Díaz Otero. 2001. "Determinación de Anticuerpos Anti-PPD En Hatos Lecheros Con Distintas Prevalencias de Tuberculosis Bovina En México." *Veterinaria* 32 (3): 207–11.
- Cooper y Khader, Shabaana A. 2008. "The Role of Cytokines in the Initiation, Expansion, yControl of Cellular Immunity to Tuberculosis." *Immunological Reviews* 226 (December): 191–204.
- Corner, L., L. Melville, K. McCubbin, K. J. Small, B. S. McCormick, P. R. Wood, yJ. S. Rothel. 1990. "Efficiency of Inspection Procedures for the Detection of Tuberculous Lesions in Cattle." *Australian Veterinary Journal* 67 (11): 389–92.
- Cosivi, O., J. M. Grange, C. J. Daborn, M. C. Raviglione, T. Fujikura, D. Cousins, R. A. Robinson, H. F. Huchzermeyer, I. de Kantor, yF. X. Meslin. 1998. "Zoonotic Tuberculosis due to Mycobacterium Bovis in Developing Countries." *Emerging Infectious Diseases* 4 (1): 59–70.
- Cousins, Debby V., Ricardo Bastida, Angel Cataldi, Viviana Quse, Sharon Redrobe, Sue Dow, Pdraig Duignan, et al. 2003. "Tuberculosis in Seals Caused by a Novel Member of the Mycobacterium Tuberculosis Complex: Mycobacterium Pinnipedii Sp. Nov." *International Journal of Systematic yEvolutionary Microbiology* 53 (Pt 5): 1305–14.
- Cressey, Peter, Rob Lake, y Andrew Hudson. 2006. "RISK PROFILE: MYCOBACTERIUM BOVIS IN RED MEAT." <https://www.mpi.govt.nz/dmsdocument/26189/direct>.
- Crosi, Gonzalo. 2017. "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." Edited by Facultad de Veterinaria yMontevideo Udelar. Udelar. FV. <https://www.colibri.udelar.edu.uy/jspui/handle/20.500.12008/23975>.
- Dannenbergh, A. M., Jr. 2001. "Pathogenesis of Pulmonary Mycobacterium Bovis

- Infection: Basic Principles Established by the Rabbit Model." *Tuberculosis* 81 (1-2): 87–96.
- De Almeida, Isabela Neves, Wânia Da Silva Carvalho, Maria Lúcia Rossetti, Elis Regina Dalla Costa, ySilvana Spindola De Miranda. 2013. "Evaluation of Six Different DNA Extraction Methods for Detection of Mycobacterium Tuberculosis by Means of PCR-IS6110: Preliminary Study." *BMC Research Notes* 6 (December): 561.
- De Kantor, I. N., F. Paolicchi, A. Bernardelli, P. M. Torres, A. Canal, J. R. Lobo, M. A. Zollin de Almeida, et al. 2008. "LA TUBERCULOSIS BOVINA EN AMÉRICA LATINA. SITUACIÓN ACTUAL Y RECOMENDACIONES." In *III Congreso Latino Americano de Zoonosis, OIE, Buenos Aires, Argentina*. [https://www.researchgate.net/profile/Isabel\\_Kantor/publication/268286089\\_LA\\_TUBERCULOSIS\\_BOVINA\\_EN\\_AMERICA\\_LATINA\\_SITUACION\\_ACTUAL\\_Y\\_RECOMENDACIONES/links/573f1a7f08aea45ee844f470.pdf](https://www.researchgate.net/profile/Isabel_Kantor/publication/268286089_LA_TUBERCULOSIS_BOVINA_EN_AMERICA_LATINA_SITUACION_ACTUAL_Y_RECOMENDACIONES/links/573f1a7f08aea45ee844f470.pdf).
- Domingo, M., E. Vidal, yA. Marco. 2014. "Pathology of Bovine Tuberculosis." *Research in Veterinary Science* 97 Suppl (October): S20–29.
- Domínguez Rodríguez, Lucas, Ana Mateos García, y Guillermo Suárez Fernández. 1996. "Aplicación de la técnica de PCR (Reacción en cadena de la polimerasa) en el diagnóstico y epidemiología de la tuberculosis en animales." Universidad Complutense de Madrid, Servicio de Publicaciones. <https://eprints.ucm.es/id/eprint/3145/>.
- Errico, F. 1989. "Guía Técnica de Métodos Y Criterios de Interpretación de La Prueba Tuberculínica En Bovinos." *Tuberculosis Y Brucelosis Bovina En El Uruguay*, 35.
- Errico, F., J. Barriola, y M. Laborde. 1980. "Tuberculosis Bovina: Situación Actual En El Uruguay." *Veterinaria* . <https://www.revistasmvu.com.uy/index.php/smvu/article/view/1074>.
