



# **“Tuberculosis bovina: transmisibilidad de cepas de *Mycobacterium bovis* y detección de micobacterias en menudencias comercializadas en bocas de expendio de carne”**

Trabajo de Tesis presentado para optar por el grado de Doctor de la  
Universidad de Buenos Aires

**Vet. María Jimena Marfil**

**Director: Dr. Martín José Zumárraga**

**Lugar de desarrollo de la Tesis:** Instituto de Biotecnología, Centro de Investigaciones en Ciencias Veterinarias y Agronómicas (CICVyA), Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA), Hurlingham.

**Área:** Microbiología

Buenos Aires, 2019

# AGRADECIMIENTOS



Esta tesis pudo llevarse a cabo gracias a la ayuda de muchas personas que me acompañaron en este camino e hicieron de ésta, una experiencia llena de desafíos, alegrías y logros.

En primer lugar, agradecerle al Dr. Martín Zumárraga, director de esta tesis, por permitirme trabajar en su laboratorio, aprender sobre tuberculosis y dirigirme en mis actividades permitiéndome desarrollarme en éste área. Gracias por el apoyo, la confianza y la enseñanza.

A las Doctoras Barandiaran y Eirin, mis compañeras de trabajo y amigas Yami y Sole. Gracias por ayudarme en esta etapa a entender lo que no podía sola, en las actividades y por estar en los momentos difíciles brindándome apoyo y soluciones.

A Carla, por permitirme iniciarme en el mundo de la investigación al dejarme ser su concurrente de investigación cuando hacía su doctorado. Y gracias por acompañarme en este momento, por más que ahora hacemos cosas diferentes, tu experiencia y ayuda fueron fundamentales en la escritura de esta tesis.

A la Dra. Marcela Martínez Vivot, por permitirme trabajar en la Cátedra de Enfermedades Infecciosas a la cual pertenezco con orgullo y por permitirme pertenecer al grupo de investigación en Tuberculosis que se desarrolla en la cátedra. También agradecerles a los docentes de la Cátedra, por ayudarme a encontrar mi lugar y desarrollarme en la docencia. A mis compañeros del *Mycobacterium team* de la facultad y amigos docentes de la Cátedra, que también fueron un apoyo y una enseñanza en muchos aspectos. Especialmente a Naty con quien comenzamos en la investigación de la mano de Carla, grupo de amigas además de colegas.

A mis compañeros de laboratorio, de ayer y hoy, Ari, Mariano, Wander, Xime, Vani, Karina; por compartir trabajo, mates, desafíos, cursos y sobretodo apoyo moral! A los visitantes del laboratorio Vale, Emiliano, y a todos los chicos de PTB que estuvieron siempre cuando necesite una mano más para trabajar. A todos ellos que siempre estuvieron dispuestos a ayudar y acompañarme en todas las etapas de este trabajo. Al IB y a INTA, por permitirme trabajar en el instituto, utilizar herramientas y equipos que me permitieron desarrollar mi trabajo de la mejor forma posible.

Mis amigos veterinarios que me acompañan desde hace muchos años y que conocí estudiando esta carrera que me llena de satisfacción. Mis amigas y colegas Jose, María, Emilse y Agus por un lado y por el otro Vale, Luis, Yani, Dami, Brenda, Lula, Sofi, y Lu. Mención especial para Vivi y Nuria por ser un grupo de contención y risas que empezó como una organización de fiesta de cumpleaños y terminó en hermosas reuniones de actualización. A Gaby, mi amiga de Costa Rica, que admiro por su conocimiento pero que además se ha convertido en una amiga con quien puedo contar a pesar de la distancia. También a mis amigas de la vida Luana y Colo que siempre

están presentes. Lu, en 2018 fuiste el gran apoyo que necesite y te lo voy a agradecer toda la vida. Pablo, por ser ese apoyo durante varios años, por enseñarme, ayudarme y acompañarme en lo que pudiste.

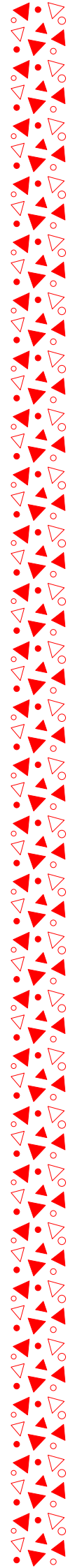
A los que me ayudaron con trabajos puntuales de esta tesis, sin quienes todavía estaría analizando datos. Ale, gracias por la ayuda con los ratones, citoquinas y estadística. Sin tu ayuda en el análisis de los resultados y en la discusión no sé como hubiese podido. Fede, compartiendo su experiencia en la inoculación de los ratones. A Pablo y Sergio del IP, con los cultivos y también por la ayuda brindada, especialmente Pablo por ayudarme con los resultados, los cuadernos y todo lo que te pedí más de una vez que revisemos a pesar que ya estabas haciendo otras cosas. A pablo con los genomas y la bioinformática, que por momentos me hizo llorar y me ayudaste a resolver. Gracias a todos por su ayuda en estas cosas que a mí me hubiesen costado el doble si no hubiese contado con ustedes.

A la universidad de Buenos Aires y a la Facultad de Cs. Veterinarias donde me formé como veterinaria, como docente y en investigación. Gracias por permitirme desarrollarme académicamente y capacitarme dentro de ella. A quienes me otorgaron las becas que me permitieron trabajar y realizar mis estudios de doctorado: Mi primera beca de la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (Agencia FONCyT), de la mano del PICT del Dr. Martín Zumárraga; y mi segunda beca de finalización de doctorado otorgada por CONICET.

A mi familia, lo más importante que tengo en mi vida. Mis papas Gaby y Luis por haberme enseñado lo importante del estudio y haberse esforzado como lo hicieron para que mis hermanos y yo tuviéramos todas las oportunidades del mundo para desarrollarnos y estudiar. Me dieron la fuerza y los medios para llegar a donde estoy y me acompañan siempre. A mis hermanos, por estar, por apoyarme y ayudarme. Fer especialmente, por la inmensa ayuda que me has brindado para que esta tesis se haya completado! Gracias a mi familia, los quiero con el alma. A mis mascotas, que como veterinaria no puedo dejar de considerar. Klauss, Misty, Akira y Dimitri que ya no están más pero estuvieron y están siempre en mi corazón. Para Soleil, que me acompañó desde primer año de la carrera y está siempre conmigo, durmiendo mientras trabajo, estudio, pero acompañándome en todo.

Como dije al principio, este camino no lo hice sola. Todos contribuyeron en que esto fuese posible. A todos los llevo en mi corazón y cuento con ustedes para poder seguir adelante, así como también estoy para ustedes cuando me necesiten. ¡Muchísimas gracias!

# ÍNDICES



## Índice general

Abreviaturas	1
Resúmenes	5
Resumen	5
Abstract	7
Introducción	9
Generalidades	9
Características de las micobacterias, taxonomía	10
Diagnóstico de la TBB	11
Diagnóstico molecular	13
Tratamiento de la tuberculosis	14
Métodos Moleculares y tipificación molecular	16
Micobacteriosis y micobacterias no tuberculosas	21
Situación de la tuberculosis bovina en Argentina	23
Tuberculosis zoonótica en Argentina	25
Transmisión epizoonótica: TBB en animales domésticos	27
Infección por <i>M. bovis</i> : Respuesta inmune y Modelos animales para el estudio de la patogenia	28
Hipótesis y Objetivos	
Hipótesis	31
Objetivos generales y específicos	32
Objetivo general	32
Objetivos específicos	32
Materiales y métodos	33
Características del muestreo	33
Bacteriología	35
Extracción de ADN	35
Identificación y tipificación molecular de los aislamientos	36
Evaluación fenotípica y molecular del perfil de resistencia a tuberculostáticos de aislamientos de <i>M. bovis</i>	40
Determinación del perfil de drogo-resistencia mediante métodos fenotípicos	40
Determinación molecular de drogo-resistencia:	41
Secuenciación del genoma completo de un aislamiento de <i>M. kansasii</i>	42
Evaluación de la virulencia y transmisibilidad de cepas genotipificadas de <i>M. bovis</i>	43
Resultados	48
Toma de muestra en bocas de expendio y frigorífico.	48
Inspección macroscópica de los órganos (pulmón e hígado)	49
Bacteriología: Obtención de aislamientos mediante cultivo	50

---

Detección molecular del CMT a partir de las muestras de tejido	52
Tipificación molecular de los aislamientos de <i>M. bovis</i>	54
Identificación molecular de las MNT	56
Co-aislamiento <i>M. bovis-M. kansasii</i>	60
Secuenciación del Genoma completo de un aislamiento de <i>M. kansasii</i>	60
Evaluación del perfil de resistencia	63
Evaluación de virulencia y transmisibilidad de cepas de <i>M. bovis</i> en modelo murino	64
Ensayo de Virulencia	65
Ensayo de Transmisibilidad	69
Determinación de citoquinas	70
Discusión	73
Conclusiones	90
Referencias bibliográficas	91
Anexos	109
Publicaciones	109
Figura 32	110

## Índice de figuras

Figura 1: Representación circular del genoma de <i>M. bovis</i>	17
Figura 2: Estructura del locus DR del genoma de <i>M. tuberculosis</i> H37RV y de <i>M. bovis</i> BCG.	18
Figura 3: Posición de los 41 MIRU loci en el cromosoma de <i>M. tuberculosis</i> H37Rv	19
Figura 4: Distribución por departamento de los 4 espoligotipos principales en las provincias de Buenos Aires, Córdoba y Santa Fe	20
Figura 5: Densidad del stock de ganado bovino en la Argentina	24
Figura 6: Tendencia decreciente de la Tuberculosis bovina detectada en frigoríficos fiscalizados por SENASA en la República Argentina durante los años 1971-2016	25
Figura 7: Flujograma de trabajo	33
Figura 8: Metodología de Spoligotyping	39
Figura 9: Experiencia de virulencia y transmisibilidad	43
Figura 10: Inoculación intratraqueal	45
Figura 11: Inspección macroscópicas de las muestras	49
Figura 12: Lesiones no LCT en pulmones comercializados	50
Figura 13: Cultivos bacteriológicos positivos	51
Figura 14: Aislamientos positivos por PCR-IS6110	51
Figura 15: PCR $\beta$ -actina	53
Figura 16: PCR-IS6110	53
Figura 17: PCR-Rv2807	54
Figura 18: Espoligotipos correspondientes a los 5 aislamientos de <i>M. bovis</i>	54



---

Figura 19: Resultados de las PCR realizadas	55
Figura 20: Amplificaciones representativas de algunos de los loci MIRU-VNTR en los aislamientos de <i>M. bovis</i> y de <i>M. bovis</i> -BCG	56
Figura 21: Patrones de restricción de PRA	57
Figura 22: Aislamientos de MNT	59
Figura 23: Amplificación por PCR de las secuencias de inserción IS 1245 e IS901	59
Figura 24: Alineamiento de las secuencias de <i>M. kansasii</i> ATCC 12478 y de <i>M. kansasii</i> 16-2700	62
Figura 25: Comparación del genoma de referencia <i>M. kansasii</i> ATCC 12478 y el genoma de <i>M. kansasii</i> 16-2700	63
Figura 26: Resultados de los productos amplificados por MAS-PCR	64
Figura 27: Signología clínica de los animales utilizados en el ensayo	65
Figura 28: Peso de los ratones inoculados y “contactos” en los distintos tiempos de eutanasia	66
Figura 29: Lesiones macroscópicas de los órganos de animales inoculados	67
Figura 30: Comparación entre animales inoculados y “contactos”	67
Figura 31: Comparación de los valores de las citoquinas IFN $\gamma$ , IL4 y TNF para los animales inoculados y los “contactos” para las 3 cepas evaluadas en los tiempos T30, T60 y T90	70
Figura 32 Aislamientos de <i>M. kansasii</i> disponibles en la base de datos de NCBI <i>genomes</i> .	110

## Índice de tablas

Tabla1: Origen y cantidad de las muestras colectadas	48
Tabla 2: Aislamientos obtenidos	52
Tabla 3: Patrones MIRU-VNTR de los aislamientos de <i>M. bovis</i>	55
Tabla 4: Identificación genotípica de los aislamientos de <i>M. bovis</i> obtenidos	56
Tabla 5: Identificación molecular mediante secuenciación de los genes 16S ARNr, <i>hsp65</i> y <i>rpoB</i>	58
Tabla 6: Datos comparativos entre el aislamiento <i>M. kansasii</i> 16-2700 y las cepas de referencia <i>Mycobacterium kansasii</i> ATCC 12478 y <i>Mycobacterium bovis</i> AF1222/97	61
Tabla 7: Valores de las Concentraciones Inhibitorias Mínimas de los aislamientos de <i>M. bovis</i>	63
Tabla 8: Animales infectados por grupo evaluados en los tiempos T30, T60 y T90	69

# ABREVIATURAS



## Abreviaturas

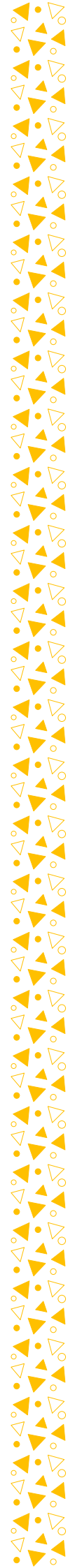
"	Pulgadas
%	Por ciento o porcentaje
<	Menor
≥	Mayor o igual
®	Marca registrada
°C	Grados centígrados
µg	Microgramo
µL	Microlitro
A	Adenina
AAVLD	Asociación Argentina de Veterinarios de Laboratorio de Diagnóstico
ACP	Proteína transportadora de acilos
ACT	Artemis Comparison Tool
ADC	Albumina Dextrosa y Catalasa
ADN	Acido desoxirribonucleico
ANLIS	Administración Nacional de Laboratorios e Institutos de Salud
ARN	Ácido Ribonucleico
ARNr	Ácido Ribonucleico ribosomal
BAAR	Bacilos ácido-alcohol resistentes
BCG	Bacilo Camette Guérin
BD™	Becton Dickinson - Trade mark
bp	Pares de base
C	Citosina
CABA	Ciudad Autónoma de Buenos Aires
CBA	Cytometric Bead Array
CD	Células dendríticas
CICUAE	Comite Institucional para el cuidado y uso de animales de experimentación
CICUAL	Comité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio
CICVyA	Centro de Investigaciones en Ciencias Veterinarias y Agronómicas
CIM	Concentración inhibitoria mínima
cm	Centímetro
cm <sup>2</sup>	Centímetro cuadrado
CMT	Complejo Mycobacterium tuberculosis
CN	Control negativo
CNIA	Centro Nacional de Investigaciones Agropecuarias
col.	Colaboradores
Corp.	Corporación
CP	Control positivo
CTAB	Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide (bromuro de hexadeciltrimetilamonio)

DI.GE.SE.GA.	Dirección General de Servicios Ganaderos
DNA	Deoxyribonucleic acid (Acido desoxirribunucleico)
dpi	Días post-inoculación
DR	Direct Repeat (Repetición Directa)
Dr.	Doctor
Dra.	Doctora
EMB	Etambutol
FCV	Facultad de Ciencias Veterinarias
Fo	Forward outer
g	Aceleración de la gravedad
G	Gauge (medida de calibre)
G	Guanina
GBA	Gran Buenos Aires
gen. nov.	Genera Nova (género nuevo)
HIV	<i>Human Immunodeficiency Virus</i> (Virus de la Inmunodeficiencia Humana)
hs	Horas
IB	Instituto de Biotecnología
IDR	Intradermoreacción
IL	Interleuquina
INER	Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias
INF-g	Interferón gamma
INH	Isoniacida
INTA	Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria
IP	Institutos de Patobiología
IS	Insertion Sequence (Secuencia de Inserción)
Kb	Kilobase
kDa	Kilodalton
LCT	Lesión compatible con tuberculosis
LEVO	Levofloxacin
LiPA	Line Probe Assay
LN	Linfonódulo
LT	Linfocitos T
MAC	Complejo Mycobacterium avium
MAS-PCR	multiplex allele-specific polymerase chain reaction
MDR	multidrug resistant (resistente a múltiples drogas)
mg	Miligramo
min	Minutos
MIRU	Mycobacterial Interspersed Repetitive Units (Unidades Repetitivas Esparcidas en Micobacterias)
mL	Mililitro
mm	Milimetro

MMC	Micro-método colorimétrico
MNT	micobacterias no tuberculosas
MOB	elementos móviles
Mpb	Millones de pares de base
N/A	No analizado
NAD(P)	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
NADH	Nicotinamida adenina dinucleótido reducida
NC	Nivel de confianza
NCBI	National Center for Biotechnology Information
nm	Nanómetro
Nº	Número
OADC	Oleico Albumina Dextrosa y Catalasa
OD	Optical density (Densidad óptica)
Pb	Pares de bases
PBS	Buffer fosfato salino
PCR	Polymerase Chain Reaction (Reacción en Cadena de la Polimerasa)
pg	Picogramo
PPD	Derivado proteínico purificado
PPDb	Derivado proteínico purificado bovina
PRA	PCR-Restriction Enzyme Analysis (Análisis por Enzimas de Restricción de productos de PCR)
PZA	Pirazinamida
qPCR	quantitative PCR (PCR en tiempo real o cuantitativa)
RAST	Rapid Annotation using Subsystem Technology
RD	Región de Diferencia
RDP	Ribosomal Database Project
RES	Resazurina
Res.	Resolución
RIF	Rifampicina
Ro	Reverse outer
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
rRNA	Ribosomal ribonucleic acid (Ácido ribonucleico ribosomal)
S.A.	Sociedad Anonima
S.A.G.	Servicio Agrícola y Ganadero
SENASA	Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria
SGC	Secuenciación de genoma completo
SIGSA	Sistema Integrado de Gestión de Sanidad Animal
SLAMTB	Sociedad Latinoamericana de Micobacterias
SM	Estreptomina
SNPs	Single Nucleotide Polymorphism (Polimorfismo en un Solo Nucleótido)
sp.	Especie
sp. nov.	species novae (especie nueva)

Spoligotyping	Spacer oligo typing (Tipeo con oligonucleótidos espaciadores)
SUB	Sustituciones de bases múltiples
Subsp.	Subespecie
Tx	Tiempo, donde x refiere al valor del tiempo
T	Timina
TB	Tuberculosis
TBB	Tuberculosis bovina
TNF- $\alpha$	Factor de necrosis tumoral alfa
UBA	Universidad de Buenos Aires
UFC	Unidades formadoras de colonias
UK	United Kingdom (Reino Unido)
UP	Unidades productivas
USA	United States of América (Estados Unidos de América)
UV	Ultra violeta
VNTRs	Variable Number Tandem Repeat (Repeticiones en Tándem de Número Variable)
w/	with (con)
x	una parte de solución concentrada, diluida en la cantidad de partes de solvente

# RESÚMENES





## Resumen

La tuberculosis bovina, causada por *Mycobacterium bovis* (*M. bovis*), es endémica en la Argentina. Su presencia en el ganado bovino representa un riesgo para la salud humana debido a su carácter zoonótico, pudiendo además afectar a diversos mamíferos. En el hombre, *M. bovis* causa enfermedad con presentación pulmonar o extrapulmonar siendo la clínica indistinguible de la producida por *Mycobacterium tuberculosis*. Los más expuestos son los niños que consumen leche o sus derivados sin pasteurizar, los adultos relacionados con la actividad laboral pecuaria y también los cazadores. Para evitar la llegada del agente al consumidor, una de las últimas barreras de protección es la inspección bromatológica en el frigorífico para poder detectar lesiones compatibles con tuberculosis y decomisar los órganos afectados y si está generalizado la res completa. Se realiza visualmente y por palpación, pero debido a la patogenia de la tuberculosis, sólo las lesiones crónicas pueden ser evidenciadas por este monitoreo. La micobacteria puede estar presente incluso en tejidos sin lesión aparente, siendo los principales órganos afectados los linfonódulos y los pulmones, pudiéndose encontrar en otros órganos parenquimatosos como el hígado. Esto puede conducir a escapes del sistema de vigilancia permitiendo que las micobacterias lleguen a los comercios y posteriormente al consumidor.

En este trabajo fueron recolectados 210 pulmones junto con los linfonódulos correspondientes y 6 hígados bovinos, provenientes de un frigorífico y de 6 carnicerías de la Ciudad Autónoma de Buenos Aires y de la provincia de Buenos Aires. Los pulmones recolectados en el frigorífico fueron inspeccionados *in situ* y se tomaron muestras del órgano para el trabajo en el laboratorio. Los pulmones e hígados que fueron comprados completos en carnicerías y fueron inspeccionados en el laboratorio. Se obtuvieron un total de 5 aislamientos de *M. bovis* en medio Stonebrink confirmados por PCR IS-6110 (aislamientos N° 134, 719, 179, 182 y 184) y además 12 aislamientos de micobacterias no tuberculosas confirmadas por la secuenciación de los genes *hsp65*, *rpoB*, 16S ARNr y secuenciación genómica de alto rendimiento para uno de ellos. Los aislamientos de *M. bovis* fueron caracterizados molecularmente por Spoligotyping y MIRU-VNTR. Se pudieron distinguir 3 patrones de Spoligotyping que se correspondieron con 3 patrones de MIRU-VNTR, 3 aislamientos compartieron ambos patrones y los otros 2 fueron únicos. Adicionalmente, se investigó en 3 de los aislamientos su capacidad de resistencia a drogas utilizadas en el tratamiento de la tuberculosis en humanos (rifampicina, isoniazida, etionamida, levofloxacina y estreptomina), encontrándose que el aislamiento 184 era resistente a isoniazida y el aislamiento 134 era multirresistente (presentando resistencia a los 4 antibióticos

probados y considerado “border” para levofloxacin). Se realizó la secuenciación completa del genoma de uno de los aislamientos identificado como *M. kansasii* empleando una plataforma Illumina mySeq. El genoma fue anotado y se describió sus características así como también se evaluó la presencia de *single nucleotide polymorphism* (SNPs) en genes de virulencia y genes relacionados a la resistencia a antibióticos y codificantes de antígenos empleados para el diagnóstico de tuberculosis. Se evaluó la virulencia y transmisibilidad de los aislamientos N° 134 y 182 junto con una cepa de referencia *M. bovis* AN5 (considerada de virulencia intermedia), en un modelo murino. Los animales fueron inoculados intratraquealmente, con  $1 \times 10^5$  UFC de cada una de las cepas a evaluar, y dichos animales se pusieron en contacto con ratones sin inocular en una relación 1:1. Se evaluó la virulencia en los animales inoculados, mientras que en los contactos sanos, se evaluó la transmisibilidad de las cepas. Se realizó la eutanasia de 5 animales infectados y 5 animales contactos sanos de cada grupo, en los tiempos 30, 60 y 90 días post-inoculación. Se cultivaron los pulmones y bazos de todos los animales infectados y los contactos sanos en los medios apropiados, evaluando su crecimiento semanalmente. Adicionalmente, los bazos fueron procesados para cuantificar las citoquinas IL-4, TNF  $\alpha$  e INF $\gamma$  por citometría de flujo mediante el kit comercial *Cytometric bead array*. El aislamiento N° 134 demostró ser virulento por producir sintomatología incompatible con la vida al día 16 posterior a la inoculación, produciendo la muerte de 9 animales, los 6 restantes fueron eutanasiados. El aislamiento N° 182 generó esplenomegalia en los ratones infectados, pero no se observó el desmejoramiento ni la muerte de los animales. Además, se pudo describir la transmisibilidad del aislamiento 182, mediante el aislamiento de la micobacteria a partir de bazo de uno de los animales “contacto”. A partir del presente trabajo se pudo detectar la presencia de micobacterias tanto zoonóticas como ambientales en vísceras comercializadas. La virulencia, transmisibilidad y la resistencia a antibióticos de cada una de ellas fue variable, requiriéndose de estudios futuros para una mejor comprensión del impacto de estas observaciones en la dinámica de la enfermedad tanto en el ámbito veterinario como en Salud pública.

Palabras clave: *Mycobacterium bovis*, *spoligootyping*, MIRU-VNTR, resistencia a antibióticos, PCR.

## Abstract

Bovine tuberculosis, a disease caused by *Mycobacterium bovis* (*M. bovis*), is endemic in Argentina. Its presence in cattle represents a risk to human health, due to its zoonotic nature and can also affect various mammals. In human beings, *M. bovis* causes disease with pulmonary or extrapulmonary presentation, being the clinical manifestation undistinguishable from that produced by *M. tuberculosis*. The most exposed are children who consume unpasteurized milk or its products, adults who works with livestock and also hunters. To avoid the arrival of the agent to the consumer, one of the main barriers of protection are the carcasses post-mortem inspection at the slaughterhouse, to detect and confiscate organs with lesions compatible with tuberculosis or even the hole animal. Inspection is performed visually and by palpation of the bovine organ, but due to the pathogenesis of the *Mycobacterium*, only the chronic lesions can be evidenced in this inspection. The *Mycobacterium* might be present even in tissues without apparent lesion, being the lymph nodes and the lungs, the most affected organs: Other parenchymal organs such as the liver could also be affected. This can lead to escapes of the surveillance system allowing the *Mycobacteria* to reach the stores and hence, arrive to the consumer.

In this study, 210 lungs along with the corresponding lymph nodes and 6 bovine livers were collected, in one slaughterhouse and 6 butchers' shops in the city of Buenos Aires and the great Buenos Aires area. The lungs collected in the slaughterhouse were inspected *in situ* and small portions of them were taken. Complete lungs and livers that were bought in butchers' shops and were then inspected in the laboratory.

A total of 5 isolates of *M. bovis* were obtained in Stonebrink medium and its identity confirmed by PCR IS-6110 (isolates number 134, 719, 179, 182 and 184). Additionally 12 non-tuberculous mycobacteria were isolated and confirmed by the sequencing of the *hsp65*, *rpoB* and 16S rRNA genes. The isolates of *M. bovis* were molecularly characterized by Spoligotyping and MIRU-VNTR. We could differentiate 3 Spoligotyping patterns that corresponded with the 3 patterns of MIRU-VNTR obtained. Three isolates shared both patterns and the other 2 were unique. Additionally, drug resistance to human treatment commonly used drugs (rifampicin, isoniazid, ethionamide, levofloxacin and streptomycin) was investigated in all *M. bovis* isolates, and it was found that isolate number 184 was resistant to isoniazid and isolate number 134 was multi-resistant (showing resistance to the 4 antibiotics tested and considered "border" for levofloxacin). One non-tuberculous mycobacteria isolates from which good quality DNA was obtained was completely sequenced (whole genome sequencing). The genome was annotated and its characteristics were investigated as well as the

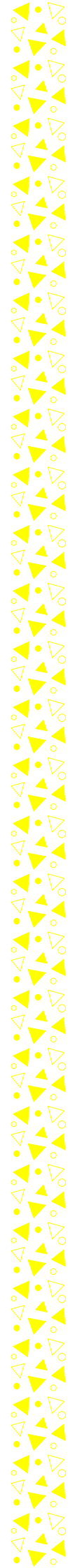
presence of single nucleotide polymorphism (SNPs) in virulence genes and genes related to resistance to antibiotics and antigens used for diagnosis.

The virulence and transmissibility of isolates number 134 and 182 were evaluated together with a reference strain *M. bovis*-AN5 (considered of intermediate virulence), in an experimental assay in a mouse model. A total of 99 BALB/c female mice aged 5 weeks, were separated in 3 groups of 33 animals each. In turn, each group was divided into 6 cages, the first cage with 3 animals and the remaining cages with 6 animals. All animals in cage number 1 of each group and 3 from each of the remaining cages, were intratracheally inoculated under sedation with isoflurane, with  $1 \times 10^5$  CFU of each of the strains to be evaluated, suspended in 100  $\mu$ L of PBS, keeping the relationship between inoculated animal and healthy contact 1:1. Virulence was evaluated in those animals that were inoculated, while in the healthy contacts that were living with the infected animals the transmissibility of the strains was investigated. Euthanasia of 5 infected animals and 5 healthy contact animals of each group were performed at times 30, 60 and 90 days post-inoculation. The lungs and spleens of all infected animals and healthy contacts were cultured. The cultures were grown at 37°C for up to 2 months, with weekly evaluation of their growth. Spleens were further processed to measure the cytokines IL-4, TNF $\alpha$  and INF $\gamma$  with the use of a commercial Cytometric bead array kit. Strain number 134 showed to be virulent because it produced symptoms incompatible with life on day 16 after inoculation, producing the death of 9 animals, the remaining 6 were euthanatized and processed. Strain number 182 generated spleen enlargement in the infected mice, but it did not generate the illness or death of any of them. The transmissibility of strain 182 could be evidenced, due to the observation of the growth of colonies from a spleen of a contact animal in the time of euthanasia 90 days after inoculation.

It was possible to detect the presence of both, zoonotic and environmental mycobacteria, in commercialized viscera. The virulence, transmissibility and drug-resistance of the *M. bovis* strains was variable, requiring future studies for a better understanding of the dynamics of the disease.

**Key words:** *Mycobacterium bovis*, spoligootyping, MIRU-VNTR, drug-resistance, PCR.

# INTRODUCCIÓN



## Introducción

### Generalidades

La tuberculosis bovina (TBB) es una enfermedad infectocontagiosa generalmente de curso crónico causada por *Mycobacterium bovis* (*M. bovis*). Su hospedador principal es el bovino, pero otras especies domésticas y silvestres también pueden ser afectadas por esta micobacteria. Por su carácter zoonótico, *M. bovis* afecta también al hombre.

La TBB genera grandes pérdidas económicas, ya que muchos órganos y medias reses son decomisados durante la inspección en playa de faena. Asimismo, a nivel productivo, provoca disminución de hasta un 6% en la fertilidad; disminución de la producción láctea de las vacas en ordeño en un 6,25% (Magnano *et al.*, 2016) pérdida del 15% en promedio del peso normal del animal, disminuyendo la producción de carne; asimismo, produce el deterioro que produce en la inmunidad y lo hace susceptible a otras enfermedades (SENASA, 2007).

La transmisión de *M. bovis* entre el ganado bovino es principalmente por vía respiratoria (80-90%), seguida de la digestiva por la ingesta de leche (10-20%), observada fundamentalmente en terneros que maman de vacas con mastitis tuberculosa (SENASA, 2007; Phillips *et al.*, 2003). La dosis infectiva por vía respiratoria, es significativamente menor respecto de la digestiva, en la que se requieren millones de bacilos para establecer la infección (Phillips *et al.*, 2003). Los sistemas de producción que favorecen el contacto entre el ganado, tales como el engorde en corral, conocido también por su denominación en inglés *feedlot*, y de producción lechera, generalmente tienen una prevalencia de la enfermedad más alta que aquellos en los que el ganado pastorea en grandes extensiones. Esto puede explicarse por el contacto estrecho y prolongado entre ganado infectado y susceptible (Perez *et al.*, 2002). La vía de ingreso de la micobacteria definirá el lugar de asiento de las principales lesiones. Cuando es la respiratoria, se ven principalmente afectados los pulmones, linfonódulos traqueobronquiales y mediastínicos. La micobacteria es fagocitada por los macrófagos alveolares, estableciéndose la infección, siendo en esta instancia en la que se forma el “complejo primario” (lesión inicial en el punto de entrada de la micobacteria y en el linfonódulo satélite). El mismo puede estabilizarse y quedar limitado en ese órgano, permaneciendo contenido sin generalizarse, o ser eliminado. Sin embargo, existe la posibilidad de diseminación a órganos vecinos por vía canalicular, vía linfática o hematogena. La diseminación de la micobacteria puede deberse a una generalización precoz o tardía, que llevará a la aparición de distintas lesiones granulomatosas en el bovino. El grado de diseminación y la velocidad en la

que ocurra dependerá del estado inmunológico del bovino, generalizándose más rápidamente en animales cuya inmunidad está más comprometida, dependiendo a su vez de la dosis infectiva y de la virulencia de la micobacteria. Las lesiones granulomatosas típicas inicialmente son microscópicas y solamente visibles por histopatología, llegando a ser macroscópicamente visibles en tiempos de evolución más avanzados (Cassidy *et al.*, 2006; Domingo *et al.*, 2014).

La enfermedad en un rodeo, en general, es clínicamente inaparente. Cuando se manifiesta, los bovinos pueden exhibir pérdida de peso (hasta el estado de consunción), disminución de la fertilidad y la producción, signos de órgano (signología asociada al órgano afectado), tos y disnea (Cassidy *et al.*, 2006; Domingo *et al.*, 2014).

### **Características de las micobacterias, taxonomía:**

Taxonómicamente las micobacterias se clasifican en el orden *Actinomycetales*, dentro de la familia *Mycobacteriaceae*, género *Mycobacterium*. Son bacilos cortos, aerobios, inmóviles, no formadores de esporas y no flagelados (de Kantor, 1988). El género *Mycobacterium* es uno de los más antiguamente definidos, y con el que se había designado a un grupo de microorganismos que crecían formando una película en medio líquido (Rastogi *et al.*, 2001). El esqueleto de la pared está formado por dos polímeros, un glicopéptido y un arabinogalactano, covalentemente unidos por puentes fosfodiéster (Holt *et al.*, 1994). Entre los lípidos se encuentran los ácidos micólicos, ácidos grasos de alto peso molecular, ramificados e hidroxilados, cuya producción las diferencia del resto de los microorganismos que integran el orden (Rastogi *et al.*, 2001). Una de las propiedades más distintivas de este género es la coloración de Ziehl-Nielsen, ya que una vez que los ácidos micólicos fijan al colorante (fucsina básica fenolada), resisten la decoloración con ácido-alcohol. Por esta característica se los denomina bacilos ácido-alcohol resistentes (BAAR) (Holt *et al.*, 1994). *M. bovis*, junto con *M. tuberculosis*, *M. bovis* BCG, *M. bovis* subsp. *caprae*, *M. africanum*, *M. microti*, *M. canetti*, *M. pinnipedii* sp. nov. *M. mungii* sp. nov., y *M. suricattae* forman un grupo particular denominado complejo *Mycobacterium tuberculosis* (CMT) (Alexander *et al.*, 2010). Estas especies, agentes causales de tuberculosis en animales y humanos, están estrechamente relacionadas a nivel de ADN, con un 99,9% de similitud a nivel nucleotídico e idénticas secuencias de ARNr 16S (Brosch *et al.*, 2002). Cada miembro del complejo está asociado a un hospedador primario principal, aunque la infección también puede producirse en hospedadores alternativos (Smith *et al.*, 2006). En el año 2018, a partir de los análisis filogenéticos comparativos de los genomas de 150 especies de micobacterias realizado por Gupta y col., (2018) se

concluyó que existen 5 grupos monofiléticos distintivos en este género. Estos nuevos grupos fueron designados como: “Tuberculosis-Simiae,” (este incluye a la mayoría de las especies de micobacterias de crecimiento lento de importancia clínica incluyendo a aquellas relacionadas con *M. tuberculosis*, *M. avium*, *M. gordonae*, *M. kansasii* y *M. simiae*) “Terraes,” renombrado como *Mycolicibacter* gen. Nov, “Triviale,” renombrado como *Mycolicibacillus* gen. Nov “Fortuitum-Vaccae,” renombrado como *Mycolicibacterium* gen. Nov y “Abscessus-Chelonae” renombrado como *Mycobacteroides* gen. Nov, (Gupta et al., 2018).

Asimismo, durante el año 2018, Oren y Garrity, propusieron un cambio de nomenclatura basado en un análisis filogenómico, que involucra a varios grupos de bacterias e incluye el cambio el género de *Mycobacterium* a *Mycolicibacterium* para algunas especies de MNT. Están contempladas en el cambio, *M. fortuitum*, *M. insubricum*, *M. phlei*, *M. porcinum*, *M. senegalense*, *M. septicum*, *M. smegmatis*, *M. vulneris* y *M. wolinskyi*, entre otras. Otras micobacterias también fueron reclasificadas y cambiaron de grupo taxonómico de *Mycobacterium* a *Mycobacteroides* (como fue el caso de *M. abscessus*), *Mycolicibacillus* y *Mycolicibacter*. Estas nuevas clasificaciones afectan principalmente a las MNT, manteniéndose la nomenclatura para las micobacterias del CMT. Esta nueva taxonomía fue comentada en la reciente reunión de la Sociedad Latinoamericana de Micobacterias (SLAMTB) que se llevó a cabo en noviembre de 2018 en Chile. En nuestro trabajo, a la espera del establecimiento de un consenso internacional, la taxonomía de las MNT se ha realizado considerando el criterio anterior.

### **Diagnóstico de la TBB**

El método primario oficial de diagnóstico en el ganado vivo, aceptado en el Plan Nacional de Control y Erradicación de la TBB, es la prueba intradérmica con tuberculina bovina, que emplea el derivado proteico purificado (PPD) obtenido de la cepa de referencia *M. bovis* AN5. La prueba consiste en la aplicación de la PPD en el pliegue ano-caudal del animal y posterior medición de la induración provocada como consecuencia de la respuesta inmune mediada por células a los antígenos inoculados. También está aceptada la aplicación de la PPD en la tabla del cuello como la doble comparativa con PPD aviar en casos particulares donde hay alta prevalencia de *M. avium* y se requiere incrementar la especificidad (SENASA, 2016). La respuesta inmune generada es una reacción de hipersensibilidad retardada mediada por células T, sensibilizadas por el contacto con el antígeno. Su sensibilidad y especificidad la posiciona como una buena prueba diagnóstica. Sin embargo debido a que, la tuberculina bovina comparte epítopes con otras micobacterias y algunas otras



bacterias relacionadas puede dar reacciones cruzadas (falsos positivos) en animales infectados por MNT (Palmer *et al.*, 2006).

Se han determinado distintos grados de sensibilidad y especificidad oscilando entre 70-75% y 96-99%, respectivamente (Wedlock *et al.*, 2002). En Argentina, de Kantor y col., (1984) estimaron una sensibilidad entre el 79,2 y 91,7% con una dosis de 0,1 y 0,25 respectivamente. Por otro lado, Francis y col. describieron una sensibilidad del 72% y una especificidad del 98,8%. De la Rúa Domenech y col. reportaron una sensibilidad entre 63,2% y 100% para la intradermorreacción aplicada en el pliegue ano caudal y una especificidad entre 75,5% y 99%. El empleo de la prueba cervical doble comparada, mejora la especificidad, describiéndose una sensibilidad entre 52% y 100% y una especificidad entre 78,8% y 100%.

Una alternativa es la medición de la respuesta celular *in vitro* mediante el dosaje de INF  $\gamma$ . Este diagnóstico está basado en la medición del INF $\gamma$  liberado por los linfocitos al ser estimulados con antígenos específicos a partir de una muestra de sangre entera heparinizada. Esta producción de INF $\gamma$  se revela mediante una prueba de ELISA sándwich. Los rangos medios de sensibilidad y especificidad son de 87,6% y 96,6% respectivamente. Existe un ensayo comercial cuyo costo es elevado para ser utilizado a nivel poblacional para el diagnóstico (Kit Bovigam - Prionics AG). Su empleo en combinación con la IDR dependerá de la zona, utilizándose en paralelo en regiones con rodeos persistentemente infectados, (para aumentar la sensibilidad diagnóstica y así controlar más rápidamente la enfermedad) y “en serie” en regiones libres o con muy baja prevalencia para detectar verdaderos reactores a la IDR (sospechados de ser reactores inespecíficos). Por otra parte, el empleo del diagnóstico serológico, que evalúa la respuesta humoral, permite la detección de la enfermedad en animales que se encuentran en estado de anergia y reaccionan negativamente a la IDR. Cabe mencionar que ninguna de estas pruebas está aceptada como prueba oficial en el marco del plan Nacional de control y erradicación de la TBB.

El diagnóstico *post-mortem* de la TBB se utiliza para la confirmación bacteriológica de la enfermedad, ya que el cultivo y subsiguiente identificación bioquímica es considerado “el estándar de oro” del diagnóstico de certeza de la enfermedad. Se aplica principalmente en animales reactores positivos a la PPD que fueron eliminados, o a partir de los decomisos y lesiones detectadas tanto durante la inspección bromatológica como en hallazgos patológicos. La inspección bromatológica en playa de faena se fundamenta principalmente en la inspección visual y la palpación de determinados órganos según el siguiente protocolo: pulmón (visualización y palpación y corte foliado de los linfonódulos bronquiales y mediastínicos), hígado (visualización y palpación, incisión del parénquima e incisión foliada de los linfonódulos retro-hepáticos

y portales), además de la revisión de los linfonódulos de inspección obligatoria (3 craneales: preescapular, prepectoral, preesternal; y 3 distales: precrural o prefemoral, isquiático, inguinal superficial o retromamario en caso de ser hembras, e ilíacos), que se realiza por cortes foliados. Cuando se detectan LCT en un único órgano, éste es decomisado. Cuando se encuentran LCT en 2 o más órganos o en pleura, se interpreta que hubo una diseminación de la micobacteria por vía hematogena, realizándose un decomiso completo del animal (vísceras y carne) ([http://www.senasa.gob.ar/sites/default/files/ARBOL\\_SENASA/INFORMACION/NORMATIVA/4238/capitulo\\_xi.pdf](http://www.senasa.gob.ar/sites/default/files/ARBOL_SENASA/INFORMACION/NORMATIVA/4238/capitulo_xi.pdf)).