- Espinosa de los Monteros, L. E., J. C. Galán, M. Gutiérrez, S. Samper, J. F. García Marín, C. Martín, L. Domínguez, et al. 1998. "Allele-Specific PCR Method Based on pncA yoxyR Sequences for Distinguishing Mycobacterium Bovis from Mycobacterium Tuberculosis: Intraspecific M. Bovis pncA Sequence Polymorphism." *Journal of Clinical Microbiology* 36 (1): 239–42.
- Esquén, Zuñe, yBenny Tomás. 2022. "Detección y Cuantificación de Mycobacterium tuberculosis con PCR digital en gotas de muestras extrapulmonares de pacientes con sospecha clínica de tuberculosis del Hospital Regional de Lambayeque 2020." Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo. <https://repositorio.unprg.edu.pe/handle/20.500.12893/10647>.
- Farias, Thaís A., Flávio R. Araújo, Ana Luíza A. R. Osório, Kláudia S. G. Jorge, Carlos N. A. Ramos, Ingrid I. F. Souza, Alexandre Azambuja, Cleber O. Soares, Márcio R. Silva, yAiesca O. Pellegrin. 2012. "ELISA BASED ON RECOMBINANT MPB70 YP27 FOR DETECTION OF ANTIBODIES AGAINST Mycobacterium Bovis." *Revista de Patologia Tropical*. <https://doi.org/10.5216/rpt.v41i2.19325>.
- Fine, Amanda E., Carole A. Bolin, Joseph C. Gardiner, y John B. Kaneene. 2011. "A Study of the Persistence of Mycobacterium Bovis in the Environment under Natural Weather Conditions in Michigan, USA." *Veterinary Medicine International* 2011 (April): 765430.
- Francis, J. 1947. "Bovine Tuberculosis, Including a Contrast with Human Tuberculosis." *Bovine Tuberculosis, Including a Contrast with Human*. <https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/19472702844>.

- Francis, J., R. J. Seiler, I. W. Wilkie, D. O'boyle, M. J. Lumsden, yA. J. Frost. 1978. "Sensitivity ySpecificity of Various Tuberculin Tests Using Bovine PPD yOther Tuberculins." *The Veterinary Record*. <https://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=US201302467286>.
- Friedman, Lloyd N. 2000. *Tuberculosis: Current Concepts yTreatment, Second Edition*. CRC Press.
- Garnier, Thierry, Karin Eiglmeier, Jean-Christophe Camus, Nadine Medina, Huma Mansoor, Melinda Pryor, Stephanie Duthoy, et al. 2003. "The Complete Genome Sequence of Mycobacterium Bovis." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100 (13): 7877–82.
- Gazquez, A. 1991. "Inflamaciones Crónicas Granulomatosas." *Patología Veterinaria. La Ed. Interamericana-McGraw-Hill, Ma-drid, España. ISBN: 84 7615-696-0*.
- Gehlen Thiessen, A. A. 2015. "Descripción de Datos de Ganado Lechero Enviado a Faena Sanitaria Por Tuberculosis Bovina En El 2013 En Uruguay." 2015. <https://www.colibri.udelar.edu.uy/jspui/bitstream/20.500.12008/10261/1/FV-31544.pdf>.
- Gil, A. 2012. "Tuberculosis Bovina: Enfermedad Reemergente En Poblaciones Bovinas de América: La Experiencia Uruguaya." 2012. <https://www.sapuvetnet.org/News%20Imas/2.4.%20Tuberculosis%20bovina%20enfermedad%20reemergente%20en%20poblaciones%20bovinas.pdf>.
- Gil, A., yLuis Samartino. 2001. "Zoonosis En Los Sistemas de Producción Animal de Las áreas Urbanas Y Periurbanas de América Latina." *Rome: FAO*, 12–13.
- Giménez, José Francisco, Sergio Rivera, y Jacobus Deward. 2009. "Caracterización de La Respuesta Inmunitaria de Bovinos Infectados Con Mycobacterium Bovis En Condiciones de Campo En El Municipio Colón, Estado Zulia, Venezuela." *Revista* 19 (5): 475–85.
- Giordano Fabre, Renzo André, yEnzo Tristant Lema. 2020. "Asociación Entre La Exposición a Enfermedades Virales Inmunopresoras Y La Reactividad Contra Mycobacterium Bovis." *Facultad de Veterinaria, UDELAR, Montevideo*. <https://www.colibri.udelar.edu.uy/jspui/handle/20.500.12008/28092>.
- Goh, K. S., yN. Rastogi. 1991. "Rapid Preliminary Differentiation of Species within the Mycobacterium Tuberculosis Complex: Proposition of a Radiometric Method." *Research in Microbiology* 142 (6): 659–65.
- Gormley, E., M. B. Doyle, T. Fitzsimons, K. McGill, yJ. D. Collins. 2006. "Diagnosis of Mycobacterium Bovis Infection in Cattle by Use of the Gamma-Interferon (Bovigam®) Assay." *Veterinary Microbiology* 112 (2): 171–79.