La sensibilidad del cultivo se ve afectada por diferentes causas, siendo los puntos críticos la toma de muestra, su transporte, la conservación, el tiempo que transcurre hasta que es procesada y principalmente el proceso de descontaminación de la flora acompañante. *M. bovis* crece preferencialmente en el medio Stonebrink, un medio selectivo a base de huevo que tiene como fuente de carbono piruvato de sodio y contiene verde de malaquita como inhibidor de desarrollo de la flora microbiana acompañante, sobre todo de bacterias gram positivas. Se cultiva a 37°C durante 8 semanas con inspección semanal (Manual de Micobacterias, Asociación Argentina de Veterinarios de Laboratorio de Diagnóstico, 2005).

### **Diagnóstico molecular:**

Como consecuencia del desarrollo lento de las micobacterias en el cultivo *in vitro* (4-8 semanas), la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, siglas del inglés *Polymerase Chain Reaction*) es una alternativa rápida, sensible y específica para el diagnóstico temprano de la TB. La PCR puede ser aplicada a partir de distintas muestras clínicas como la leche (Bernardelli *et al.*, 2005; Zumárraga *et al.*, 2012) y órganos con presencia o ausencia de lesiones (Araújo *et al.*, 2014; Zumárraga *et al.*, 2001). La identidad de las colonias de bacterias desarrolladas en medios de cultivo también puede ser confirmada por PCR. Entre las secuencias blanco más utilizadas para la identificación de micobacterias del CMT se encuentran las secuencias de inserción IS6110 (Hermans *et al.*, 1990), IS1081 (Collins *et al.*, 1991), y Rv2807 (Araújo *et al.*, 2014).

Cabe mencionar que el diagnóstico molecular ha sido recientemente incorporado al Plan de Control y Erradicación de la TBB como herramienta complementaria al diagnóstico. De este modo, los servicios de laboratorios de diagnóstico deben poseer la capacidad de realizar diagnóstico histopatológico, bacteriológico y eventualmente de biología molecular cuando se requiera la confirmación del resultado, especialmente de LCT en muestras de material tomado en necropsias o en el frigorífico, ya que dichas

lesiones pueden deberse tanto a *M. bovis* como a otras micobacterias, y provenir de linfonódulos de un animal reaccionante o de muestras tomadas para monitoreo de zonas en control (SENASA, Res. 128/12).

Como resultado del trabajo de nuestro laboratorio junto al ministerio de la Producción de la provincia de Santa Fe se ha optimizado la prueba de PCR en leche de tanque de tambo para la detección de rodeos infectados con *M. bovis* (Zumárraga *et al.*, 2012). Como consecuencia, en el año 2012, la provincia de Santa Fe, incorporó a la PCR-IS6110 en leche de tanque de tambo como prueba oficial de vigilancia epidemiológica (Res. 949/12). Esto remarca el valor de las pruebas moleculares en el monitoreo de las infecciones.

La PCR en tiempo real o cuantitativa (qPCR, del inglés *quantitative* PCR) es una variante de la PCR que permite visualizar el curso de la reacción a medida que se van formando los productos de amplificación. Como la formación de éstos es proporcional a la concentración del templado en la muestra, es posible su cuantificación, representando una de las principales características distintivas respecto de la PCR convencional o de tiempo final. La detección de los productos de amplificación se realiza a partir de la emisión de fluorescencia, no requiriéndose la separación de los productos de PCR mediante electroforesis horizontal, representando una ventaja adicional ya que se evita la apertura de los tubos, reduciendo el riesgo de contaminaciones. Por otra parte, es posible incrementar la especificidad de la reacción mediante la utilización de sondas, siendo una de las más usadas las del tipo hidrolizable como las Taq Man. Como ejemplo del uso de estas sondas para mejorar el diagnóstico de la TBB podemos citar el trabajo de Araùjo y col. (2014), donde utilizaron una PCR convencional seguida de una qPCR para mejorar la sensibilidad de la detección de micobacterias del CMT a partir de muestras de tejido de bovinos y bubalinos (Araùjo *et al.*, 2014).

### **Tratamiento de la tuberculosis**

En animales domésticos, de producción y de compañía, el tratamiento con antibióticos no es recomendado, puesto que es muy difícil que el propietario o tenedor lo cumpla adecuadamente durante el tiempo que es prescripto por el veterinario actuante, ya sea por falta de docilidad del animal o falta de compromiso y responsabilidad del que administra la medicación. Los animales de producción deben ser enviados a faena y se debe sugerir la eutanasia a los animales de compañía afectados. La ley N° 15.465 (notificaciones médicas obligatorias) establece la obligatoriedad de notificar los casos de tuberculosis en animales de compañía a las autoridades sanitarias por parte del

veterinario o del laboratorio donde se realizó el diagnóstico. Según la comisión científica de Micobacterias de la Asociación Argentina de Veterinarios de Laboratorio de Diagnóstico, se debe evitar el tratamiento en mascotas y sugerir la eutanasia. La eutanasia en mascotas no es obligatoria y el dueño puede optar por realizar el tratamiento recomendado por el veterinario quien deberá presentarle la opción del tratamiento (el cual se puede ser realizado en el Instituto Pasteur o por su veterinario), luego de la firma de un consentimiento informado puesto que es una enfermedad zoonótica (Martinez Vivot *et al.*, 2006).

Sin embargo, al utilizar las mismas drogas para el tratamiento en humanos, se corre el riesgo que su uso incorrecto condicione su efectividad de éstas en humanos, llevando a la aparición de cepas resistentes.

En humanos, se utiliza la combinación de 2 o más drogas y el tratamiento se realiza por al menos 6 meses, con controles periódicos de la evolución del paciente. En las personas, el cumplimiento del tratamiento completo suele ser bajo, puesto que un porcentaje de los pacientes abandonan el tratamiento, permitiendo la proliferación de los clones resistentes a ciertas drogas utilizadas. Esta es una de las principales causas de generación de cepas multiresistentes (Ministerio de Salud de la Nación, 2014).

La resistencia a drogas antituberculosas en micobacterias se da generalmente por presión selectiva de antibióticos. La micobacteria sufre continuamente mutaciones al azar en subpoblaciones de bacterias con una alta tasa. Por esta causa, cuando un tratamiento antibiótico no se realiza correctamente (tiempo prolongado y combinación de drogas adecuada), se seleccionan subpoblaciones resistentes. En consecuencia, la monoterapia debe evitarse para prevenir la selección de mutantes, siendo la probabilidad de que un bacilo presente resistencia a una droga, el producto de las probabilidades de resistencia a cada una de ellas. La Organización Mundial de la Salud recomienda como componente central de la estructura del plan de control de la tuberculosis en humanos, el tratamiento acortado estrictamente supervisado. Su esquema consiste en la administración simultánea durante una fase intensiva, de tres tuberculostáticos, rifampicina (RIF), isoniacida (INH) y pirazinamida (PZA), seguido de otra fase de sostén con RIF e INH, hasta completar seis meses bajo estricta supervisión médica (OMS, 2018).

Conocer la micobacteria que está produciendo la enfermedad es de fundamental importancia al instaurar el tratamiento en humanos. Se debe considerar que *M. bovis* es naturalmente resistente PZA (Konno *et al.*, 1967), pero no es habitual detectar resistencia a otras drogas.

Entre el 96 y 100 % de los casos de resistencia a RIF, se produce por mutaciones en el gen *rpoB*, que codifica la subunidad  $\beta$  de la ARN polimerasa ADN dependiente, impidiendo la formación del ARN mensajero por inhibición de la polimerasa (Tan *et al.*, 2012).

La principal resistencia a INH surge como resultado de la pérdida de la actividad catalasa codificada por el gen *katG*, impidiendo la conversión a su metabolito activo, pero también, por mutaciones en genes que intervienen en la síntesis de ácidos micólicos de la pared celular como *inhA* (Zhang *et al.*, 1992).

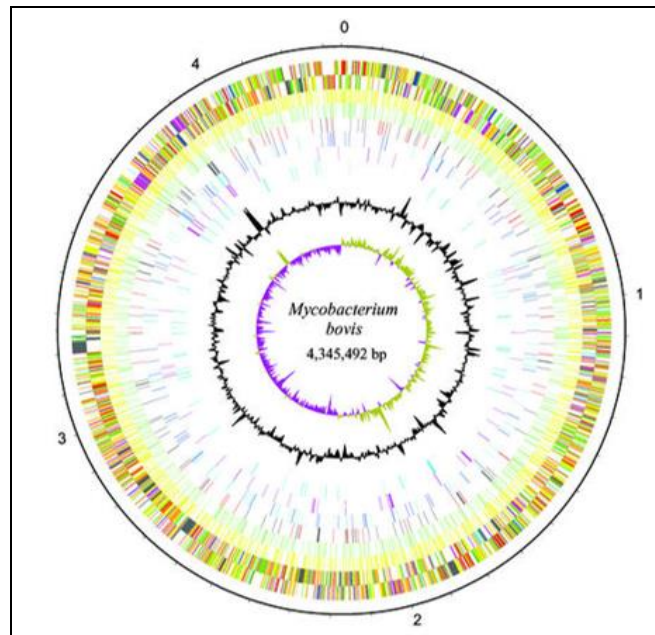
La resistencia a EMB no ha sido completamente estudiada a nivel genético, sin embargo ha podido relacionarse con mutaciones en el gen *embB*, más frecuentemente en los codones 306, 319, 354 y 406 (Plinke *et al.*, 2006).

A pesar de ser éstas las más comunes, no son las únicas que pueden encontrarse presentes y pueden no ser consideradas en los kits comerciales basados en detección molecular. La resistencia conjunta a RIF e INH define a una cepa como MDR (Imperiale *et al.*, 2011).

### **Métodos Moleculares y tipificación molecular:**

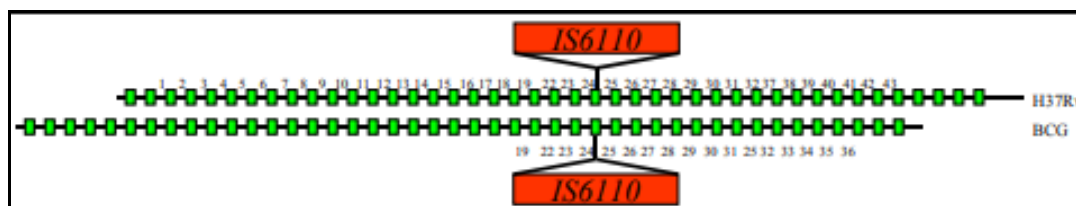
En año 2003, Garnier y col., secuenciaron y describieron el genoma completo de un aislamiento de *M. bovis*, (*M. bovis* AF2122/97) (Figura 1), obtenido en Gran Bretaña en el año 1997 a partir de un bovino que presentaba lesiones caseosas tanto en pulmón como en linfonódulos bronco-mediastínicos. La cepa fue caracterizada como virulenta (Garnier *et al.*, 2003). El tamaño del genoma de esta cepa es de 4.345.492 pares de bases (pb), dispuestos en un único cromosoma circular, con un contenido de G-C del 65,3%. Contiene además 3.952 genes que codifican proteínas, incluido un profago y 42 secuencias de inserción (Garnier *et al.*, 2003). El genoma de *M. bovis* fue comparado con el de la cepa *M. tuberculosis* H37Rv y *M. tuberculosis* CDC1551. *M. bovis* y *M. tuberculosis* presentan un 99,5% de identidad, habiendo deleciones de aproximadamente 12,7 Kb en el genoma de *M. bovis* (Garnier *et al.*, 2003; Zumárraga *et al.*, 1999 b).

Estas características diferenciales entre *M. tuberculosis* y *M. bovis* han permitido el desarrollo de métodos y estrategias para su identificación. Así se ha descrito una *multiplex*-PCR basada en una deleción de 12,7Kb en *M. bovis* en la región de diferencia RD7 (Zumárraga *et al.*, 1999 b; Etchechoury *et al.*, 2010). Esto es de particular utilidad en las regiones que tienen mayor frecuencia de transmisión zoonótica.



**Figura 1: Representación circular del genoma de *M. bovis*.** Gráfico tomado del paper de Garnier *et al.*, 2003.

La epidemiología molecular de la TBB ha evolucionado significativamente con la introducción de las técnicas basadas en PCR. Esto se debe a una reducción del tiempo para obtener resultados, de no requerir grandes cantidades de ADN para su realización y en algunos casos, poder aplicarse directamente sobre material clínico sin aislamiento previo. Entre las más difundidas se encuentra la técnica de hibridación reversa de Spoligotyping y las repeticiones en tándem de número variable (VNTR del inglés *Variable Number Tandem Repeat*). La primera se basa en la detección del polimorfismo de la región DR, específica del genoma de las micobacterias que conforman el CMT (Kamerbeek *et al.*, 1997). Esta región está constituida por secuencias repetitivas directas, múltiples y conservadas, de 36 pb, entre las que se hallan intercaladas secuencias polimórficas (espaciadores), que poseen una longitud que oscila entre 35 y 41 pb. La presencia o ausencia de “espaciadores” de secuencia conocida, definen patrones de hibridación o “espoligotipos” permitiendo la diferenciación interespecie e intraespecie de las micobacterias que integran el CMT (Kamerbeek *et al.*, 1997). La naturaleza del polimorfismo contempla principalmente deleciones, causadas por recombinaciones homólogas entre DR adyacentes o distantes, y duplicaciones durante la replicación del ADN (Figura 2).

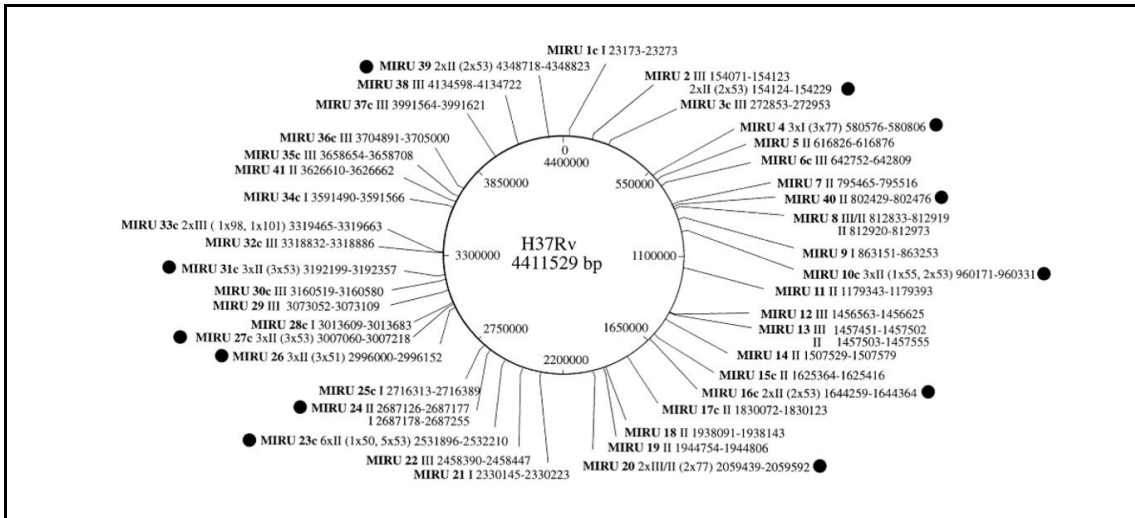


**Figura 2: Estructura del locus DR del genoma de *M. tuberculosis* H37RV y de *M. bovis* BCG.** Los rectángulos verdes representan los *Direct Repeat* (DR) de 36 pb (Manual del Kit de Spoligotyping, Isogen).

Existen herramientas *in silico* que permiten obtener un espoligotipo a partir de lecturas de la secuenciación de genomas completos. Existen distintos *softwares* disponibles, entre éstos el SpoTyping (Xia *et al.*, 2016) que además de generar el espoligotipo, lo compara con la base de datos pública curada de Spoligotyping y MIRU-VNTRs de SITVIT ([http://www.pasteur-guadeloupe.fr:8081/SITVIT\\_ONLINE/](http://www.pasteur-guadeloupe.fr:8081/SITVIT_ONLINE/)) y el SpolPred ([www.pathogenseq.org/spolpred](http://www.pathogenseq.org/spolpred)) que predice el espoligotipo de las cepas a partir de lecturas obtenidas de la secuenciación del genoma completo (Coll *et al.*, 2012; Lasserre *et al.*, 2018). Estas herramientas son de gran utilidad para realizar vigilancia epidemiológica y genotipificación de aislamientos de *M. tuberculosis* y *M. bovis* (Xia *et al.*, 2016; Lasserre *et al.*, 2018).

Los VNTRs constituyen fragmentos de ADN repetitivos y dispuestos en tándem en distintas regiones del genoma. El polimorfismo se debe a la variabilidad del número de unidades repetitivas en cada locus, siendo los eventos recombinatorios del ADN una de las causas de su variabilidad (Supply *et al.*, 2000; Homolka *et al.*, 2008).

Entre las distintas secuencias de este tipo se pueden mencionar a las “Unidades Repetitivas Intercaladas en Micobacterias” (MIRU) (Supply *et al.*, 2000). Estas estructuras están compuestas por secuencias dispuestas en 41 lugares a lo largo del cromosoma de *M. tuberculosis* H37RV. Doce de estas presentan polimorfismos en el número de copias que permite diferenciar distintos aislamientos (Figura 3).



**Figura 3: Posición de los 41 MIRU loci en el cromosoma de *M. tuberculosis* H37Rv.** Gráfico tomado del paper de Supply *et al.*, 2000.

La correcta interpretación de un estudio de tipificación molecular depende de la disponibilidad de la información epidemiológica clásica y del poder discriminatorio alcanzado con cada una de las técnicas aplicadas. El Spoligotyping es la mejor opción para estudios a gran escala de distribución de cepas de *M. bovis*, mientras que para establecer relaciones cercanas en el tiempo se requiere de marcadores moleculares más discriminativos como los VNTRs.

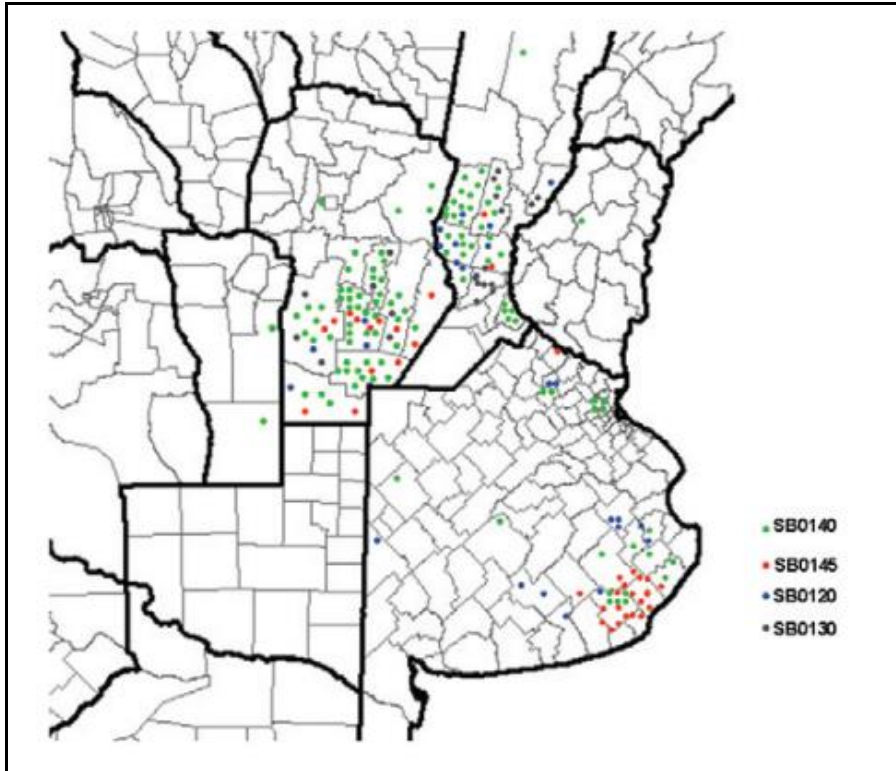
Los estudios de epidemiología molecular en Argentina contribuyeron activamente con la mejor comprensión de la distribución de cepas de *M. bovis*, tanto en la población de bovinos como en la de otros hospedadores susceptibles (Zumárraga *et al.*, 1999 a; 2013). En la actualidad, nuestro laboratorio cuenta con los espiligotipos de 2100 aislamientos tipificados de distintos hospedadores de Argentina, Brasil, Uruguay, Paraguay y México (Shimizu *et al.*, 2014; Zumárraga *et al.*, 1999 a; Zumárraga *et al.*, 2009; Zumárraga *et al.*, 2013; Etchechoury *et al.*, 2010; Barandiaran *et al.*, 2011; Cobos-Marin *et al.*, 2005; Zanini *et al.*, 2005; Colmegna *et al.*, 2004; Rodríguez *et al.*, 2004). Uno de los resultados más relevantes fue la detección de un mismo espiligotipo (SB0140) que agrupó al 46% de los aislamientos de *M. bovis* de bovinos y otros hospedadores de Argentina (Zumárraga *et al.*, 1999 a). Este genotipo es predominante en Reino Unido y en los países que fueron importadores de razas británicas a principios del siglo pasado como Irlanda, Nueva Zelanda y Australia (Cataldi *et al.*, 2002). Asimismo se realizó un estudio comparativo con los espiligotipos de *M. bovis* de Argentina, Brasil, Chile, Venezuela y México, en el que se visualizó su distribución y frecuencia en cada país (Zumárraga *et al.*, 2013).

A nivel regional, en aislamientos de bovinos provenientes de las provincias de Buenos Aires, Santa Fe y Córdoba, se determinó que el espiligotipo predominante en todas



las provincias fue el SB0140, seguido por el SB0130 y finalmente por el SB0145 (Figura 4).

A su vez, el espoligotipo predominante se subdividió por MIRU VNTR en 26 patrones diferentes. En este contexto se detectó un genotipo que agrupó al 47% de los aislamientos tipificados (Shimizu *et al.*, 2014).



**Figura 4: Distribución por departamento de los 4 espoligotipos principales en las provincias de Buenos Aires, Córdoba y Santa Fe.** Cada punto representa 1 caso, los colores representan los espoligotipos presentes (Shimizu *et al.*, 2014).

Sin embargo, restan algunos aspectos por dilucidar como la transmisión entre distintos hospedadores y la virulencia relativa de los distintos genotipos que expliquen la distribución de los mismos en nuestro país (Garbaccio *et al.*, 2014). Aguilar León y col. (2009) demostraron que cepas con igual espoligotipo se comportaban diferente con respecto a su virulencia en un modelo murino. Una cepa aislada de jabalí *M. bovis* 303 fue de alta virulencia mientras que otra aislada de bovino *M. bovis* 534 fue de baja virulencia, considerando la sobrevivencia de los animales, el número de micobacterias recuperadas de sus órganos y la inmunopatología (Zumárraga, 2007; Aguilar León *et al.*, 2009). Ambas cepas tenían el mismo el espoligotipo SB0140 aunque diferente patrón de MIRU (Zumárraga, 2007; Aguilar León *et al.*, 2009).

Las MNT como ya se mencionó, pueden provocar lesiones de características similares a las ocasionadas por las especies incluidas en el CMT. Por esta razón, es necesaria su correcta identificación, actividad que es muy compleja si no se utilizan métodos

moleculares. Entre éstos se encuentra el “Análisis por Enzimas de Restricción de productos de PCR” (PRA) descrito por Telenti y col., (1993). Esta técnica ha sido ampliamente utilizada ya que permite diferenciar en gran medida las especies del género *Mycobacterium* (Telenti *et al.*, 1993). La técnica de PRA, consiste en la amplificación por PCR del gen *hsp65*, que codifica para la proteína de estrés térmico de 65kDa, seguido de una digestión con dos enzimas de restricción. Luego de la separación de los fragmentos de restricción por electroforesis en gel de agarosa, se obtienen patrones característicos de especie, las que son identificadas mediante el uso de un algoritmo basado en los tamaños de los distintos fragmentos, incluidos en una base de datos *PRASite* (<http://app.chuv.ch/prasite/index.html>).

Asimismo, la secuenciación de fragmentos de genes conservados como 16S ARNr, *rpoB*, *hsp65* y *sodA*; que codifican los genes de la porción 16S del ribosoma, la subunidad  $\beta$  de la ADN polimerasa; la proteína de estrés térmico de 65kDa y la proteína superóxido dismutasa, respectivamente (Kirshner & Böttger, 1998; Monteserin *et al.*, 2016), resulta una opción más robusta que se está constituyendo en el procedimiento estándar y versátil para identificar fehacientemente a la micobacteria aislada. La variabilidad de las secuencias entre especies y su estabilidad dentro de una misma especie es lo que permite su identificación. Cabe mencionar que gracias al avance tecnológico, la secuenciación de genomas completos ha irrumpido en la especialidad como herramienta para la identificación y tipificación fehaciente de bacterias (Wang *et al.*, 2015). Sin embargo, en países como el nuestro, el costo es todavía muy elevado.

### **Micobacteriosis y micobacterias no tuberculosas**

Las micobacterias no tuberculosas (MNT) se encuentran ampliamente distribuidas en el ambiente, hallándose en el agua y la tierra, pero también pueden encontrarse como endosimbiontes en protozoarios, invertebrados y amebas (Ovrutsky *et al.*, 2013). Existen más de 180 especies identificadas como ambientales o saprófitas, distribuidas en 5 complejos que serán descritos con mayor detalle en los próximos párrafos (Gupta *et al.*, 2018). En general, no producen enfermedad en individuos sanos o inmunocompetentes, considerándose patógenos oportunistas. Debido a su ubicuidad, los animales se encuentran siempre en contacto con las MNT, pudiendo enfermar cuando su estado de salud se ve comprometido. Las micobacteriosis son aquellas enfermedades producidas por cualquiera de estas micobacterias, las cuales pueden afectar el diagnóstico por intradermorreacción debido a reacciones cruzadas antigénicas inespecíficas (Cooney *et al.*, 1997).

La infección de estas MNT en los bovinos es principalmente por vía digestiva, encontrándose mayormente la presencia de bacilos en linfonódulos mesentéricos (Kankya *et al.*, 2011). Los animales domésticos también pueden infectarse con MNT, como ha sido documentado en perros y gatos de nuestro país (Barandiaran *et al.*, 2017).

El diagnóstico de la infección y la identificación de las MNT es laboriosa, demanda tiempo y muchas veces los resultados no son concluyentes. El aislamiento realizado por cultivo en medio Löwenstein Jensen, requiere desde una semana para las MNT de crecimiento rápido, hasta 8 semanas para las de crecimiento lento y en el caso de *Mycobacterium leprae*, ésta no puede ser aislada. A este tiempo se suma el que lleva la identificación por pruebas bioquímicas (Manual de Micobacterias, Asociación Argentina de Veterinarios de Laboratorio de Diagnóstico, 2005). Por otro lado, las técnicas moleculares basadas en secuenciación de fragmentos conservados constituyen una herramienta rápida, confiable y cada vez más utilizada.

Las principales especies de micobacterias detectadas en animales son las del MAC, pudiendo o no generar lesiones, principalmente en linfonódulos (Lucas & Gayot, 1967; Dvorska *et al.*, 2004). Particularmente, *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* produce grandes pérdidas económicas para los productores de ganado bovino, al generar una enfermedad crónica con alta prevalencia en los rodeos (Biet & Boschirolli, 2014; Morsella & Paolicchi, 2008). Asimismo, por su capacidad de resistir a las condiciones convencionales de pasteurización, fue aislada de leche pasteurizada comercializada en Argentina (Paolicchi *et al.*, 2012). Otro agente del mismo complejo es *M. avium* subsp. *hominissuis* y *M. avium* subsp. *avium* que se encuentran habitualmente en el ambiente y se ha reportado en animales como cerdos y aves, respectivamente (Matlova *et al.*, 2005; Mijs *et al.*, 2002; Barandiaran *et al.*, 2011). A su vez, hay reportes de reacciones inespecíficas a la intradermoreacción en bovinos infectados tanto con estas especies como con otras MNT (Biet & Boschirolli, 2014; Oriani *et al.*, 2011).

Asimismo, MNT del complejo *Mycobacterium terrae*, como *Mycobacterium nonchromogenicum* y *Mycobacterium terrae*, son aisladas de suelo y agua. *Mycobacterium nonchromogenicum* se ha aislado de bovinos que habían reaccionado tanto positiva como negativamente a la intradermoreacción y usualmente no genera lesiones (Biet & Boschirolli, 2014). Esta especie es una de las principales MNT aisladas en Irlanda y en Francia (Hughes *et al.*, 2005; Guerin-Faubleee *et al.*, 2013).

*Mycobacterium kansasii* es una micobacteria de crecimiento lento que también se encuentra en tierra y agua. A diferencia de otras MNT, esta especie conserva los genes que codifican para los antígenos ESAT-6 y CFP-10, una característica de las

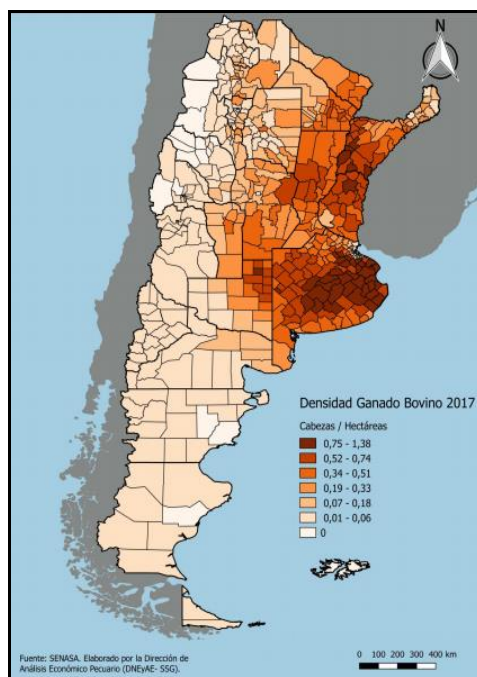
micobacterias del CMT. Como consecuencia, los animales infectados con *M. kansasii* son potenciales reactivos a las pruebas de tuberculización y otras pruebas inmunológicas. Adicionalmente, se ha podido determinar que *M. kansasii* está muy cercanamente relacionado a *M. tuberculosis* mediante análisis filogenéticos (Wang *et al.*, 2015). En bovinos, ha sido detectada en LCT en los linfonódulos del tracto respiratorio (Waters *et al.*, 2006; Waters *et al.*, 2010) y también se obtuvieron aislamientos a partir de tejidos de animales que habían reaccionado positivamente a la intradermorreacción.

En un estudio realizado por Traversa y col., se estudiaron 28 aislamientos de MNT obtenidos de bovinos, 1 de cabra y 5 animales silvestres, provenientes de 7 provincias de nuestro país. Las especies descritas fueron: *M. smegmatis* (9); *M. shimoidei* (4); *M. phlei* y *M. avium/intracellulare* (3); *M. chelonae*, *M. chitae*, *M. flavescens*, *M. nonchromogenicum*, *M. szulgai* y *M. thermoresistibile* (2) y *M. malmoense*, *M. gastri* y *M. terrae* (1) (Traversa *et al.*, 2011).

Recientemente, colaboramos en un trabajo con la Facultad de Ciencias Veterinarias de Universidad Nacional de La Pampa, en el cual se describió la presencia de MNT en agua de bebida, fuentes públicas y humedales de la provincia de La Pampa (Tortone *et al.*, 2018). La identificación de las MNT se realizó mediante secuenciación de los genes *hsp65* y 16S ARNr, así como también mediante la caracterización fenotípica. Entre las MNT recuperadas, se pudieron detectar especies que han sido relacionadas a casos de micobacteriosis en Argentina, como son *M. gordonae*, *M. intracellulare*, *M. fortuitum*, *M. vaccae*, *M. lentiflavum* y *M. nonchromogenicum* (Tortone *et al.*, 2018).

### **Situación de la tuberculosis bovina en Argentina**

En nuestro país la TBB es endémica, siendo la provincia de Tierra del Fuego la única oficialmente libre de la enfermedad (SENASA, Res. N°100/2011). Las regiones mayormente afectadas son aquellas que constituyen la cuenca lechera del país, comprendiendo las provincias de Buenos Aires, Córdoba, Entre Ríos, La Pampa y Santa Fe. En la cuenca lechera se concentra el stock de ganado bovino del país (Figura 5). El stock bovino Nacional, según datos oficiales de SENASA del año 2018, es de 54.816.050 de cabezas.



**Figura 5: Densidad del stock de ganado bovino en la Argentina.** Datos oficiales del SENASA del año 2017 (Ministerio de Agroindustria, Presidencia de la Nación).

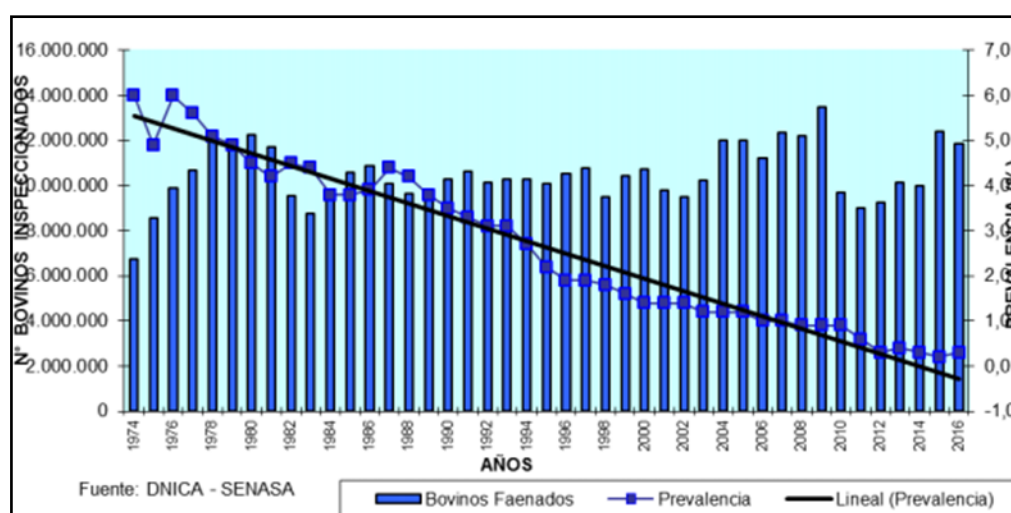
El Plan de Control y erradicación de Tuberculosis Bovina entró en vigencia en el año 1998 (Res. SENASA N° 115/99). En el año 2012, se aprobó la resolución N° 128 (Res. SENASA N° 128/12), que establece la incorporación obligatoria de la totalidad de los establecimientos y cabañas lecheras de las especies bovina, caprina y ovina, como así también a las cabañas de bovinos y caprinos de carne del país, para su inscripción e inicio de actividades de saneamiento hasta lograr la certificación oficial de “libres de TBB”. Se considera que un rodeo está “libre de TBB”, cuando los animales han reaccionado negativamente a dos pruebas intradérmicas consecutivas, con un intervalo no menor de 60 a 90 días.

Desde que se implementó la Res. 128/12 hasta diciembre de 2016, se logró que 10.063 unidades productivas (UP) bovinas fueran certificadas como “establecimientos libres de TBB”. Esto incluye 5.897 rodeos de bovinos de leche, 3.575 rodeos de carne, 42 centros de inseminación y transferencia y 549 cabañas bovinas de carne y leche (SENASA, 2016). Las acciones del plan lograron una disminución de la prevalencia de la enfermedad desde 6,7% en el año 1970 hasta 0,3% en 2016.

La inspección bromatológica de los animales faenados en frigoríficos y mataderos con inspección federal, provincial y municipal, establece una de las últimas barreras de protección para el consumidor, preservando la calidad higiénico-sanitaria del producto final. Según la reglamentación bromatológica nacional (decreto N° 4238/68), los decomisos pueden ser totales o parciales, según la localización y características de las lesiones (SENASA, 2018). En Argentina, la inspección bromatológica tiene una

sensibilidad y especificidad del 76,4% y 86,1% respectivamente, en relación a la confirmación del diagnóstico de laboratorio (SENASA, 2018). En un estudio, Latini y col., (1997) confirmaron la presencia de *M. bovis* en el 89% de las muestras con lesiones compatibles con tuberculosis (LCT). Asimismo, con la inspección de 6 pares de linfonódulos, además de los pulmonares y los mesentéricos, se logra el 95% de identificación de los animales con lesiones (Corner *et al.*, 1994). En 1987, de Kantor y col., obtuvieron cultivos de *M. bovis* en el 2,8% de animales que no fueron confiscados por tuberculosis, lo cual confirma la existencia de escapes.

Además, la vigilancia epidemiológica, constituye otro método para estimar la prevalencia de la enfermedad. En el año 2011, en el cual se formuló el proyecto que dio origen a esta tesis, se estimaba una prevalencia de TBB en Argentina de 0,6%. Luego en 2015, la prevalencia disminuyó a 0,2% mientras que en 2016, alcanzó el 0,3%, constituyendo el último dato oficial disponible (SENASA, 2016). Estos datos son obtenidos en base a la tasa de decomisos completos registrados en frigoríficos y mataderos con inspección federal, provincial y municipal (Figura 6).



**Figura 6:** Tendencia decreciente de la Tuberculosis bovina detectada en frigoríficos fiscalizados por SENASA en la República Argentina durante los años 1971-2016. Datos oficiales de SENASA, 2016.

### **Tuberculosis zoonótica en Argentina**

El número de casos de enfermedad humana por *M. bovis* que se registran en Argentina depende de la región geográfica y del período de tiempo considerado. La mayoría de los casos, están asociados a grupos de riesgo vinculados con la actividad pecuaria o trabajadores de frigoríficos. Sin embargo, de los 56 casos reportados entre los años 2017 y 2018, 19 (34%) fueron de la Ciudad Autónoma de Buenos Aires (CABA) y 5 (8,9%) del Gran Buenos Aires (GBA). En ese mismo período la provincia de Santa Fe contabilizó 15 casos (26,3%) seguida por Córdoba con 13 casos (22,8%),

y Entre Ríos, La Pampa, Neuquén y Tucumán con un solo caso por provincia. El grupo etario más afectado fue el de adultos entre 30-44 años (24,6%), seguido por niños menores de 15 años (21%) (Dr. Hugo Fernández, Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias (INER) “Dr Emilio Coni”, comunicación personal).

La provincia de Santa Fe, que concentra al 21% del ganado lechero del país y contribuye en un 34% a la producción nacional de leche a nivel nacional, es considerada una zona de alta prevalencia de TBB. Entre los años 1977 y 2001, en el Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias (INER) “Dr Emilio Coni” se confirmó por cultivo la presencia de *M. bovis* en un 2,3% del total de casos de TB en personas de dicha provincia. Sin embargo, descendió a 1,6%, entre 2002 y 2011, en concordancia con la disminución de la prevalencia en bovinos (de Kantor *et al.*, 2012). En la provincia de Buenos Aires, la información de los casos de TBB respecto al total de casos de TB diagnosticados en el Hospital Cetrángolo fue de 0,34% en el período 2001-2005 y 0,36% entre 2006-2010, mientras que en el hospital Muñiz, los porcentajes decrecieron desde 1,8% en 1971 a 0,22% en 2006 (de Kantor *et al.*, 2012).

Con ayuda de las herramientas de tipificación molecular como Spoligotyping y MIRU-VNTR, hemos podido estudiar distintos casos de TBB en humanos. A partir del estudio realizado en nuestro laboratorio, donde se analizaron por estas técnicas moleculares distintos aislamientos de *M. bovis* obtenidos de humanos de las provincias de Santa Fe, Buenos Aires, Chaco y Tucumán, se pudo demostrar la transmisión persona-persona de una cepa de *M. bovis* resistente a múltiples drogas (MDR, del inglés *multidrug resistant*) entre dos pacientes de la provincia de Buenos Aires que tenían el vínculo de padre e hija. El padre era un trabajador de un frigorífico y luego de ser diagnosticado con TB en 1987 fue tratado empíricamente con antibióticos de primera línea. Sin embargo, en el año 2000 tuvo una recaída, momento en el que se aisló una cepa de *M. bovis* MDR. Luego de distintos episodios de abandono de tratamiento, el paciente fallece en 2003 a causa de la enfermedad. La hija, que nunca había tenido contacto con animales ni con la actividad pecuaria, fue diagnosticada de TB en 1999. En el año 2005 se le aisló una cepa de *M. bovis* MDR que resultó ser genotípicamente idéntica al aislamiento identificado en su padre (Etchechoury, *et al.*, 2010). Otro caso estudiado involucró a una mujer con artritis glenohumeral séptica por *M. bovis* no asociada a la actividad pecuaria (Colmegna, *et al.*, 2004). Si bien la fuente de contagio no pudo ser determinada, se presume que la causa pudo haber sido la manipulación de vísceras bovinas, principalmente pulmón crudo, para alimentar a sus mascotas felinas o la transmisión zoonótica a partir de una de ellas con confirmación de infección por *M. bovis* (Colmegna, *et al.*, 2004).

En otro estudio, tipificamos por Spoligotyping 18 aislamientos de *M. bovis* obtenidos de pacientes en el INER de la Provincia de Santa Fe, uno obtenido en el año 2012 y los restantes en el período 2016-2017. Se detectaron 8 espoligotipos, uno de los cuales (SB0140) fue el predominante ya que agrupó al 55% de los casos y es el más frecuente entre los aislamientos bovinos estudiados de Argentina. Otro de los espoligotipos, denominado SB0145, fue obtenido en 2 aislamientos y ha sido detectado en otras oportunidades en la provincia de Santa Fe. Los restantes espoligotipos se detectaron en un solo aislamiento cada uno y a su vez, otro fue considerado “nuevo”, ya que no estaba registrado en las bases de datos internacionales (Barandiaran *et al.*, 2018).

### **Transmisión epizootica: TBB en animales domésticos**

Además de los bovinos, entre los animales de producción más afectados por tuberculosis se encuentran las cabras y los cerdos. Los caprinos son susceptibles a *M. bovis* pero también a *Mycobacterium avium* (*M. avium*) y *M. tuberculosis*. Por otra parte, *Mycobacterium caprae*, otra micobacteria que puede afectar a estos animales, no ha sido detectado en el país ni tampoco hay reportes en otros países de la región. Al igual que en los bovinos, también se realiza la prueba ano-caudal de PPD para identificar a los animales infectados, los cuales deben ser eliminados del rodeo (descrita en la sección de “Diagnóstico de TBB”). En algunos estudios realizados en cabras del noroeste Argentino se observa una prevalencia de tuberculosis producida por *M. bovis* variable según la zona, desde un 0,67% en la provincia de Tucumán hasta un 2,6% en la provincia de Córdoba (Tribulo *et al.*, 2002; Garbaccio *et al.*, 2008). En otro estudio, realizado en la región de Cuyo en el año 2015, se demostró la existencia de LCT en 51 cabras provenientes de 8 hatos de pequeños productores que habían resultado positivos a la prueba tuberculínica (Magnano *et al.*, 2012). Sin embargo, estos datos son puntuales y se requieren de futuros estudios que consideren la situación de la tuberculosis en la población caprina en las distintas regiones productivas del país. Hemos reportado en el laboratorio, la detección de LCT en necropsias de caprinos a partir de las que se ha aislado *M. bovis* (Etchechoury *et al.*, 2010, Zumárraga *et al.*, 2013).

Los cerdos, en general, adquieren la infección por la ingesta de leche y derivados provenientes de bovinos infectados sin tratamiento térmico, como también en situaciones de convivencia entre distintas especies por el contacto con los aerosoles generados. Trabajos propios nos han permitido detectar los mismos espoligotipos en cerdos que los comúnmente aislados en bovinos (Barandiaran *et al.*, 2011;



Barandiaran *et al.*, 2015). Asimismo, el cerdo puede estar afectado por otras MNT como son las del complejo *Mycobacterium avium* (MAC) (Barandiaran *et al.*, 2014). Por otra parte, también fue descrita la co-infección de los cerdos con distintas especies de micobacterias como *M. bovis* y *Mycobacterium avium* subsp. *hominissuis* (Barandiaran *et al.*, 2014).

Los gatos son las mascotas más susceptibles a la tuberculosis y pueden ser afectados por *M. tuberculosis*, *M. bovis* y por las especies incluidas dentro del MAC (Underwood *et al.*, 1999; Zumárraga *et al.*, 2009). En un estudio realizado en el municipio de Morón la enfermedad ha sido detectada entre 2-7% de los gatos necropsiados, aunque se considera que existe un subregistro de esta enfermedad (Fernández & Morici, 1999). El curso de la enfermedad provoca una generalización precoz de la infección que conduce a la muerte del animal. Distintas evidencias sugieren que la principal fuente de infección en felinos es la ingesta de pulmón bovino crudo (bofe) y leche sin tratamiento térmico proveniente de bovinos infectados (Fernández & Morici, 1999; Underwood *et al.*, 1999; Zumárraga *et al.*, 2009). En nuestro laboratorio, se han genotipificado por Spoligotyping 19 aislamientos de *M. bovis* obtenidos a partir de gatos atendidos en el Hospital-escuela de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad de Buenos Aires. De los 9 espoligotipos detectados, el 57,9% de los aislamientos se agruparon en el espoligotipo más frecuente del ganado bovino, indicando una posible relación epidemiológica (Zumárraga *et al.*, 2009). Más recientemente, Barandiaran y col. (2017) identificaron 2 cepas de *M. bovis* aisladas a partir de gatos de CABA, pero además detectaron otras micobacteriosis causadas por *Mycobacterium fortuitum* y *Mycobacterium avium* subsp. *hominissuis* (Barandiaran *et al.*, 2017).

Aunque la infección por *M. bovis* en gatos es extremadamente rara en regiones donde la TBB no es endémica, hay reportes de casos de gatos infectados con esta micobacteria que además cohabitaban con personas en Texas, EEUU, (Ramdas *et al.*, 2015). Por otra parte, se pudo demostrar el primer caso de TBB transmitida de un gato a una pareja de ancianos con los que convivía en Inglaterra, (Gibbens *et al.*, 2014).

### **Infección por *M. bovis*: Respuesta inmune y Modelos animales para el estudio de la patogenicidad**

La infección por micobacterias es un proceso complejo que ocurre en distintas etapas y es el resultado de las propiedades inherentes del bacilo y del hospedador. La infección primaria ocurre en el macrófago pulmonar y probablemente en células dendríticas (CD) donde *M. bovis* es capaz de sobrevivir, replicar y diseminarse a otros lugares. La interacción inicial entre la micobacteria y el macrófago provoca una

respuesta inmune mediada por células, en la cual intervienen linfocitos T (LT) colaboradores CD4<sup>+</sup> y citotóxicos CD8<sup>+</sup> (Salyers & Whitt, 1994). La liberación de gamma interferón (INF- $\gamma$ ) por parte de los LT CD4<sup>+</sup> (Th1), estimula la activación de los macrófagos y la unión de las células dendríticas con los LT, que migran desde el torrente sanguíneo a los tejidos adyacentes para converger en el área afectada.

La producción de citoquinas tales como factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) e interleuquina 12 (IL-12) por CD o macrófagos infectados contribuye al desarrollo de una respuesta inmune celular Th1. Por otra parte, la respuesta Th2 contrarresta a la Th1, suprimiendo la respuesta inmune mediada por celular e incrementando la respuesta humoral a medida que progresa la enfermedad produciéndose IL-4, IL-5 y IL-10 (Blanco *et al.*, 2009).

Si bien el estudio del curso de la enfermedad no cuenta con modelos animales adecuados, por no poder reproducirse el estado de latencia, se utiliza al modelo murino por su capacidad de generar respuestas inmunológicas fuertes, su facilidad en el manejo y por la existencia de líneas bien caracterizadas (Glickman & Jacobs, 2001). El otro modelo ampliamente utilizado es el del cobayo (*Cavia porcellus*) debido a sus semejanzas con los procesos patológicos que ocurren en el humano (Lasco *et al.*, 2004). El cobayo es usado regularmente para evaluar la potencia y estandarización biológica de la tuberculina y ensayar nuevas drogas para el tratamiento de la enfermedad (Mc. Murray, 1994).

Se ha comprobado en un modelo murino la variabilidad en la patogenicidad de distintos clones de *M. tuberculosis* (Albanna *et al.*, 2011; Aguilar Leon *et al.*, 2009; López *et al.*, 2003; van Soolingen *et al.*, 2003) y de *M. bovis* (Aguilar Leon *et al.*, 2009). La sobrevivencia de los ratones infectados con una cepa de *M. tuberculosis* del genotipo W-Beijing, fue notoriamente menor respecto a la de las cepas de referencia *M. tuberculosis* H37Rv y Erdman, induciendo una patología pulmonar severa aunque una respuesta inmunológica insignificante (van Soolingen *et al.*, 2003). Análogamente la sobrevivencia de los ratones inoculados con una cepa de *M. bovis* aislada de un jabalí de La Pampa fue marcadamente menor respecto a la de cepa de referencia AN5 y otras aisladas de bovinos y un humano (Zumárraga, 2007; Aguilar Leon *et al.*, 2009). Además, recientemente se ha evaluado la capacidad de transmisión de diferentes cepas de *M. tuberculosis* con diferente grado de virulencia en un modelo murino de infección pulmonar progresiva pudiendo concluir que la alta virulencia de las cepas estuvo asociada con una alta transmisión (Marquina-Castillo *et al.*, 2009). Si bien existen varios trabajos de realizados con cepas de *M. tuberculosis* en el modelo murino, hasta el presente no hay antecedentes de estudios de estas características realizados con cepas de *M. bovis*.

En este trabajo tesis se buscó aislar micobacterias patógenas pertenecientes al CMT a partir de órganos bovinos que estaban aptos para el consumo. Estos aislamientos fueron posteriormente caracterizados molecular y epidemiológicamente, así como también se investigó su virulencia y transmisibilidad en el modelo murino. La existencia de escapes de *Mycobacterium bovis* de la vigilancia epidemiológica de rutina en frigoríficos advierte sobre el peligro relacionado con la salud pública y la zoonosis.

# HIPÓTESIS Y OBJETIVOS



## **Hipótesis**

Debido a las características inherentes a la tuberculosis bovina existen lesiones que no son detectadas en la inspección bromatológica de rutina en frigorífico, manifestadas por la presencia de *M. bovis* en pulmones e hígados bovinos comercializados en bocas de expendio de carne.

Los aislamientos que presentan los genotipos de *M. bovis* más frecuentemente detectados en Argentina, son los que tienen mayor virulencia y transmisibilidad.

## **Objetivos generales y específicos**

### **Objetivo general**

Estudiar en un modelo murino de tuberculosis la transmisibilidad de cepas de *M. bovis* genotipificadas, de alto y bajo grado de virulencia, aisladas tanto de bovinos como de otros hospedadores y de pulmones, linfonódulos e hígados bovinos comercializados en bocas de expendio de carne.

### **Objetivos específicos**

Detectar *M. bovis* en pulmones/linfonódulos e hígados bovinos comercializados en bocas de expendio de carne de la Ciudad Autónoma de Buenos Aires y conurbano bonaerense.

Tipificar molecularmente los aislamientos de micobacterias obtenidos a partir del cultivo de los pulmones e hígado bovinos.

Caracterizar la resistencia a antibióticos de los aislamientos obtenidos.

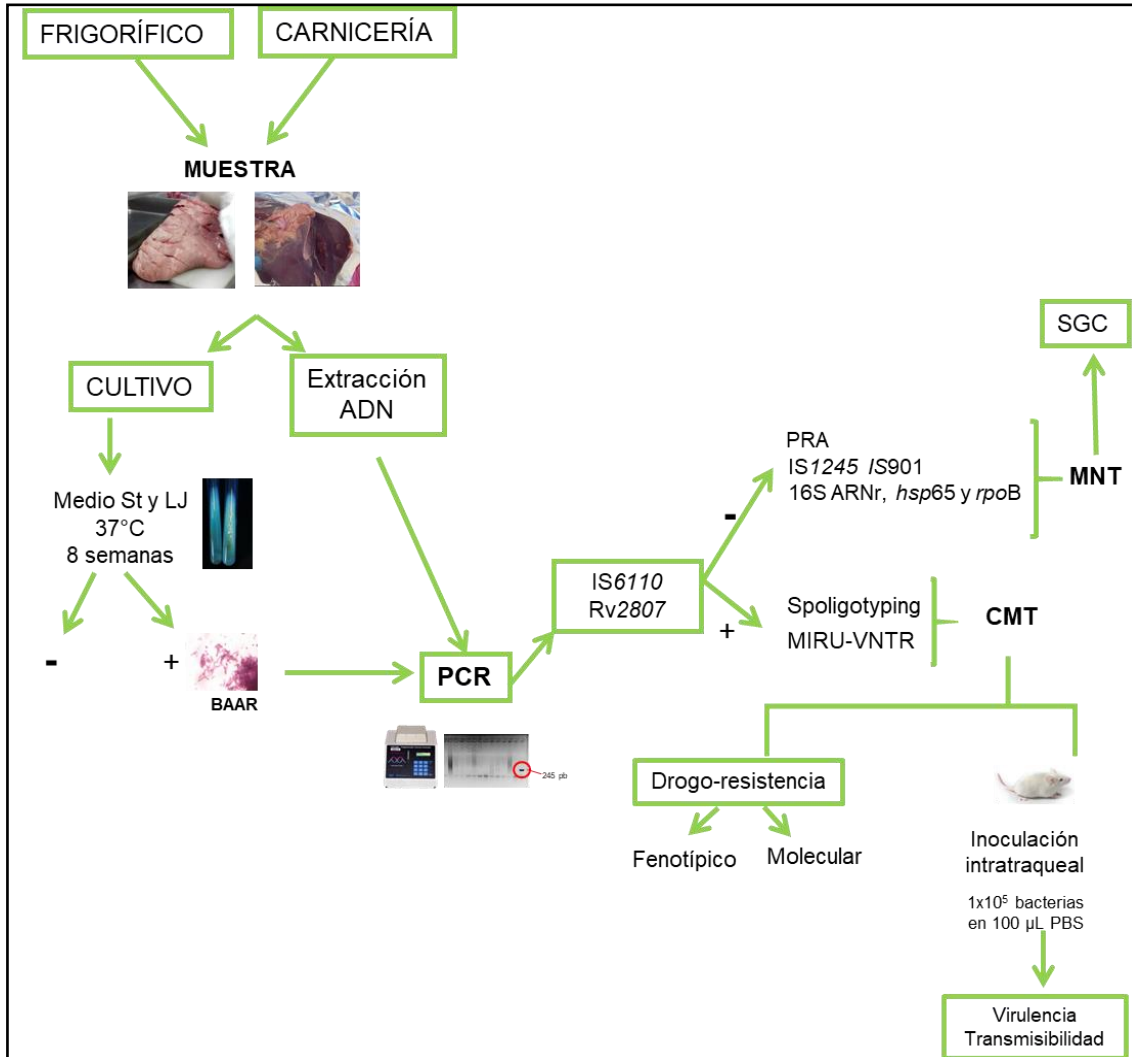
Evaluar en un modelo murino de tuberculosis la virulencia y capacidad de transmisión de las cepas de *M. bovis* aisladas de los pulmones/linfonódulos e hígado bovinos como también de cepas de colección aisladas de distintos hospedadores.

# MATERIALES Y MÉTODOS



## Materiales y métodos:

A continuación se resumen las actividades realizadas.



**Figura 7: Flujograma de trabajo.** Se indican las actividades que se realizaron durante este trabajo de tesis. PCR: *Polymerase chain reaction*; PRA: *PCR Restriction Analysis*; SGC: *Secuencia del genoma completo*.

### Características del muestreo

El número inicial de muestras a incorporar en el estudio fue estimado al partir de la información disponible por el SENASA en el año 2012, año de la presentación del proyecto. Considerando el promedio de faena anual en el año 2011 de 9.034.220 bovinos, una tasa promedio de decomisos de 0,6% con 57.808 bovinos afectados (con LCT) en frigoríficos de inspección federal (SENASA, 2016), según el estudio estadístico realizado con Win episcopo 2.0, para detectar un aislamiento de *M. bovis* con un 95% de confianza, serían necesarios analizar al menos 498 animales, asumiendo que la bacteriología constituye la técnica de oro en el diagnóstico de la tuberculosis bovina. La unidad en estudio fue el pulmón y el hígado bovino.



$$n = \left( 1 - (1 - NC)^{\frac{1}{d}} \right) \cdot \left( N - \frac{(d-1)}{2} \right)$$

Donde:

d: prevalencia de la enfermedad en la población

N: Tamaño de la población

NC: Nivel de confianza (95 %)

\*Nota: se asume que la bacteriología, es “el estándar de oro” del diagnóstico de certeza de la enfermedad y se considera que tiene una sensibilidad y una especificidad del 100 %.

Los valores estimados de las prevalencias de TBB en la Argentina, son solamente orientativos de la situación de la enfermedad en el país, porque muchos animales con lesiones microscópicas no son detectados durante la inspección.

Se seleccionaron carnicerías de la Ciudad Autónoma de Buenos Aires (CABA) y conurbano bonaerense, que vendieran de forma regular pulmón bovino entero e hígado. Se escogieron 7 establecimientos, uno de CABA, 3 de zona oeste, 2 de zona norte y 1 de zona sur. Para tomar un mayor número de muestras en un corto lapso de tiempo, también se concurrió a un frigorífico de la zona oeste para inspeccionar y recolectar muestras de pulmón y linfonódulos de órganos que ya hubieren pasado exitosamente la inspección bromatológica de rutina y que estaban pronto a comercializarse. Las muestras compradas en carnicerías correspondieron a pulmones enteros junto con los linfonódulos correspondientes (pulmonares, mediastínicos y traqueobronquiales) e hígado bovino. Los órganos fueron inspeccionados en una cabina de seguridad biológica Clase II tipo 2A. La misma consistió en la visualización y palpación de todo el órgano, seguida del fraccionamiento mediante cortes foliados y profundos de aproximadamente 1cm de distancia. Se seleccionaron porciones del tejido que presentaran LCT. Cuando no se encontraban, se tomaron porciones de aproximadamente 1cm<sup>2</sup> de todos los lóbulos junto con los linfonódulos acompañantes cuando estos acompañaban el órgano. Todos los hígados bovinos, se obtuvieron por la compra directa del órgano entero en carnicerías. Estos fueron inspeccionados en el laboratorio y se realizaron cortes foliados de 1 cm de distancia aproximadamente, de todo el órgano. Cuando no se detectaban lesiones se tomaron varias porciones del tejido, especialmente aquellas cercanas al hilio hepático. Cuando el hígado estaba acompañado de los linfonódulos, éstos también fueron colectados.

Las muestras de pulmones/linfonódulos e hígado cortadas se colectaron en un frasco estéril de 100 mL llenando su capacidad.

Las muestras fueron procesadas en los laboratorios de los Institutos de Patobiología (IP) y Biotecnología (IB), Centro de Investigaciones en Ciencias Veterinarias y Agronómicas, del Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria y de la Cátedra de

Enfermedades Infecciosas de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad de Buenos Aires (FCV).

### **Bacteriología**

Cultivo de *M. bovis*: Las muestras fueron trituradas por acción mecánica en un Stomacher (Basic Masticator type 470, IUL Instruments), hasta la formación de un homogenato. La mitad del macerado se conservó a -20°C como reserva (contra-muestra) ante la eventualidad de contaminaciones. La otra mitad se descontaminó por el método de Petroff modificado (de Kantor *et al.*, 1988). El producto de este procedimiento fue sembrado por duplicado en medios sólidos a base de huevo para el aislamiento de micobacterias: Stonebrink y Löwenstein-Jensen, e incubados a 37°C. Al no ser prioritaria la búsqueda de MNT, el medio Löwenstein-Jensen solamente fue utilizado en la FCV, ya que allí se realizan rutinariamente cultivos en ambos medios, mientras que en el IP, solamente se utilizó el medio Stonebrink. Este procedimiento fue realizado en una cabina de seguridad biológica Clase II tipo 2A. Se consideró negativo un cultivo que no desarrolló colonias en el término de dos meses. Todo desarrollo fue sometido a la coloración de Ziehl-Neelsen para la identificación de BAAR.

Los aislamientos obtenidos fueron repicados en medio sintético líquido (Medio Middelbrock 7H9, suplementado con piruvato de sodio 0,4% y albúmina dextrosa y catalasa (ADC) al 10%, y una vez desarrollados se almacenaron en glicerol al 30% a -80° C, hasta ser utilizados en los subsiguientes ensayos.

### **Extracción de ADN**

A partir de colonias: Se realizó la lisis de las colonias por acción del calor. Las colonias desarrolladas en el medio de cultivo se tomaron con un ansa estéril y se suspendieron en 250µL de agua destilada estéril libre de pirógenos contenidos en eppendorfs de 1,5 mL de capacidad y se incubó a 95°C durante 40 min. Luego de centrifugar a 12.000g durante 5 min., 5 µL del sobrenadante se utilizaron como templado para las diferentes reacciones de PCR (*colony* PCR).

A partir del macerado de órganos: Complementariamente al cultivo, a partir de los tejidos disgregados se extrajo ADN para detectar la presencia de micobacterias del CMT por PCR. Para realizar la extracción de ADN se utilizaron distintos kits comerciales siguiendo las instrucciones provistas por los fabricantes (INBIO HIGHWAY T-kit, Argentina; Macherey-Nagel NucleoSpin® Tissue, Alemania y Qiagen DNeasy Blood & Tissue Kit, USA). Se utilizó también un sistema de extracción de

ácidos nucleicos automatizada "Tacomini", (GeneReach, Taiwan). Este sistema está basado en la ruptura mecánica del tejido con perlas de acero y posterior extracción mediante lisis química y utilización de microperlas magnéticas que capturan los ácidos nucleicos y lo incuban en las distintas soluciones buffers de lavado y elusión.

Se evaluó la presencia del gen de la  $\beta$ -actina como control de extracción de ADN de los tejidos y detectar la presencia de inhibidores de la polimerasa. Se utilizaron los *primers* T.F (TCCCTGGAGAAGAGCTACGA) y T.R (AGGAAGGAAGGCTGGAAGAG) y se utilizó el ciclado descrito por Thacker y col. (2011). El producto obtenido fue sometido a electroforesis en agarosa al 2% con bromuro de etidio (0,5  $\mu$ L/mL) y visualizado por exposición a la luz UV, observándose un fragmento de 98 pb. El ADN obtenido fue luego utilizado para identificar las micobacterias del CMT por PCR.

### **Identificación y tipificación molecular de los aislamientos**

La identificación y tipificación molecular de los aislamientos se realizó mediante la utilización de técnicas basadas en la reacción de PCR. Se detectó la presencia de la secuencia de inserción 6110 (IS6110) para identificar a las micobacterias que integran el CMT. La amplificación se realizó utilizando los *primers* INS1 (CGTGAGGGCATCGAGGTGGC) e INS2 (GCGTAGGCGTCGGTGACAAA) (Hermans *et al.*, 1990) y el programa de ciclado *Touch-Down* (Zumárraga *et al.*, 2005). El producto amplificado fue sometido a electroforesis en agarosa al 2% con bromuro de etidio (0,5  $\mu$ L/mL) y visualizado por exposición a la luz UV, observándose un fragmento de 245 pb.

En forma complementaria y confirmatoria en las muestras de ADN extraído de tejido, también se amplificó la secuencia Rv2807, características del CMT (Araújo *et al.*, 2014). El ciclado utilizado fue el mismo que el utilizado para IS6110. Los *primers* utilizados fueron Fo (*Forward outer*: GGCGGTGGCGGAGTTGAAGGCGATGAG) y Ro (*Reverse outer*: GCCGCGAGCGAGTCTGGGCGATGTC), descritos por Araújo y col. (2014). El producto amplificado fue sometido a electroforesis en agarosa al 2% con bromuro de etidio (0,5  $\mu$ L/mL) y visualizado por exposición a la luz UV, observándose un fragmento de 443 pb.

Aquellos aislamientos que resultaron negativos por PCR-IS6110 se tipificaron para identificar MNT. Inicialmente, para el primer aislamiento de MNT obtenido, se utilizó la técnica de PRA (PCR-Restriction Analysis) Telenti y col. (1993) mientras que para los sucesivos, se adoptó como estrategia la amplificación y secuenciación de un fragmento de los genes 16S ARNr que codifica la subunidad 16S de ARN ribosomal, *hsp65* que codifica la proteína de shock térmico (*Heat shock protein*) y *rpoB* que codifica la subunidad  $\beta$  de la ARN polimerasa. Las secuencias obtenidas se

compararon con las de las bases de datos del *National Center for Biotechnology Information* (NCBI <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), *Mycobacterium 65 Kilodalton Heat Shock Protein Gene BLAST* (<http://hsp65blast.phsa.ca/blast/blast.html>) y en el caso de 16S ARNr también en *Ribosomal Database Project* (RDP <http://rdp.cme.msu.edu/>). Como criterio de identificación de género y especie se consideró el consenso de la identidad obtenida con al menos dos de los genes evaluados (16S ARNr, *hsp 65* y *rpoB*) (Adekambi *et al.*, 2003; Monteserin *et al.*, 2016).  
PCR- 16S ARN ribosomal: Se utilizaron los *primers* 264 (TGCACACAGGCCACAAGGGA) y 285 (GAGAGTTTGATCCTGGCTCAG) descritos por Kirshner y Böttger, (1998). El producto de PCR obtenido fue sometido a electroforesis en agarosa al 1% con bromuro de etidio (0,5 µL/mL) y visualizado por exposición a la luz UV, observándose un fragmento de 1037 pb.

PCR-*hsp65*: La amplificación se realizó utilizando los *primers* TB11 (ACCAACGATGGTGTGTCCAT) y TB12 (CTTGTCGAACCGCATACCCT) y el programa de ciclado descrito por Telenti y col., (1993) para la técnica de PRA. El producto de PCR obtenido fue sometido a electroforesis en agarosa al 2% y visualizado por exposición a la luz UV, obteniendo un producto de amplificación de 440 pb. Para el caso del aislamiento que se tipificó por PRA luego de la amplificación se realizó la digestión con las enzimas *BstEII* y *HaeIII*. La electroforesis de los productos de restricción se realizó en agarosa al 3% (Agarose 1000 Invitrogen, Life Technologies) con bromuro de etidio (0,5 µL/mL). Como marcador de peso molecular se utilizó 50 bp DNA Ladder (Promega Corp., USA). La estimación de los tamaños de los fragmentos de restricción se realizó con el programa BioNumerics (Applied, Maths, Bélgica). La identificación de la especie de micobacteria se realizó en la base de datos PRASITE (<http://app.chuv.ch/prasite/index.html>).

PCR-*rpoB*: Se analizó la presencia del gen *rpoB* (que codifica para la subunidad β de la ARN polimerasa). La amplificación se realizó utilizando los *primers* Myco-F (GGCAAGGTCACCCGAAGGG) y Myco-R (AGCGGCTGCTGGGTGATCATC) y del ciclado descrito por Adekambi y col. (2003). El producto amplificado por PCR fue sometido a electroforesis en agarosa al 1% y visualizado por exposición a la luz UV, observándose un fragmento de 764 pb.

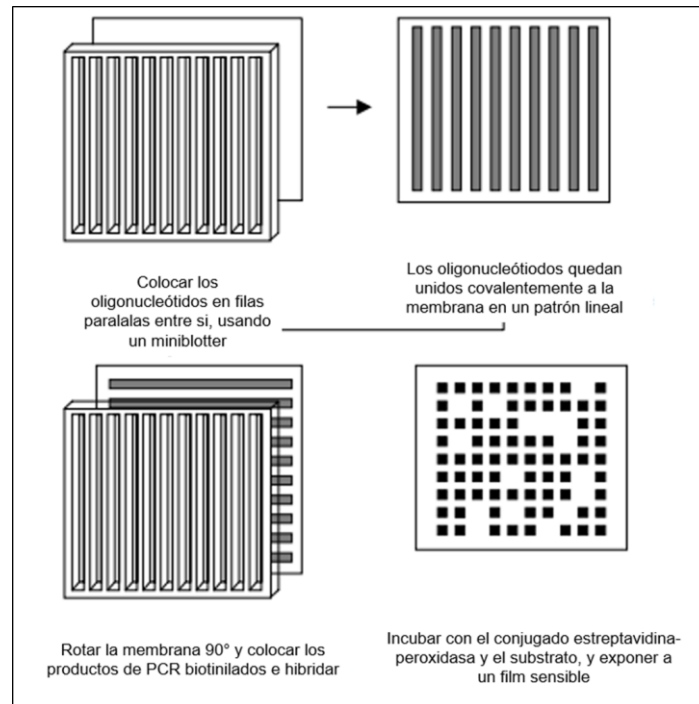
Los ciclados utilizados para la amplificación de las distintas secuencias fueron aquellas sugeridas por los autores. Se utilizó agua y ADN obtenido de la cepa de referencia *M. tuberculosis* H37Rv como controles negativos y positivos de la PCR respectivamente. Luego de las respectivas PCR, el producto de amplificación fue purificado utilizando el kit "Illustra DNA and Gel Band Purification Kit" (GE Healthcare, UK) y cuantificado por espectrofotometría a 260nm (Nanodrop 2000, Termo Scientific, USA).

La secuenciación de ADN se realizó en las instalaciones de la Unidad de Genómica del Instituto de Biotecnología de INTA. Se empleó un secuenciador de 16 capilares ABI3130xl (Applied Biosystems), utilizando “Big Dye Terminator v3.1” (Cycle Sequencing Kit).

Para identificar por PCR la subespecie de micobacteria del complejo *Mycobacterium avium* (*M. avium* subsp. *hominissuis* / *M. avium* subsp. *avium*) se utilizaron las secuencias IS1245 e IS901. Para la amplificación de IS1245 se utilizaron los *primers* P1 (GCCGCCGAAACGATCTAC) y P2 (AGGTGGCGTCGAGGAAGAC), descritos por Guerrero y col (1995). El ciclado fue el mismo utilizado por los autores obteniéndose un producto de 427 pb. Para la amplificación de IS901, se utilizaron los *primers* P1 (GGATTGCTAACCACGTGGTG) y P2 (GCGAGTTGCTTGATGAGCG) descrito por Moravkova y col. (2008). El ciclado fue el mismo que el descrito por los autores y se generó un producto de 577 pb al ser sometido a electroforesis en agarosa al 1% y visualizado por exposición a la luz UV.

Aquellos aislamientos identificados como pertenecientes al CMT, se tipificaron por la técnica de hibridación reversa de Spoligotyping (Kamerbeek *et al.*, 1997) y MIRU-VNTR (Supply *et al.*, 2000). Los resultados obtenidos fueron comparados en las bases de datos de Mbovis.org (VISAVET, Universidad Complutense de Madrid) y MIRU-VNTR plus (Weniger *et al.*, 2010; Allix-Béguec *et al.*, 2008) respectivamente.

Spoligotyping: Se realizó siguiendo el protocolo descrito por Kamerbeek y col. (1997). En la primera etapa se amplificó por PCR la región DR utilizando los *primers* Dra (marcado con biotina) y Drb. Luego, los productos amplificados se desnaturalizaron por calor (100 °C por 10 minutos) y fueron colocados inmediatamente en hielo. Se sembraron en forma transversal al sentido en que los oligonucleótidos espaciadores están fijados covalentemente en una membrana de nylon (Mapmygenome, India) y dispuestos paralelamente entre sí. Este paso se realizó utilizando un miniblotter (Mapmygenome, India). Luego, la membrana se incubó con el conjugado estreptavidina-peroxidasa, y la detección de la hibridación se realizó por quimioluminiscencia (Pierce®ECL Western Blotting Substrate, Thermo Scientific, USA) revelando por autorradiografía por exposición a un film sensible (Hyperfilm, Amersham, GE Healthcare, UK). Dado que el sentido de siembra del producto de PCR se realiza de manera transversal a la disposición de los oligonucleótidos en la membrana, la hibridación se visualiza en forma de punto. Como controles se utilizaron ADN de las cepas *M. tuberculosis* H37RV y *M. bovis* BCG (Figura 8).



**Figura 8: Metodología de Spoligotyping.** Se pueden observar los pasos para la hibridación de los oligonucleótidos espaciadores, la siembra transversal de los productos de PCR biotinilados y el producto final donde se observan los *spots* que determinan un espoligotipo. Adaptado del Manual de Spoligotyping (Isogen, 2005)

Criterio de interpretación de los resultados de Spoligotyping: Un patrón de Spoligotyping (espoligotipo) se define por la presencia o ausencia de cada uno de los 43 oligonucleótidos espaciadores (que se observa como un *spot* que indica un revelado positivo) y se lo designa con un número de acuerdo con la base de datos Mbovis.org. Así, los patrones obtenidos se compararon con los incluidos en las bases de datos del IB y de la Universidad Complutense de Madrid ([www.mbovis.org](http://www.mbovis.org)).

Adicionalmente, para confirmar que aquellos aislamientos que tuvieron el mismo espoligotipo de *M. bovis* BCG eran aislamientos salvajes, se analizó la presencia de los genes *esxA* y *esxB*, que codifican las proteínas ESAT-6 y CFP-10 respectivamente, deletadas en la cepa vacunal *M. bovis* BCG. Para la amplificación de *esxA* se utilizaron los *primers* *esxAfLM* (GAGAGATCTCATGACAGAGCAGCAGTGG AATTTC) y *esxArLM* (GTTGGATCCTGCGAACATCCCAGTGACG), que amplifican un producto de 288 pb, mientras que para la amplificación de *esxB* se usaron los *primers* *esxBf* (TGACAACAGACTTCCCGG) y *esxBr* (CGATACCCGCGAAATTTC) que amplifican un fragmento de 450 pb. Para ambos genes la reacción se realizó con el programa de ciclado sugerido por los autores (Encinas *et al.*, 2018). Los productos de PCR obtenidos con cada uno de los pares de *primers* fueron sometidos a electroforesis en agarosa al 2% con bromuro de etidio (0,5 µL/mL) y visualizados por exposición a la luz UV.

*Mycobacterial Interspersed Repetitive Units- Variable-Number Tandem Repeat* (MIRU-VNTR): La técnica se realizó según el protocolo detallado por Supply y col. (2000). Cada uno de los 12 MIRU se amplificó por PCR utilizando como polimerasa a *HotStarTaq* DNA Polymerase (Qiagen, USA). Los productos de amplificación fueron separados por electroforesis en geles de agarosa de alta pureza (Agarose 1000, Invitrogen, Life Technologies) al 4% teñido con bromuro de etidio (0,5 µL/mL). Para estimar el tamaño de los fragmentos amplificados, como marcadores de peso molecular se utilizaron 50 bp DNA Ladder, (Promega Corp., USA) y 100 bp DNA Ladder, (Promega Corp., USA). Las bandas visualizadas se analizaron con el programa BioNumerics (Applied, Maths, Bélgica) para estimar el tamaño de los fragmentos amplificados. A partir de los resultados obtenidos y comparando los mismos con una tabla de referencia se estableció el número de unidades repetitivas de cada locus.

### **Evaluación fenotípica y molecular del perfil de resistencia a tuberculostáticos de aislamientos de *M. bovis***

La evaluación fenotípica de los aislamientos de *M. bovis* obtenidos a partir de los órganos se realizó en colaboración con el Laboratorio de Tuberculosis y Micobacteriosis del Hospital Dr. Antonio A. Cetrángolo, Florida, Provincia de Buenos Aires, mientras que la evaluación molecular por MAS-PCR (*multiplex allele-specific polymerase chain reaction*) con DILAB-SENASA, Martínez, Buenos Aires.

**Determinación del perfil de drogo-resistencia mediante métodos fenotípicos:** Los métodos utilizados de evaluación fenotípicos para el estudio de resistencia a antibióticos consistieron en sembrar un inóculo del aislamiento viable en medios selectivos con tuberculostáticos en concentraciones conocidas en las condiciones de crecimiento adecuadas para el desarrollo de las micobacterias. Posteriormente, se determinó el crecimiento en presencia de éstos.

Para la evaluación del perfil de drogo-resistencia se utilizaron cultivos viables y frescos de *M. bovis* obtenidos en medio de cultivo Middlebrook 7H9 (M7H9) a partir de cepas conservadas a -80 °C. La cepa de *M. tuberculosis* H37Rv, sensible a las drogas anti-tuberculosas, fue utilizada como cepa de referencia. La determinación de sensibilidad a drogas antituberculosas de primera línea se realizó mediante dos métodos:

**a-MGIT® 960 SIRE kit** (Becton Dickinson, Argentina). Este método es un sistema comercial de detección automatizada, en el cual se cultiva en tubos conteniendo M7H9 suplementado con ácido oleico, albúmina, dextrosa y catalasa (OADC, BD Argentina),

en presencia de isoniazida, estreptomicina, rifampicina y etambutol (INH: 0,1 µg/mL; SM: 1,0µg/mL, RIF: 1,0 µg/mL, EMB: 5,0 µg/mL), respectivamente y se compara el desarrollo micobacteriano con el tubo control sin droga. El protocolo utilizado fue el aportado por el fabricante y los resultados fueron leídos y registrados automáticamente por el *Microsoft EpiCenter* (BD Argentina).

**b-Micro-método colorimétrico (MMC).** Se utilizó el MMC para determinar el perfil de drogo-resistencia a drogas de primera línea y asimismo explorar el nivel de resistencia antibiótica de cada uno de los aislamientos, mediante la determinación de la concentración inhibitoria mínima (CIM).

Brevemente, para este sistema se emplearon placas de 96 pocillos, utilizando la resazurina (RES) como indicador de crecimiento y viabilidad celular. Se realizó microdilución en placa utilizando las mismas drogas (INH, SM, RIF y EMB) y además se agregó levofloxacina (LEVO) pero con diluciones seriadas al medio (1/2) decrecientes, utilizando el protocolo previamente publicado según Morcillo y col. (2010). El medio de cultivo utilizado fue M7H9 suplementado con OADC. Se evaluaron los siguientes rangos de concentraciones: INH: 1,0-0,06; µg/mL; SM: 8,0-0,25 µg/mL, RIF: 2,0-0,06 µg/mL, EMB: 32,0-1,0 µg/mL; LEVO: 2,0-0,06 µg/mL.

**Determinación molecular de drogo-resistencia:** La determinación molecular de resistencia a INH y RIF consistió en una PCR *multiplex* MAS-PCR (Imperiale *et al.*; 2011). Basada en la identificación de las principales mutaciones puntuales en los genes *inhA*, *katG* y *rpoB*. El gen *katG* codifica la síntesis de una catalasa-peroxidasa que activa a la INH (Zhang *et al.*, 1992) mientras que el gen *inhA* codifica la síntesis de la NADH enoil ACP reductasa que está implicada en la biosíntesis de ácidos micólicos de la pared celular (Banerjee *et al.*, 1994). Por su parte el gen *rpoB* codifica la subunidad β de la ARN polimerasa, cuando la RIF se une interfiere con la síntesis del ARN mensajero por inhibición de la polimerasa. Cuando hay mutaciones en el gen *rpoB*, la RIF no puede unirse. Esta PCR detecta las mutaciones en el codón 315 del gen *katG* (*katG315*) y en la posición -15 de la región promotora del gen *inhA* (*inhAP-15*) y en los codones 516, 526 y 531 del gen *rpoB*. La identificación de las mutaciones presentes se basó en la presencia o ausencia de amplificación y en el tamaño del producto amplificado obtenido para cada PCR. En el caso de cepas sensibles (salvajes), los productos de amplificación esperados fueron: 292 pb y 210 pb para las mutaciones del gen *katG* en la posición 315 y en el promotor del *inhA* en la posición -15 respectivamente; y para el gen *rpoB*, los tamaños de los productos de amplificación esperados fueron de 218 pb, 185 pb y 170 pb para los codones 516, 526 y 531 respectivamente. La ausencia de amplificación indicó mutación del codón target en



cada caso. El ADN utilizado como templado se obtuvo por lisis térmica con incubación a 95°C por 40 minutos de una suspensión de micobacterias realizada a partir de los cultivos obtenidos. Para las respectivas PCR se utilizaron los siguientes *primers* descritos por Imperiale y col. (2011): *katG*-R ATACGACCTCGATGCCGC, *katG*-F GCAGATGGGGCTGATCTACG; *inhA*P-R CACCCCGACAACCTATCG, *inhA*P-F GCGCGGTCAAGTTCCACA; *rpoB*-R TTGACCCGCGCGTACAC, *rpoB*-516 CAGCTGAGCCAATTCATGGA, *rpoB*-526 CTGTCTGGGGTTGACCCA y *rpoB*-531 CACAAGCGCCGACTGTC. Las condiciones utilizadas para realizar la MAS-PCR fueron las descritas previamente (Imperiale, *et al.* 2011). Los productos de PCR obtenidos fueron sometidos a electroforesis en gel de agarosa al 2% y teñidos con bromuro de etidio (0,5 µL/mL) y visualizados por exposición a luz UV.