- Guaman, María de Lourdes. 2012. "Diagnostico de Tuberculosis Bovina Mediante Alergenización." Escuela Superior Politécnica de Chimborazo. <http://dspace.esepoch.edu.ec/handle/123456789/2126>.
- Hines, Nichole, Janet B. Payeur, y Lorraine J. Hoffman. 2006. "Comparison of the Recovery of Mycobacterium Bovis Isolates Using the BACTEC MGIT 960 System, BACTEC 460 System, yMiddlebrook 7H10 y7H11 Solid Media." *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation: Official Publication of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, Inc* 18 (3): 243–50.
- Hosek, J., P. Svastova, M. Moravkova, I. Pavlik, yM. Bartos. 2006. "Methods of Mycobacterial DNA Isolation from Different Biological Material: A Review." *Veterinarni Medicina* 51 (5): 180–92.
- Houlihan, M. G., F. W. Dixon, y N. A. Page. 2008. "Outbreak of Bovine Tuberculosis Featuring Anergy to the Skin Test, Udder Lesions yMilkborne Disease in Young Calves." *Veterinary Record*. <https://doi.org/10.1136/vr.163.12.357>.

- Huard, Richard C., Michel Fabre, Petra de Haas, Luiz Claudio Oliveira Lazzarini, Dick van Soolingen, Debby Cousins, y John L. Ho. 2006. "Novel Genetic Polymorphisms That Further Delineate the Phylogeny of the Mycobacterium Tuberculosis Complex." *Journal of Bacteriology* 188 (12): 4271–87.
- Humblet, Marie, Maria Laura Boschioli, y Claude Saegerman. 2009. "Classification of Worldwide Bovine Tuberculosis Risk Factors in Cattle: A Stratified Approach." *Veterinary Research* 40 (5): 50.
- Infantes-Lorenzo, José Antonio, Inmaculada Moreno, María de Los Ángeles Risalde, Álvaro Roy, Margarita Villar, Beatriz Romero, Nieves Ibarrola, et al. 2017. "Proteomic Characterisation of Bovine  $\gamma$ Avian Purified Protein Derivatives yIdentification of Specific Antigens for Serodiagnosis of Bovine Tuberculosis." *Clinical Proteomics* 14 (November): 36.
- Irureta, Milagros. 2016. "Tuberculosis Bovina: Actualización Sobre La Enfermedad Y La Campaña Sanitaria En Uruguay." *Facultad de Veterinaria, UDELAR, Montevideo*.
- Johnson, Linda, Gillian Dean, Shelley Rhodes, Glyn Hewinson, Martin Vordermeier, y Arun Wangoo. 2007. "Low-Dose Mycobacterium Bovis Infection in Cattle Results in Pathology Indistinguishable from that of High-Dose Infection." *Tuberculosis* 87 (1): 71–76.
- Kamerbeek, J., L. Schouls, A. Kolk, M. van Agterveld, D. van Soolingen, S. Kuijper, A. Bunschoten, et al. 1997. "Simultaneous Detection yStrain Differentiation of Mycobacterium Tuberculosis for Diagnosis yEpidemiology." *Journal of Clinical Microbiology* 35 (4): 907–14.
- Kantor y Ritacco, De. 2006. "An Update on Bovine Tuberculosis Programmes in Latin American yCaribbean Countries." *Veterinary Microbiology* 112 (2-4): 111–18.
- Karlsón, A. G., y E. F. Lessel. 1970. "Mycobacterium Bovis Nom. Nov." *International Journal of Systematic Bacteriology* 20 (3): 273–82.
- Keating, Lisa A., Paul R. Wheeler, Huma Mansoor, Jacqueline K. Inwald, James Dale, R. Glyn Hewinson, y Stephen V. Gordon. 2005. "The Pyruvate Requirement of Some Members of the Mycobacterium Tuberculosis Complex Is due to an Inactive Pyruvate Kinase: Implications for in Vivo Growth." *Molecular Microbiology*. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2005.04524.x>.
- Koch, Robert. 1882. "The Etiology of Tuberculosis." *Reviews of Infectious Diseases* 4 (6): 1270–74.
- Latini, M. S., O. A. Latini, M. L. Lopez, y J. O. Ceconi. 1990. "Tuberculosis Bovina En Seres Humanos." *Rev Arg Torax* 51: 13–16.
- Latini y Barrera, L. 2014. *MANUAL PARA EL DIAGNÓSTICO BACTERIOLÓGICO DE LA TUBERCULOSIS: Normas y guía técnica—Parte I: Baciloscopia*. Pan American Health Org.
- Lenzini, L., P. Rottoli, y L. Rottoli. 1977. "The Spectrum of Human Tuberculosis." *Clinical yExperimental Immunology* 27 (2): 230–37.