### **Secuenciación del genoma completo de un aislamiento de *M. kansasii***

Se seleccionó el aislamiento de *M. kansasii* 16-2700 que fue obtenido de un pulmón bovino y que fue co-aislado junto con *M. bovis* (muestra N° 179), debido al interés pecuario de éste en relación a la interferencia en el diagnóstico de la TBB por poseer las proteínas ESAT-6 y CFP-10. Este aislamiento fue conservado en glicerol al 30% a -80 °C, a partir de éste se realizó un cultivo en medio Middlebrook 7H9 adicionado con piruvato de sodio al 0,4% y ADC al 10%. Se realizó una extracción de ADN a partir del cultivo con bromuro de hexadeciltrimetilamonio (CTAB), según lo descrito por van Embden y col (1992). Se cuantificó por espectrofotometría (NanoDrop® 1000, Spectrophotometer, Thermo Scientific, USA) y luego se remitió a la Unidad de Genómica del Instituto de Biotecnología de INTA. Allí fue nuevamente cuantificado y se midió su pureza e calidad mediante el *Fragment analyzer* (Advanced Analytical Technologies, Inc., USA). La muestra fue procesada en un equipo *MiSeq Sequencing System* (Illumina, USA) que opera mediante la tecnología de secuenciación por síntesis. La secuencia genómica obtenida fue enviada y procesada en la Estación Experimental Agropecuaria de INTA Rafaela, Santa Fe, donde, mediante una colaboración establecida con el Dr. Ariel Amadio en el marco del proyecto PIP-CONICET 11220150100316 CO coordinado por la Dra. Andrea Gioffré, se procedió a realizar el ensamblado del genoma secuenciado. Se construyeron las bibliotecas genómicas utilizando el kit Nextera XT (Illumina, USA) con extremo emparejado (*paired-end*) amplificando lecturas de 2 x 250 pb según protocolo del fabricante. El criterio de corte (*quality trimming*) de las lecturas crudas (*raw reads*) se programó en 15. El ensamblaje *de novo* se realizó utilizando el programa SPAdes v3.6.2 (St. Petersburg State University, Center for Algorithmic Biotechnology, Rusia) obteniendo *contigs* y *scaffolds*. Los *scaffolds* fueron orientados con el programa ABACAS (Sanger

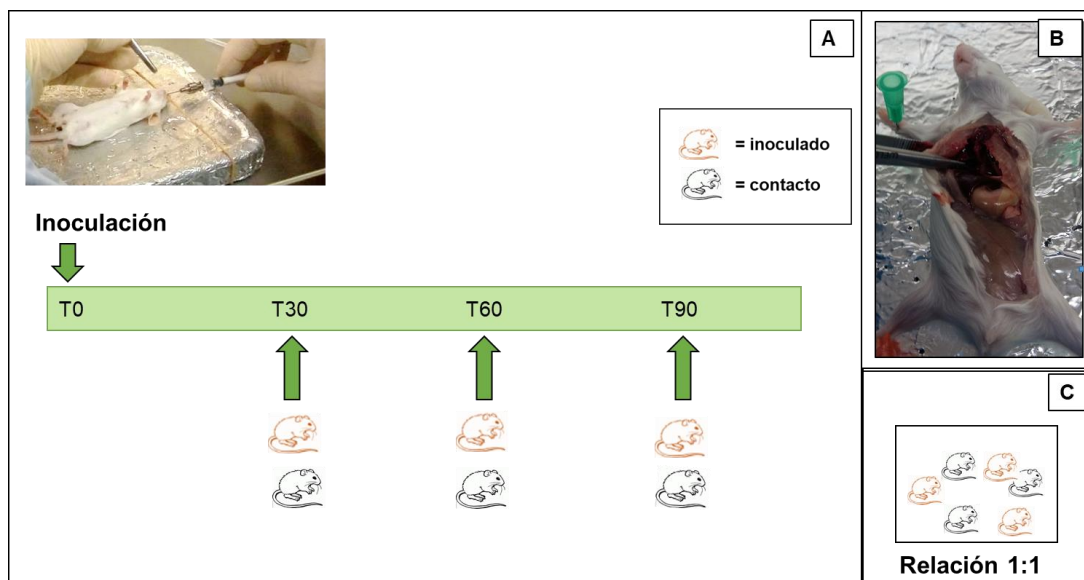
Institute, UK) utilizando el genoma de *Mycobacterium kansasii* ATCC 12478 como referencia (Wang *et al.*, 2015). El genoma fue anotado utilizando el programa PROKKA (Victorian bioinformatics consortium, Australia) y RAST (OMICtools, USA). La anotación del genoma fue realizado en RAST (*Rapid Annotation using Subsystem Technology*, Version 2.0) usando el esquema de anotación de ClassicRAST.

La comparación del genoma 16-2700 con el de referencia se realizó con la herramienta online Mauve (The Darling Lab, USA). A su vez se realizó una comparación con la herramienta *Artemis Comparison Tool* (ACT) (Sanger Institute, Inglaterra) entre el genoma de referencia de *M. kansasii* ATCC 12478 y el genoma de 16-2700. Se evaluó la presencia de SNPs entre *M. kansasii* 16-2700 y el genoma de referencia *M. bovis* AF2122/97.

### **Evaluación de la virulencia y transmisibilidad de cepas genotipificadas de**

#### **M. bovis**

La figura 9 resume la metodología de trabajo empleada en el ensayo de virulencia y transmisibilidad.



**Figura 9: Experiencia de virulencia y transmisibilidad.** A: Esquema de trabajo para la evaluación de la virulencia y la transmisibilidad. Las flechas verdes en los tiempos T30, T60 y T90 se realizarán eutanasias y recolección de pulmones y bazo de ratones infectados (ratón naranja) y “contactos” (ratón negro). B: Imagen representativa de necropsia para realizar la recolección de órganos. C: Disposición de los animales en jaulas, manteniendo la relación 1:1.

Se seleccionaron dos aislamientos obtenidos a partir de órganos con LCT, uno obtenido a partir de un pulmón, cuya muestra se tomó en el frigorífico (aislamiento N° 134) y el otro obtenido a partir de un hígado adquirido en una carnicería (aislamiento N° 182). Además de la presencia de LCT y de haber pasado en forma exitosa el control bromatológico, el criterio adoptado para la elección fue, en el caso del

aislamiento N° 134, que su espoligotipo (SB0140) es el más frecuente tanto en la provincia de Buenos Aires como en los aislamientos estudiados de Argentina, mientras que en el caso del aislamiento N° 182, la importancia que tiene el hígado en la dieta de las personas, siendo que es un alimento consumido y vendido con frecuencia, que la LCT fue evidente solo después de procesar el órgano, y que fue vendido en una carnicería de un barrio de la zona oeste del gran Buenos Aires.

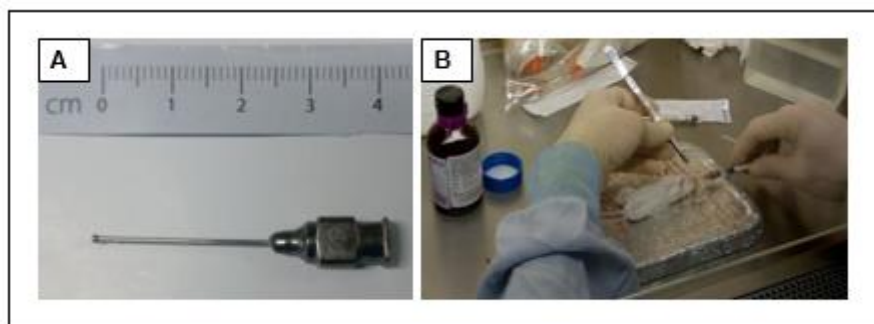
Como cepa de referencia se utilizó *M. bovis* AN5 cuya virulencia había sido evaluada previamente por el grupo de trabajo y considerada como intermedia al haber sido comparada con aislamientos de *M. bovis* de 3 bovinos, 1 humano y 1 jabalí (Aguilar Leon *et al.*, 2009; Zumárraga, 2007).

Los aislamientos almacenados en glicerol al 30% y a -80 °C se cultivaron, en medio líquido Middlebrook 7H9 adicionado con piruvato de sodio al 0,4%, Tween 10X al 0,05% y ADC al 10%. Se colocaron en estufa sin agitación a 37 °C y su crecimiento fue evaluado semanalmente. Una vez obtenido el crecimiento en medio líquido (que tardó entre 2 y 3 semanas), se determinó la OD por espectrofotometría (LKB Novaspect II, Pharmacia LKB Biotechnology, Suecia) en una longitud de onda de 600 nm y una vez alcanzada la fase estacionaria, las suspensiones de bacterias fueron alicuotadas y congeladas a -80°C hasta su utilización y también sembradas en medio sólido Middlebrook 7H10 adicionado con piruvato de sodio 0,4%, Tween 10X al 0,05% y ADC al 10% para estimar las unidades formadoras de colonias recuperadas (UFC).

Un total de 99 ratones BALB/c hembra mayores de 6 a 8 semanas provenientes del bioterio de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Nacional de La Plata, fueron divididos en tres grupos experimentales de 33 animales.

Se establecieron 4 tiempos (T) de eutanasia, T0 (1 día post inoculación), T30 (30 dpi), T60 (60 dpi) y T90 (90 dpi), que se realizó en cámara de dióxido de carbono.

De cada grupo fueron inoculados 18 ratones por vía intratraqueal con una cánula rígida de punta esférica (22Gx1" w/ 1-1/4 mm, Thomas Scientific) (Figura 10 A), previa sedación con isofluorano (Figura 10 B), con  $1 \times 10^5$  bacterias suspendidas en 100  $\mu$ L PBS de una suspensión de cultivo de *M. bovis* cepa 134, *M. bovis* cepa 182 y *M. bovis* AN5 respectivamente.



**Figura 10: Inoculación intratraqueal.** A: Se observa cánula rígida de punta esférica. B: Procedimiento de inoculación intratraqueal en un ratón sedado con isofluorano en cabina de seguridad biológica.

Este procedimiento se realizó en el laboratorio de patógenos del IB. Los animales se mantuvieron en *racks* de bioseguridad ventilados y fueron manipulados dentro de la cabina de seguridad biológica. Adicionalmente, el bioterio consta con una estación de cambiado (similar a cabina de seguridad biológica Clase II tipo 2A) diseñada para el recambio de camas y alimento.

Los ratones inoculados fueron identificados por marcación de las orejas y fueron distribuidos en 6 jaulas de confinamiento con 3 ratones en cada una.

Para el T0 se destinaron 3 animales de cada grupo para comprobar la correcta inoculación de los animales. Los restantes ratones inoculados, agrupados de a 3 por jaula, se los puso en contacto con otros 3 ratones no infectados (contactos sanos centinelas de infección) totalizando 6 ratones por jaula.

En los tiempos restantes, de cada grupo se evaluaron 5 animales inoculados y 5 sin inocular (contactos sanos centinelas de infección) manteniendo la relación 1-1 en cada jaula. En los animales inoculados, se evaluó la virulencia de las distintas cepas mientras en los contactos sanos, su capacidad de transmisión por contacto cercano durante los tiempos de exposición evaluados.

En los tiempos de eutanasia, se evaluó el peso en gramos de cada animal, el peso del bazo en gramos y se colectaron tanto bazo como pulmón. A partir de una porción de bazo y del pulmón completo se realizaron cultivos para recuperar las cepas por cultivo. El pulmón se procesó junto con 1 mL de PBS estéril mediante el uso de politrón (TH, Omni International - The homogenizer Company, USA), y se sembraron en una placa de petri con medio 7H10 adicionado con piruvato de sodio al 0,4%, ADC al 10% y Tween 10X al 0,05% por duplicado, sin diluir y con dilución 1/10. El bazo fue procesado por fricción en un portaobjetos con vidrio esmerilado para ser completamente homogenizado. Se tomaron 100  $\mu$ L del homogenato y se sembraron en una placa de petri con medio 7H10 adicionado con piruvato al 0,4%, ADC al 10% y Tween 10X al 0,05% en una dilución 1:2 con tritón al 0,1%. Tanto pulmones como

bazos fueron cultivados y se colocaron en estufa a 37 °C por 60 días y fueron observados de forma semanal.

En los casos en donde no se pudo obtener cultivo a partir de los órganos, y con el fin de confirmar la infección en los ratones inoculados y en los “contactos”, se realizó PCR-Rv2807 a partir de ADN extraído de los pulmones. En el caso de los animales inoculados, todos los pulmones de aquellos animales que tuvieron cultivo negativo (de pulmón y bazo), fueron procesados individualmente realizando una extracción a partir de tejido con el T-kit de INBIO HIGHWAY (Argentina), como fue especificado en la sección de “extracción de ADN” y posteriormente se realizó PCR-Rv2807 con ese ADN extraído. Para los “contactos”, se realizaron pools de los grupos separados por tiempo y cepa evaluada, excluyendo a los animales que tuvieran cultivo positivo (pulmón o bazo). La extracción de ADN y la PCR-Rv2807 fueron realizadas como fueron descritas previamente en la sección de “Extracción de ADN” e “Identificación y tipificación molecular de los aislamientos”.

El resto del homogenato de bazo fue procesado para la evaluación de las citoquinas INF $\gamma$ , IL-4 y TNF para evaluar la respuesta inmune que se generó en cada tiempo de eutanasia. Para ello se obtiene  $1 \times 10^5$  esplenocitos/pocillo y se estimularon por duplicado con PPD<sub>b</sub> (20mg/mL), un mitógeno *pokeweed* (2mg/mL) como control positivo y RPMI completo adicionado con antibiótico-antimicótico (Thermo-Fisher, USA), y con suero fetal bovino (Biotecnológico-Internegocios S.A., Argentina) como control negativo. Se toman los sobrenadantes a las 16 hs y 72 hs y se conservaron a -80 °C hasta que fueron procesados. Los sobrenadantes obtenidos a las 72 hs en todos los tiempos de eutanasia fueron unidos a *beads* marcados con el kit comercial BD™ *Cytometric Bead Array* (CBA) Flex Set system (Becton & Dickinson, USA). Se analizaron en un citómetro de flujo FACSCalibur (Becton & Dickinson, USA), en el CICVyA INTA.

La clasificación de las cepas como de mayor o menor virulencia se realizó en base a los siguientes criterios: las cepas más virulentas fueron aquellas que se recuperaron en un mayor número de los órganos de los ratones inoculados, que provocaron lesiones macroscópicas, mayor esplenomegalia y presentaron menor sobrevivencia de los animales y un perfil diferencial de citoquinas. Se consideró como más transmisibles aquellas cepas que infectaron un mayor número de animales contactos sanos en menor tiempo y que fueron recuperadas en mayor número de los órganos de los animales y un perfil diferencial de citoquinas.

Asimismo, como experiencia preliminar del grupo de trabajo, se evaluó la transmisibilidad de tres cepas de la colección del laboratorio de tuberculosis del Instituto de Biotecnología, dos de ellas fueron cepas de *M. bovis* (534 y 303) a las que

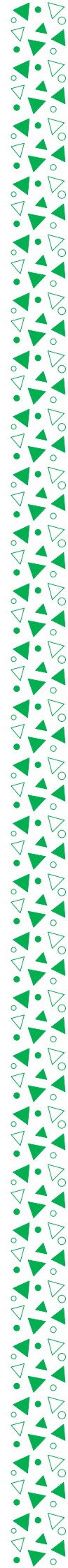
previamente se les había evaluado la virulencia (Aguilar Leon *et al.*, 2009; Zumárraga 2007; Marfil *et al.*, 2016 b).

Para el análisis estadístico de los datos obtenidos, utilizamos el programa GraphPad prism 6.0 (San Diego California USA, [www.graphpad.com](http://www.graphpad.com)). En aquellos casos donde los resultados obtenidos se comportaron de manera normal, utilizamos tests paramétricos (ANOVA y post-test Bonferroni de comparación múltiple con un  $\alpha=0,05$ ). Cuando con el test de Bartlett o Brown-Forsythe se observaron diferencias significativas entre los desvíos estándar ( $\alpha=0,05$ ), debieron ser utilizados test no paramétrico (Kruskal-Wallis y post-test de Dunn de comparación múltiple con un  $\alpha=0,05$ ) ya que no cumplían con el supuesto de homogeneidad de varianzas.

Los cambios con un  $p<0,05$  se consideraron significativos, mientras que si resultaron  $p<0,1$  se consideró marginalmente significativo.

Las experiencias contaron con los avales de los comités de ética del CICVyA INTA (CICUAE 30/2014; 63/2017) y de FVET-UBA (CICUAL 2015/28; 2015/46).

# RESULTADOS



## Resultados

Con el objetivo de detectar la presencia de *M. bovis* en órganos que pasaron en forma exitosa el control bromatológico de rutina en frigorífico, se realizó un muestreo en bocas de expendio de carne (carnicerías) y frigorífico. Se realizó cultivo bacteriológico, amplificación génica directamente a partir de los tejidos, y todos los aislamientos obtenidos fueron tipificados molecularmente.

### Toma de muestra en bocas de expendio y frigorífico.

Un total de 210 pulmones junto con los linfonódulos (en los casos en que estaban presentes), y 6 hígados bovinos fueron colectados en los 7 establecimientos seleccionados por conveniencia: 1 establecimiento de la Ciudad Autónoma de Buenos Aires (CABA) y 6 del conurbano bonaerense. Se recolectaron 8 pulmones en CABA (provenientes de una carnicería) mientras que del conurbano bonaerense 9 muestras se obtuvieron en comercios de zona norte (un supermercado y una carnicería), 156 de la zona oeste (un frigorífico y dos carnicerías) y 37 pulmones en un comercio de zona sur (una carnicería). Los 6 hígados se recolectaron en una carnicería de la zona oeste. En el frigorífico seleccionado, se recolectaron 137 pulmones y linfonódulos después de haber pasado con éxito la inspección bromatológica de rutina. Estos fueron revisados *in situ*, tomándose porciones representativas de los distintos lóbulos para su posterior procesamiento.

La tabla 1 resume la cantidad de muestras colectadas de cada establecimiento y las zonas geográficas de los mismos.

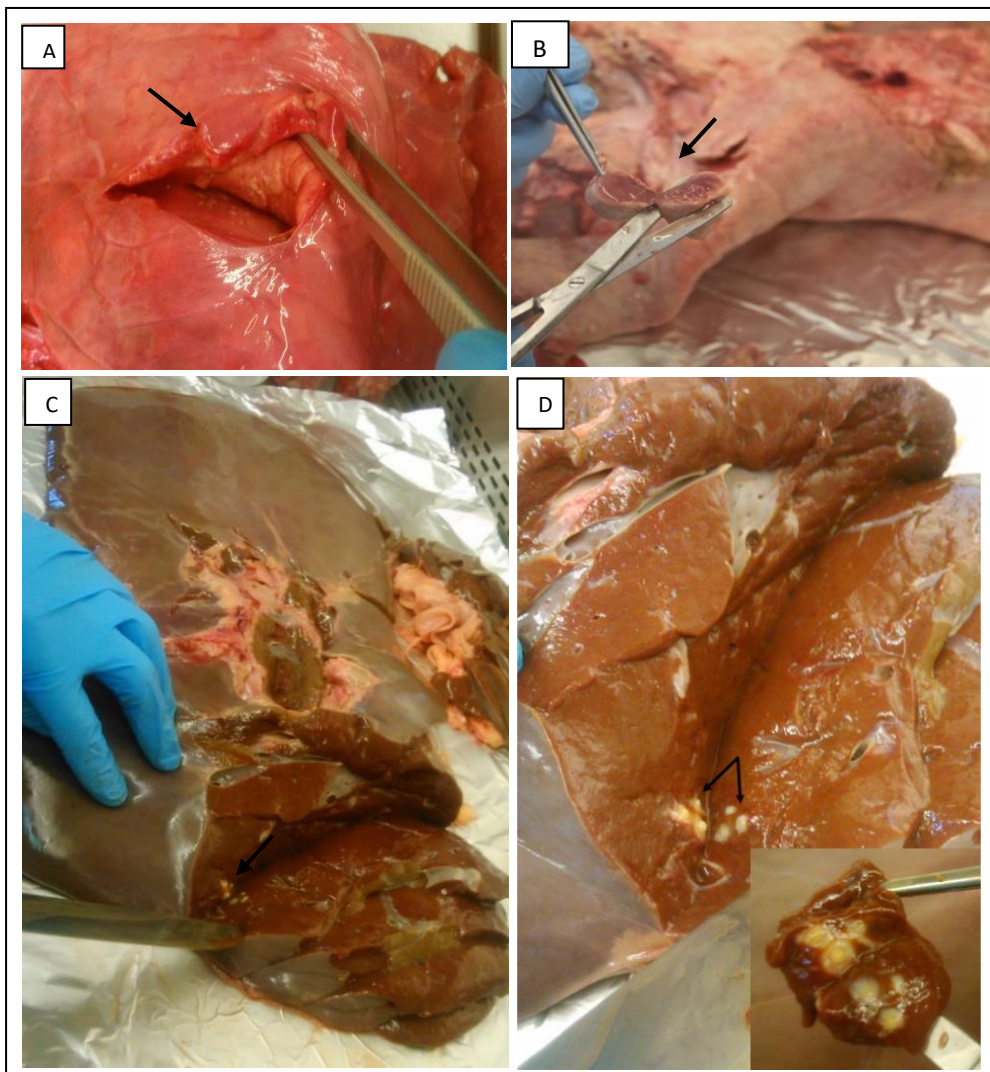
**Tabla1: Origen y cantidad de las muestras colectadas.** Total de muestras colectadas en los distintos establecimientos y zonas. CABA: Ciudad Autónoma de Buenos Aires; GBA: Gran Buenos Aires.

Tipo de establecimiento	Zona	Cantidad de muestras
Carnicería	GBA, Zona Oeste	4 Pulmones
Carnicería	GBA, Zona Oeste	15 Pulmones - 6 Hígados
Frigorífico	GBA, Zona Oeste	137 Pulmones
Carnicería Supermercado	GBA, Zona Norte	4 Pulmones
Carnicería	GBA, Zona Norte	5 Pulmones
Carnicería de Frigorífico	GBA, Zona Sur	37 Pulmones
Carnicería	CABA	8 Pulmones
		Total: 210 Pulmones, 6 Hígados



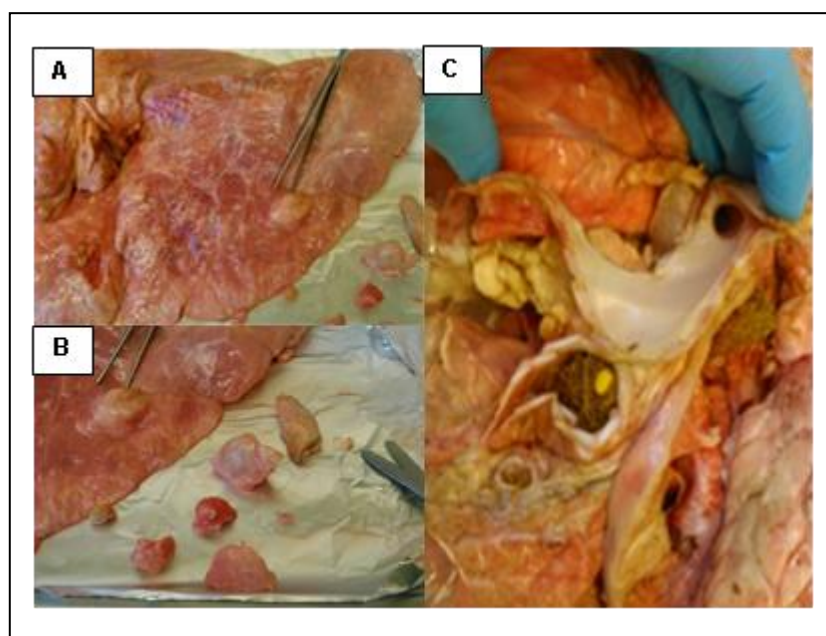
**Inspección macroscópica de los órganos (pulmón e hígado)**

Del total de muestras inspeccionadas macroscópicamente, el 12% (26/216) presentó lesiones, de las cuales 20, eran lesiones compatibles con tuberculosis (LCT) o linfadenitis. Las principales lesiones observadas en linfonódulos fueron agrandamiento, pérdida de la relación cortico-medular y cambios en la consistencia. Se encontraron lesiones tipo nodulares blanco-amarillentas en el parénquima pulmonar, todas ellas de variado tamaño (Figura 11 A y B). Una sola de las muestras de hígado presentó lesiones. Éstas eran pequeñas e internas, redondeadas con un diámetro de aproximadamente 2 cm, con un contenido blanco-amarillento, líquido, contenido dentro de una estructura capsular (Figura 11 C y D).



**Figura 11: Inspección macroscópicas de las muestras.** A: Pulmón bovino, se observa material caseoso en el interior del parénquima pulmonar. B: Linfonódulo bovino, se observa pérdida de la consistencia normal de la médula y de la relación cortico-medular. C: Hígado bovino, se observan 2 lesiones encapsuladas con material amarillento líquido denso en su interior. Las lesiones se encuentran dentro del parénquima y no deformaban la superficie del tejido. D: foto ampliada de la lesión en hígado.

También fueron encontrados pulmones con lesiones no compatibles con TBB, como la presencia de quistes hidatídicos (pulmón N° 194) (Figura 12 A y B), una masa nodular hemorrágica de aproximadamente 1,5 cm de diámetro (pulmón N° 168) y la presencia de alimento en las vías aéreas inferiores (N° 193) (Figura 12 C).

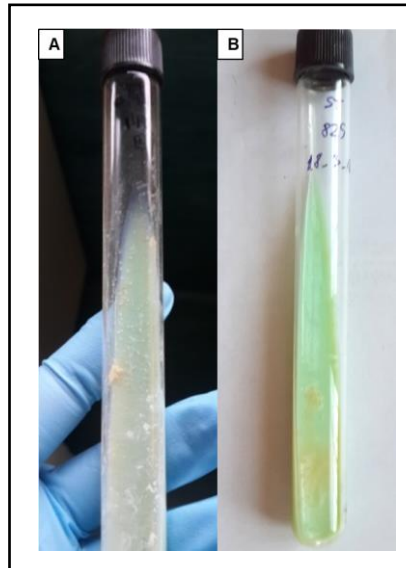


**Figura 12: Lesiones no LCT en pulmones comercializados.** A: Múltiples quistes hidatídicos de distinto desarrollo en el parénquima pulmonar B: Imagen ampliada de los quistes encontrados en el pulmón N° 194. C: Pulmón bovino, se observa alimento en las vías aéreas inferiores.

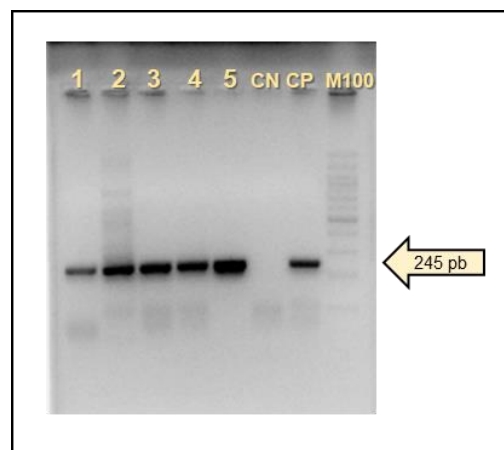
### **Bacteriología: Obtención de aislamientos mediante cultivo.**

Se realizaron un total de 235 cultivos (197 cultivos en el medio Stonebrink en el IP y 19 cultivos en los 2 medios Löwenstein Jensen y Stonebrink, en FCV), siguiendo los protocolos de rutina de cada laboratorio. Se obtuvieron 18 aislamientos a partir de 17 muestras, que fueron positivos por la tinción de Ziehl-Neelsen, indicando la presencia de BAAR. Para la identificación de especies del CMT, se realizó *colony* PCR-IS6110 (Figura 13). Cinco aislamientos fueron identificados como pertenecientes al CMT, uno obtenido a partir de un hígado bovino (muestra N° 182) y los restantes correspondieron a 4 pulmones procesados en conjunto con sus respectivos linfonódulos (muestras N° 134, N° 179, N° 184 y N° 719) (Tabla 2). El pulmón N° 134 y el hígado N° 182 presentaron LCT, un nódulo granulomatoso pequeño y un nódulo con contenido caseoso licuefactivo, respectivamente. El aislamiento N° 719 no pudo ser recuperado por repique en medio sólido o líquido sintético. Sin embargo, se contó con suficiente ADN obtenido a partir del aislamiento primario para realizar su caracterización molecular. Todos los aislamientos obtenidos fueron conservados a -80°C hasta su procesamiento.

A partir del cultivo bacteriológico (Figuras 13 A y B) y confirmación por PCR-IS6110, se obtuvieron un total de 5 aislamientos del CMT (Figura 14), que fueron obtenidos a partir del procesamiento de 4 pulmones con sus respectivos linfonódulos (1 colectado en frigorífico post inspección bromatológica y 3 adquiridos en carnicerías) y de un hígado adquirido en una carnicería (Tabla 2).



**Figura 13: Cultivos bacteriológicos positivos.** A y B son aislamientos del CMT obtenidos en medio de cultivo Stonebrink.



**Figura 14: Aislamientos positivos por PCR-IS6110.** Gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio (0,5 $\mu$ L/mL) en el que se observa la amplificación de IS6110 a partir de los cultivos obtenidos en el medio de Stonebrink. El producto de PCR amplificado fue de 245 pb, y el utilizó un marcador de peso molecular de 100 pb (100bp DNA Ladder, Promega).

**Tabla 2: Aislamientos obtenidos.** Se puede observar el origen y el tipo de muestra de los que fueron obtenidos. GBA: Gran Buenos Aires; LN: Linfonódulos.

Aislamiento	Origen	Muestra
134	Frigorífico, Zona Oeste	Pulmón y LN
719	GBA, Zona Norte	Pulmón y LN
179	GBA, Zona Oeste	Pulmón y LN
182	GBA, Zona Oeste	Hígado
184	GBA, Zona Oeste	Pulmón y LN

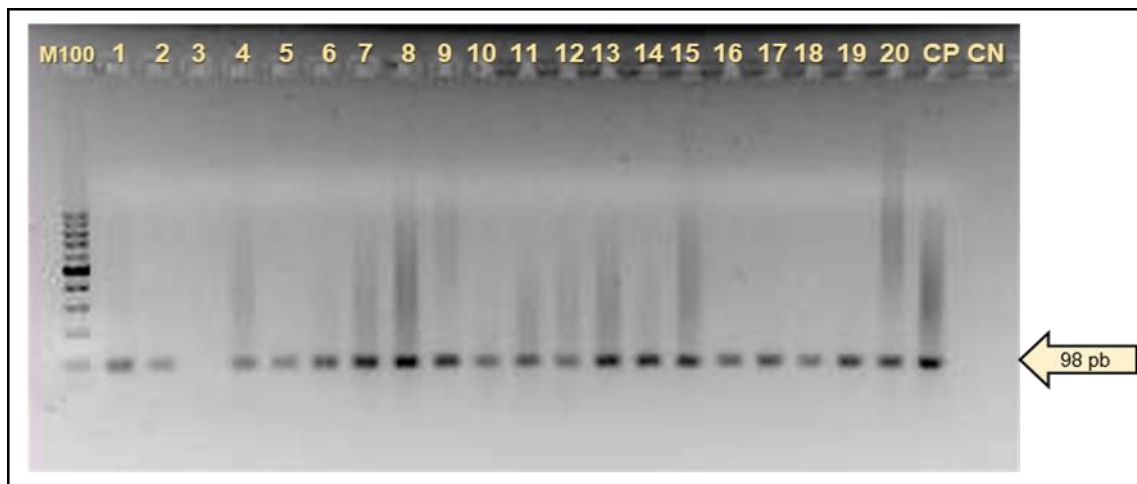
### **Detección molecular del CMT a partir de las muestras de tejido**

Con el objetivo de incrementar la sensibilidad en la detección de micobacterias presentes en las muestras, se realizó la detección molecular por PCR a partir de fracciones de los tejidos de hígado y pulmón. Para llevar a cabo este procedimiento, se realizó la extracción de ADN a partir de pequeñas porciones de tejido (aproximadamente 25 mg, equivalente al tamaño de un “grano de arroz”), mediante la utilización de diferentes kits comerciales. Se extrajo ADN de las 216 muestras de órganos. Para detectar la posible presencia de inhibidores de la polimerasa, se amplificó un fragmento de 98 pb del gen que codifica  $\beta$ -actina (bovino). En aquellas extracciones que fueron negativas a  $\beta$ -actina, se realizaron nuevas extracciones de ADN y fueron re-procesadas para evaluar la amplificación de este gen. Finalmente el total de las muestras pudo ser amplificado indicando que el proceso de extracción y purificación del ADN extraído directamente a partir de los tejidos fue eficiente (Figura 15). Luego, todas muestras fueron sometidas a PCR para la detección de las secuencias específicas de las especies que integran el CMT (PCR IS-6110 y Rv-2807). Como se mencionó previamente, 20 muestras presentaban LCT, tomándose estas como muestra, mientras que cuando no se evidenciaron LCT, se tomaron muestras representativas del tejido sano o lesionado por otras causas y también los linfonódulos.

Se detectaron 30 extracciones de ADN positivas para PCR-IS6110, pero las amplificaciones de éstas presentaban bandeados y amplificaciones inespecíficas. Sólo 5 de ellas fueron reconfirmadas por PCR-Rv2807. Solo de una de estas muestras positivas a ambas secuencias, se obtuvo un cultivo positivo.

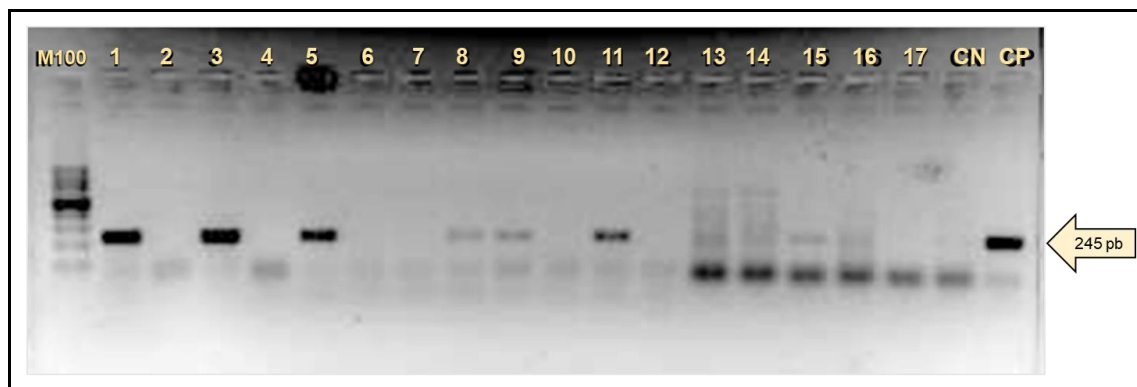
Para esta actividad se utilizaron 3 kits de extracción de ADN genómico de distintas casas comerciales, adaptando los protocolos, de acuerdo a lo que se describe en la sección metodológica. Al obtenerse resultados comparables en la eficiencia de la

extracción de ADN se optó por utilizar el de menor costo INBIO HIGHWAY T-kit de fabricación nacional.

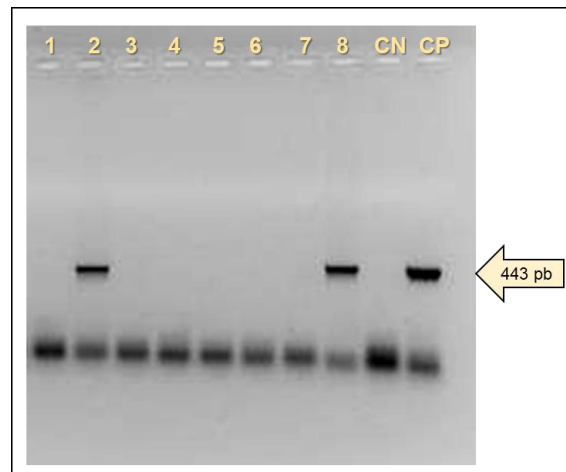


**Figura 15: PCR  $\beta$ -actina.** Gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio ( $0,5\mu\text{L}/\text{mL}$ ) mostrando la amplificación de  $\beta$ -actina (98 pb). Se observa amplificación positiva en todos los casos, a excepción de la muestra N° 3. Como control positivo (CP) se utilizó ADN extraído a partir de un tejido con aislamiento positivo y como control negativo de la PCR (CN) se utilizó agua. Se empleó un marcador de peso molecular de 100 pb (100 pb DNA Ladder, Promega).

A partir del cultivo de las muestras y posterior confirmación por PCR-IS6110 y de las PCR-IS6110 y Rv2807 aplicadas directamente a partir de tejido (Figuras 16 y 17), se puso en evidencia la presencia de micobacterias del CMT en 5 muestras estudiadas, constituyendo posibles escapes al sistema de vigilancia bromatológica.



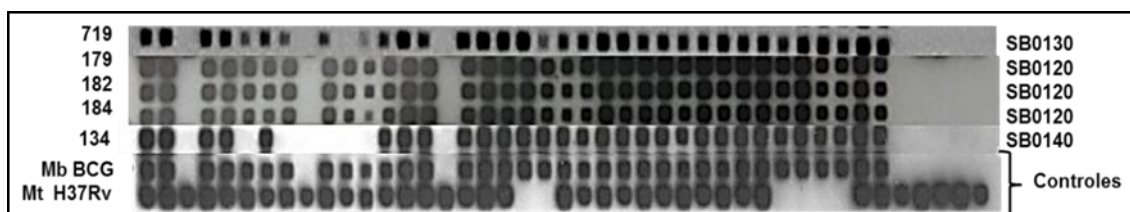
**Figura 16: PCR-IS6110.** Gel de agarosa al 2% representativo teñido con bromuro de etidio ( $0,5\mu\text{L}/\text{mL}$ ), Se observan los productos de PCR de 245 pb de PCR IS6110 de las muestras de tejido. Como control positivo (CP) se utilizó un cultivo de *M. bovis* y como control negativo (CN) se utilizó agua. Se utilizó un marcador de peso molecular de 100 pb (100 pb DNA Ladder, Promega).



**Figura 17: PCR-Rv2807.** Gel de agarosa al 2% representativo teñido con bromuro de etidio (0,5  $\mu$ L/mL). Se observan los productos de PCR de 443 pb de PCR-Rv2807 de las muestras de tejido. Como control positivo (CP) se utilizó un cultivo de *M. bovis* y como control negativo (CN) se utilizó agua.

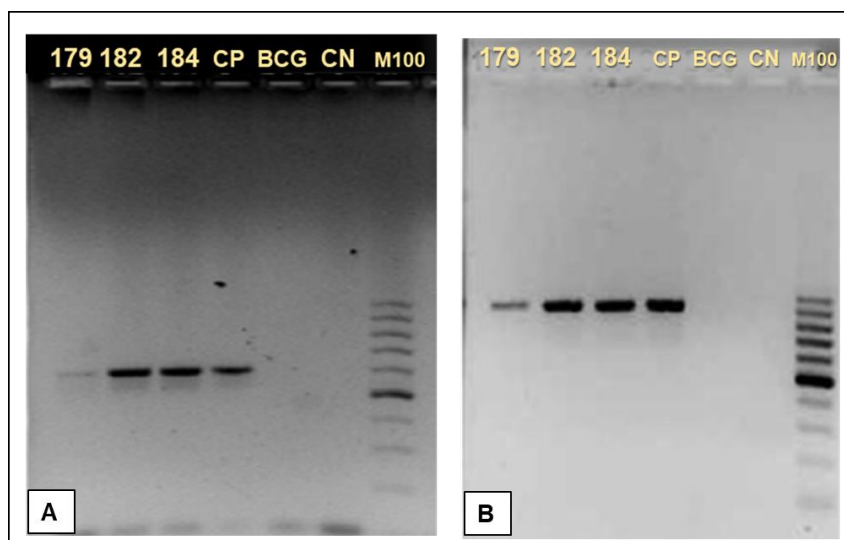
### **Tipificación molecular de los aislamientos del CMT:**

Los 5 aislamientos identificados por PCR como pertenecientes al CMT, fueron tipificados por Spoligotyping, cuyo espoligotipo fue característico de *M. bovis* por la ausencia de los espaciadores 3, 9, 16 y 39 a 43. Se detectaron los espoligotipos SB0140 (aislamiento N° 134), el SB0130 (aislamiento N° 719) y el SB0120 (n=3) (aislamientos N° 179, 182 y 184) (Figura 18).



**Figura 18: Espoligotipos correspondientes a los 5 aislamientos de *M. bovis*.** Se observan los espoligotipos de los aislamientos de *M. bovis* 719, 179, 182, 184 y 134. Se utilizaron como controles *M. bovis* cepa BCG y *M. tuberculosis* cepa H37Rv.

El espoligotipo SB0120 es el característico de la cepa vacunal *M. bovis* BCG, aunque también ha sido detectado en aislamientos salvajes (Zumárraga *et al.*, 1999 a; Zumárraga *et al.*, 2013; Barandiaran *et al.*, 2011). Si bien la probabilidad de contaminación en el laboratorio con la cepa vacunal *M. bovis* BCG era extremadamente baja, se completó la tipificación mediante MIRU-VNTR y adicionalmente, se realizó la amplificación de los genes *esxA* y *esxB* ausentes en *M. bovis* BCG debido a la delección de la región de diferencia RD1 (Figura 19 A y B) (Lewis *et al.*, 2003; Marfil *et al.*, 2018).

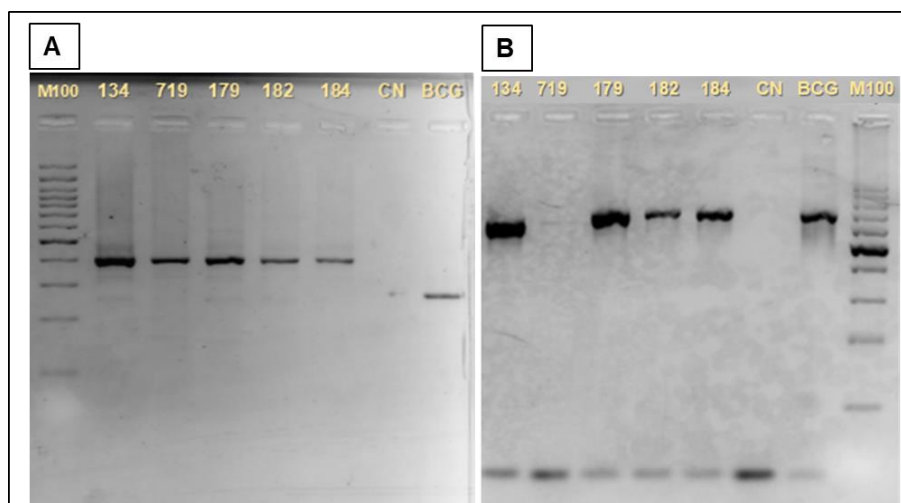


**Figura 19: Resultados de las PCR realizadas.** Geles de agarosa mostrando los productos de las PCR de *esxA* (A) y *esxB* (B). Los números 179, 182 y 184 corresponden a cada uno de los aislamientos de *M. bovis* con espoligotipo SB0120. CP: Control positivo, aislamiento salvaje de *M. bovis*. CN: Control negativo, agua; BCG: *M. bovis* BCG cepa Pasteur. Se utilizó un marcador de peso molecular de 100 pb (100bp DNA Ladder, Promega).

Con el objetivo de incrementar el poder discriminatorio de la técnica de Spoligotyping, se empleó la técnica de MIRU-VNTR. A partir del análisis de los 12 loci, se identificaron 3 patrones diferentes en los 5 aislamientos evaluados (Tabla 3). Las 3 muestras con el mismo patrón MIRU-VNTR también tuvieron el mismo espoligotipo. Sin embargo, el patrón de MIRU-VNTR de *M. bovis* BCG se diferenció de estos 3 aislamientos, con quien compartían el espoligotipo, por presentar alelos diferentes en los loci 4, 16, 27, 31 y 39 (Tabla 3). Diferencias en los alelos de los locus 4 y 16 se pueden observar en la figura 20. En la tabla 4 se pueden observar los alelos obtenidos para cada locus evaluado, así como el espoligotipo obtenido.

**Tabla 3: Patrones MIRU-VNTR de los aislamientos de *M. bovis*.** Se observan los alelos obtenidos para cada locus y el patrón de VNTR de cada uno de los aislamientos de *M. bovis*.

Muestra	Locus MIRU-VNTR												Patrones VNTR
	2	4	10	16	20	23	24	26	27	31	39	40	
134	2	3	3	3	2	4	2	5	3	3	2	2	VNTR 233324253322
719	2	3	2	2	1	4	2	5	3	3	2	2	VNTR 232214253322
179	2	3	2	3	1	4	2	5	1	2	1	2	VNTR 232314251212
182	2	3	2	3	1	4	2	5	1	2	1	2	VNTR 232314251212
184	2	3	2	3	1	4	2	5	1	2	1	2	VNTR 232314251212
BCG	2	1	2	1	1	4	2	5	3	3	2	2	



**Figura 20: Amplificaciones representativas de algunos de los loci MIRU-VNTR en los aislamientos de *M. bovis* y de *M. bovis*-BCG.** Se observan las amplificaciones para cada uno de los aislamientos y control positivo *M. bovis*-BCG y negativo (agua) de los loci 4 (A) y 16 (B). Se muestran los alelos correspondientes a cada *locus*.

**Tabla 4: Identificación genotípica de los aislamientos de *M. bovis* obtenidos.** Resumen de los resultados de la genotipificación de los aislamientos de *M. bovis*. Se indica el origen, el tipo de muestra, el resultado de la PCR-IS6110, el espoligotipo y el patrón MIRU-VNTR. GBA: Gran Buenos Aires; LN: linfonódulo.

Aislamiento	Origen	Muestra	PCR-IS6110	Espoligotipo	MIRU-VNTR
134	Frigorífico, Zona Oeste	Pulmón y LN	positivo	SB0140	233324253322
719	GBA, Zona Norte	Pulmón y LN	positivo	SB0130	232214253322
179	GBA, Zona Oeste	Pulmón y LN	positivo	SB0120	232314251212
182	GBA, Zona Oeste	Hígado	positivo	SB0120	232314251212
184	GBA, Zona Oeste	Pulmón y LN	positivo	SB0120	232314251212

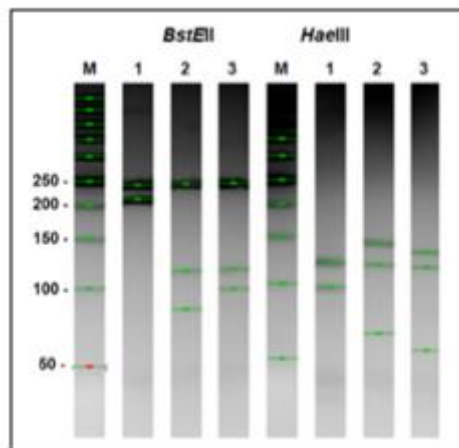
### **Identificación molecular de las MNT:**

Del total de los 18 aislamientos obtenidos por cultivo a partir de los órganos procesados, que fueron positivos a la tinción de Ziehl Neelsen, 13 (todos aislados en medio Stonebrink y 2 adicionalmente en medio Löwenstein Jensen) fueron negativos por PCR-IS6110, sugiriendo la presencia de MNT. Con el objetivo de identificar a estos aislamientos, se emplearon técnicas moleculares con el soporte de las bases de datos públicas respectivas.

El primero de estos 13 aislamientos, obtenido en medio Stonebrink a partir de un pulmón recolectado en un frigorífico luego de la inspección bromatológica de rutina, fue tipificado por PRA. Se obtuvieron los siguientes fragmentos de restricción: *Bst*EII:



235; 120 y 100pb y *HaeIII*: 145; 130 y 60pb (Figura 21); correspondiéndose con el patrón de *M. intracellulare* según la base de datos PRAsite (<http://app.chuv.ch/prasite/index.html>) (Marfil *et al.*, 2016 a). Seguidamente, para confirmar el resultado obtenido, se completó la tipificación mediante la secuenciación del gen 16S ARNr. El análisis y comparación de la secuencia de ADN mediante BLAST en las bases de datos NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) y RDP (*Ribosomal Database Project*), permitió la identificación de *M. intracellulare* con un 99,9% y 98,8% de identidad, respectivamente (Marfil *et al.*, 2016 a).



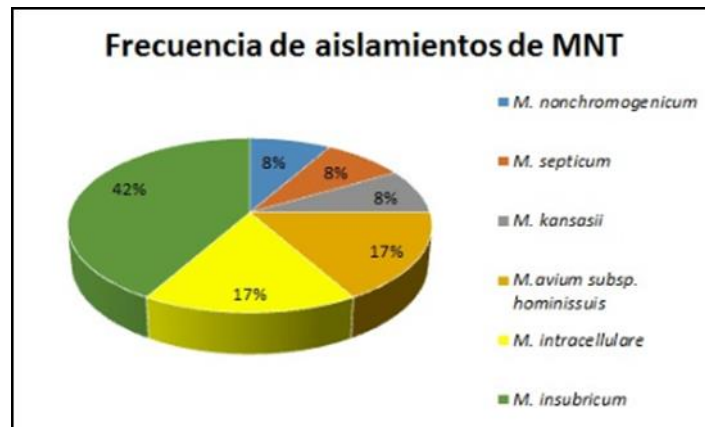
**Figura 21: Patrones de restricción de PRA.** Imágenes del gel de agarosa al 4%, procesadas con el software BioNumerics. 1) *M. avium* subsp. *avium*; 2) *M. bovis*; 3) *M. avium* subsp. *intracellulare*; M: Marcador de peso molecular 50pb (50bp DNA Ladder , Promega).

El resto de los aislamientos BAAR positivos y PCR-IS6110 negativos, fueron tipificados mediante la secuenciación de los genes *hsp65*, 16S ARNr y *rpoB*, (Tabla 5). Todos los aislamientos pudieron ser amplificados para el gen que codifica el ARN ribosomal 16S. Sin embargo, para *hsp65* se obtuvo amplificación en suficiente cantidad para secuenciar en 10 de los aislamientos, mientras que para el gen *rpoB*, en 8 de los aislamientos.

**Tabla 5: Identificación molecular mediante secuenciación de los genes 16S ARNr, hsp65 y rpoB.** Se indica la identidad (%) en las bases de datos consultadas NCBI, RDP, *Mycobacterium* 65Kilodalton Heat Shock Protein Gene BLAST. En “negrita” se indican las identidades de las secuencias consensuadas por al menos 2 genes.

Muestra	Medio	Secuenciación 16S ARNr	Identidad (%)		Secuenciación hsp65	Identidad (%)		Secuenciación rpoB	Identidad (%)	Identificación
			NCBI	RDP		NCBI	<i>Mycobacterium</i> hsp65			
4	ST	<i>M. intracellulare</i>	99,9	98,8	<i>M. intracellulare</i> identificado con PRA	-	-	sec. B/C	-	<b><i>M. intracellulare</i></b>
60	ST	<i>M. nonchromogenicum</i>	98	90	<i>M. nonchromogenicum</i>	99	98	sec. B/C	-	<b><i>M. nonchromogenicum</i></b>
77	ST	<i>M. insubricum</i>	99	92	<i>M. insubricum</i>	99	99	<i>M. insubricum</i>	100	<b><i>M. insubricum</i></b>
87	ST	<i>M. insubricum</i>	99	95	sec. B/C	-	-	sec. B/C	-	<i>M. insubricum</i>
88	ST	<i>M. insubricum</i>	100	100	<i>M. insubricum</i>	100	100	<i>M. insubricum</i>	99	<b><i>M. insubricum</i></b>
115	ST	<i>M. wolinskyi</i>	98	95,8	<i>M. insubricum</i>	99	99	<i>M. insubricum</i>	99	<b><i>M. insubricum</i></b>
123	ST	<i>M. porcinum</i> ; <i>M. fortuitum</i> ; <i>M. neworleansense</i> ; <i>M. septicum</i>	98,3-100	100	<i>M. brisbanense</i>	99	99	<i>M. septicum</i> , <i>Mycobacterium</i> sp., <i>M. peregrinum</i>	99	<b><i>M. septicum</i></b>
125	ST	<i>M. intracellulare</i> ; <i>M. yongonense</i> ; <i>M. colombiense</i> ; <i>M. bouchederhonenese</i>	100	100	<i>M. avium</i> , <i>M. intracellulare</i>	100	96	<i>M. vulneralis</i> , <i>M. bouchederhonenese</i>	98-99	<b><i>M. bouchederhonenese</i>, <i>M. intracellulare</i></b>
136	ST	<i>M. insubricum</i>	99	98,3	<i>M. insubricum</i>	100	100	<i>M. insubricum</i>	100	<b><i>M. insubricum</i></b>
143	ST	<i>Corynebacterium</i> sp.	99	99,1	<i>Nocardia</i> ( <i>asiatica</i> , <i>cyriaciorgica</i> , <i>cerradonensis</i> )	90	90	<i>Corynebacterium</i> sp.	99	<b><i>Corynebacterium</i> sp</b>
179	ST	<i>M. kansasii</i>	100	100	<i>M. kansasii</i>	84	88	sec. B/C	-	<b><i>M. kansasii</i></b>
717	ST y LJ	Complejo <i>M. avium</i>	100	100	sec. B/C	-	-	sec. B/C	-	<i>M. avium</i> subsp. <i>hominissuis</i> *
720	ST y LJ	Complejo <i>M. avium</i>	100	100	<i>M. avium</i> subsp. <i>paratuberculosis</i> , <i>M. Colombiense</i> , <i>M. avium</i> subsp. <i>avium</i> , <i>M. intracellulare</i> , <i>M. avium</i> , <i>M. avium</i> subsp. <i>hominissuis</i>	100	100	<i>M. avium</i> subsp. <i>Hominissuis</i> ; <i>M. avium</i> subsp. <i>avium</i>	100	<b><i>M. avium</i> subsp. <i>hominissuis</i>*</b>

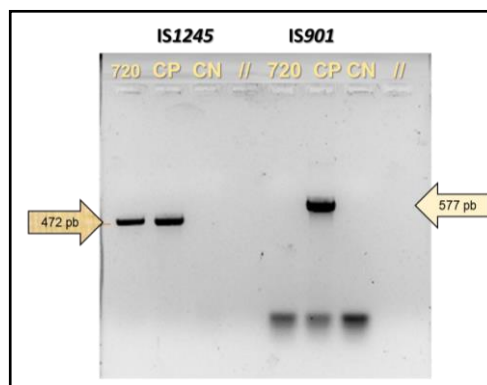
Del total de aislamientos de MNT obtenidos, el 42% fue identificado como *M. insubricum*, mientras que el 17% fue identificado como *M. intracellulare* y *M. avium* subsp. *hominissuis* (Figura 22).



**Figura 22: Aislamientos de MNT.** Proporción de los aislamientos de MNT obtenidos.

Los aislamientos 717 y 720 fueron identificados por secuenciación del gen 16S ARNr y *hsp65* como pertenecientes al complejo *M. avium*. Por este motivo, se realizó la identificación de la subespecie por PCR en base a las secuencias de inserción IS1245 e IS901. La amplificación de IS1245 fue positiva mientras que la de IS901 fue negativa en ambos casos indicando la presencia de *M. avium* subsp. *hominissuis* (Figura 23).

Uno de los aislamientos obtenidos (N° 143) con tinción de Ziehl Neelsen positiva, fue identificado como *Corynebacterium* sp. Esta bacteria, que pertenece al orden de los *Actinomycetales* al igual que las micobacterias, puede ser identificada en lesiones granulomatosas como en este caso, ya que el órgano (pulmón) del cual fue aislada presentaba una pequeña lesión. Esta muestra fue adquirida en una carnicería de la zona sur de GBA.



**Figura 23: Amplificación por PCR de las secuencias de inserción IS1245 e IS901.** Gel de agarosa al 2% mostrando la amplificación de IS1245 e IS901 del aislamiento N° 720. La PCR positiva de IS1245 (Complejo *M. avium*) pero negativa de IS901 es indicativo de la presencia de *M. avium* subsp. *hominissuis*. C+: control positivo *M. avium* subsp. *avium*; C-: control negativo (agua).

### **Co-aislamiento *M. bovis*-*M. kansasii***

El aislamiento correspondiente a la muestra N° 179 (Pulmón adquirido de zona oeste del GBA), tuvo una coloración amarillo-anaranjada en el aislamiento primario obtenido en el medio de cultivo Stonebrink. Sin embargo, fue igualmente evaluado por PCR-IS6110 como todos los otros aislamientos obtenidos, resultando positivo e indicando la presencia de secuencias genómicas de micobacterias del CMT que fueron confirmadas por PCR-Rv2807. Asimismo, también se tipificó por Spoligotyping mostrando un espoligotipo característico de *M. bovis* (SB0120) y también por MIRU-VNTR (patrón 232314251212) (Tabla 4). Estos resultados eran indicativos de la presencia de *M. bovis* y de otra MNT.

Al ser repicado en medio sintético (Middlebrook 7H10, Difco) para obtener colonias aisladas para realizar la extracción de ADN para la posterior identificación por secuenciación, fue posible separar la MNT de *M. bovis*. Sin embargo, no fue posible obtener el aislamiento de *M. bovis* en pureza, posiblemente debido a las mayores exigencias de ésta para su crecimiento. Por otra parte, el desarrollo obtenido en el medio de cultivo sintético no fue pigmentado a pesar de tratarse de la MNT.

Por secuenciación de los genes 16S ARNr, *hsp65* (con un porcentaje de identidad del 100% y del 84% respectivamente) se confirmó la presencia de *M. kansasii*, especie de crecimiento lento y fotocromógena. El gen *rpoB* no pudo ser analizado debido a la mala calidad de esta secuencia.

Debido a que esta especie puede interferir en el diagnóstico de la tuberculosis bovina y a la importancia de haberlo obtenido como un posible co-aislamiento con *M. bovis* se secuenció su genoma completo para compararlo con los de *M. bovis* y *M. tuberculosis*.

### **Secuenciación del Genoma completo de un aislamiento de *M. kansasii*:**

Los datos enviados por el servicio de secuenciación fueron analizados. El tamaño del genoma era mayor al de *M. bovis* por 2 millones de pb, con lo cual decidimos realizar un BLAST *microbe* con cada *contig* ensamblado, contra la base de datos del NCBI.

Se secuenció el genoma completo del aislamiento de *M. kansasii* 16-2700. Este número se le asignó como número interno de identificación cuando fue enviado al secuenciador y lo conservamos para no utilizar el número de la muestra (N° 179), con el que ya habíamos identificado al aislamiento de *M. bovis*. Este aislamiento fue obtenido de un pulmón bovino procedente de una carnicería del conurbano bonaerense (Muestra N° 179) sin lesiones visibles. El genoma secuenciado se obtuvo utilizando la tecnología de MiSeq (Illumina). Se obtuvieron 2.281.114 lecturas *pair-end* iniciales, 761.835 lecturas *pair-end* y 1.492.657 *singletons* después del control de

calidad utilizando la herramienta *FASTQC* y *Trimomatic* 0.36 (2014), llegando a la sumatoria de 432 Mpb.

Se ensamblaron los *reads* y los *contigs* resultantes se ordenaron en base al genoma de *M. kansasii* ATCC 12478, disponible en la base de datos del NCBI, con la herramienta Mauve (*Multiple genome alignment*, Darling Lab). Se obtuvo un genoma de 6.415.678 pb luego del ensamblado, representado en 154 *contigs* (siendo el más largo de un tamaño de 373.015 pb), con un N<sub>50</sub> de 110.421 pb y una cobertura de 100X. El contenido de GC fue de 66,2%.

Se realizó la anotación del genoma con el programa RAST (*Rapid Annotation using Subsystem Technology*, Version 2.0) usando el esquema de anotación de ClassicRAST y con PROKKA (*rapid prokaryotic genome annotation*). Se identificaron un total de 5.924 secuencias codificantes y un total de 49 genes codificantes para ARN.

Los datos obtenidos fueron comparados con los disponibles en NCBI para las cepas de referencia de *M. kansasii* (*M. kansasii* ATCC 12478) y *M. bovis* (*M. bovis* AF2122/97) (Tabla 6). En la sección de anexos se encuentra una tabla que detalla los aislamientos de *M. kansasii* disponibles en la base de datos de NCBI *genomes*.

**Tabla 6: Datos comparativos entre el aislamiento *M. kansasii* 16-2700 y las cepas de referencia *Mycobacterium kansasii* ATCC 12478 y *Mycobacterium bovis* AF1222/97.** Se indica la cepa, su origen, el tamaño del genoma, los genes que codifican ARN, el % de GC y el número de genes.

Cepa	Origen	Tamaño (Mb)	ARN	%GC	Genes
<i>Mycobacterium kansasii</i> ATCC 12478	Humano (enfermedad pulmonar), Canada	6,577230	52	66,19	5631
<i>Mycobacterium kansasii</i> 16-2700	Bovino (pulmón), Argentina	6,415678	49	62	5924
<i>Mycobacterium bovis</i> AF2122/97	Bovino, Gran Bretaña	4,345492	50	65,5	3951

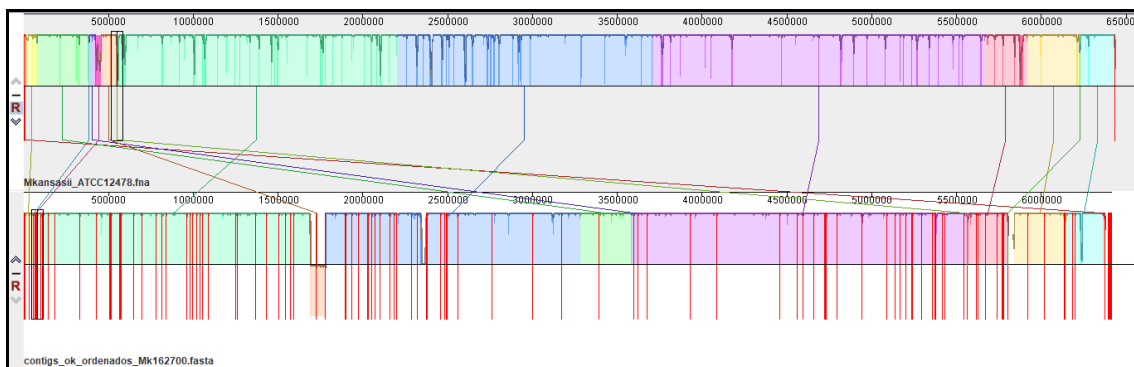
Se comparó con el genoma de referencia de la cepa *M. bovis* AF2122/97 para realizar una predicción de distintas mutaciones: inserciones, deleciones, sustituciones de base única (SNP), sustituciones de bases múltiples (SUB), amplificaciones y elementos móviles (MOB) usando el programa *breseq* (Deatherage, D.E., Barrick, J.E., 2014). Para la comparación se empleó el genoma de referencia de la cepa *M. bovis* AF2122/97. A partir de este análisis se obtuvo un total de 123.736 mutaciones, de las cuales 108.453 fueron SNPs. Estudiamos la presencia de SNPs en los genes de interés que incluyeron factores de virulencia como *rfaA*, de importancia para el diagnóstico como *esxA*, *esxB*, *mb3645c* y de resistencia a antibióticos tuberculostáticos como *rpoB*, *inhA*, *katG*.

En el gen *rfpA*, que está asociado a la resucitación del estado de latencia de las micobacterias (Rickman *et al.*, 2005), se detectaron 28 SNPs, de los cuales 10 fueron no sinónimos.

Los genes *esxA*, *esxB* y *mb3645c* codifican para las proteínas ESAT-6, CFP-10 y EspC respectivamente y son los antígenos T más relevantes desde el punto de vista del diagnóstico (Encinas *et al.*, 2018). Los genes *esxA* y *esxB* se encuentran en la región DR dispuestos de forma contigua, separados por una región intragénica de 33 pb en el genoma de la cepa de referencia *M. bovis* AF2122/97. En el gen *esxA* de *M. bovis* 16-2700, se detectaron 20 SNPs sinónimos, mientras que en el gen *esxB* se detectaron 27 SNPs, 5 de ellos fueron no sinónimos. El gen *mb3645c*, que codifica para la proteína EspC no presentó mutaciones.

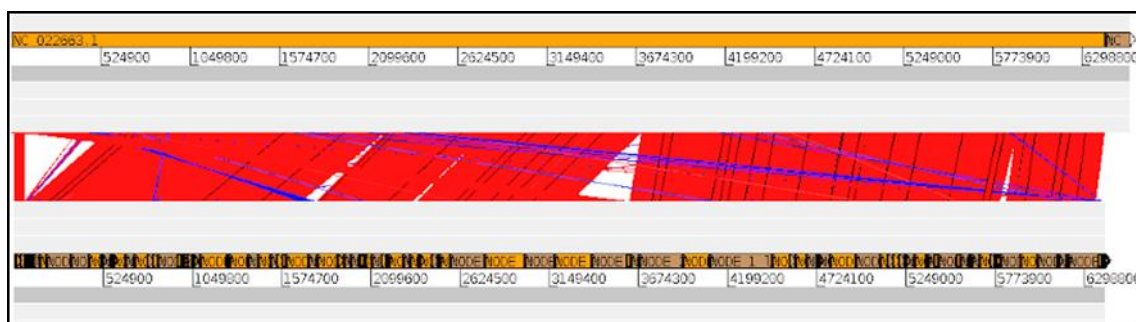
Los genes *rpoB*, *inhA* y *katG* son genes que se relacionan con la resistencia a antibióticos (el primero con la resistencia a RIF mientras que mutaciones en los 2 genes restantes se asocian a resistencia a INH). Se detectaron 261 SNPs en el gen *rpoB* (27 no sinónimos), 74 SNPs en *inhA* (11 no sinónimos) y 37 en *katG* (7 no sinónimos).

El genoma obtenido también fue comparado con el de *M. kansasii* ATCC 12478 y el de su plásmido pMK12478. El genoma de la muestra 16-2700, pudo ser identificada por BLAST como *M. kansasii*. Pudimos observar que nuestro aislamiento carecía del plásmido, ya que no obtuvimos alineamientos por BLAST con las secuencias de éste y tampoco al usar la herramienta informática *PrimerMap* (Sequence Manipulation Suite, Canadá), con la que realizamos una PCR *in silico* buscando el plásmido en el genoma. La comparación de *M. kansasii* 16-2700 y el genoma de referencia por Mauve aportó información del ordenamiento de los genes y la ausencia en el genoma de *M. kansasii* 16-2700 de algunos genes que codifican para proteínas oxidoreductasas NAD(P) dependientes de la familia SDR; proteínas de la familia PE y de la familia PPE, aminotransferasas clase III entre otras (Figura 24).



**Figura 24: Alineamiento de las secuencias de *M. kansasii* ATCC 12478 y de *M. kansasii* 16-2700.** Se utilizó la herramienta Mauve. Los bloques de igual color indican sintenia entre las secuencias. Los contigs en el genoma de *M. kansasii* 16-2700, se muestran con líneas rojas.

El genoma fue comparado por la herramienta ACT (*Artemis Comparison Tool*), lo que evidenció una gran similitud entre las dos cepas. El ordenamiento de los *contigs* de *M. kansasii* 16-2700 presenta gran similitud al de la cepa de referencia (Figura 25).



**Figura 25: Comparación del genoma de referencia *M. kansasii* ATCC 12478 y el genoma de *M. kansasii* 16-2700.** Se utilizó la herramienta ACT (*Artemis Comparison Tool*). Las líneas rojas las líneas rojas indican bloques colineales locales de similitud entre ADN-ADN; mientras que las líneas azules indican las regiones reorganizadas.

### **Evaluación del perfil de resistencia resistencia de los aislamientos de *M. bovis*:**

Se evaluó el perfil de resistencia a drogas de primera línea de los 3 aislamientos de *M. bovis* recuperados en medio sólido Middlebrook 7H10 (Difco) (N° 134, 182 y 184), mediante métodos fenotípicos y moleculares.

La evaluación fenotípica se realizó mediante los métodos previamente descritos, MGIT 960 SIRE kit y microdilución en placa, en el Hospital Dr. Cetrángolo de Vicente López, provincia de Buenos Aires.

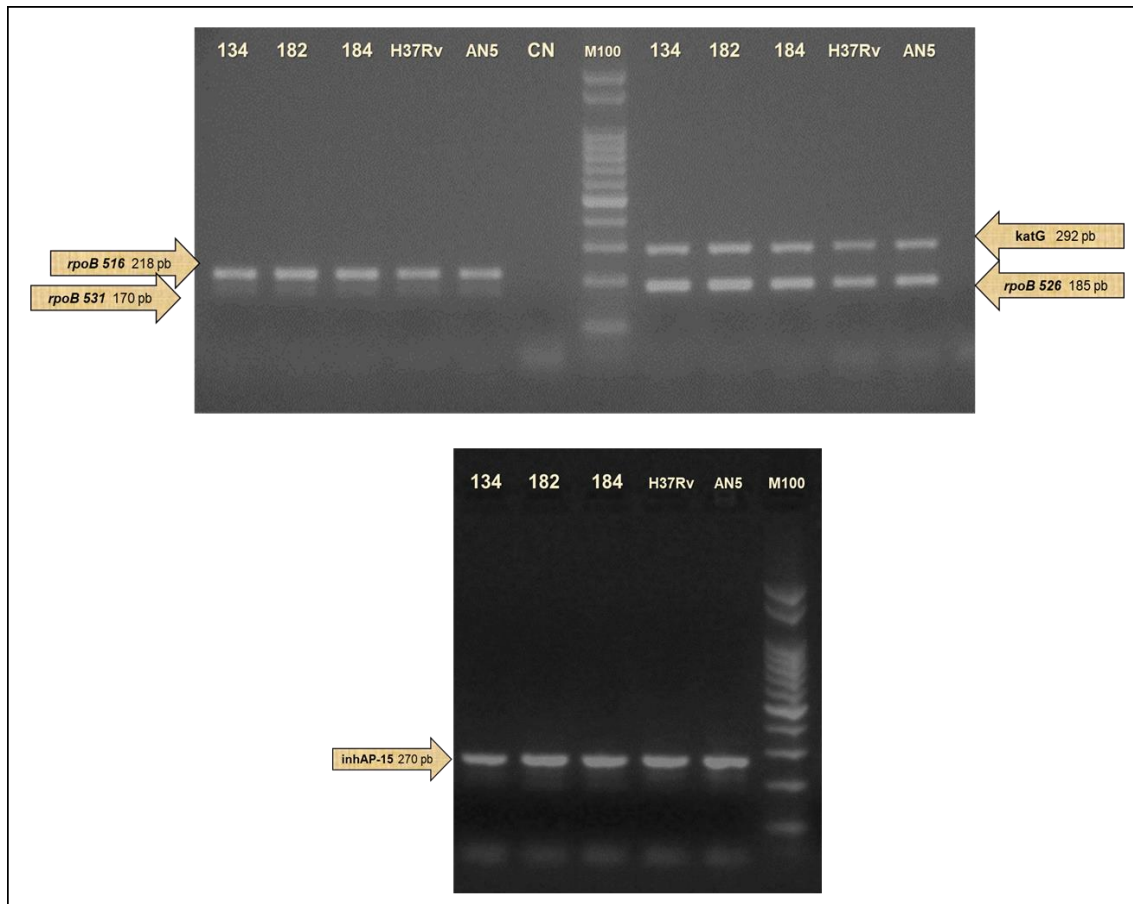
El aislamiento N° 134 resultó ser sensibles a INH, RIF, EMB y LEVO al ser evaluada por ambos métodos fenotípicos. El aislamiento N° 184 demostró resistencia a INH al ser evaluada por ambos métodos fenotípicos. El aislamiento N° 182 demostró ser sensible a todas las drogas probadas al ser evaluada por ambos métodos fenotípicos (Tabla 7).

**Tabla 7: Valores de las Concentraciones Inhibitorias Mínimas de los aislamientos de *M. bovis*.** Los aislamientos fueron evaluados en el Hospital Dr. Cetrángolo. Los valores de *cut-off* determinan la sensibilidad o resistencia de la cepa.

	Control	INH (µg/mL)	S (µg/mL)	RIF (µg/mL)	ETH (µg/mL)	LEVO (µg/mL)
<b>Cut-off</b>	/	≥0,25	≥0,5	≥0,5	≥8	≥0,5
<b>Cepa 134</b>	OK	0,5	1	0,5	8	0,5
<b>Cepa 184</b>	OK	0,25	0,25	0,06	4	0,5
<b>Cepa 182</b>	OK	0,06	0,25	<0,06	4	0,5

INH: isoniazida; S: streptomycin; RIF: rifampicina; ETH: etambutol; LEVO: levofloxacin.

Con respecto a la evaluación molecular realizada por MAS-PCR, en DILAB-SENASA, Martínez, provincia de Buenos Aires; las amplificaciones de los 3 aislamientos estudiados se correspondieron con aquellas de cepas sensibles a los tuberculostáticos evaluados (INH y RIF), contemplando las principales mutaciones asociadas a la resistencia a estas drogas. Para todas las muestras evaluadas, para el gen *katG315* se obtuvo un amplicón de 292 pb, para el gen *inhAP-15* se obtuvo un amplicón de 270 pb y para el gen *rpoB* se obtuvieron 3 amplicones de 218 pb, 185 pb y 170 pb (Figura 26).



**Figura 26: Resultados de los productos amplificados por MAS-PCR.** Se observan los geles de agarosa al 1,5 % mostrando la amplificación por MAS PCR de los genes *rpoB* 516, *rpoB* 526, *rpoB*531, *katG* y *inhAP-15*, de todos los 3 aislamientos de *M. bovis* (134; 182 y 184) y de las cepas de referencia H37Rv y AN5 (como controles positivos); CN: Control Negativo.

### **Evaluación de virulencia y transmisibilidad de cepas de *M. bovis* en modelo murino:**

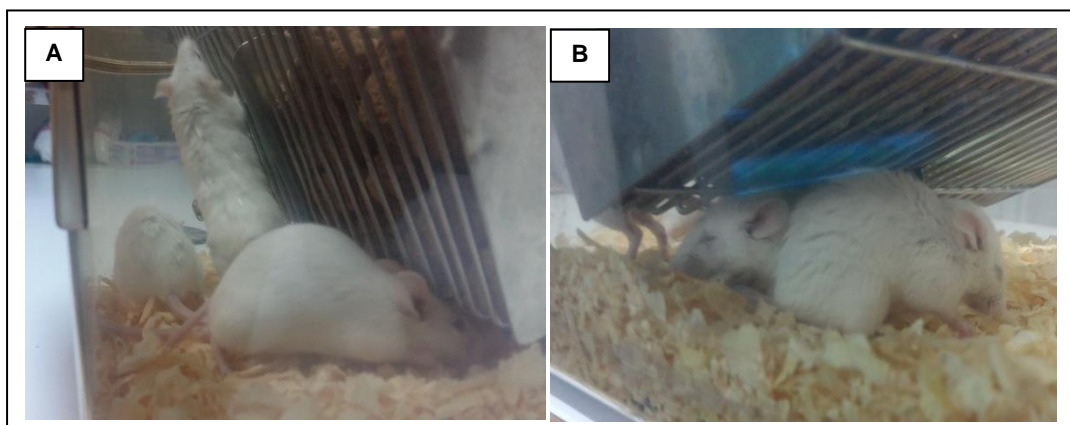
Para poder determinar si las cepas de *M. bovis* seleccionadas son virulentas y transmisibles, se estudiaron en un modelo murino de infección intratraqueal. El ensayo de virulencia y transmisibilidad se realizó al mismo tiempo. Sin embargo, para presentar los resultados de manera más organizada, los resultados de la evaluación de la virulencia, transmisibilidad y citoquinas fueron descriptos por separado.



En un ensayo preliminar evaluamos la transmisibilidad de 2 cepas de *M. bovis* caracterizadas como hipervirulenta una de ellas (*M. bovis* 303) y de baja virulencia la otra (*M. bovis* 534). Pudimos comprobar la transmisibilidad de la cepa *M. bovis* 303 (hipervirulenta), por aislamiento desde el primer tiempo de eutanasia (T30), a partir de los pulmones de animales “contacto” de colonias de *M. bovis* (Marfil *et al.*, 2016 b). Se pudo comprobar de esta forma que el modelo murino de transmisibilidad puede demostrar eficientemente la transmisibilidad de una cepa de una animal inoculado a un “contacto” conviviendo en la misma jaula por el período de 4 meses que duró la experiencia.

### Ensayo de Virulencia:

Se evaluaron 2 cepas de *M. bovis* N° 134 (muestra de pulmón) y N° 182 (muestra de hígado) según los criterios de selección mencionados en la sección de materiales y métodos, junto con la cepa de referencia *M. bovis* AN5, en ratones Balb/C. Los ratones fueron mantenidos hasta el momento de su eutanasia (1; 30; 60 y 90 dpi), en las cajas designadas para ellos. De los 18 ratones inoculados con la cepa N° 134, 3 fueron eutanasiados en el T0 (1 dpi) como había sido previsto. Los 15 ratones restantes, no completaron los tiempos de eutanasia y convivencia planteados. Nueve murieron en la jaula y para los 6 restantes se decidió realizar la eutanasia para paliar el sufrimiento y para poder estudiar los bazos y pulmones (entre los 15 y 20 dpi). Estos ratones mostraron desmejoramiento general, taquipnea y consunción (Figura 27 A y B). Se encontraban letárgicos, con dolor y no buscaban alimento ni comían. De estos 15 ratones, se pudo realizar cultivo de órganos en 12 de ellos, debido a que 3 de los animales que habían muerto en la jaula mostraban signos de cambios *post-mortem*. En la necropsia se observaron granulomas en pulmón de todos los animales inoculados con la cepa N°134.

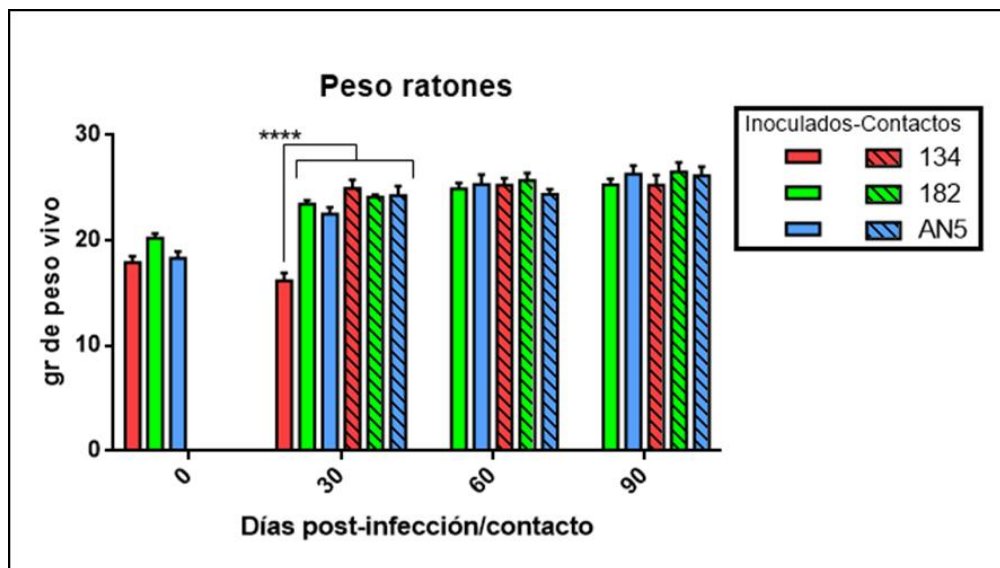


**Figura 27: Signología clínica de los animales utilizados en el ensayo.** A: Dos ratones inoculados con la cepa N° 134, conviviendo con un ratón “contacto sano”. Es notoria la diferencia de tamaño entre los individuos. B: Ratones inoculados con el aislamiento N° 134 el

día que se realizó la eutanasia. Los animales mostraban manto deslucido, dolor demostrado por los ojos cerrados y la posición antiálgica, y marcado descenso del peso.

Los ratones inoculados con la cepa N°182 y la cepa de referencia AN5, no mostraron signos de enfermedad durante los 90 días que duró la experiencia.

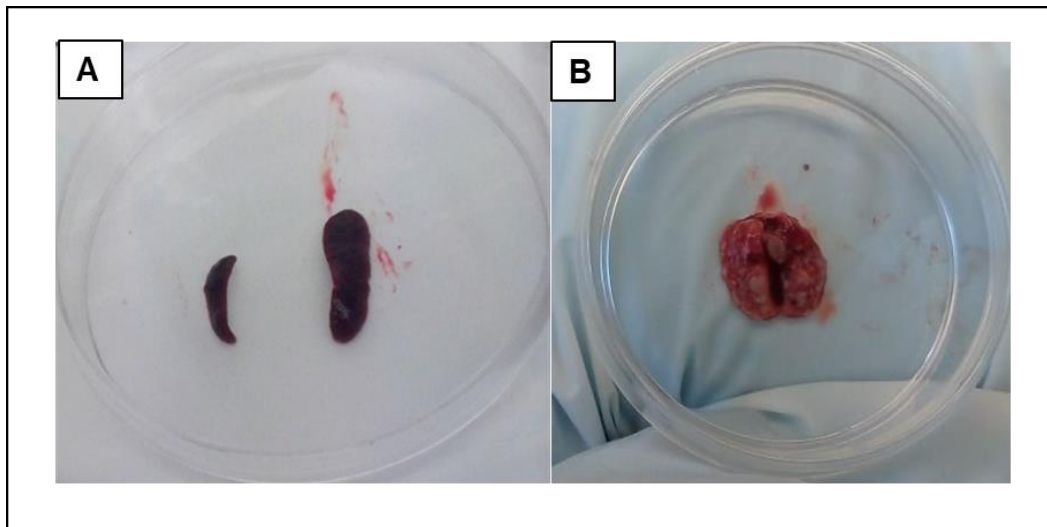
Se determinaron los pesos de los ratones en los distintos tiempos de eutanasia (Figura 28). Se pudo observar que los animales inoculados con la cepa N° 134 presentaron una marcada disminución de sus pesos al momento de la muerte, que incluso fueron menores a los registrados al inicio del ensayo (T0). Los animales inoculados de los otros dos grupos evaluados, tuvieron pesos normales a elevados en concordancia con los pesos para animales de esa misma edad y no se observó que disminuyeran de peso durante la experiencia. Se observan diferencias significativas (\*\*\*\*) entre los animales inoculados con la cepa N° 134 con respecto a todos los otros grupos evaluados. Es importante destacar que los pesajes de los animales del grupo inoculados con el aislamiento N° 134, fueron realizados en el momento de la muerte (entre 15 y 20 dpi), esto es entre 10 y 15 días antes que el resto de los animales (T30). El análisis estadístico utilizado fue *Two-way ANOVA* y *post-test Bonferroni* (\*\*\*\*  $p < 0.0001$ ).