- Lepper, A. W., C. W. Pearson, y L. A. Corner. 1977. "Anergy to Tuberculin in Beef Cattle." *Australian Veterinary Journal* 53 (5): 214–16.
- Lilenbaum, Walter, y Leila de Souza Fonseca. 2006. "The Use of ELISA as a Complementary Tool for Bovine Tuberculosis Control in Brazil." *Braz J Vet Res Anim Sci*. <https://www.revistas.usp.br/bjvras/article/download/26507/28290/30778>.
- Luchter, B. 2004. *Introducción Al Estudio de Las Enfermedades Infecciosas. Enfermedades Infecciosas de Los Rumiantes*. Edited by Editorial Universitaria de la Patagonia.

- MacGregor-Fairlie, Michael, Samuel Wilkinson, Gurdyal S. Besra, y Pola Goldberg Oppenheimer. 2020. "Tuberculosis Diagnostics: Overcoming Ancient Challenges with Modern Solutions." *Emerging Topics in Life Sciences* 4 (4): 423–36.
- MAPA. 2018. "Manual de Detección de Animales Infectados Anérgicos En Explotaciones T2, de Riesgo O Con Antecedentes de Tuberculosis." Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación; Universidad Complutense Madrid.
- Marassi, Carla D., Luciana Medeiros, Eduardo Figueiredo, Leila S. Fonseca, Rafael Duarte, Vania Paschoalin, Walter M. R. Oelemann, yWalter Lilenbaum. 2013. "A Multidisciplinary Approach to Diagnose Naturally Occurring Bovine Tuberculosis in Brazil." *Pesquisa Veterinaria Brasileira: Revista Do Colegio Brasileiro de Patologia Animal; Brazilian Journal of Veterinary Research* 33 (1): 15–20.
- Martín-Hernando, Maria Paz, Ursula Höfle, Joaquin Vicente, Francisco Ruiz-Fons, Dolores Vidal, Marta Barral, Joseba M. Garrido, José de la Fuente, yChristian Gortazar. 2007. "Lesions Associated with Mycobacterium Tuberculosis Complex Infection in the European Wild Boar." *Tuberculosis* 87 (4): 360–67.
- McNair, J., M. D. Welsh, y J. M. Pollock. 2007. "The Immunology of Bovine Tuberculosis yProgression toward Improved Disease Control Strategies." *Vaccine* 25 (30): 5504–11.
- Medeiros, Luciana Dos Santos, Carla Dray Marassi, Eduardo Eustáquio S. Figueiredo, y Walter Lilenbaum. 2010. "Potential Application of New Diagnostic Methods for Controlling Bovine Tuberculosis in Brazil." *Brazilian Journal of Microbiology: [publication of the Brazilian Society for Microbiology]* 41 (3): 531–41.
- Meyer, Robert M. 2012. "Erradicación de La Tuberculosis Bovina En Grandes Rodeos Lecheros: Métodos Y Enfoques Utilizados En Estados Unidos." *XL Jornadas Uruguayas de Buiatría*.  
[https://bibliotecadigital.fvet.edu.uy/bitstream/handle/123456789/774/JB2012\\_118-120.pdf?sequence=1&isAllowed=y](https://bibliotecadigital.fvet.edu.uy/bitstream/handle/123456789/774/JB2012_118-120.pdf?sequence=1&isAllowed=y).
- MGAP. 2021. "PROCEDIMIENTO DE RASTREO Y ATENCIÓN DE FOCO DE TUBERCULOSIS BOVINA." MGAP.
- Monaghan, M. L., M. L. Doherty, J. D. Collins, J. F. Kazda, yP. J. Quinn. 1994. "The Tuberculin Test." *Veterinary Microbiology* 40 (1-2): 111–24.
- Monies, R. J., yJ. C. Head. 1999. "Bovine Tuberculosis in Housed Calves." *The Veterinary Record* 145 (25): 743.
- Montiel, Milagros, Sergio Rivera, Rosaura Hernández, Manzur Hassanhi, Francisco Vargas, yJosé Nuñez. 2002. "Respuesta inmunitaria y anergia. Estudio en pacientes tuberculosos del Hospital Universitario de Maracaibo, Venezuela." *Acta científica venezolana*. <https://pesquisa.bvsalud.org/portal/resource/pt/lil-314789>.
- Moreira, C. 2021. "SITUACIÓN EPIDEMIOLÓGICA DE LA TUBERCULOSIS BOVINA EN URUGUAY." In *Jornada de Brucelosis Y Tuberculosis. Diagnóstico de La Situación Y Perspectivas En Países de América Del Sur.*, 41–46. [researchgate.net](https://www.researchgate.net).
- Morris, R. S., D. U. Pfeiffer, y R. Jackson. 1994. "The Epidemiology of Mycobacterium Bovis Infections." *Veterinary Microbiology*.  