**Figura 28: Peso de los ratones inoculados y “contactos” en los distintos tiempos de eutanasia.** Se observan diferencias significativas entre los ratones inoculados con el aislamiento N° 134 y los animales de los grupos restantes (inoculados y “contactos”), en el T30.

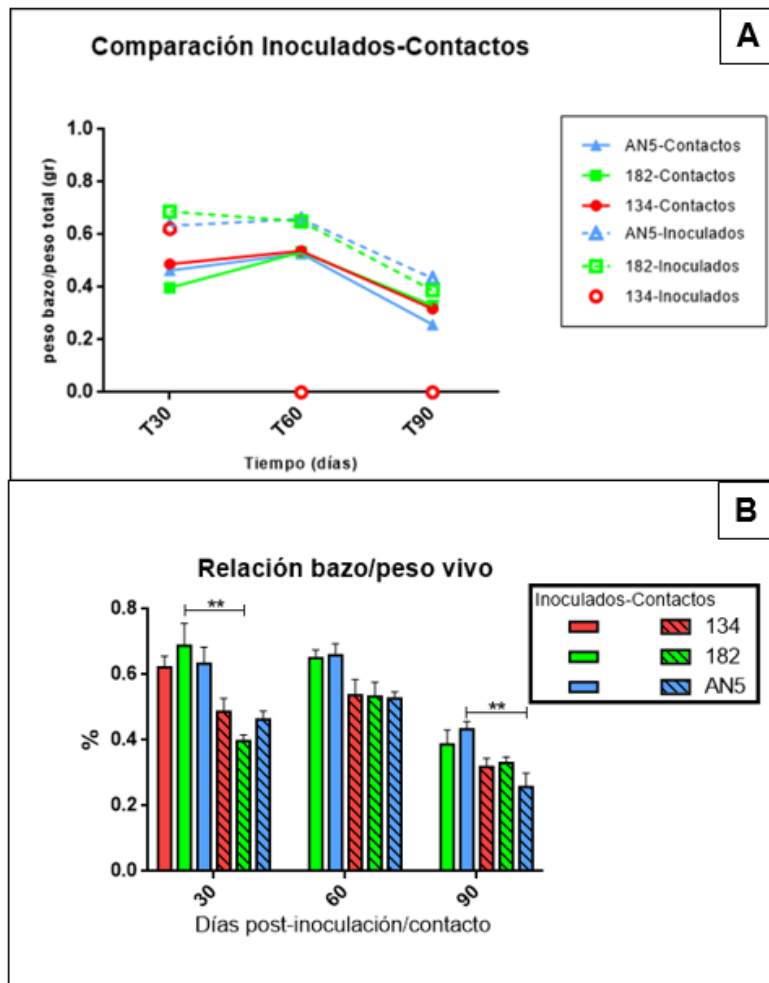
Los bazo de los animales inoculados presentaron pesos mayores respecto de los animales “contacto sanos”. Fue evidente durante las necropsias de los ratones que el tamaño de los bazo era mayor en los grupos inoculados con la cepa N° 182 y con la cepa de referencia AN5 (Figura 29 A). En los animales inoculados con la cepa N° 134, los bazo no se apreciaban como agrandados a simple vista y no se pudieron comparar con los de los animales “contactos” en ese mismo tiempo. Sin embargo, al

observar el cociente peso bazo/peso total del ratón (%), se notó la esplenomegalia presente en este grupo de animales respecto de los “contactos sanos” (Figura 30 A). Los pulmones de los animales inoculados con la cepa N° 134 mostraron signos característicos de procesos inflamatorios, como así también zonas hiperémicas y hemorrágicas (Figura 29 B). Los pulmones de los animales inoculados con la cepa N° 182 y la cepa de referencia AN5 y los animales “contactos” de todos los grupos, no mostraron lesiones severas.



**Figura 29: Lesiones macroscópicas de los órganos de animales inoculados.** A: Comparación del tamaño del bazo de un animal “contacto sano” (izquierda), respecto de un animal inoculado con la cepa N° 182 (derecha), al mismo tiempo de eutanasia (T60). B: Pulmón de un ratón inoculado con la cepa N° 134 a los 20 días post-inoculación, se observan múltiples lesiones focales blanquecinas y la superficie del pulmón se encuentra hiperémica y con signos de inflamación.

La relación entre el peso del bazo respecto del peso del ratón (%) que fue registrado durante los tiempos de eutanasia, evidenciaron que los ratones presentaban esplenomegalia (Figura 30 A). Los animales inoculados con la cepa N° 182, presentaron las relaciones más altas entre el peso del bazo y el peso total del ratón. Esta esplenomegalia se pudo confirmar estadísticamente por Análisis *Two-way* ANOVA y *post-test* Bonferroni. Éste presentó diferencias significativas (\*\*  $p < 0.01$ ) en el T30 para el los ratones del grupo inoculado con la cepa N° 182 y sus “contactos”. En el T90, ya no se observaron diferencias significativas en ese grupo pero sí en el grupo inoculados y “contactos” de la cepa de referencia AN5, siendo significativamente mayores (\*\*  $p < 0.01$ ) los bazos de los animales inoculados con la cepa AN5 (Figura 30 B). Los valores de esta relación en los ratones inoculados con el aislamiento N° 134, solo pudieron ser evaluados en primer tiempo de eutanasia (15-20 dpi), puesto que todos los animales inoculados murieron o fueron eutanasiados a ese tiempo.



**Figura 30: Comparación entre animales inoculados y “contactos”.** Se grafica la relación peso del bazo/peso del animal (%) entre ambos grupos de animales a través de dos gráficos. A: Gráfico de líneas donde se puede observar el agrupamiento por un lado de los animales inoculados con las distintas cepas y por el otro de los “contactos”, los bazos eran proporcionalmente más pesados en los animales inoculados. B; Gráfico de barras donde se puede observar la estadística realizada. Se observan diferencias significativas (\*\*) en el T30 para los animales de grupo inoculado con la cepa N° 182 y los “contactos”, y en el T90 entre los animales inoculados con la cepa AN5 y los “contactos”.

Los cultivos realizados a partir de los bazos y los pulmones no pudieron confirmar en todos los casos la infección con los distintos aislamientos en los T30, T60 y T90. Es importante destacar que en el T0 se pudo confirmar la infección de los animales inoculados (para lo que se había destinado un total de 3 animales por grupo). Para las siguientes consideraciones, solo tendremos en cuenta los 15 animales restantes por grupo destinados para ser evaluados en los tiempos T30, T60 y T90.

En el caso de los ratones inoculados con la cepa N°134, 12 de los 15 muertos o eutanasiados entre los 15-20 dpi, pudieron ser procesados para obtener sus órganos y realizar cultivo. Se obtuvieron aislamientos por cultivo del bazo de 8 ratones (8/12; 66%) y de 2 ratones por cultivo de pulmón (2/12; 16%). En los animales inoculados de los que no se obtuvo aislamiento de ninguno de los órganos, se confirmó la presencia

de la cepa de *M. bovis* inoculada mediante extracción de ADN de los pulmones y posterior amplificación por PCR-Rv2807 (Tabla 8).

Para el caso de la cepa N°182, solo de un ratón inoculado, eutanasiado en el T60, se pudo recuperar UFC, tanto de bazo como de pulmón (1/15; 6%). Los pulmones de todos los ratones que no presentaron UFC, fueron sometidos a PCR-Rv2807, comprobando que estos ratones no estaban infectados durante los tiempos de eutanasia evaluados (Tabla 8).

Con respecto a la cepa de referencia AN5, se confirmó la infección en 9 de 15 ratones inoculados, ya que se comprobó la presencia de UFC en pulmón (1/14; 7%) y en bazo (9/14; 64%). Los pulmones de los ratones negativos al cultivo, fueron evaluados por PCR-Rv2807, comprobando que estos no estaban infectados (Tabla 8).

**Tabla 8: Animales infectados por grupo evaluados en los tiempos T30, T60 y T90.** Se consideró infectado a aquellos animales de los que se logró comprobar por cultivo o PCR-Rv2807 la presencia de micobacterias en los órganos de estos animales. (\*) PCR-Rv2807 fue realizado solo en los casos donde los cultivos fueron negativos. N/A: No analizado.

		Aislamiento N° 134			Aislamiento N° 182			Cepa AN5		
		T30	T60	T90	T30	T60	T90	T30	T60	T90
Cultivo	Pulmón	1 (1/12)	N/A	N/A	0	1 (1/15)	0	0	0	1 (1/15)
	Bazo	8 (8/12)	N/A	N/A	0	1 (1/15)	0	2 (2/15)	3 (3/12)	3 (3/2)
PCR-Rv2807*		4	N/A	N/A	0	0	0	0	0	0
Total Positivos		12 (12/12)			1 (1/15)			9 (9/15)		

### Evaluación de transmisibilidad:

Ninguno de los “contactos sanos”, que convivieron con los animales inoculados, presentaron signología clínica ni lesiones en órganos durante la necropsia, en el tiempo que duró la experiencia de transmisibilidad (90 días). Los pulmones y bazos cultivados de los ratones “contactos sanos” que convivieron con los animales inoculados con la cepa N° 134 y de la cepa de referencia AN5, no demostraron UFC. Un solo animal “contacto sano”, que convivió con los animales inoculados con la cepa N° 182, presentó UFC en cultivo a partir de bazo. Este ratón convivió en una jaula con animales cuya infección no pudo ser demostrada. Los valores de las citoquinas en este animal en particular fueron menores que el resto de los animales del mismo grupo.

Para comprobar fehacientemente que los ratones no estaban infectados, se hicieron pools de tejido de pulmón de los grupos por jaula y por tiempo y se realizó la extracción de ADN con kit y posteriormente se evaluó por PCR-Rv2807. Todos los *pools* de los animales “contactos sanos” fueron negativos a CMT.

**Determinación de citoquinas:**

Para evaluar la respuesta inmunológica de los animales y establecer si los contactos sanos tomaron contacto con la micobacteria inoculada, se realizó la medición de las citoquinas IFN $\gamma$ ; IL4 y TNF. Los valores de las citoquinas en los distintos tiempos de eutanasia para los distintos grupos de animales evaluados se muestran en la figura 31. Para el caso de la cepa N°134, si bien los animales murieron y/o fueron eutanasiados a los 20 dpi, se consideraron los valores como correspondientes al T30 establecido.

El análisis estadístico para evaluar las 3 citoquinas en los homogenatos de bazo estimulados con PPD<sub>b</sub>, fue el Test Kruskal-Wallis y Dunn (\*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ ), puesto que al no ser homogéneas las varianzas se debió utilizar un test no paramétrico. Los resultados se expresan en Mediana (pg/mL)  $\pm$  rango intercuartil de la diferencia entre la producción en células estimuladas con PPD<sub>b</sub> y la producción basal de estas células sin estimular (Test Kruskal-Wallis y Dunn; \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ ).

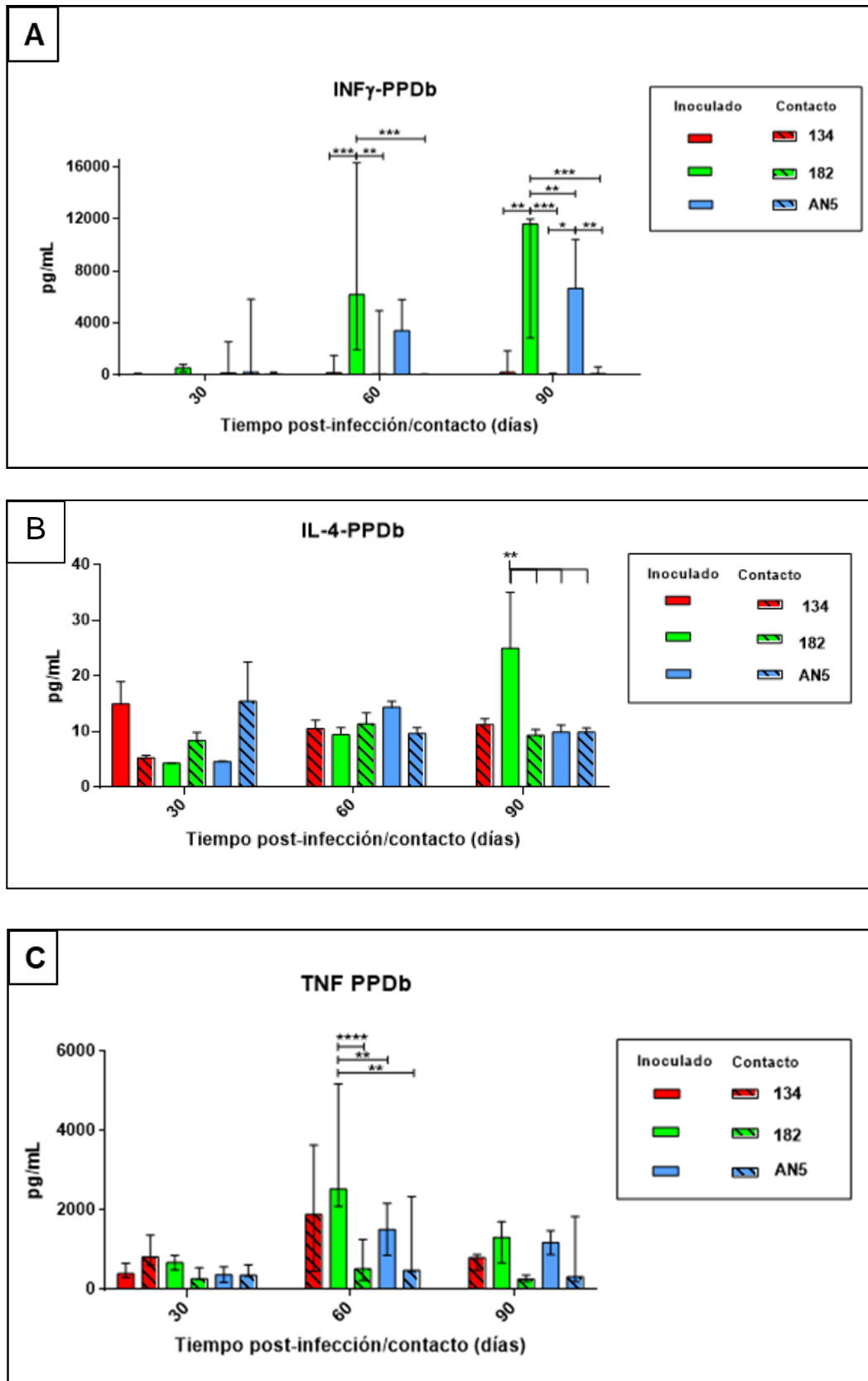


Figura 31: Comparación de los valores de las citoquinas IFN $\gamma$ , IL4 y TNF para los animales inoculados y los “contactos” para las 3 cepas evaluadas en los tiempos T30, T60 y T90. A: Valores de las citoquinas IFN $\gamma$  B: Valores de las citoquinas IL-4. C: Valores de las citoquinas TNF. En rojo: cepa 134, en verde: cepa 182 y en celeste: cepa AN5.

Para los ratones inoculados con la cepa N°134, los valores de INF- $\gamma$  fueron bajos respecto del resto de los animales, indicando que la bacteria generó una reacción aguda y fulminante que no les permitió montar una respuesta inmune adecuada y los ratones murieron o estaban en estado terminal. Los “contactos sanos” de este grupo no expresaron valores coincidentes con los de animales generando una respuesta inmune celular. Al contrario, el grupo de animales inoculados con la cepa N°182, que no se infectaron con ésta, presentaron valores elevados de esta citoquina, relacionada con una respuesta celular eficiente, especialmente en los T60 y T90. Los “contactos sanos” presentaron valores mayores de esta citoquina en el T60, pero llegando a ser prácticamente nulos en el T90. Los ratones inoculados con la cepa de referencia AN5, que logro infectar al 60 % de los animales inoculados, generó valores de esta citoquina significativamente mayores a los de los “contactos sanos” en el último tiempo evaluado (T90).

Los valores de IL-4 fueron similares para todos los animales tanto del grupo inoculado como los “contactos sanos” para todos los tiempos salvo para los animales inoculados con la cepa N° 182 en el T90, donde fue significativamente mayor. Esto coincide con que la respuesta inmune de estos animales fue mejor y pudieron eliminar la infección.

Los valores de TNF fueron similares para todos los animales evaluados en todos los tiempos de eutanasia, salvo para el grupo inoculado con la cepa N° 182, que produjeron valores significativamente mayores a los 60 días.

De los animales del grupo de ratones inoculados con la cepa N° 182, un único animal presentó infección, es de destacar que este animal presentó los valores más bajos de citoquinas evaluadas, principalmente de INF- $\gamma$  e IL4, en comparación con los demás animales del mismo grupo (INF- $\gamma$ : 16109,9804 pg/mL; IL-4: 6,85856148 pg/mL; TNF: 2217,14033 pg/mL).



# DISCUSIÓN



## Discusión

La vigilancia epidemiológica en frigorífico permite detectar LCT en los bovinos y evitar de esta forma que *M. bovis* llegue al consumidor. El monitoreo de los animales en los frigoríficos demostró ser fundamental en el control y la erradicación de la TBB en países como Australia, EE. UU. Canadá y Cuba. Esto fue logrado al poder identificar exitosamente animales procedentes de áreas de cuarentena y al seguimiento con trazabilidad en origen de los animales con lesiones compatibles con TB detectados en playa de faena (SENASA, 2018). La inspección bromatológica se basa en la observación visual mediante la palpación y cortes de órganos internos de los bovinos. Las lesiones de gran tamaño y superficiales son fácilmente detectables. Sin embargo, en los primeros estadios de la infección la lesión comienza de manera microscópica y posteriormente, por la cronicidad de la enfermedad, llega a ser visible (Corner *et al.*, 1994).

En esta tesis, se obtuvieron 5 aislamientos de *M. bovis*, de los cuales 4 fueron luego del procesamiento de 210 pulmones (junto con sus linfonódulos) (1,9%) y 1 de un hígado con lesión de un total de 6 hígados analizados (16,6%). De estos aislamientos 4 fueron comprados en carnicerías mientras que solamente uno de ellos fue obtenido de un frigorífico luego de haber pasado exitosamente la inspección bromatológica de rutina. En el trabajo presentado por de Kantor y col. en 1987, se analizaron 178 muestras tomadas al azar (de bovinos provenientes de rodeos de los cuales ya se habían decomisado animales con LCT), pudiendo detectar en algunos de éstos órganos con lesiones incipientes aún luego de la inspección bromatológica. En ese trabajo fueron obtenidos 5 aislamientos de *M. bovis* a partir de tejidos sin lesión (con excepción de un linfonódulo que presentaba LCT pero que había pasado la inspección). Esos resultados son comparables con los que obtenidos en el presente trabajo. La presencia de LCT no necesariamente indican la presencia de *M. bovis*, sino que pueden deberse a MNT (de Kantor *et al.*, 1987). Las principales especies de MNT detectadas en este trabajo fueron *M. insubricum* (42%), *M. intracellulare* (17%), *M. avium* subsp. *hominissuis* (17%), *M. septicum* (8%), *M. nonchromogenicum* (8%) y *M. kansasii* (8%). Mientras que las aisladas por de Kantor y col., (1987) fueron *M. chelonae*, *M. fortuitum*, complejo *M. terrae* y complejo *M. avium-intracellulare*. A pesar de no coincidir en la totalidad de las especies aisladas, podemos considerar que al ser especies ambientales pueden indistintamente estar en contacto con los animales e incluso ser característicos de las regiones de procedencia de los animales. Con el propósito de minimizar la contaminación de las muestras las mismas, fueron tomadas del interior del parénquima del órgano y colocadas directamente en un frasco estéril ya

que las MNT podrían incluso estar en las superficies de las mesadas de la carnicería, así como también en el frigorífico. En este último, cuando se colectaron los linfonódulos se tomaron enteros. Asimismo, hay que considerar que la identificación de las MNT en ambos trabajos se basaron en métodos distintos, fenotípicos (crecimiento diferencial en medio de cultivo y pruebas bioquímicas) y genotípicos (secuenciación génica y posterior comparación en bases de datos). Está bien documentado que los resultados no siempre son concordantes puesto que los métodos fenotípicos además de ser muy laboriosos son difíciles de interpretar (Adekambi *et al.*, 2003). Por otra parte, debido a que en esta tesis no se había propuesto como objetivo aislar las MNT, se tipificaron aquellas que crecieron en el medio de cultivo preferencial para obtener aislamientos de *M. bovis*. Es por eso que las MNT se obtuvieron a partir del cultivo en medio Stonebrink a 37°C y no se probaron otros medios de cultivo, tiempos de incubación ni temperaturas como de Kantor y col., (1987) quienes utilizaron también el medio Löwenstein Jensen.

En nuestro trabajo hemos aislado 12 MNT, 3 a partir de órganos con lesiones y 9 de tejido sin lesiones aparentes. Distintos trabajos reportan su presencia en lesiones de animales (Biet & Boschirolli; 2014; Marfil *et al.*, 2016 a; Nalapa *et al.*, 2017) aunque también están ampliamente distribuidas en el ambiente y han sido aisladas incluso de agua de red (Oriani, *et al.*, 2011; Tortone *et al.*, 2018). Si bien durante la toma de muestras se tomaron todos los recaudos, para evitar contaminaciones, no se puede descartar la posibilidad que los órganos se hayan contaminado en el ambiente, ya sea la carnicería o durante la faena y despostación en el frigorífico.

La prevalencia de TBB reportada oficialmente en el año 2016 fue de 0,3% (SENASA, 2016). Como ésta es calculada sobre la base de los decomisos totales en frigoríficos fiscalizados por el SENASA, la prevalencia real es difícil de estimar. Aunque el muestreo de nuestro trabajo fue limitado y acotado a zonas geográficas particulares, basados en el número de aislamientos obtenidos a partir de los órganos muestreados y teniendo en cuenta la especificidad y sensibilidad de la técnica del cultivo bacteriológico, como ejercicio pudimos estimar que la prevalencia real sería de 0,58%. Aunque teórico y sesgado, este número es casi el doble del estimado oficialmente en 2016, e indicaría que la prevalencia de la TBB podría estar subestimada.

A nivel regional, otros países que cuentan con planes de control y erradicación de TB son Brasil, Chile, Uruguay y Paraguay. Por su parte Brasil se encuentra regionalizado, y cada zona posee distintas prevalencias. La más alta la posee la zona sudoeste del país (São Paulo, Minas Gerais y Espírito Santo) y se asocia a la activa producción lechera (Rocha *et al.*, 2016, Parreiras *et al.*, 2012, Galvis *et al.*, 2016). Chile posee datos de 2014 de un censo que alcanzó al 10% de los establecimientos bovinos del

país y al 23 % de los bovinos del país, pudiendo establecer una prevalencia de TBB de 0,76%. La mayor prevalencia se encuentra en la región de Magallanes, seguida por la región Metropolitana, Atacama, Biobío y Coquimbo. Chile también ha determinado una zonificación para su país para mejorar la gestión de la TBB impulsada por el Servicio Agrícola y Ganadero (S.A.G.) en el “Proyecto de Control y Erradicación de la Tuberculosis Bovina” desde 2011, dividiendo el país en dos zonas: una de erradicación y otra de control (Tamayo, 2012; SAG, 2012). Al igual que lo que ocurre en nuestro país, la región de Tierra del Fuego se encuentra libre de Tuberculosis. En Uruguay, desde 1897 se trabaja en la lucha contra la TBB. El plan actualmente vigente data del año 1998 y está implementado conjuntamente con el de brucelosis. Entre el 90-95% del total de bovinos faenados cuenta con Inspección Veterinaria Oficial. En la actualidad, la tuberculosis bovina es considerada reemergente en el Uruguay, detectándose la aparición de nuevos focos en diversas zonas (DI.GE.SE.GA., 2015; Clavijo *et al.*, 2014, Casas Olascoaga, 2013; Irureta Goyena Baldomir, 2016) como así también casos zoonóticos (Rivas *et al.*, 2012). Paraguay, según los datos oficiales del SENACSA, reporta en el año 2017 haber realizado la prueba de IDR a 20.454 bovinos obteniendo solamente 15 animales positivos, reportando una prevalencia muy baja (0,0007%). Datos del 2002 de este país informaban de que 11.000 animales evaluados por la IDR solo un 0,7% fue positivo a TBB (de Kantor & Ritacco, 2006).

Se debe considerar que debido a las características propias de la patogenicidad de la enfermedad, las lesiones producidas por *M. bovis* tienen una evolución lenta y progresiva, siendo inicialmente microscópicas y evolucionando lentamente hasta constituir el granuloma típico (Corner *et al.*, 1994). Debido a esto, la inspección visual y manual puede ser insuficiente en presencia de lesiones microscópicas, aunque los frigoríficos y mataderos cuenten con personal suficiente y muy bien capacitado para realizarla.

El grado de sensibilidad de la técnica de inspección durante una necropsia para la detección de lesiones dependerá del tiempo y el esmero de quien la realiza. El personal debe ser capaz de efectuar una inspección rigurosa de los órganos y del sistema linfático, donde se detectan con mayor frecuencia LCT (SENASA, 2018; Corner *et al.*, 1994). Algunos estudios realizados en Argentina revelan que la sensibilidad y especificidad de la inspección bromatológica veterinaria fue de 76,4% y 86,1% respectivamente, en relación a la confirmación del diagnóstico de laboratorio (Pelegriño *et al.*, 1996; SENASA. 2018). Sin embargo, otros estudios marcan que la confiabilidad de la inspección fue cercana al 89% en seis frigoríficos de la provincia de Santa Fe (Latani *et al.*, 1997).

Además de la vigilancia epidemiológica, el objetivo prioritario de la inspección veterinaria en frigoríficos es establecer una de las últimas barreras de protección para el consumidor, y no la detección de lesiones para diagnóstico. Se debe preservar la calidad higiénico-sanitaria del producto final y asegurar que sea apto para el consumo. El lugar de inspección también puede afectar la detección de LCT, siendo fundamental el conocimiento de la patogenia de la TBB así como también la distribución anatómica de las lesiones en orden de frecuencia, reforzando la necesidad de capacitación permanente del personal en lo que respecta a la anatomía patológica, diagnóstico diferencial y toma y remisión de muestras. Como el objetivo del presente trabajo fue el de detectar los escapes, se ha realizado una revisión rigurosa mediante cortes por todo el tejido, lo que condujo a detectar mayor número de lesiones e incluso, en el caso del hígado, encontrar una lesión que no podría haber sido detectada en la inspección de rutina. Este órgano es revisado mediante palpación y visualización, luego se realizan 5 únicos cortes en los conductos biliares, parénquima y linfonódulos, preservando la mayor parte del tejido para poder comercializarlo. En el hígado N° 182, la lesión era muy pequeña y no generaba alteraciones palpables, así como también estaba fuera de la zona inspeccionada por cortes. En este caso la revisión bromatológica fue realizada correctamente, pero no permitió detectar este órgano infectado.

Al ser una enfermedad zoonótica, todos los miembros de la cadena están en riesgo, desde el personal que realiza la inspección, hasta el carnicero y la persona que manipula el alimento en su preparación.

A su vez, las características de las lesiones y la diseminación que se logre dependerán en gran medida de la inmunidad del hospedero, pudiéndose mantener contenida en linfonódulos únicamente o diseminarse por varios órganos, siendo aquellos animales con sintomatología y lesiones los más enfermos y con posibilidad de diseminar la enfermedad. Esta limitación de la técnica de la inspección tiene que ver con la evolución de la enfermedad y no con la capacidad de quien realice la inspección, ya que incluso el personal más meticuloso podría no detectar lesiones microscópicas. La revisión de los linfonódulos que acompañan el pulmón, se realiza junto con la inspección propia de éste. En general se revisan más activamente cuando son detectados signos de inflamación o lesiones visibles. En nuestra experiencia, hemos encontrado linfonódulos moderadamente agrandados, con pérdida de la relación corticomedular o de consistencia friable en los pulmones enteros comprados en carnicerías y recolectados de frigorífico y en pulmón, lesiones del tipo petequiales o puntillados hemorrágicos fueron las más comúnmente identificadas. Incluso hemos comprado un pulmón con gran número de quistes hidatídicos en distintos grados de

evolución, que debería haber sido decomisado y no llegar a ser comercializado. Este último tipo de lesiones suelen confundirse con los granulomas cuando el quiste se encuentra en un estadio avanzado y se deshidrata y son diferenciables en la inspección puesto que el quiste hidatídico se desprende fácilmente con el cuchillo al rasparlo. Estos hallazgos nos hacen notar que a pesar de que el órgano pueda encontrarse alterado, éstos no pudieron ser detectados en la inspección rutinaria. La mayoría de estos signos de linfadenitis no son específicos, y podrían corresponder a distintas reacciones, infecciosas o no. Hay autores que sugieren que la TB es una enfermedad de los linfonódulos con un portal pulmonar, indicando que estos órganos serían de gran importancia en la patogénesis de la infección y sería una excelente muestra para tomar cuando se sospeche de la enfermedad (Behr & Waters, 2014). La aparición de lesiones groseras como estas en vísceras compradas en carnicerías, advierten que la inspección bromatológica no es realizada siempre o no es realizada completamente y la posibilidad de que este y otros agentes lleguen al consumidor es mayor. Además no todos los animales o partes de animales que llegan al consumidor son inspeccionados por un frigorífico con control oficial. Muchos transitan por la vía informal o son faenados de manera clandestina. La inspección *ante mortem* y *post mortem* está reglamentada y debe ser realizada por un veterinario o personal capacitado para tal fin. Sin embargo esto no siempre se realiza, y cuando los animales no pasan por los canales oficiales, la calidad higiénico-sanitarias de esa res o vísceras no puede ser asegurada (Rhades, 2010).

El cultivo bacteriológico es el estándar de oro para el diagnóstico de la TB. Sin embargo, constituye un técnica cuya sensibilidad oscila entre un 40-60% y muchas veces esta sensibilidad está relacionada con el operador (Garbaccio *et al.*, 2016). El mismo insume hasta dos meses para la obtención del resultado, además de contar con puntos técnicos críticos como la etapa previa de descontaminación con hidróxido de sodio al 4% (Método de Petroff), que puede afectar la viabilidad de la micobacteria. Esto es relevante en muestras paucibacilares, ya que se condiciona la población de bacilos viables para que desarrollen en el medio de cultivo. La mayoría de las muestras que procesamos no poseían lesiones visibles o solo se evidenciaban lesiones inespecíficas en linfonódulos. Asumimos entonces que la carga bacteriana de estas muestras fue baja. Esto pudo afectar en el número de micobacterias recuperadas a partir de los órganos evaluados. Esta observación es compatible con el hecho que los órganos evaluados se adquirieron posterior a la etapa de inspección en playa de faena, en la cual aquellos que presentaron lesiones más avanzadas seguramente fueron detectados y decomisados previamente en el frigorífico. Un caso particular lo constituye el aislamiento número 182 que fue obtenido a partir de un

hígado comprado entero en una carnicería. Por fuera, el órgano se encontraba en perfectas condiciones y fue nuevamente inspeccionado por nosotros, pero esta vez realizando cortes foliados por todo el tejido, lo que nos permitió detectar una lesión pequeña no deformante con contenido licuado en su interior, a partir del cual se logró un aislamiento de *M. bovis*. Este órgano había pasado una inspección bromatológica con éxito y externamente parecía apta para el consumo, sin embargo poseía una lesión considerable que de ser consumida o manipulada inadecuadamente podría comportarse como fuente de infección (Marfil *et al.*, 2018). Es importante destacar que debido a que el hígado es consumido por la población, no pueden realizarse el número y extensión de los cortes que nosotros realizamos en el laboratorio en una inspección de rutina (perdería el valor comercial si se vendiera cortado en su totalidad).

La PCR-IS6110 realizada a partir de tejido es una herramienta complementaria, rápida que permite la detección del CMT antes que por cultivo. Asimismo, el cultivo puede resultar negativo por múltiples causas y debido a las limitaciones mencionadas anteriormente, no podría detectarse micobacterias viables en esas muestras. Sin embargo, como la PCR no discrimina entre microorganismos viables o muertos, no puede evaluarse el riesgo que representa un alimento. Sin embargo, puede resultar de gran ayuda en algunas instancias. En nuestro caso, en la muestra N°134 se había obtenido un resultado de PCR positivo mientras que el cultivo había sido negativo. Este resultado fue considerado y la muestra se volvió a cultivar, obteniéndose un aislamiento en una segunda instancia, que de otra forma hubiese pasado inadvertido sin habérselo podido detectar. Sin embargo, en el caso de las otras 4 muestras de tejido positivas por PCR, no se obtuvieron aislamientos a pesar de que las mismas también fueron cultivadas en una segunda instancia. Un trabajo realizado en la Facultad de Ciencias Veterinarias de la UBA, en la cátedra de Enfermedades Infecciosas, logró demostrar que la PCR realizada a partir de ADN extraído de tejidos de porcinos con LCT era igualmente eficiente y más rápida que el cultivo bacteriológico. Más aún, no solo permitió obtener resultados en menor tiempo y con buena concordancia con los resultados de la bacteriología, sino que también permitió detectar falsos negativos a la bacteriología, pudiendo detectar animales positivos que a pesar de las lesiones presentes tenían un cultivo negativo (Pietronave *et al.*, 2015). En otro trabajo de la misma cátedra, se compararon los resultados obtenidos de PCR a partir de muestras de ADN extraídas de tejido utilizando dos secuencias blanco diferentes, IS6110 y Rv2807. En ambos casos se logró detectar al CMT con la misma sensibilidad permitiendo su utilización indistintamente o mismo para confirmar el resultado obtenida con una de ellas (Barandiaran *et al.*, 2013; Hermida *et al.*, 2014).

Con respecto al tamaño muestral calculado al comienzo del proyecto, considerando una prevalencia de TBB de 0,6% (SENASA, 2012), para obtener un aislamiento de *M. bovis* debían muestrearse 498 órganos. La unidad en estudio fue el pulmón y el hígado bovino cuyas muestras fueron colectadas entre los años 2014 y 2017. Al considerar entre esos años una tasa promedio de decomisos por TB de 0,3% (34.270 bovinos con LCT), un promedio de faena anual de 11.423.602 animales, se habrían requerido analizar 998 muestras para obtener un evento (cultivo) positivo (cálculo estadístico realizado con Win episcopo 2.0). Sin embargo, luego de procesar 134 muestras se obtuvo un aislamiento de *M. bovis*. Al culminar el trabajo se procesaron un total de 216 muestras obteniéndose 5 aislamientos de *M. bovis*. Esto es sugerente de la existencia de un subregistro o una subestimación de la prevalencia real de esta enfermedad en el ganado bovino. Es necesario considerar que las estadísticas de los organismos oficiales tienen en cuenta los decomisos por LCT en estos órganos, en frigoríficos de inspección federal únicamente (fiscalizados por SENASA), sin tener en cuenta los municipales. Es también conocido el hecho que no todos los animales son faenados en frigoríficos oficiales, existiendo la faena clandestina, que hacen que el número de animales positivos que son faenados en frigoríficos oficiales sea probablemente menor al que realmente existe en el país (Gómez Andrade & Delguy, 2003; Rhades 2010; Marfil *et al.*, 2018). En este estudio, además de ir a distintas carnicerías de CABA y GBA, se obtuvieron órganos de un frigorífico municipal de la zona oeste de GBA.

Con respecto a la importancia de estos hallazgos en la salud pública, la adquisición de infección por ingestión de bacilos viables que “escapan” de esta inspección no sería la forma más frecuente de contraer TB zoonótica. La cocción adecuada de los alimentos es una buena práctica para inactivar microorganismos, entre ellos a las micobacterias. Sin embargo, la manipulación de los alimentos crudos o la costumbre de alimentar a mascotas y animales callejeros o del campo con vísceras crudas incrementa el contagio de estas especies, que al convivir con la población humana se convierten en una potencial fuente de infección. En nuestro grupo de trabajo se ha estudiado la presencia de *M. bovis* en gatos de la CABA (Zumárraga *et al.*, 2009) y la posible transmisión zoonótica a una paciente (Colmegna *et al.*, 2004). Cabe destacar que en CABA y GBA el pulmón no es muy consumido por la población, y la presencia de alimentos balanceados para gatos y perros que, aunque de mala calidad, son muy económicos, hicieron que la costumbre de alimentar a las mascotas y animales callejeros con pulmón (o también llamado bofe) no sea una práctica tan común en estos tiempos. Sin embargo, en las zonas rurales o de menos recursos esta práctica continúa. El hígado en cambio, sí es consumido por las personas y se puede encontrar habitualmente en carnicerías de toda la provincia.



El costo del hígado es más elevado que el del pulmón y es por esto que no es tan comúnmente utilizado para alimentar mascotas. Sin embargo, al procesar los alimentos, es habitual que los dueños administren las sobras crudas a los animales. Asimismo, la manipulación de los alimentos crudos es riesgosa si no se mantienen medidas higiénicas adecuadas. Los carniceros, trabajadores de frigorífico y manipuladores de alimentos se encuentran en riesgo de enfermedad (Mertoglu *et al.*, 2016). Un hombre de 46 años que trabajaba como carnicero en Francia fue diagnosticado con TB cutánea a partir de una herida que no cicatrizaba en una de sus manos. Sin embargo, luego de ser estudiado más exhaustivamente, pudo comprobarse la presencia de LCT en tórax (Mertoglu *et al.*, 2016). Esto alerta de la exposición de esta profesión, que la vía de ingreso de la bacteria, además de ser por contacto, puede ser también aerógena. No solo el riesgo se corre por contacto con *M. bovis*, es también importante considerar a las MNT, que pueden estar presentes en el agua con que el carnicero limpia las mesadas y los cuchillos. Las condiciones higiénico-sanitarias de los establecimientos que fueron visitados en este trabajo fueron variadas. Las carnicerías y frigorífico de la zona oeste no se encontraban en condiciones óptimas de limpieza y cuidado. Por otra parte, los trabajadores de frigorífico constituyen un grupo de riesgo, ya que durante el eviscerado de los animales y la revisión, se exponen a las micobacterias además de otros microorganismos presentes en los bovinos. Además, en general no utilizan guantes, para evitar que las vísceras se les resbalen corriendo mayores riesgos de cortes y lesiones por cuchillo. Tampoco usan otros elementos de protección personal como barbijos ni protección ocular, estando en permanente contacto con los aerosoles que se forman al cortar las reses y los líquidos que salpican cuando revisan los órganos. La presencia de micobacterias patógenas viables en las muestras obtenidas en este trabajo, demuestra que la exposición de estos trabajadores y del consumidor es alta y constituyen una potencial fuente de infección que requiere atención (Marfil *et al.*, 2018). Recientemente se reportó un caso de una paciente pediátrica de 10 años de edad con tuberculosis pulmonar por *M. bovis*. La paciente de la CABA no tenía contacto con animales, ni establecimientos de la industria agropecuaria. El único nexo epidemiológico habría sido el consumo de quesos de venta informal. Sin embargo no se pudo demostrar que ese fuera el producto que habría actuado como fuente de infección de la menor (Vega, 2018).

En relación a la tipificación molecular de los aislamientos, tanto el Spoligotyping como los MIRU-VNTR diferenciaron a las cepas en el mismo número de patrones, es decir que ambas técnicas combinadas no incrementaron su poder discriminatorio en los aislamientos de *M. bovis* estudiados. Por Spoligotyping fueron detectados 3

espoligotipos: SB0140; SB0120 y SB0130. El espoligotipo SB0140 es el más frecuente entre los aislamientos estudiados de Argentina, habiéndose detectado en una frecuencia de 46% en un total de 1729 aislamientos de *M. bovis* estudiados, seguido por el espoligotipo SB0130 con un 12% (Base de datos IB-INTA, Zumárraga *et al.*, 2013). Mientras que el espoligotipo SB0120 representa el 4,9% de los aislamientos. Siendo que los espoligotipos ya han sido detectados en aislamientos de *M. bovis* en el país en frecuencias considerables, era factible su detección en los aislamientos obtenidos en el presente trabajo de tesis. Por otra parte, en la provincia de Buenos Aires, los espoligotipos SB0140; SB0120 y SB0130 representan el 40%; 8% y 4% respectivamente, del total de los aislamientos estudiados de esa provincia (Base de datos IB-INTA). Por MIRU-VNTR los patrones obtenidos fueron 233324253322, 232214253322 y 232314251212. Si bien la base de datos de MIRU-VNTR del IB-INTA no cuenta con un gran número de aislamientos tipificados como la de Spoligoyping, los patrones detectados en este trabajo no habían sido detectados previamente. Se ha intentado establecer la relación presente entre el genotipo de una cepa y el grado de lesión que es capaz de producir en los órganos bovinos (Garbaccio *et al.*, 2014). En este trabajo, se utilizó la técnica de Spoligotyping para determinar el genotipo y se desarrolló un score macroscópico de lesiones con base en la observación clínica (número, tamaño, localización de LCT y características histopatológicas). Se logró determinar que los genotipos que eran más virulentos y que mayores lesiones produjeron fueron SB0273 y SB0520, ambos aislados en la provincia de Córdoba, ninguno de estos detectados entre las muestras de este estudio. El espoligotipo SB0140 presentó un score de lesiones medio (Garbaccio *et al.*, 2014). Nuestro aislamiento con ese genotipo (Muestra N° 134) presentaba una pequeña LCT granulomatosa. Sin embargo, en 3 aislamientos obtenidos en una misma zona, que a su vez compartieron el mismo espoligotipo, no se comportaron de igual forma en lo que respecta a la presencia de lesiones, habiendo presentado una LCT solo el hígado y no en los pulmones (Muestras N° 179, 182 y 184) (Marfil *et al.*, 2018). Aguilar León y col. (2009) demostraron que cepas aisladas de diferentes hospedadores y con diferentes genotipos, caracterizados por MIRU-VNTR y Spoligotyping, generaban distintas lesiones inmunopatológicas.

El modelo murino de virulencia y transmisibilidad es de mucha utilidad para caracterizar el comportamiento de los aislamientos de *M. bovis*.

En una experiencia previa, se estudiaron tres cepas de la colección de nuestro laboratorio. Se comparó una cepa de *M. pinnipedii* con dos cepas caracterizadas previamente en el laboratorio, una cepa de baja virulencia (*M. bovis* 534 aislada de un bovino) y una hipervirulenta (*M. bovis* 303 aislada de un jabalí) (Aguilar León *et al.*,

2009; Meikle *et al.*, 2011). A su vez, se realizó la experiencia de transmisibilidad para las 3 cepas, que no había sido reportada previamente. *M. pinnipedii* provocó esplenomegalia en los animales infectados y se obtuvieron UFC en cultivos de bazo tanto de los animales infectados como de animales “contacto sanos”, sin embargo no produjo la muerte en estos últimos animales. Se demostró la transmisión presumiblemente por vía aerógena de las cepas estudiadas debido a la recuperación de las cepas a partir de los pulmones de los animales contactos sanos incluso desde el primer tiempo de eutanasia (30 dpi) (Marfil *et al.*, 2016 b). A pesar de esto, los animales que estuvieron en contacto con los infectados por la cepa hipervirulenta no murieron ni demostraron signología, como sí lo hicieron los animales inoculados con esa cepa.

*M. pinnipedii* cobra importancia, ya que es una especie zoonótica y se presume que habría sido la responsable de la TB en la era Pre-colombina (Bos *et al.*, 2014). Las cepas que actualmente causan TB en humanos tienen mayor similitud con las cepas europeas, pero aquellas que produjeron enfermedad en la era Pre-colombina se agrupaban con linajes de origen animal. Esto fue demostrado a partir de la comparación de secuencias de ADN obtenidas de huesos con lesiones compatibles con tuberculosis halladas en momias peruanas con las de 262 genomas de especies que integran el CMT, habiéndose detectado 76 SNPs comunes con *M. pinnipedii* (Bos *et al.*, 2014). La tuberculosis antes de la llegada de Colón, habría llegado a América a través de mamíferos marinos que viajaban desde África (Bos *et al.*, 2014).

La cepa N° 134, obtenida de un pulmón junto con sus linfonódulos tomado en el frigorífico posteriormente a la inspección de rutina del establecimiento, produjo el desmejoramiento y la muerte de todos los animales inoculados. Los “contactos”, en quienes se midió la transmisibilidad, no presentaron signología clínica durante los meses que duró la experiencia. Tampoco se obtuvieron aislamientos positivos a partir de los órganos de éstos ni se pudo detectar *M. bovis* en los *pools* de pulmón evaluados por PCR-Rv2807. Los valores de citoquinas de estos animales no demostraron perfiles que indiquen infección en ninguno de los ratones de ese grupo. Con esta información, se presume que este aislamiento podría ser hipervirulento, al haber generado la muerte tan rápida de los animales inoculados (entre 15 y 20 días post-inoculación) y no habría llegado a transmitirse. Futuros estudios serán requeridos para continuar con la caracterización de este aislamiento.

La cepa N° 182, obtenida a partir de un hígado con LCT, produjo esplenomegalia en los animales experimentalmente infectados, pero ningún signo clínico de relevancia. Los animales evaluados en el T0 evidenciaron infección, pero en los restantes tiempos sólo de un animal se obtuvo aislamiento positivo a partir de bazo y pulmón en el T60,

este animal presentó los valores más bajos de citoquinas. Los animales “contactos sanos” no presentaron signología ni patologías evidentes. De un solo animal “contacto sano” se pudo obtener cultivo positivo a partir de bazo en el último tiempo de eutanasia (T90 dpi), evidenciando transmisión del aislamiento evaluado. Este animal también presentó valores bajos de las citoquinas. Estos animales no convivieron en la misma jaula. Se podría considerar que este animal “contacto” tomó contacto con la micobacteria en los primeros días de convivencia, cuando el resto de los animales habían sido inoculados y estaban eliminando la micobacteria de sus organismos. Pensando en la posible vía de transmisión, se podría considerar la vía digestiva, puesto que los aislamientos fueron obtenidos a partir de bazo aunque tampoco puede descartarse la aerógena. Algunos investigadores referentes en el tema, asocian la localización de lesiones con la vía de entrada del patógeno (Ana Canal, comunicación personal en la AAVLD 2018; Serrano *et al.*, 2018). El contacto con materia fecal de los animales infectados por parte de los contactos sanos podría representar una importante vía de transmisión. Sin embargo, no se puede descartar que la bacteria haya entrado por la vía respiratoria y luego se haya diseminado. Este aislamiento podría ser considerado de forma preliminar como de virulencia baja y transmisible, pero se requerirán nuevos ensayos con mayor número de animales y una curva de supervivencia para poder caracterizar este aislamiento.

Un aspecto a destacar fue que la esplenomegalia se observó en todos los animales inoculados con la cepa N° 134, la cepa de referencia AN5 y especialmente con la cepa N°182, así como también con la cepa hipervirulenta 303 y con *M. pinnipedii* en una experiencia anterior (Marfil *et al.*, 2016 b). Esta característica no fue observada en ninguno de los casos de los animales “contactos sanos”.

Es interesante el hecho que la cepa N° 134 y las cepas de colección evaluadas *M. bovis* 303 y *M. bovis* 534, posean el mismo espoligotipo y sin embargo, se hayan comportado de manera diferente en su virulencia. Si bien las 3 compartían el espoligotipo SB0140, el más comúnmente aislado en el país, demostraron diferencias en su virulencia, siendo más virulentas 2 de ellas (cepas N° 134 y *M. bovis* 303).

Con respecto a las citoquinas utilizadas para caracterizar la infección, INF- $\gamma$  indica una respuesta del tipo celular, mientras que IL-4 se ve más representada en aquellas respuestas humorales y suele estar aumentada en la progresión de la enfermedad. TNF aumenta por múltiples causas, pero está asociado a una respuesta pro-inflamatoria como INF- $\gamma$ . En esta experiencia, se pudo observar que los niveles de todas las citoquinas fueron mayores en los animales experimentalmente inoculados respecto del grupo sin infectar, los “contactos sanos”. Se observó una tendencia marcadamente pro-inflamatoria con mayores niveles de INF- $\gamma$  y TNF, con niveles

basales de IL-4 en todos los animales. Los animales infectados con la cepa N° 134 fueron los que tuvieron niveles más bajos de INF- $\gamma$  entre los experimentalmente infectados. Esto puede ser debido a que la enfermedad se comportó de forma aguda y los animales no pudieron montar una respuesta inmune adecuada. Cabe destacar que los valores para estos animales fueron tomados al día 16 de la experiencia, puesto que empezaron a morir y por razones éticas debieron ser eutanasiados. Así también, solo 6 animales de los 15 originales pudieron ser eutanasiados a tiempo para poder coleccionar sus bazos y procesarlos, el resto de los animales murieron durante la experiencia. Los pulmones y bazos igualmente fueron cultivados salvo en 3 animales en los que esto no pudo ser posible debido a los signos *post-mortem* que presentaban. La resistencia a drogas y su asociación con ciertos genes ha sido ampliamente estudiada desde 1992, cuando Zhang relacionó las mutaciones en el gen *katG* con la resistencia a INH (Zhang *et al.*, 1992). Sin embargo, no todas las mutaciones en genes asociados a resistencia contra drogas pueden ser detectadas por métodos moleculares. Más importante aún, no todas las mutaciones en esos genes se traducen en resistencia. Como la especificidad de las técnicas moleculares no es del 100% para todas las drogas, es necesario realizar el método de susceptibilidad a drogas basado en cultivo para llegar a un resultado más certero de estas resistencias (Lin & Desmond, 2014).

Existen distintos métodos moleculares para la identificación de las resistencias a antibióticos, basados en la detección con sondas o por secuenciación, revelando la identidad de la mutación (Lin & Desmond, 2014). Ejemplos de esos métodos son el *Line Probe Assay* (LiPA) y el *GenoType MTBDR plus* (Morgan *et al.*, 2005; Viveiros *et al.*, 2005; Imperiale *et al.*, 2014; Theron *et al.*, 2014). El BACTEC MGIT 960 es un sistema automatizado de cultivo que detecta el consumo de oxígeno por fluorescencia. Para el ensayo de susceptibilidad a drogas, la cepa sensible es aquella que al no desarrollar en presencia de antibióticos y no consume oxígeno. Este método puede ser usado para realizar primocultivo y posteriormente realizar la prueba de sensibilidad a drogas. El MGIT® 960 SIRE kit (Becton Dickinson, Argentina) es un kit que detecta directamente la sensibilidad o resistencia a las 4 principales drogas de utilidad para el tratamiento. Varios reportes de brotes causados por *M. bovis* multirresistente en pacientes con HIV han sido comunicados en países de Europa, donde destacan que la resistencia a antibióticos fue dada principalmente por presión de selección ante la utilización de antibióticos en forma inadecuada (Blazquez *et al.*, 1997; Guerrero *et al.*, 1997; Bouvet *et al.*, 1993). Poca información se ha obtenido en lo que respecta a la resistencia de aislamientos de *M. bovis* obtenidos de bovinos. En la mayoría de los casos no se ha detectado resistencia a drogas antituberculosas salvo a pirazinamida

(Z), ya que *M. bovis* es naturalmente resistente a Z (Konno *et al.*, 1967). Esta droga es utilizada con frecuencia en los tratamientos de TB en humanos en combinación con rifampicina (RIF) e incluso ha sido utilizada para distinguir *M. tuberculosis* de *M. bovis* en caso de sospecha en aislamientos en humanos. En el norte de Italia se pudieron detectar aislamientos de bovinos multirresistentes, presentando resistencia a RIF e INH (Chang *et al.*, 2010).

En el presente trabajo de tesis, se estudió la resistencia a antibióticos en 3 de los aislamientos de *M. bovis* que pudieron mantenerse viables en condiciones de crecimiento *in vitro*. Como dato relevante, la cepa de *M. bovis* N° 184 fue resistente a INH, resistencia detectada mediante los dos métodos fenotípicos evaluados. Sin embargo, la técnica molecular aquí utilizada, basada en multiplex PCR (MAS-PCR), no evidenció las mutaciones en los genes asociados a resistencia. A su vez, la cepa *M. bovis* N°134, se comportó como multirresistente al ser evaluada por los métodos fenotípicos, demostrando resistencia a RIF, INH, SM y EMB. Sin embargo, la técnica de MAS-PCR tampoco detectó la resistencia genotípica asociada. Esto podría explicarse considerando que ambas cepas podrían presentar una mutación diferente a las contempladas en el diseño del método molecular el cual incluye 3 mutaciones en *rpoB* (codones 516, 526 y 531) para RIF y para la resistencia a INH, mutaciones en los genes *inhAP-15* y *katG* 315. Otros autores coinciden en que éstos métodos tienen sus limitaciones en lo que respecta a la sensibilidad y especificidad de la técnica, que llega al 100%, ya que contempla solo las mutaciones más frecuentes, además de no estar disponibles para todas las drogas (Lin & Desmond, 2014). Esto remarca la importancia de evaluar la susceptibilidad a drogas por varios métodos como los fenotípicos o los moleculares basados en la secuenciación ya sea de genes de interés o de genomas (*Next Generation Sequencing*) (Lin & Desmond, 2014).

Hay que considerar que la resistencia a antibióticos que adquieren las micobacterias en general es debida a presión de selección durante el tratamiento con antibióticos. Los animales domésticos no son tratados contra la tuberculosis, lo cual abre un abanico de posibilidades a la hora de considerar las posibles causas por las cuales estas mutaciones se adquieren y se fijan en el genoma de la micobacteria aislada. Por un lado, pudo haber sucedido que el bovino haya adquirido una cepa resistente de un tambero que fue tratado contra *M. bovis*. Otra teoría posible es que las mutaciones al azar y microevolución de las micobacterias, se reflejen en mutaciones en genes de resistencia. Esto es interesante ya que se conoce que la tasa de mutación en *M. bovis* es similar a la de *M. tuberculosis*. En un estudio realizado por Navarro y col., se demostró la microevolución de aislamientos de *M. bovis*, la cual generaba variantes clonales nuevas en un 50% de la población en estudio, que eran bovinos naturalmente

infectados. El período de estudio fue de 12 meses, lo que denota la rapidez con que estos cambios pueden darse, generando variantes clonales más adaptadas. Esta variabilidad no se relacionaba con ningún espigotipo particular (Navarro *et al.*, 2016). Como caso emblemático de resistencia de *M. bovis*, entre los años 1993 y 1995, en España se registraron dos brotes epidémicos ocasionados por una cepa de resistente a once drogas en pacientes humanos infectados con el virus de la inmunodeficiencia humana (Blazquez *et al.*, 1997; Samper *et al.*, 1997).

Ante la obtención de un aislamiento de *M. bovis*, y teniendo en cuenta su rol zoonótico, es de interés realizar la identificación de posibles resistencias a tuberculostáticos. Por este motivo, los hallazgos del presente trabajo sustentan la necesidad del desarrollo de herramientas moleculares que permitan identificar nuevas variantes asociadas a resistencia al tratamiento. Otro dato de relevancia es que la técnica de MAS-PCR ha sido puesta a punto para aislamientos obtenidos a partir de humanos (incluyendo *M. tuberculosis* y *M. bovis*).

Como antecedente, en España, entre los años 1950 y 1960, era común la administración de INH al ganado para promover su crecimiento, práctica que podría haber facilitado en ese país la aparición de mutantes resistentes a la droga (Romero *et al.*, 2006). En nuestro país, no hay reportes al respecto, aunque no podría descartarse. Colegas veterinarios han reportado el tratamiento de bovinos con INH en algunas zonas de la provincia de Córdoba. Si bien no está fehacientemente comprobado, se consideraría de particular interés ante la casuística del presente trabajo (Reunión de la comisión de Micobacterias, Asociación Argentina de Veterinarios de Laboratorios de Diagnóstico, 2018).

En aislamientos de animales silvestres o domésticos, el tema ha sido poco explorado, sin embargo existen en nuestro país reportes en aislamientos de un bovino y un cerdo, que presentaron resistencia a INH (Comunicación personal Dra. Barandiaran).

En la Argentina, en las áreas de diagnóstico y vigilancia epidemiológica se cuenta con la Red Nacional de Laboratorios coordinada por la Administración Nacional de Laboratorios e Institutos de Salud (ANLIS) “Dr. Carlos Malbrán” y el Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias “Dr. Emilio Coni”, ubicados en la Ciudad Autónoma de Buenos Aires y Santa Fe, respectivamente, que sumados a centros de referencia provinciales como el hospital Dr. Antonio Cetrángolo; constituyen los laboratorios para la identificación de aislamientos resistentes a drogas anti-tuberculosas.

En lo que respecta a las MNT encontradas en los pulmones evaluados, consideramos que si bien no son zoonóticas, es importante considerarlas ya que pueden ocasionar la enfermedad en personas o animales inmunosuprimidos. Además, como las MNT suelen presentar resistencia a los antibióticos “de primera línea” usados en el

tratamiento de la TB, su incorrecta identificación puede conducir al mal manejo del paciente enfermo prolongando el tiempo de tratamiento (Imperiale *et al.*, 2012). Las especies aisladas en este trabajo se han reportado en bibliografía como casos asociados a enfermedad en pacientes principalmente inmunosuprimidos. *M. intracellulare* ha sido descrita como causante de enfermedad en pacientes con HIV, fibrosis quística y cáncer de pulmón (Hoza *et al.*, 2016; Martinano *et al.*, 2019; Garg *et al.*, 2018) pero también ha sido aislada de agua en saunas y en pacientes con enfermedad pulmonar que habían estado expuestos al vapor en saunas (Hanak *et al.*, 2006). Es comúnmente aislada de tracto respiratorio de pacientes enfermos pero no siempre tiene implicancias clínicas para ellos. *M. insubricum* es una micobacteria de crecimiento lento y sensible a antibióticos, se la ha detectado en al menos 5 casos clínicos en humanos con sintomatología respiratoria. Sin embargo, los autores llegaron a la conclusión que no eran los causantes primarios de la enfermedad (Tortoli *et al.*, 2009; Tortoli *et al.*, 2014). *M. nonchromogenicum* está ampliamente citada en la bibliografía como causante de inmunidad cruzada durante el diagnóstico de TBB (Biet & Boschirolli, 2014; Jenkins *et al.*, 2018), así como también como contaminante de la leche bovina (Sgarioni *et al.*, 2014; Bolaños *et al.*, 2018). Asimismo, en humanos ha sido reportada desde la década del 80' como causante de enfermedad pulmonar (Tsukamura *et al.*, 1983). *M. septicum* también ha sido identificada como causante de enfermedad pulmonar en humanos o produciendo abscesos en piel (Adekambi *et al.*, 2006; Lian *et al.*, 2013; Miki *et al.*, 2010). *M. kansasii* ha sido aislada de agua y suelo, pero también se la ha relacionado a casos de enfermedad pulmonar en individuos inmunosuprimidos o con enfermedades pulmonares asociadas (Lillo *et al.*, 1990). Al conservar los genes que codifican para ESAT-6 y CFP-10, podría llegar a interferir en el diagnóstico por IDR en el ganado bovino (Wang *et al.*, 2015).

La utilización de los genes ARNr 16 S, *rpoB* y *hsp65* en combinación, permitió definir con mayor certeza la identidad de la MNT. De todos los aislamientos, sólo uno (N° 143) resultó no pertenecer al género *Mycobacterium*, sino que se lo identificó como *Corynebacterium sp.* que también es positivo a la tinción de Ziehl-Neelsen. En el caso de las muestras N° 4 y 60, cuya amplificación del gen *rpoB* no rindió un producto en suficiente concentración para poder secuenciarse, su identificación se basó en el resultado de la comparación de las secuencias de los otros genes, siguiendo el criterio preestablecido para la determinación de la identidad de las MNT (Monteserín *et al.*, 2016).

Con respecto al aislamiento N°179, tenemos evidencias suficientes para confirmar la co-existencia de *M. bovis* y *M. kansasii* en el cultivo obtenido a partir del pulmón y sus linfonódulos, del que fue tomada la muestra. Esto podría explicar una posible co-



infección. Originalmente, el crecimiento en el medio de Stonebrink presentó un color amarillo-anaranjado, esta colonia, como todas las otras MNT fue sometida a PCR IS-6110, dando un resultado positivo y su genotipificación se continuó por Spoligotyping y MIRU-VNTR pudiéndose caracterizar correctamente. A su vez, intentamos repicarla en medio de cultivo sintético, para continuar con la caracterización del aislamiento como lo hicimos con las restantes *M. bovis*. El aislamiento no presentó la coloración que inicialmente tuvo en el medio Stonebrink, desarrollando un gran crecimiento en este medio. A pesar de haberlo intentado en reiteradas oportunidades, el aislamiento de *M. bovis* se perdió al pasar a un medio sintético puesto que *M. kansasii*, al tener menos requerimientos que *M. bovis*, creció antes y desplazó competitivamente a *M. bovis*. Debido a que *M. kansasii* puede interferir en el diagnóstico de la TBB, se decidió realizar la secuenciación del genoma de este aislamiento.

La secuenciación del genoma completo nos permitió confirmar su identidad como *M. kansasii* por comparación con las secuencias disponibles en la base de datos. Se requerirá de un nuevo cultivo a partir del tejido original en medios y temperaturas especiales para lograr la separación de las 2 cepas (*M. bovis* y *M. kansasii*). En la secuenciación de este aislamiento pudimos comprobar la presencia de los genes que codifican para las proteínas ESAT-6 y CFP-10, cuya presencia podría implicar un falso positivo en la IDR de animales infectados con esta MNT en lugar de *M. bovis*. Se pudo comprobar a su vez, que su genoma presentaba un ordenamiento muy similar de sus genes respecto del de la cepa de referencia, pero no poseía el plásmido descrito en la misma. En la comparación mediante *Breseq* con *M. bovis*, presentó varios SNPs en genes relacionado con la resistencia a antibióticos. Consideramos que estas mutaciones son de interés para ser incorporadas en kits diagnósticos o basados en métodos moleculares, para de esta forma mejorar la identificación de cepas resistentes de *M. bovis*, siendo que esta documentado que las MNT suelen presentar droga-resistencia (Imperiale *et al.*, 2012).

Los aislamientos obtenidos de *M. bovis* obtenidos en esta tesis son de importancia para la salud pública por tratarse de una especie zoonótica, que podrían haber actuado como fuentes de infección en la comunidad, particularmente en aquellas personas que estuvieran en contacto con los órganos de donde se aislaron (trabajadores del campo, personal de frigorífico, carniceros y consumidores) como así también de mascotas que podrían haber ingerido el alimento. El hecho que 2 de estos aislamientos hayan presentado resistencia a antibióticos de primera línea de tratamiento es alarmante y difícil de atribuirle una explicación y resalta la importancia del concepto de trazabilidad del origen de los alimentos, poco frecuente en nuestro país. Asimismo se requiere continuar con la evaluación de susceptibilidad a drogas de

nuevos aislamientos para dilucidar si se trató de un hallazgo puntual o si es una situación más frecuente de encontrar.

Si bien la erradicación de la enfermedad de los rodeos es fundamental para lograr reducir el número de animales con lesiones que lleguen al frigorífico, a partir de los resultados obtenidos en este trabajo de tesis en el que se demostró la presencia de *M. bovis* viable en órganos comercializados en carnicerías de CABA y GBA, que constituyen escapes al sistema de control e inspección, se propone:

- a) Incrementar la capacitación y el entrenamiento del personal de fiscalización bromatológica de frigoríficos (nacionales, provinciales y municipales) para la identificación de LCT, aportando a mejorar la vigilancia epidemiológica de la TBB.
- b) Confirmar la presencia de LCT mediante cultivo y tipificación molecular, determinando además el perfil de drogo-resistencia y adoptar las medidas sanitarias y sanciones pertinentes en el establecimiento de origen.
- c) Remarcar en la población mediante campañas de difusión, la importancia de la cocción de los alimentos, aún cuando son administrados a las mascotas, ya que esta medida representa la última barrera de protección.
- d) Incrementar la comercialización de alimentos cárnicos envasados, con identificación de origen para su trazabilidad, reduciendo así el fraccionamiento en las carnicerías minoristas y minimizando la posibilidad de venta de alimentos sin control provenientes de faena clandestina.

Estas acciones y/o medidas propuestas constituirían una nueva estrategia del Plan Nacional de Control y Erradicación de la Tuberculosis bovina en nuestro país.

# CONCLUSIONES



## Conclusiones

- Se demostró la presencia de *M. bovis* viable en órganos comercializados en carnicerías, que evidencian la existencia de escapes al sistema de vigilancia bromatológico de rutina, debido a características inherentes a la enfermedad.
- Se reportó la frecuencia de las micobacterias patógenas y ambientales presentes en este tipo de muestras mediante la identificación y tipificación por técnicas moleculares.
- Se secuenció el primer genoma de *M. kansasii* aislado a partir de un pulmón bovino comercializado en una carnicería, que contribuirá a establecer la importancia de esta micobacteria en el sector pecuario.
- Las mutaciones no sinónimas detectadas en los genes asociados a la drogo-resistencia, virulencia y en genes utilizados con fines diagnósticos, contribuirán a mejorar las técnicas moleculares utilizadas actualmente.
- La detección de cepas salvajes de *M. bovis* resistentes a drogas de primera línea utilizadas en el tratamiento de la tuberculosis humana, es un hallazgo de importancia para la Salud Pública, siendo que la búsqueda de drogo-resistencia en el ambiente veterinario es una práctica poco frecuente. La discordancia entre los métodos fenotípicos y moleculares remarca la importancia de su utilización combinada, ya que estos últimos contemplan únicamente a las mutaciones que generaran resistencia con más frecuencia.
- El modelo murino de transmisibilidad fue eficiente para demostrar la transmisión de distintas cepas de *M. bovis*. La variabilidad en la virulencia y transmisibilidad en las cepas de *M. bovis* evaluadas, pueden conducir a la manifestación de distintos escenarios epidemiológicos de la enfermedad tanto en Salud Pública como veterinaria.

*Los resultados obtenidos en este trabajo de tesis, contrastaron y confirmaron las hipótesis propuestas y han generado información que podrá contribuir tanto a mejorar como a diseñar nuevas estrategias para afrontar la problemática de la enfermedad en la Argentina en apoyo al sector pecuario del país en el marco del Plan Nacional de Control y Erradicación de la Tuberculosis bovina, aportando además al concepto de “Una Salud”.*

# REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS



## Referencias bibliográficas

Adékambi, T., Colson, P., Drancourt, M. (2003). *rpoB* -Based Identification of Nonpigmented and Late-Pigmenting Rapidly Growing. *Journal of Clinical Microbiology*, 41 (12), pp: 5699–5708. <https://doi.org/10.1128/JCM.41.12.5699>

Adékambi, T., Drancourt, M. (2006). Isolation of *Mycobacterium septicum* from the sputum of a patient suffering from hemoptoic pneumonia. *Research in Microbiology*, 157(5), 466–470. <https://doi.org/10.1016/J.RESMIC.2005.10.006>

Aguilar León, D., Zumárraga, M. J., Jiménez Oropeza, R., Gioffré, A. K., Bernardelli, A., Orozco Estévez, H., Hernández Pando, R. (2009). *Mycobacterium bovis* with different genotypes and from different hosts induce dissimilar immunopathological lesions in a mouse model of tuberculosis. *Clinical and Experimental Immunology*, 157(1), 139–147. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2249.2009.03923.x>

Albanna, A. S., Reed, M. B., Kotar, K. V., Fallow, A., McIntosh, F. A., Behr, M. A., & Menzies, D. (2011). Reduced Transmissibility of East African Indian Strains of *Mycobacterium tuberculosis*. *PLoS ONE*, 6(9), e25075. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0025075>

Alexander, K. A., Laver, P. N., Michel, A. L., Williams, M., van Helden, P. D., Warren, R. M., Laver, P. (2010). Novel *Mycobacterium tuberculosis* Complex Pathogen, *M. mungi*. *Emerg Infect Dis*, 16(8). <https://doi.org/10.3201/eid1608.100314>

Allix-Béguec, C., Harmsen, D., Weniger, T., Supply, P., & Niemann, S. (2008). Evaluation and strategy for use of MIRU-VNTRplus, a multifunctional database for online analysis of genotyping data and phylogenetic identification of *Mycobacterium tuberculosis* complex isolates. *Journal of Clinical Microbiology*, 46(8), 2692–2699. <https://doi.org/10.1128/JCM.00540-08>

Araújo, C. P., Luiza, A., Osório, A. R., Jorge, K. S. G., Ramos, C. A. N., Souza Filho, A. F., Araújo, F. R. (2014). Direct detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex in bovine and bubaline tissues through nested-PCR. *Brazilian Journal of Microbiology*, 45, 633–640.

Banerjee, A., Dubnau, E., Quemard, A., Balasubramanian, V., Um, K. S., Wilson, T., Jacobs, W. R. J. (1994). *inhA*, a Gene Encoding a Target for Isoniazid and Ethionamide in *Mycobacterium tuberculosis* Sun Um , Theresa Wilson , Des Collins , Geoffrey de Lisle and William R . Jacobs Jr. Published by: American Association for the Advancement of Science Stable URL. *Science*, 263(5144), 227–230.

Barandiaran, S., Martínez Vivot, M., Moras, E. V., Cataldi, A. A., Zumárraga, M. J. (2011). *Mycobacterium bovis* in Swine: Spoligotyping of isolates from Argentina. *Veterinary Medicine International*, 2011, 1–6. <https://doi.org/10.4061/2011/979647>

- Barandiaran S., Garbaccio S, Martinez Vivot M., Zumárraga M. (2013) Evaluación de distintas metodologías de extracción del ADN para la detección de *Mycobacterium bovis* en tejidos. Trabajo presentado en el XIII Congreso Argentino de Microbiología –Septiembre de 2013. CABA, Argentina.
- Barandiaran, S., Pérez, A. M., Gioffré, A. K., Martínez Vivot, M., Cataldi, A. A., Zumárraga, M. J. (2014). Tuberculosis in swine co-infected with *Mycobacterium avium* subsp. *Hominissuis* and *Mycobacterium bovis* in a cluster from Argentina. *Epidemiology and Infection*, 143(5), 966–974. <https://doi.org/10.1017/S095026881400332X>
- Barandiaran, S., Martínez Vivot, M., Pérez, A. M., Cataldi, A. A., Zumárraga, M. J. (2015). Bovine tuberculosis in domestic pigs: Genotyping and distribution of isolates in Argentina. *Research in Veterinary Science*, 103, 44–50. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2015.09.013>
- Barandiaran, S., Martínez Vivot, M., Falzoni, E., Marfil, M. J., Pérez Tort, G., Rovatti, P., Zumárraga, M. J. (2017). Mycobacterioses in dogs and cats from Buenos Aires, Argentina. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 1–4. <https://doi.org/10.1177/1040638717713795>
- Soledad Barandiaran, María Jimena Marfil, Marcela Martínez Vivot, Elvira Falzoni, Martín José Zumárraga, Lorena Ceglie, Carolina Maffi, Susana Imaz. (2018). Tuberculosis Zoonótica: Tipificación de aislamientos de *Mycobacterium bovis* de pacientes humanos. Póster presentado en el “II Congreso Internacional de Zoonosis y el IX Congreso Argentino de Zoonosis”, Junio 2018. Buenos Aires, Argentina.
- Behr, MA, Waters, WR (2014). Is tuberculosis a lymphatic disease with a pulmonary portal? *The Lancet Infectious Diseases*, 14(3), 250-255. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(13\)70253-6](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(13)70253-6)
- Bernardelli A, Nicola A, Alonso B. (2005).Tuberculosis bovina: Evaluación de técnicas de diagnóstico. *Rev Med Vet* 2005; 86: 183–194.
- Biet, F., Boschioli, M. L. (2014). Non-tuberculous mycobacterial infections of veterinary relevance. *Research in Veterinary Science*, 97(S), S69–S77. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2014.08.007>
- Blanco, F. C., Nuñez-García, J., García-Pelayo, C., Soria, M., Bianco, M. V., Zumárraga, M., Bigi, F. (2009). Differential transcriptome profiles of attenuated and hypervirulent strains of *Mycobacterium bovis*. *Microbes and Infection*, 11(12), 956–963. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2009.06.006>
- Blázquez, J., De Los Monteros, L. E. E., Samper, S., Martín, C., Guerrero, A., Cobo, J., Gómez-Mampaso, E. (1997). Genetic characterization of multidrug-resistant *Mycobacterium*

*bovis* strains from a hospital outbreak involving human immunodeficiency virus- positive patients. *Journal of Clinical Microbiology*, 35(6), 1390–1393.

Bolaños, C. A. D., Franco, M. M. J., Souza Filho, A. F., Ikuta, C. Y., Burbano-Rosero, E. M., Ferreira Neto, J. S., Ribeiro, M. G. (2018). Nontuberculous mycobacteria in milk from positive cows in the intradermal comparative cervical tuberculin test: implications for human tuberculosis infections. *Revista Do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo*, 60, e6. <https://doi.org/10.1590/s1678-9946201860006>

Bos, K. I., Harkins, K. M., Herbig, A., Coscolla, M., Weber, N., Comas, I., Krause, J. (2014). Pre-Columbian mycobacterial genomes reveal seals as a source of New World human tuberculosis. *Nature*, 514(7253), 494–497. <https://doi.org/10.1038/nature13591>

Bouvet, E., Casalino, E., Mendoza-Sassi, G., Lariven, S., Valleé, E., Pernet, M., Vachon, F. (1993). A nosocomial outbreak of multidrug-resistant *Mycobacterium bovis* among HIV-infected patients. A case controlled study. *AIDS*, 3(2), 1453–1460.

Brosch, R., Gordon, S. V., Marmiesse, M., Brodin, P., Buchrieser, C., Eiglmeier, K., Garnier, T., Gutierrez, C., Hewinson, G., Kremer, K., Parsons, L. M., Pym, A. S., Samper, S., van Soolingen, D., Cole, S. T. (2002). A new evolutionary scenario for the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(6), 3684–3689. <https://doi.org/10.1073/pnas.052548299>

Casas Olascoaga, R. (2013). Técnico: Antecedentes de la Tuberculosis Bovina en Uruguay, Periodo Marzo 1888 – Enero 1998. *Veterinaria (Montevideo)*, 49(189), 14–30.

Cassidy, J. P. (2006). The pathogenesis and pathology of bovine tuberculosis with insights from studies of tuberculosis in humans and laboratory animal models. *Veterinary Microbiology*, 112(2–4), 151–161. <https://doi.org/10.1016/J.VETMIC.2005.11.031>

Cataldi, A. A., Gioffré, A., Santtangelo, M. P., Alito, A., Caimi, K., Bigi, F., Romano, M. I., Zumárraga, M. (2002). The genotype of the principal *Mycobacterium bovis* in Argentina is also that of the British Isles: did bovine tuberculosis come from Great Britain? *Revista Argentina de Microbiología*, 34(1), 1–6.

Chang, K. C., Yew, W. W., Chiu, R., & Chan, Y. (2010). Rapid assays for fluoroquinolone resistance in *Mycobacterium tuberculosis* : a systematic review and meta-analysis. *J Antimicrob Chemother*, 65 (June), 1551–1561. <https://doi.org/10.1093/jac/dkq202>

Clavijo, A. M., de Rolo, M., Alfaro, C., Corso, M. (2004). Todo lo que usted necesita saber sobre Tuberculosis Bovina. *Revista Digital CENIAP HOY Número Especial 2004*. Maracay, Aragua,



Venezuela. Disponible en: [www.ceniap.gov.ve/ceniaphoy/articulos/ne/arti/clavijo\\_a/arti/clavijo\\_a.htm](http://www.ceniap.gov.ve/ceniaphoy/articulos/ne/arti/clavijo_a/arti/clavijo_a.htm).

Cobos-Marín, L., Montes-Vargas, J., Zumarraga, M., Cataldi, A., Romano, M. I., Estrada-García, I., González-y-Merchand, J. A. (2005). Spoligotype analysis of *Mycobacterium bovis* isolates from Northern México. *Canadian Journal of Microbiology*, 51(11), 996–1000. <https://doi.org/10.1139/w05-083>

Coll, F., Mallard, K., Preston, M. D., Bentley, S., Parkhill, J., McNerney, R., Martin, N., Clark, T. G. (2012). SpolPred: rapid and accurate prediction of *Mycobacterium tuberculosis* spoligotypes from short genomic sequences. *Bioinformatics (Oxford, England)*, 28(22), 2991–2993. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bts544>

Collins, D. M., & Stephens, D. M. (1991). Identification of an insertion sequence, IS1081, in *Mycobacterium bovis*. *FEMS Microbiology Letters*, 67(1), 11–15.

Colmegna, I., Ricci, B. G., Zumarraga, M., Cataldi, A. A., Di Lonardo, M. M., Citera, G., & Maldonado-Cocco, J. A. (2004). *Mycobacterium bovis* and septic glenohumeral arthritis. *Clin Rheumatol*, 23(4), 379–380. <https://doi.org/10.1007/s10067-004-0891-x>

Cooney, R., Kazda, J., Queen, J., Cook, B., Muller, K., Monaghan, N. (1997). Environmental mycobacteria in Ireland as a source of non-specific sensitisation to tuberculin. *Irish Veterinary J.* 50, 370–373.

Corner, L. A. (1994). Post mortem diagnosis of *Mycobacterium bovis* infection in cattle. *Veterinary Microbiology*, 40(1–2), 53–63. [https://doi.org/10.1016/0378-1135\(94\)90046-9](https://doi.org/10.1016/0378-1135(94)90046-9)

Gómez Andrade, Delguy. (2003). Nota periodística para “La Nación”: “El cuatrero y la faena clandestina, una historia sin fin”. Disponible en el siguiente Link: <https://www.lanacion.com.ar/507024-el-cuatrerismo-y-la-faena-clandestina-una-historia-sin-fin>

Kantor, I. N. de, Nader, A., Bernardelli, A., Girón, D. O., & Man, E. (1987). Tuberculous Infection in Cattle not Detected by Slaughterhouse Inspection. *Journal of Veterinary Medicine, Series B*, 34(1–10), 202–205. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0450.1987.tb00388.x>

de Kantor, I. N. (1988). Algunas novedades sobre un viejo conocido: el bacilo tuberculoso. *Medicina*, 48, 321.

De Kantor, I. N., & Ritacco, V. (2006). An update on bovine tuberculosis programs in Latin American and Caribbean countries. *Veterinary Microbiology*, 112 (2–4 SPEC. ISS.), 111–118. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2005.11.033>

de Kantor, I. N., Torres, P. M., Morcillo, N., Imaz, M. S., & Sequeira, M. D. (2012). La tuberculosis zoonótica en la Argentina. *Medicina (Argentina)*, 72 (6), 514–520.

Deathage, D., & Barrick, J. (2014). Identification of mutations in laboratory evolved microbes from next-generation sequencing data using breseq Daniel. *Methods Mol Biol.*, 1151, 165–188. <https://doi.org/10.1007/978-1-4939-0554-6>

Domingo, M., Vidal, E., & Marco, A. (2014). Pathology of bovine tuberculosis. *Research in Veterinary Science*, 97(S), 20–29. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2014.03.017>

Dvorska, L., Matlova, L., Bartos, M., Parmova, I., Bartl, J., Svastova, P., Bull, T.J., Pavlik, I. (2004). Study of *Mycobacterium avium* complex strains isolated from cattle in the Czech Republic between 1996 and 2000. *Veterinary Microbiology*, 99(3–4), 239–250. <https://doi.org/10.1016/J.VETMIC.2004.01.008>

Encinas, M., Marfil, M. J., Garbaccio, S., Barandiaran, S., Huertas, P., Morsella, C., Macías, A., Magnano, G., Zapata, L., Bigi, F., Cataldi, A., Paolicchi, F., Zumárraga, M., Eirin, M. E. (2018). *Mycobacterium bovis* ESAT-6, CFP-10 and EspC antigens show high conservation among field isolates. *Tuberculosis*, 111(December 2017), 143–146. <https://doi.org/10.1016/j.tube.2018.06.007>

Etchechoury, I., Valencia, G. E., Morcillo, N., Sequeira, M. D., Imperiale, B., López, M., Caimi, K., Zumárraga, M. J., Cataldi, A., Romano, M. I. (2010). Molecular typing of *Mycobacterium bovis* isolates in Argentina: First description of a person-to-person transmission case. *Zoonoses and Public Health*, 57(6), 375–381. <https://doi.org/10.1111/j.1863-2378.2009.01233.x>

Fernández F, Morici E. Tuberculosis felina por *Mycobacterium bovis*: comunicación de dos casos. *Rev Argent Microbiol* 1999; 31 Supl 1: 19-20.

Galvis, J. O. A.; Grisi Filho, J. H. H; Costa, D.; Said, A. L. P. R.; Amaku, M.; Dias, R. A.; Ferreira, F.; Gonçalves, V. S. P.; Heinemann, M. B.; Telles, E. O.; Ferreira Neto, J. S. (2016) Epidemiologic characterization of bovine tuberculosis in the state of Espírito Santo, Brazil. *Semina: Ciências Agrárias, Londrina*, v. 37, n. 5, p. 3567-3578, 2016. Suplemento 2.

Garbaccio, S., Saldaño, S., & Rabasa, A. (2008). Relevamiento de enfermedades de interés en Salud Pública en pequeños rumiantes de la provincia de Tucumán, Argentina. *Rev. Med. Vet.* 2008. 89 (4). 159–163.

Garbaccio, S., Macias, A., Shimizu, E., Paolicchi, F., Pezzone, N., Magnano, G., CNI, A., Cataldi, A. (2014). Association between spoligotype-VNTR types and virulence of *Mycobacterium bovis* in cattle. *Virulence*, 5(2), 297–302.