[https://doi.org/10.1016/0378-1135\(94\)90053-1](https://doi.org/10.1016/0378-1135(94)90053-1).
- Moura, André, Mikael Arrais Hodon, Paulo Martins Soares Filho, Marina de Azevedo Issa, Ana Paula Ferreira de Oliveira, yAntônio Augusto Fonseca Júnior. 2016. "Comparison of Nine DNA Extraction Methods for the Diagnosis of Bovine Tuberculosis by Real Time PCR." *Ciencia Rural* 46 (7): 1223–28.

- Nakatani, S. M., M. Burger, M. C. Assef, S. R. Brockelt, L. L. Cogo, y J. T. Messias-Reason. 2004. "Efficient Method for Mycobacterial DNA Extraction in Blood Cultures Aids Rapid PCR Identification of Mycobacterium Tuberculosis yMycobacterium Avium." *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases: Official Publication of the European Society of Clinical Microbiology* 23 (11): 851–54.
- Neill, S. D., D. G. Bryson, y J. M. Pollock. 2001. "Pathogenesis of Tuberculosis in Cattle." *Tuberculosis* 81 (1-2): 79–86.
- Neill, S. D., J. J. O'Brien, y J. Hanna. 1991. "A Mathematical Model for Mycobacterium Bovis Excretion from Tuberculous Cattle." *Veterinary Microbiology* 28 (1): 103–9.
- Neill, S. D., J. M. Pollock, D. B. Bryson, y J. Hanna. 1994. "Pathogenesis of Mycobacterium Bovis Infection in Cattle." *Veterinary Microbiology* 40 (1-2): 41–52.
- Nunes-Alves, C., Booty, M. G., Carpenter, S. M., Jayaraman, P., Rothchild, A. C., y Behar, S. M. (2014). In search of a new paradigm for protective immunity to TB. *Nature Reviews. Microbiology*, 12(4), 289–299.
- Nyaruaba, Raphael, Caroline Mwaliko, Kelvin Kimutai Kering, y Hongping Wei. 2019. "Droplet Digital PCR Applications in the Tuberculosis World." *Tuberculosis* 117 (July): 85–92.
- OMSA. 2021. "Tuberculosis bovina." OMSA. March 23, 2021. <https://www.woah.org/es/enfermedad/tuberculosis-bovina/>.
- Ortega, Javier, José A. Infantes-Lorenzo, Javier Bezos, Álvaro Roy, Lucia de Juan, Beatriz Romero, Inmaculada Moreno, et al. 2021. "Evaluation of P22 ELISA for the Detection of Mycobacterium Bovis-Specific Antibody in the Oral Fluid of Goats." *Frontiers in Veterinary Science* 8 (August): 674636.
- Ortega, J., J. A. Infantes-Lorenzo, A. Roy, L. de Juan, B. Romero, I. Moreno, M. Domínguez, L. Domínguez, y J. Bezos. 2022. "Factors Affecting the Performance of P22 ELISA for the Diagnosis of Caprine Tuberculosis in Milk Samples." *Research in Veterinary Science* 145 (July): 40–45.
- Otero, Fernando Díaz, Victor Banda Ruiz, Laura Jaramillo Meza, Camila Arriaga Díaz, Dante Gonzalez Salazar, yCiro Estrada-Chavez. 2003. "Identification of Mycobacterium Bovis Infected Cattle by Immunological yMolecular Methods." *Veterinaria Mexico* 34 (1): 13–26.
- PAHO. 2020. "Tuberculosis." 2020. <https://www.paho.org/es/temas/tuberculosis>.
- Palmer, Mitchell V., yW. Ray Waters. 2006. "Advances in Bovine Tuberculosis Diagnosis yPathogenesis: What Policy Makers Need to Know." *Veterinary Microbiology*. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2005.11.028>.
- Palmer, Mitchell V., yW. Ray Waters. 2011. "Bovine Tuberculosis ythe Establishment of an Eradication Program in the United States: Role of Veterinarians." *Veterinary Medicine International* 2011 (May): 816345.
- Parsons, Linda M., RolyBrosch, Stewart T. Cole, Akos Somoskövi, Arthur Loder, Gisela Bretzel, Dick Van Soolingen, Yvonne M. Hale, yMax Salfinger. 2002. "Rapid ySimple Approach for Identification of Mycobacterium Tuberculosis Complex Isolates by PCR-Based Genomic Deletion Analysis." *Journal of Clinical Microbiology* 40 (7): 2339–45.
- Paullier, C., E. Perdomo, F. Errico, C. Easton, D. Cesar, G. Gómez, I. Sena, C. Bove, yM. L. Blanco. 1986. "Diagnóstico Histopatológico de Tuberculosis Bovina; Tuberculosis Y Brucelosis Bovina En El Uruguay." IICA, Montevideo (Uruguay) Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca ....