- Garbaccio, S., Barandiaran, S., Fernandez, A., Macias, A., Magnano, G., Martinez, M., Peyrú, M., Cataldi, A. (2016). Ensayo interlaboratorio : aislamiento de *Mycobacterium bovis* a partir de lesiones granulomatosas en bovinos. *Revista Argentina de Microbiología*, 48(2), 161–165. <https://doi.org/10.1016/j.ram.2016.03.004>
- Garg, N., Punch, C., Stein, M., & Schofield, C. (2018). When occam's razor can fail- active mycobacteria infection and lung cancer: A case of neuroendocrine lung cancer diagnosed in the setting of refractory *Mycobacterium avium-intracellulare*. *Clinical Case Reports*, 6(11), 2156–2159. <https://doi.org/10.1002/ccr3.1813>
- Garnier, T., Eiglmeier, K., Camus, J.-C., Medina, N., Mansoor, H., Pryor, M., Duthoy, S., Grondin, S., Lacroix, C., Monsempe, C., Simon, S., Harris, B., Atkin, R., Dogget, J., Mayes, R., Keating, L., Wheeler, P. R., Parkhill, J., Barrell, B. G., Cole, S. T., Gordon, S. V., Hewinson, R. G. (2003). The complete genome sequence of *Mycobacterium bovis*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 100(13), 7877–7882. <https://doi.org/10.1073/pnas.1130426100>
- Gibbens, N. (2014) *Mycobacterium bovis* infection in cats. *Veterinary Records*. Vol: 174, pp: 331-332.
- Glickman, M. S., & Jacobs, W. R. (2001). Microbial pathogenesis of *Mycobacterium tuberculosis*: dawn of a discipline. *Cell*, 104(4), 477–485. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(01\)00236-7](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(01)00236-7)
- Guérin-Faublée V, Flandrois J, Pichat C, Boschirolì M, Lamy B. *Mycobacterium bourgelatii* sp. nov., a rapidly growing, non-chromogenic species isolated from the lymph nodes of cattle. *Int J Syst Evol Microbiol*. 63(12):4669-4674 doi:10.1099/ijs.0.051979-0
- Guerrero, C., Bernasconi, C., Burki, D., Bodmer, T., & Teleni, A. (1995). A novel insertion element from *Mycobacterium avium*, IS1245, is a specific target for analysis of strain relatedness. *Journal of Clinical Microbiology*, 33(2), 304–307.
- Guerrero A, Cobo J, Fortún J, Navas E, Quereda C, Asensio A, Cañón J, Blazquez J, Gómez-Mampaso E. (1997). Nosocomial transmission of *Mycobacterium bovis* resistant to 11 drugs in people with advanced HIV-1 infection. *Lancet*. 1997, Dec 13; 350 (9093):1738-1742. PMID: 9413465
- Gupta, R. S., Lo, B., Son, J. (2018). Phylogenomics and comparative genomic studies robustly support division of the genus *Mycobacterium* into an emended genus *Mycobacterium* and four novel genera. *Frontiers in Microbiology*, 9 (FEB), 1–41. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00067>

- Hanak, V., Kalra, S., Aksamit, T. R., Hartman, T. E., Tazelaar, H. D., Ryu, J. H. (2006). Hot tub lung: Presenting features and clinical course of 21 patients. *Respiratory Medicine*, 100(4), 610–615. <https://doi.org/10.1016/j.rmed.2005.08.005>
- Hermans, P. W., van Soolingen, D., Dale, J. W., Schuitema, A. R., McAdam, R. A., Catty, D., van Embden, J. D. (1990). Insertion element IS986 from *Mycobacterium tuberculosis*: a useful tool for diagnosis and epidemiology of tuberculosis. *Journal of Clinical Microbiology*, 28(9), 2051–2058.
- Hermida, H; Pierdomenico, A; Martinez Vivot, M; Zumarraga, JM; Barandiaran, S. (2014). Comparación de diferentes técnicas diagnósticas de la tuberculosis bovina, prueba de oro versus técnicas modernas. Póster presentado en las Jornadas de Jóvenes investigadores, FCV, UBA. Buenos Aires, Junio, 2014.
- Homolka, S., Post, E., Oberhauser, B., George, A. G., Westman, L., Dafaie, F., Rüscher-Gerdes, S., Niemann, S. (2008). High genetic diversity among *Mycobacterium tuberculosis* complex strains from Sierra Leone. *BMC Microbiology*, 8(103), 1–8. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-8-103>
- Holt, J. G., Krieg, V., Sneath, P., Staley, J., Williams, S. (1994). The *Mycobacterium*. In Editorial Lippincott Williams & Wilkins (Ed.), *Bergey's manual of determinative bacteriology*. (9th ed., pp. 597–603). USA.
- Hoza, A. S., Mfinanga, S. G. M., Rodloff, A. C., Moser, I., König, B. (2016). Increased isolation of nontuberculous mycobacteria among TB suspects in Northeastern, Tanzania: Public health and diagnostic implications for control programmes. *BMC Research Notes*, 9(1), 1–9. <https://doi.org/10.1186/s13104-016-1928-3>
- Hughes, A. J., Hutchinson, P. , Gooding, T. , Freezer, N. J., Holdsworth, S. R. and Johnson, P. D. (2005), Diagnosis of *Mycobacterium tuberculosis* infection using ESAT-6 and intracellular cytokine cytometry. *Clinical & Experimental Immunology*, 142: 132-139. doi:10.1111/j.1365-2249.2005.02884.x
- Imperiale, B. R., Cataldi, A. A., Morcillo, N. S. (2011). Rapid detection of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* by multiplex allele-specific polymerase chain reaction. *The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease*, 15(4), 496–501. <https://doi.org/10.5588/ijtld.10.0397>
- Imperiale, B., Zumárraga, M., Gioffré, A., Di Giulio, B., Cataldi, A., Morcillo, N. (2012). Disease caused by non-tuberculous mycobacteria: diagnostic procedures and treatment evaluation in the North of Buenos Aires Province. *Revista Argentina de Microbiología*, 44, 3–9. <https://doi.org/10.1590/S0325-75412012000100002>

Irureta Goyena Baldomir, M. (2016). Tesis Doctoral: *Tuberculosis Bovina: Actualización Sobre La Enfermedad Y La Campaña Sanitaria En Uruguay*. Universidad de la República. Uruguay.

Jenkins, A. O., Gormley, E., Gcebe, N., Fosgate, G. T., Conan, A., Aagaard, C., Michel, A.L., Rutten, V. P. M. G. (2018). Cross reactive immune responses in cattle arising from exposure to *Mycobacterium bovis* and non-tuberculous mycobacteria. *Preventive Veterinary Medicine*, 152, 16–22. <https://doi.org/10.1016/J.PREVETMED.2018.02.003>

Kankya, C., Djonne, B., Muwonge, A., Munyeme, M., Opuda-Asibo, J., Skjerve, E., Oloya, J., Edvardsen, V., Johansen, T. B. (2011). Isolation of non-tuberculous mycobacteria from pastoral ecosystems of Uganda: Public Health significance. *BMC Public Health*, 11(1), 320. <https://doi.org/10.1186/1471-2458-11-320>

Kirschner, P., & Böttger, E. C. (1998). Species identification of mycobacteria using rDNA sequencing. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 101, 349–361. <https://doi.org/10.1385/0-89603-471-2:349>

Konno, K., Feldmann, F., & McDermott, W. (1967). Pyrazinamide susceptibility and amidase activity of tubercle bacilli. *Am Rev Respir Dis*, 95(3), 461–469. <https://doi.org/10.1164/ARRD.1967.95.3.461>

Lasco, T. M., Turner, O. C., Cassone, L., Sugawara, I., Yamada, H., McMurray, D. N., Orme, I. M. (2004). Rapid accumulation of eosinophils in lung lesions in guinea pigs infected with *Mycobacterium tuberculosis*. *Infection and Immunity*, 72(2), 1147–1149. <https://doi.org/10.1128/IAI.72.2.1147-1149.2004>

Lasserre, M., Fresia, P., Greif, G., Iraola, G., Castro-Ramos, M., Juambeltz, A., Nuñez, A., Naya, H., Robello, C., Berná, L. (2018). Whole genome sequencing of the monomorphic pathogen *Mycobacterium bovis* reveals local differentiation of cattle clinical isolates. *BMC Genomics*, 19(1), 1–14. <https://doi.org/10.1186/s12864-017-4249-6>

Latini, O., Canal, A. M., Ferrara, M. E., Sequeira, M. D., Sequeira, G., Bagnaroli, R., Torres, P. (1997). Confiabilidad en la determinación de prevalencia de infección por *Mycobacterium bovis* en ganado bovino por decomisos en frigoríficos. *Archivos de Medicina Veterinaria*, 29(2), 197–204. <https://doi.org/10.4067/S0301-732X1997000200004>

Lewis, K. N., Liao, R., Guinn, K. M., Hickey, M. J., Smith, S., Behr, M. A., & Sherman, D. R. (2003). Deletion of RD1 from *Mycobacterium tuberculosis* mimics bacille Calmette-Guérin attenuation. *The Journal of Infectious Diseases*, 187(1), 117–123. <https://doi.org/10.1086/345862>

- Lian, L., Deng, J., Zhao, X., Dong, H., Zhang, J., Li, G., Xiao, T., Wu, Y., Li, Q., Wan, K. (2013). The first case of pulmonary disease caused by *Mycobacterium septicum* in China. *International Journal of Infectious Diseases*, 17(5), 352–354. <https://doi.org/10.1016/J.IJID.2012.12.011>
- Liébana, E., Aranaz, A., Mateos, A., Vilafranca, M., Gomez-Mampaso, E., Tercero, J. C., Alemany, J., Suarez, G., Domingo, M., Dominguez, L. (1995). Simple and rapid detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex organisms in bovine tissue samples by PCR. *Journal of Clinical Microbiology*, 33(1), 33–36.
- Lin, S. Y. G., Desmond, E. P. (2014). Molecular diagnosis of tuberculosis and drug resistance. *Clinics in Laboratory Medicine*, 34(2), 297–314. <https://doi.org/10.1016/j.cll.2014.02.005>
- Lillo M, Orengo S, Cernoch P, Harris RL. (1990). Pulmonary and disseminated infection due to *Mycobacterium kansasii*: a decade of experience. *Rev Infect Dis*. 12:760–767.
- Lopez, B., Aguilar, D., Orozco, H., Burger, M., Espitia, C., Ritacco, V., van Soolingen, D. (2003). A marked difference in pathogenesis and immune response induced by different *Mycobacterium tuberculosis* genotypes. *Clinical and Experimental Immunology*, 133(1), 30–37. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2249.2003.02171.x>
- Lucas, A., Gayot, G. (1967). Pathology of milk production. HI. Methods of detecting tuberculosis in cattle. Pathology of milk production. HI. Methods of detecting tuberculosis in cattle. Francia: Paris: Centre National de la Recherche Scientifique, 15 Quai Anatole-France.
- Magnano, G., Macías, A., Sticotti, E., Mació, M., Scheneider, M., Abate Daga, F., Sánchez, J., Degorgis, A., Delgado, G., Getzrow, N., Rodríguez, M., Camuñas, C., Flaquer, L., Berenguer, H., Vecco, J., Fernández, C., Martín, A., Gaetano, D., Ciallella, M., Enrique, M., Rossi, S., Morilla, J. Giraud, J. (2012). Tuberculosis caprina: descripción de hallazgos patológicos en animales positivos a la prueba tuberculínica. *Revista Del Colegio de Veterinarios de La Provincia de Buenos Aires*, 52–53.
- Magnano, G., Severina, W., Macias, A., Sanchez, J., Sticotti, E., Macio, M., Schneider, M., Bérnago, E., Giraud, J. (2016). Impacto de la tuberculosis bovina sobre la producción láctea en un establecimiento de la provincia de Córdoba. *Revista Veterinaria Argentina*, (36), 1–12.
- Manual de Micobacterias. (2005), Asociación Argentina de Veterinarios de Laboratorio de Diagnóstico. 1ra Edición. ISBN: 987-21667-1-4.
- Marfil, M. J., Garbaccio, S. G., Huertas, P. G., Barandiaran, S., Alonso, B., Zumárraga, M. J. (2016. a). Aislamiento de *Mycobacterium intracellulare* a partir de un pulmón bovino comercializado en una carnicería de la zona oeste del conurbano bonaerense. *InVet*, 18 (1).

- Marfil, M.J., Blanco, F., Colombatti, A., Zumárraga, M.J. (2016. b). Transmisión aerógena de *Mycobacterium pinnipedii*. Póster presentado en la "VIII Reunión de la Sociedad Latinoamericana de Tuberculosis y otras Micobacteriosis (SLAMTB), Rosario, Santa Fe, Argentina.
- Marfil, M. J., Huertas, P. S., Garbaccio, S. G., Barandiaran, S., Martínez Vivot, M., Garro, C., Alonso, B., Eirin, M. E., Zumárraga, M. J. (2018). Detection of Viable *Mycobacterium bovis* in Lungs and Livers Sold in Butchers' Shops in Buenos Aires, Argentina. *Foodborne Pathogens and Disease*, 15 (12), fpd.2018.2467. <https://doi.org/10.1089/fpd.2018.2467>
- Marquina-Castillo, B., García-García, L., Ponce-De-León, A., Jimenez-Corona, M. E., Bobadilla-Del Valle, M., Cano-Arellano, B., Canizales-Quintero, S., Martinez-Gamboa, A., Kato-Maeda, M. Robertson, B., Young, D., Small, P., Schoolnik, G., Sifuentes-Osornio, J., Hernandez-Pando, R. (2009). Virulence, immunopathology and transmissibility of selected strains of *Mycobacterium tuberculosis* in a murine model. *Immunology*, 128(1), 123–133. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2567.2008.03004.x>
- Martínez Vivot M.; Bernardelli A.; Canal A.; Cataldi A.; Gentile F.; Jorge C.; Oriani S.; Paolicchi F.; Schneider M. (2006). Conducta a seguir ante un canino o felino con tuberculosis. XVI Reunión Científico Técnica de la AAVLD Asociación Argentina de Veterinarios de Laboratorio de Diagnóstico. Diciembre 2006. Mar del Plata, Argentina.
- Matlova, L., Dvorska, L., Ayele, W. Y., Bartos, M., Amemori, T., & Pavlik, I. (2005). Distribution of *Mycobacterium avium* complex isolates in tissue samples of pigs fed peat naturally contaminated with mycobacteria as a supplement. *Journal of Clinical Microbiology*, 43(3), 1261–1368. <https://doi.org/10.1128/JCM.43.3.1261-1268.2005>
- McMurray, D. N. (1994). Guinea Pig Model of Tuberculosis. In Barry R. Bloom (Ed.), *Tuberculosis Pathogenesis, Protection and Control* (pp. 135–147). Washington DC: American Society of Microbiology. <https://doi.org/10.1128/9781555818357.ch9>
- Meikle, V., Bianco, M. V., Blanco, F. C., Gioffré, A., Garbaccio, S., Vagnoni, L., Di Rienzo, J., Canal, A., Bigi, F., Cataldi, A. (2011). Evaluation of pathogenesis caused in cattle and guinea pig by a *Mycobacterium bovis* strain isolated from wild boar. *BMC Veterinary Research*, 7(1), 37. <https://doi.org/10.1186/1746-6148-7-37>
- Mertoğlu, A., Biçmen, C., Karaarslan, S., & Buğdayci, M. H. (2018). Pulmonary tuberculosis due to *Mycobacterium bovis* revealed by skin lesion in slaughterhouse worker. *Clinical Respiratory Journal*, 12(1), 317–321. <https://doi.org/10.1111/crj.12485>

- Mijs W, de Haas P, Rossau R, Van der Laan T, Rigouts L, Portaels F, van Soolingen D. (2002) Molecular evidence to support a proposal to reserve the designation *Mycobacterium avium* subsp. *avium* for bird-type isolates and '*M. avium* subsp. *hominissuis*' for the human/porcine type of *M. avium*. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2002 Sep; 52 (Pt 5):1505-18. PMID: 12361252
- Miki, M., Shimizukawa, M., Okayama, H., Sato, M., Irie, T., Kita, A., Kazumi, Y. (2010). A first case of non-tuberculous mycobacterial disease caused by *Mycobacterium septicum* accompanied with tuberculous subcutaneous abscess. *Nihon Naika Gakkai Zasshi. The Journal of the Japanese Society of Internal Medicine*, 99(4), 825–827.
- Monteserin, J., Paul, R., Lopez, B., Cnockaert, M., Tortoli, E., Menéndez, C., García, M. J., Palomino, J. C., Vandamme, P., Ritacco, V., Martin, A. (2016). Combined approach to the identification of clinically infrequent non-tuberculous mycobacteria in Argentina. *International Journal of Tuberculosis and Lung Disease*, 20(9), 1257–1262. <https://doi.org/10.5588/ijtld.16.0122>
- Moravkova, M., Hlozek, P., Beran, V., Pavlik, I., Preziuso, S., Cuteri, V., Bartos, M. (2008). Strategy for the detection and differentiation of *Mycobacterium avium* species in isolates and heavily infected tissues. *Research in Veterinary Science*, 85(2), 257–264. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2007.10.006>
- Morcillo, N., Imperiale, B., & Di Giulio, B. (2010). Evaluation of MGIT 960™ and the colorimetric-based method for tuberculosis drug susceptibility testing. *The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease*, 14(9), 1169–1175. <https://doi.org/10.5588/ijtld.15.0136>
- Morgan, M., Kalantri, S., Flores, L., & Pai, M. (2005). A commercial line probe assay for the rapid detection of rifampicin resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: a systematic review and meta-analysis. *BMC Infectious Diseases*, 5 (1), 62. <https://doi.org/10.1186/1471-2334-5-62>
- Morsella, C., & Paolicchi, F. (2008). Aplicación de métodos de diagnóstico y control de Paratuberculosis en Argentina. Resumen presentado en el "XXI Congreso Panamericano de Ciencias Veterinarias". 12 a 16 de octubre, Guadalajara, México. (pp. 37–43).
- Nalapa, D. P., Muwonge, A., Kankya, C., Olea-Popelka, F. (2017). Prevalence of tuberculous lesion in cattle slaughtered in Mubende district, Uganda. *BMC Veterinary Research*, 13(1), 1–8. <https://doi.org/10.1186/s12917-017-0991-x>
- Oriani, D. S., Dubarry, J. R., Errea, A. L., Vera, O. A., Maria, A. E., Cavagión, L. J., Staskevich, A. S., Tortone, C., Buey, V., Dos Santos Sismeiro, M. I., Mascaró, D. E., Bernardelli, A. (2011). Asociación entre el diagnóstico de Tuberculosis Bovina por intradermorreacción, la anatomopatología, la bacteriología y la posible interferencia con micobacterias ambientales. *13(1)*, 42–47.



- Ovrutsky, A. R., Chan, E. D., Kartalija, M., Bai, X., Jackson, M., Gibbs, S., Falkinham, J. O., Iseman, M. D., Reynolds, P. R., McDonnell, G., Thomas, V. (2013). Co-occurrence of free-living amoebae and nontuberculous Mycobacteria in hospital water networks, and preferential growth of *Mycobacterium avium* in *Acanthamoeba lenticulata*. *Applied and Environmental Microbiology*, 79(10), 3185–3192. <https://doi.org/10.1128/AEM.03823-12>
- Palmer, M. V., & Whipple, D. L. (2006). Survival of *Mycobacterium bovis* on Feedstuffs Commonly Used as Supplemental Feed for White-tailed Deer (*Odocoileus virginianus*). *Journal of Wildlife Diseases*, 42(4), 853–858. <https://doi.org/10.7589/0090-3558-42.4.853>
- Paolicchi, F., Cirone, K., Morsella, C., & Gioffré, A. (2012). First isolation of. *Brazilian Journal of Microbiology*, 43(3), 1034–1037. <https://doi.org/10.1590/S1517-838220120003000028>
- Parreiras PM, Andrade GI, do Nascimento TF, Oelemann MC, Gomes HM, de Alencar AP, de Assis RA, Mota PMPC, Pereira MAS, Lobato FCF, Lage AP, Suffys PN 2012. Spoligotyping and variable number tandem repeat analysis of *Mycobacterium bovis* isolates from cattle in Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 107: 64-73.
- Perez, A. M., Ward, M. P., Torres, P., Ritacco, V. (2002). Use of spatial statistics and monitoring data to identify clustering of bovine tuberculosis in Argentina. *Preventive Veterinary Medicine*, 56(1), 63–74.
- Phillips, C.J.C., Foster, C.R.W., Morris, P.A., Teverson, R., 2003. The transmission of *Mycobacterium bovis* infection to cattle. *Res. Vet. Sci.* 74, 1–15.
- Pietronave, J.; Barandiaran, S.; Campos, L; Falzoni, E.; Zumárraga, M.; Martínez Vivot, M. (2015). Detección de especies del complejo *Mycobacterium tuberculosis*, mediante la reacción en cadena de la polimerasa, en decomisos de frigoríficos. Póster presentado en las “IX Jornadas Internacionales de Veterinaria”. Agosto 2015. Mar del Plata, Argentina.
- Plinke, C., Rüsck-Gerdes, S., & Niemann, S. (2006). Significance of mutations in *embB* codon 306 for prediction of ethambutol resistance in clinical *Mycobacterium tuberculosis* isolates. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 50(5), 1900–1902. <https://doi.org/10.1128/AAC.50.5.1900-1902.2006>
- Ramdas, K. E. F., Lyashchenko, K. P., Greenwald, R., Robbe-Austerman, S., McManis, C., & Waters, W. R. (2015). *Mycobacterium bovis* Infection in Humans and Cats in Same Household, Texas, USA, 2012. *Emerging Infectious Diseases*, 91(1), 62–67. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0412.2011.01262.x>

Rastogi, N., Legrand, E., & Sola, C. (2001). The *Mycobacteria*: an introduction to nomenclature and pathogenesis. *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz* (Vol. 20).

Rhades, L.C. (2010). Semblanzas de la vida cotidiana de un veterinario rural : ciudadanos de segunda. *REDVET*, 12, 1–3.

Rickman L, Scott C, Hunt DM, Hutchinson T, Menéndez MC, Whalan R, Hinds J, Colston MJ, Green J, Buxton RS. (2005). A member of the cAMP receptor protein family of transcription regulators in *Mycobacterium tuberculosis* is required for virulence in mice and controls transcription of the *rpfA* gene coding for a resuscitation promoting factor. *Mol Microbiol*. 2005 Jun; 56 (5):1274-86. Erratum in: *Mol Microbiol*. 2005 Aug; 57(3):869. PMID: 15882420

Rivas, C., Greif, G., Coitinho, C., Araújo, L., Laserra, P., Robello, C. (2012). Primeros casos de Tuberculosis pulmonar por *Mycobacterium bovis*: una zoonosis reemergente en Uruguay. *Revista Médica del Uruguay*, volumen 28, n°3.

Rocha, W., de Sá Jaime, V., Arrais de Alencar Mota, A. L., Diederichsen de Brito, W., de Castro Pires, G., Seares Ferreira Neto, J., Hildebrand Grsi Filho, J. H., Dias, R. A. Amaku, M., Oliveira Telles, E., Ferreira, F., Heinemann, M. B., Picao Goncalves, V. S. (2016). Prevalence and herd-level risk factors of bovine tuberculosis in the State of Goiás, Brazil Prevalência e Fatores de Risco da Tuberculose Bovina no Estado de Goiás, Brasil. *Semina: Ciências Agrárias*, 37 (nro 5, Suplemento 2), 3625–3638. <https://doi.org/10.5433/1679-0359.2016v37n5Supl2p3625>

Rodriguez, C. A. R., Zumárraga, M. J., Oliveira, E. M. de D., Cataldi, A. A., Romano, M. I., Otto, H. H., Bonafé, V.L., Neto, J. S. F. (2004). Caracterização Molecular de isolados de *Mycobacterium bovis* do Estado De São Paulo Brasil, utilizando a técnica de Spoligotyping. *Arq. Inst. Biol.*, 71(3), 277–282.

Romero, B., Aranaz, A., De Juan, L., Álvarez, J., Bezos, J., Mateos, A., Gómez-Mampaso, E., Domínguez, L. (2006). Molecular epidemiology of multidrug-resistant *Mycobacterium bovis* isolates with the same spoligotyping profile as isolates from animals. *Journal of Clinical Microbiology*, 44(9), 3405–3408. <https://doi.org/10.1128/JCM.00730-06>

Salyers, A. A., & Whitt, D. D. (2002). A molecular approach. *Bacterial Pathogenesis*. American Society for Bacteriology. Washington, DC.

Samper, S., Martín, C., Pinedo, A., Rivero, A., Blázquez, J., Baquero, F., van Soolingen, D., van Embden, J. (1997). Transmission between HIV-infected patients of multidrug-resistant tuberculosis caused by *Mycobacterium bovis*. *Aids*, 11(10), 1237–1242.

SENASA 2007. SAGPyA. PROGRAMA NACIONAL DE LUCHA CONTRA LA TUBERCULOSIS BOVINA. Disponible en el siguiente link: [http://www.produccion-animal.com.ar/sanidad\\_intoxicaciones\\_metabolicos/infecciosas/bovinos\\_en\\_general/20-programa\\_nacional\\_tuberculosis.pdf](http://www.produccion-animal.com.ar/sanidad_intoxicaciones_metabolicos/infecciosas/bovinos_en_general/20-programa_nacional_tuberculosis.pdf)

SENASA, 2012. Torres, P. M. (2016). *Situación de la Tuberculosis bovina en la República Argentina*. Retrieved from [https://www.argentina.gob.ar/sites/default/files/situacion\\_tuberculosis\\_bovina\\_rep.argentina\\_2016.pdf](https://www.argentina.gob.ar/sites/default/files/situacion_tuberculosis_bovina_rep.argentina_2016.pdf)

SENASA, 2018. Torres, P. M. *Vigilancia Epidemiológica: Importancia de la detección en faena de la tuberculosis bovina*. Disponible en el siguiente link: [http://www.senasa.gob.ar/sites/default/files/ARBOL\\_SENASA/ANIMAL/BOVINOS\\_BUBALINOS/PROD\\_PRIMARIA/SANIDAD/ENF\\_Y ESTRAT/TUBERCULOSIS/file1004-37.pdf](http://www.senasa.gob.ar/sites/default/files/ARBOL_SENASA/ANIMAL/BOVINOS_BUBALINOS/PROD_PRIMARIA/SANIDAD/ENF_Y ESTRAT/TUBERCULOSIS/file1004-37.pdf)

Serrano, M., Sevilla, I. A., Fuertes, M., Geijo, M., Risalde, M. Á., Ruiz-Fons, J. F., Gortazar, C., Juste, R. A., Domínguez, L., Elguezabal, N., Garrido, J. M. (2018). Different lesion distribution in calves orally or intratracheally challenged with *Mycobacterium bovis*: Implications for diagnosis. *Veterinary Research*, 49(1), 1–10. <https://doi.org/10.1186/s13567-018-0566-2>

Sgarioni, S. A., Hirata, R. D. C., Hirata, M. H., Leite, C. Q. F., de Prince, K. A., de Andrade Leite, S. R., Cardoso, R. F. (2014). Occurrence of *Mycobacterium bovis* and non-tuberculous mycobacteria (NTM) in raw and pasteurized milk in the northwestern region of Paraná, Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology: [Publication of the Brazilian Society for Microbiology]*, 45(2), 707–711.

Shimizu, E., Macías, A., Paolicchi, F., Magnano, G., Zapata, L., Fernández, A., Canal, A., Garbaccio, S., Cataldi, A., Caimi, K., Zumárraga, M. (2014). Genotyping *Mycobacterium bovis* from cattle in the Central Pampas of Argentina: Temporal and regional trends. *Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz*, 109(2), 236–245. <https://doi.org/10.1590/0074-0276140292>

Smith, N. H. (2006). A re-evaluation of *M. prototuberculosis*. *PLoS Pathogens*, 2 (9), e98. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.0020098>

Supply, P., Mazars, E., Lesjean, S., Vincent, V., Gicquel, B., & Locht, C. (2000). Variable human minisatellite-like regions in the *Mycobacterium tuberculosis* genome. *Molecular Microbiology*, 36(3), 762–771. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2000.01905.x>

Tamayo, R. (2012). Tuberculosis bovina: un desafío país. Instituto de Medicina Preventiva Veterinaria UACH. Disponible en el siguiente link: <http://www.elnavegable.cl/noticia/editorial/tuberculosis-bovina-un-desafio-pais>.

- Tan, Y., Hu, Z., Zhao, Y., Cai, X., Luo, C., Zou, C., Liu, X. (2012). The beginning of the *rpoB* gene in addition to the rifampin resistance determination region might be needed for identifying rifampin/rifabutin cross-resistance in multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates from Southern China. *Journal of Clinical Microbiology*, 50 (1), 81–85. <https://doi.org/10.1128/JCM.05092-11>
- Telenti, A., Marchesi, F., Balz, M., Bally, F., Böttger, E. C., & Bodmer, T. (1993). Rapid identification of mycobacteria to the species level by polymerase chain reaction and restriction enzyme analysis. *Journal of Clinical Microbiology*, 31(2), 175–178.
- Thacker, T. C., Harris, B., Palmer, M. V., & Waters, W. R. (2011). Improved specificity for detection of *Mycobacterium bovis* in fresh tissues using IS6110 real-time PCR. *BMC Veterinary Research*, 7(50), 1–5. <https://doi.org/10.1186/1746-6148-7-50>
- Theron, G., Richardson, P. J., Donegan, B. M., Warren R, Kr, S., Dheda K. (2014). The diagnostic accuracy of the GenoType ® MTBDRsl assay for the detection of resistance to second-line anti-tuberculosis drugs. *Cochrane Database of Systematic Reviews*.
- Tortoli, E., Baruzzo, S., Heijdra, Y., Klenk, H. P., Lauria, S., Mariottini, A., van Ingen, J. (2009). *Mycobacterium insubricum* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 59(6), 1518–1523. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.003459-0>
- Tortoli, E. (2014). Microbiological features and clinical relevance of new species of the genus *Mycobacterium*. *Clinical Microbiology Reviews*, 27(4), 727–752. <https://doi.org/10.1128/CMR.00035-14>
- Traversa, M. J., Etchehoury, I., Garbaccio, D., Mg, D., Abdala, A., Tarabla, H., Schneider, M., Magnano, G., Zumárraga, M., Rodríguez, L., Huertas, P., Morsella, C., Paolicchi, F. (2011). Micobacterias aisladas de especies domésticas y silvestres durante 2004-2008, 31(1), 10–14.
- Tribulo, H., Tribulo, R., Chesta, P., Colla, C., Schneider, M., Magnano, G. Y Giraudó, J. 2002. Estudio de la prevalencia de brucelosis y tuberculosis en hatos caprinos de la región centro y norte de la provincia de Córdoba. Póster presentado en la “XIV Reunión Científico Técnica de la Asociación Argentina de Veterinarios de Laboratorios de Diagnóstico”. Noviembre de 2002, Villa General Belgrano, Córdoba.
- Tsukamura, M., Kita, N., Otsuka, W., & Shimoide, H. (1983). A Study of the Taxonomy of the *Mycobacterium nonchromogenicum* Complex and Report of Six Cases of Lung Infection Due to *Mycobacterium nonchromogenicum*. *Microbiology and Immunology*, 27(3), 219–236. <https://doi.org/10.1111/j.1348-0421.1983.tb03585.x>

- Underwood S, Pinto MC, Rey Moreno JC. Tuberculosis felina: casos diagnosticados y consideraciones sobre su posible fuente de infección. *Rev Argent Microbiol* 1999; 31 Supl. 1:17–8.
- van Embden JD, van Soolingen D, Small PM, Hermans PW. (1992). Genetic markers for the epidemiology of tuberculosis. *Res Microbiol.* 1992 May; 143 (4):385-91. Review. PMID: 1360692
- van Soolingen, D., Kremer, K., & Vynnycky, E. (2003). New Perspectives in the Molecular Epidemiology of Tuberculosis. In S. H. E. Kaufmann (Ed.), *Mycobacteria and TB* (Vol. 2, pp. 17–45). Basel: KARGER. <https://doi.org/10.1159/000066887>
- Vega. 2018. Tuberculosis por *M. bovis* en un paciente pediátrico. Repaso de distintas fuentes de infección. Conferencia en el 46° Congreso Argentino de Medicina Respiratoria. Buenos Aires, Argentina.
- Viveiros M, Leandro C, Rodrigues L, Almeida J, Bettencourt R, Couto I, Carrilho L, Diogo J, Fonseca A, Lito L, Lopes J, Pacheco T, Pessanha M, Quirim J, Sancho L, Salfinger M, Amaral L. (2005). Direct application of the INNO-LiPA Rif.TB line-probe assay for rapid identification of *Mycobacterium tuberculosis* complex strains and detection of rifampin resistance in 360 smear-positive respiratory specimens from an area of high incidence of multidrug-resistant tuberculosis. *J Clin Microbiol.* 2005, Sep; 43 (9): 4880-4884. PMID: 16145166
- Wang, J., McIntosh, F., Radomski, N., Dewar, K., Simeone, R., Enninga, J., Brosch, R., Rocha, E. P., Veyrier, F. J., Behr, M. A. (2015). Insights on the emergence of *Mycobacterium tuberculosis* from the analysis of *Mycobacterium kansasii*. *Genome Biology and Evolution*, 7(3), 856–870. <https://doi.org/10.1093/gbe/evv035>
- Waters, W. R., Palmer, M. V., Thacker, T. C., Payeur, J. B., Harris, N. B., Minion, F. C., Greenwald, R., Esfandiari, J., Andersen, P., McNair, J., Pollock, J. M., Lyashchenko, K. P. (2006). Immune Responses to Defined Antigens of *Mycobacterium bovis* in Cattle Experimentally Infected with *Mycobacterium kansasii*. *Clinical and Vaccine Immunology*, 13(6), 611. <https://doi.org/10.1128/CVI.00054-06>
- Waters, W. R., Whelan, A. O., Lyashchenko, K. P., Greenwald, R., Palmer, M. V., Harris, B. N., Hewinson, R. G., Vordermeier, H. M. (2010). Immune responses in cattle inoculated with *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium tuberculosis*, or *Mycobacterium kansasii*. *Clinical and Vaccine Immunology*, 17(2), 247–252. <https://doi.org/10.1128/CVI.00442-09>
- Weniger, T., Krawczyk, J., Supply, P., Niemann, S., Harmsen, D. (2010). MIRU-VNTRplus: A web tool for polyphasic genotyping of *Mycobacterium tuberculosis* complex bacteria. *Nucleic Acids Research*, 38 (Supp. 2), pp: 326–331. <https://doi.org/10.1093/nar/gkq351>

- Xia, E., Teo, Y.-Y., Ong, R. T.-H. (2016). SpoTyping: fast and accurate in silico *Mycobacterium* spoligotyping from sequence reads. *Genome Medicine*, 8(19), 1–9. <https://doi.org/10.1186/s13073-016-0270-7>
- Zanini, M. S., Moreira, E. C., Salas, C. E., Lopes, M. T. P., Barouni, A. S., Roxo, E., Telles, M. A., Zumarraga, M. J. (2005). Molecular Typing of *Mycobacterium bovis* Isolates from South-east Brazil by Spoligotyping and RFLP. *Journal of Veterinary Medicine Series B*, 52(3), 129–133. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0450.2005.00835.x>
- Zhang, Y., Heym, B., Allen, B., Young, D., & Cole, S. (1992). The catalase-peroxidase gene and isoniazid resistance of *Mycobacterium tuberculosis*. *Nature*, 358, 591–593.
- Zumárraga M.J., Martín C., Samper S., Alito A., Latini O., Bigi F., Roxo E., Cicuta M.E., Errico F., Castro Ramos M., Cataldi A., van Soolingen D. Romano M.I. (1999). Usefulness of Spoligotyping in the molecular epidemiology of *Mycobacterium bovis* – related infections in South American countries. *J. Clin. Microbiol.* (1999).Feb;37( 2):296-303.
- Zumárraga, M., Bigi, F., Alito, A., Romano, M. I., Cataldi, A. (1999). A 12.7 kb fragment of the *Mycobacterium tuberculosis* genome is not present in *Mycobacterium bovis*. *Microbiology*, 145(4), 893–897. <https://doi.org/10.1099/13500872-145-4-893>
- Zumarraga MJ, Resoagli EH, Cicuta ME, Martinez AR, Ortiz de Rott MI, de Millan SG, Caimi K, Gioffre A, Alito A, Bigi F, Cataldi AA, Romano MI. (2001). PCR-restriction fragment length polymorphism analysis (PRA) of *Mycobacterium leprae* from human lepromas and from a natural case of an armadillo of Corrientes, Argentina. *Int J Lepr Other Mycobact Dis.* 2001 Mar; 69(1):21-5. PMID: 11480312
- Zumarraga, M. J., Meikle, V., Bernardelli, A., Abdala, A., Tarabla, H., Romano, M. I., Cataldi, A. (2005). Use of Touch-Down Polymerase Chain Reaction to enhance the sensitivity of *Mycobacterium bovis* detection. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 17(3), 232–238. <https://doi.org/10.1177/104063870501700303>
- Zumárraga, M. J. (2007). Tesis Doctoral: *Epidemiología molecular de la tuberculosis bovina*. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires.
- Zumárraga, M. J., Martínez Vivot, M., Marticorena, D., Bernardelli, A., Fasán, R., Iachini R, Cataldi, A. (2009). *Mycobacterium bovis* in Argentina: isolates from cats typified by spoligotyping. *Revista Argentina de Microbiología*, 41, 215–217.
- Zumárraga, M. J., Soutullo, A., García, M. I., Marini, R., Abdala, A., Tarabla, H., Echaide, S., López, M., Zervini, E., Canal, A., Cataldi, A. A. (2012). Detection of *Mycobacterium bovis* – Infected Dairy Herds Using PCR in Bulk Tank Milk Samples. *Foodborne Pathogens and Disease*, 9(2), 132–137. <https://doi.org/10.1089/fpd.2011.0963>.

Zumárraga, M. J., Arriaga, C., Barandiaran, S., Cobos-marín, L., Waard, J. De, Estrada-garcia, I., Figueiredo, T., Gimenez, F., Gomes, H M., Gonzalez y Merchand, J. A., Macías, A., Milián-Suazo, F., Rodriguez, C A R., Santillán, M A., Suffys, P., Trangoni, M., Zárraga, A M., Cataldi, A. A. (2013). Understanding the relationship between *Mycobacterium bovis* spoligotypes from cattle in Latin American Countries. *Research in Veterinary Science*, 94, 9–21. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2012.07.012>

# ANEXOS





## **Publicaciones**

Los resultados derivados de esta tesis doctoral fueron presentados en las siguientes publicaciones:

**Marfil, M. J.**, Garbaccio, S. G., Huertas, P. G., Barandiaran, S., Alonso, B., & Zumárraga, M. J. (2016). Aislamiento de *Mycobacterium intracellulare* a partir de un pulmón bovino comercializado en una carnicería de la zona oeste del conurbano bonaerense. *InVet*, 18 (1).

**Marfil, M. J.**, Huertas, P. S., Garbaccio, S. G., Barandiaran, S., Martínez Vivot, M., Garro, C., Alonso, B., Eirin, M. E., Zumárraga, M. J. (2018). Detection of Viable *Mycobacterium bovis* in Lungs and Livers Sold in Butchers' Shops in Buenos Aires, Argentina. *Foodborne Pathogens and Disease*, 15 (12), fpd.2018.2467. <https://doi.org/10.1089/fpd.2018.2467>.

A su vez, he participado en las siguientes publicaciones:

Barandiaran, S., Martínez Vivot, M., Falzoni, E., **Marfil, M. J.**, Pérez Tort, G., Rovatti, P., Fernández, M., Iachini, R., Satek, F., Duchene, A., Zumárraga, M. J. (2017). Mycobacterioses in dogs and cats from Buenos Aires, Argentina. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 1–4. <https://doi.org/10.1177/1040638717713795>

Encinas, M., **Marfil, M. J.**, Garbaccio, S., Barandiaran, S., Huertas, P., Morsella, C., Macías, A., Magnano, G., Zapata, L., Bigi, F., Cataldi, A., Paolicchi, F., Zumárraga, M., Eirin, M. E. (2018). *Mycobacterium bovis* ESAT-6, CFP-10 and *EspC* antigens show high conservation among field isolates. *Tuberculosis*, 111 (December 2017), 143–146. <https://doi.org/10.1016/j.tube.2018.06.007>.

Tortone, C. A., Oriani, D. S., Staskevich, A. S., Oriani, A. S., Gino, L. M., **Marfil, M. J.**, Nava Vargas, A., Gioffré, A. K., Zumárraga, M. J. (2018). Diversidad de especies de micobacterias no tuberculosas aisladas en ambientes acuáticos de la ciudad de General Pico, La Pampa, Argentina. *Revista Argentina de Microbiología*, (xx), 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.ram.2018.08.005>