- Pestana, Elpidio Gonzalo Chamizo. 2022. "Tuberculosis Bovina." *Anuario Ciencia en la UNAH* 17 (2). <https://rcta.unah.edu.cu/index.php/ACUNAH/article/view/1594>.
- Pollock, J. M., M. D. Welsh, y J. McNair. 2005. "Immune Responses in Bovine Tuberculosis: Towards New Strategies for the Diagnosis yControl of Disease." *Veterinary Immunology yImmunopathology* 108 (1-2): 37–43.
- Poma, Hugo, Carolina Davies, Dolores Gutiérrez Cacciabue, María Mora, Miguel Basombrío, yVerónica Rajal. 2012. "Comparación de la eficiencia de extracción de ácidos nucleicos utilizando distintos kits comerciales y empleando la qPCR. Efecto de las sustancias inhibidoras." *Revista Argentina de Microbiología vol.44 no.3 Ciudad Autónoma de Buenos Aires* 44.
- Ramírez-Villaescusa, A. M., G. F. Medley, S. Mason, yL. E. Green. 2010. "Risk Factors for Herd Breakdown with Bovine Tuberculosis in 148 Cattle Herds in the South West of England." *Preventive Veterinary Medicine* 95 (3-4): 224–30.
- Reed, G. B. 1957. "Genus Mycobacterium (species Affecting Warm-Blooded Animals except Those Causing Leprosy)." *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. 7th Ed.*
- Reviriego Gordejo y Vermeersch, J. P. 2006. "Towards Eradication of Bovine Tuberculosis in the European Union." *Veterinary Microbiology* 112 (2-4): 101–9.
- Ritacco, Viviana, Beatriz López, Lucia Barrera, A. Nader, E. Fliess, yIsabel N. Kantor. 1990. "Further Evaluation of an Indirect Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for the Diagnosis of Bovine Tuberculosis." *Journal of Veterinary Medicine. B, Infectious Diseases yVeterinary Public Health* 37 (1-10): 19–27.
- Ritacco, V., B. López, I. N. De Kantor, L. Barrera, F. Errico, yA. Nader. 1991. "Reciprocal Cellular yHumoral Immune Responses in Bovine Tuberculosis." *Research in Veterinary Science* 50 (3): 365–67.
- Rivas, Carlos, Gonzalo Greif, Cecilia Coitinho, Luis Araújo, Paula Laserra, yCarlos Robello. 2012. "Primeros Casos de Tuberculosis Pulmonar Por Mycobacterium Bovis: Una Zoonosis Reemergente En Uruguay." *La Revista Médica Del Uruguay* 28 (3): 209–14.
- Rodríguez, Amalia. 2022. "24 de Marzo - Día Mundial de la Tuberculosis 2022." CHLAEP. March 24, 2022. <https://chlaep.org.uy/24-de-marzo-dia-mundial-de-la-tuberculosis-2022/>.
- Rodríguez, Juan C. García, Silvia Restrepo, y María Mercedes Zambrano. 2010. "Análisis comparativo de seis genomas del complejo Mycobacterium tuberculosis." *Biomedica: revista del Instituto Nacional de Salud* 30 (1): 23–31.
- Romero Martínez, B. 2010. "Tuberculosis Bovina: Epidemiología Molecular Y Su Implantación En Sanidad Animal Y Salud Pública." <https://eprints.ucm.es/14504/1/T32528.pdf>.
- Romero, R. E., D. L. Garzón, G. A. Mejía, W. Monroy, M. E. Patarroyo, yL. A. Murillo. 1999. "Identification of Mycobacterium Bovis in Bovine Clinical Samples by PCR Species-Specific Primers." *Canadian Journal of Veterinary Research = Revue Canadienne de Recherche Veterinaire* 63 (2): 101–6.
- Rothel, J. S., S. L. Jones, L. A. Corner, J. C. Cox, yP. R. Wood. 1992. "The Gamma-Interferon Assay for Diagnosis of Bovine Tuberculosis in Cattle: Conditions Affecting the Production of Gamma-Interferon in Whole Blood Culture." *Australian Veterinary Journal* 69 (1): 1–4.
- Rua-Domenech, R. de la, A. T. Goodchild, H. M. Vordermeier, R. G. Hewinson, K. H. Christiansen, yR. S. Clifton-Hadley. 2006. "Ante Mortem Diagnosis of Tuberculosis in Cattle: A Review of the Tuberculin Tests,  $\gamma$ -Interferon Assay yOther Ancillary Diagnostic Techniques." *Research in Veterinary Science* 81 (2):

190–210.

- Rüsch-Gerdes, S., K. H. Schröder, y C. Fetting. 1985. “[Studies with the Bactec 460 system. Evaluation of sensitivity in Mycobacterium tuberculosis. Comparison of the radiometric with the conventional method].” *Praxis und Klinik der Pneumologie* 39 (12): 967–69.
- Salgado, Jakes. 2022. “ANÁLISIS TEMPORAL DE LA EFICACIA DEL PROGRAMA DE ERRADICACIÓN DE LA TUBERCULOSIS BOVINA EN ESPAÑA.” *Zaguan.unizar.es*. <https://zaguan.unizar.es/record/124850>.
- Sayin, Z., yO. Erganis. 2013. “Diagnosis of Bovine Tuberculosis by PPD-ELISA ySonication-ELISA.” 2013. <http://ijvm.org.il/sites/default/files/sayin.pdf>.
- Schiller, I., B. Oesch, H. M. Vordermeier, M. V. Palmer, B. N. Harris, K. A. Orloski, B. M. Buddle, T. C. Thacker, K. P. Lyashchenko, yW. R. Waters. 2010. “Bovine Tuberculosis: A Review of Current yEmerging Diagnostic Techniques in View of Their Relevance for Disease Control yEradication.” *Transboundary yEmerging Diseases* 57 (4): 205–20.
- Schlüter, Aline Silja. 2006. *Die amtliche Fleischuntersuchung der Tierart Rind in Deutschland: Retrospektiven, Status quo und Perspektiven*.
- Schwartz, R. H., P. Gómez-García, L. C. Cruz-Sánchez, G. Hernández-Tepichín, F. Brito-Galeana, G. Fanning, R. Amado, G. Symonds, M. Roberto-Sánchez, yElaine J. Abrams. 2004. “Anergia de Células T.” *Alergia, Asma E Inmunología Pediátricas - Free Works* 13 (1): 24–29.
- Senasa. 2007. “PROGRAMA NACIONAL DE LUCHA CONTRA LA TUBERCULOSIS BOVINA.” *Produccion Animal. SENASA*. 2007. [https://www.produccion-animal.com.ar/sanidad\\_intoxicaciones\\_metabolicos/infecciosas/bovinos\\_en\\_general/20-programa\\_nacional\\_tuberculosis.pdf](https://www.produccion-animal.com.ar/sanidad_intoxicaciones_metabolicos/infecciosas/bovinos_en_general/20-programa_nacional_tuberculosis.pdf).
- Soares Filho, P. M., A. K. Ramalho, A. M. Silva, M. A. Issa, P. M. P. C. Mota, C. H. O. Silva, A. C. C. L. Ribeiro, J. K. P. Rei, yR. C. Leite. 2020. “Diagnostic Performance of a Commercial ELISA Used as a Complementary Test for Bovine Tuberculosis in Two Bovine Herds with Different Disease Status.” *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinaria E Zootecnia* 72 (1): 1–8.
- Souza, Rudielle de Arruda Rodrigues, Kláudia Santos Gonçalves Jorge, Marcio Roberto Silva, Walter Lilenbaum, Carlos Eugênio Soto Vidal, Rodrigo Nestor Etges, Miladin Kostovic, yFlabio Ribeiro Araujo. 2019. “ELISA Using a Recombinant Chimera of ESAT-6/MPB70/MPB83 for Mycobacterium Bovis Diagnosis in Naturally Infected Cattle.” *The Journal of Veterinary Medical Science / the Japanese Society of Veterinary Science* 81 (1): 9–14.
- Souza, Mariana A., Nadia G. Bombonato, Cristina C. Dib, yAnna M. C. Lima. 2022. “Indirect ELISA as a Complementary Diagnostic Method of Bovine Tuberculosis.” *Pesquisa Veterinaria Brasileira: Revista Do Colegio Brasileiro de Patologia Animal = Brazilian Journal of Veterinary Research* 42 (April). <https://doi.org/10.1590/1678-5150-PVB-6981>.
- Spositto, F. L. E., P. A. Z. Campanerut, L. D. Ghiraldi, C. Q. F. Leite, M. H. Hirata, R. D. C. Hirata, V. L. D. Siqueira, yR. Fressatti Cardoso. 2014. “Multiplex-PCR for Differentiation of Mycobacterium Bovis from Mycobacterium Tuberculosis Complex.” *Brazilian Journal of Microbiology: [publication of the Brazilian Society for Microbiology]* 45 (3): 841–43.
- Stonebrink, B. 1958. “The Use of a Pyruvate Containing Egg Medium in the Culture of Isoniazid Resistant Strains of Mycobacterium Tuberculosis Var. Hominis.” *Acta Tuberculosea Scandinavica*. <https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/19582702387>.

- Thom, M., J. H. Morgan, J. C. Hope, B. Villarreal-Ramos, M. Martin, yC. J. Howard. 2004. "The Effect of Repeated Tuberculin Skin Testing of Cattle on Immune Responses yDisease Following Experimental Infection with Mycobacterium Bovis." *Veterinary Immunology yImmunopathology* 102 (4): 399–412.
- Tizard, Ian R. 2009. *Introducción a La Inmunología Veterinaria*. Elsevier Health Sciences.
- Toossi y Ellner, J. J. 1996. "Mechanisms of Anergy in Tuberculosis." *Current Topics in Microbiology yImmunology*. [https://doi.org/10.1007/978-3-642-80166-2\\_10](https://doi.org/10.1007/978-3-642-80166-2_10).
- Torres, Pedro M. 2007. "LAS PRUEBAS TUBERCULINICAS EN EL GANADO BOVINO." 2007. [http://www.senasa.gob.ar/sites/default/files/ARBOL\\_SENASA/ANIMAL/BOVINO\\_S\\_BUBALINOS/PROD\\_PRIMARIA/SANIDAD/ENF\\_Y\\_ESTRAT/TUBERCULOSIS/file1014-101.pdf](http://www.senasa.gob.ar/sites/default/files/ARBOL_SENASA/ANIMAL/BOVINO_S_BUBALINOS/PROD_PRIMARIA/SANIDAD/ENF_Y_ESTRAT/TUBERCULOSIS/file1014-101.pdf).
- Vestal, Annie L. 1977. *Procedures for the Isolation yIdentification of Mycobacteria*. Department of Health, Education, yWelfare, Public Health Service, Center for Disease Control, Bureau of Laboratories, Training yConsultation Division.
- Vordermeier, H. M., A. Whelan, y G. Hewinson. 2008. "The Scientific Case for the Gamma Interferon 'BOVIGAM™' Assay." *Government Veterinary Journal*.
- Wahl, Sharon M. 1992. "Transforming Growth Factor Beta (TGF-?) in Inflammation: A Cause ya Cure." *Journal of Clinical Immunology*. <https://doi.org/10.1007/bf00918135>.
- Wei, Zhenhong, Xiaoping Zhang, Chaojun Wei, Liang Yao, Yonghong Li, Xiaojing Zhang, Hui Xu, et al. 2019. "Diagnostic Accuracy of in-House Real-Time PCR Assay for Mycobacterium Tuberculosis: A Systematic Review yMeta-Analysis." *BMC Infectious Diseases* 19 (1): 701.
- Yang, Jiaru, Xinlin Han, Aihua Liu, Xiyuan Bai, Cuiping Xu, Fukai Bao, Shi Feng, Lvyan Tao, Mingbiao Ma, yYun Peng. 2017. "Use of Digital Droplet PCR to Detect Mycobacterium Tuberculosis DNA in Whole Blood-Derived DNA Samples from Patients with Pulmonary yExtrapulmonary Tuberculosis." *Frontiers in Cellular yInfection Microbiology* 7: 369.
- Zanini, M. S., E. C. Moreira, M. T. Lopes, P. Mota, yC. E. Salas. 1998. "Detection of Mycobacterium Bovis in Milk by Polymerase Chain Reaction." *Zentralblatt Fur Veterinarmedizin. Reihe B. Journal of Veterinary Medicine. Series B* 45 (8): 473–79.
- Zumárraga, Martín José, Adriana Soutullo, María Inés García, Rocío Marini, Alejandro Abdala, Héctor Tarabla, Susana Echaide, et al. 2012. "Detection of Mycobacterium Bovis-Infected Dairy Herds Using PCR in Bulk Tank Milk Samples." *Foodborne Pathogens yDisease* 9 (2): 132–37.
- Brenner, D. J., Krieg, N. R., Staley, J. T., y Garrity, G. M. (Eds.). (2005). *Bergey's manual® of systematic bacteriology: volume two: The proteobacteria, part A introductory essays*. New York: Springer.

## 12. ANEXOS

Anexo 1. Detección y cuantificación de *Mycobacterium bovis* mediante ddPCR de muestras de sangre entera bovina.

PAC	Nº muestra	ng/µl	ddPCR
Negativo	22	147	Negativo
Negativo	29	155	Positivo
Negativo	35	185	Negativo
Negativo	36	135	Negativo
Negativo	51	115	Negativo
Negativo	71	239	Negativo
Negativo	72	195	Negativo
Negativo	90	122	Negativo
Negativo	106	305	Negativo
Negativo	117	117	Negativo
Negativo	141	215	Negativo
Negativo	147	195	Negativo
Negativo	151	174	Negativo
Negativo	156	169	Negativo
Positivo	174	142	Negativo
Positivo	184	101	Negativo

Positivo	203	185	Negativo
Positivo	208	167	Negativo
Positivo	213	139	Negativo
Positivo	215	174	Negativo
Positivo	217	184	Positivo
Positivo	223	177	Negativo
Positivo	260	148	Negativo
Positivo	264	123	Negativo
Positivo	275	236	Negativo
Positivo	276	184	Negativo
Positivo	278	164	Negativo
Positivo	280	194	Negativo