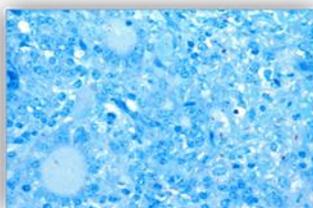




SERIE MONOGRÁFICA
MICOBACTERIAS DE INTERÉS VETERINARIO

MÓDULO TUBERCULOSIS BOVINA
ACTUALIZACIÓN EN EL DIAGNÓSTICO

2



SERIE MONOGRÁFICA
MICOBACTERIAS DE INTERÉS VETERINARIO

TUBERCULOSIS BOVINA

ACTUALIZACIÓN EN EL DIAGNÓSTICO

2

**ASOCIACIÓN ARGENTINA DE VETERINARIOS DE
LABORATORIO DE DIAGNÓSTICO**

COMISIÓN CIENTÍFICA DE MICOBACTERIAS

Chile 1856 PB (1227), Ciudad Autónoma de Buenos Aires,
Buenos Aires Argentina

Enero de 2022

AUTORES

Sergio G. Garbaccio. Instituto de Patobiología Veterinaria (IPVet), CICVyA, INTA. N. Repetto y De Los Reseros s/n, (B1686IGC) Hurlingham, Buenos Aires, Argentina

Ana M. Canal, Martín J. Zumárraga, Amelia Bernardelli, Carlos J. Garro, Fernando A. Paolicchi, Bernardo Alonso, Gabriel Magnano, D. Susana Oriani, Marcela E. Martinez Vivot, Nora Morcillo, Alejandro Abdala, Alejandra Colombatti, Gabriel Travería, Francisco Gentile, Claudia Tortone, Soledad Barandiaran, Fabiana Cipollini, Angel Cataldi, M. Julia Traversa, M. Emilia Eirin

Contribuciones de los autores

Todos los coautores contribuyeron por igual en las opiniones de este consenso.

EDITORES

María Emilia Eirin. Instituto de Agrobiotecnología y Biología Molecular (IABiMo), CICVyA, CNIA, INTA Castelar, Dr. N. Repetto y Los Reseros s/n, (1686) Hurlingham, CONICET, Buenos Aires, Argentina.

María Julia Traversa. Dto. Sanidad Animal y Medicina Preventiva, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional del Centro de la Provincia de Buenos Aires, CIVETAN, CIC, CONICET, Campus Universitario, Tandil, Buenos Aires, Argentina.

Angel Cataldi. Instituto de Agrobiotecnología y Biología Molecular (IABiMo), CICVyA, CNIA, INTA Castelar, Dr. N. Repetto y Los Reseros s/n, (1686) Hurlingham, CONICET, Buenos Aires, Argentina.

DISEÑO DE TAPAS

María Laura Chiapparrone y María Julia Traversa. Dto. Sanidad Animal y Medicina Preventiva, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional del Centro de la Provincia de Buenos Aires, CIVETAN, CIC, CONICET, Campus Universitario, Tandil, Buenos Aires, Argentina.

ÍNDICE

PRÓLOGO	1
GENERALIDADES ACERCA DEL DIAGNÓSTICO	2
PRUEBA TUBERCULÍNICA O INTRADERMORREACCIÓN (IDR)	4
DIAGNÓSTICO MACROSCÓPICO DE LAS LESIONES	9
BACILOSCOPIA CON COLORACIÓN DE ZIEHL NEELSEN	10
DIAGNÓSTICO MICROSCÓPICO DE LAS LESIONES	11
CULTIVO Y AISLAMIENTO DE <i>M. bovis</i>	13
REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)	15
DETECCIÓN DE LA PRODUCCIÓN ESPECÍFICA DE γ INF	21
DETECCIÓN DE LA PRODUCCIÓN ESPECÍFICA DE ANTICUERPOS	26
SINTESIS	30
REFERENCIAS	32

PRÓLOGO

La Asociación Argentina de Veterinarios de Laboratorios de Diagnóstico (AAVLD), se creó el 1 de noviembre de 1984, comenzando su actividad en el marco de la Sociedad de Medicina Veterinaria e integrando desde entonces la *World Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians* (WAVLD). La misma nuclea a profesionales del ámbito de la salud animal con el objeto de promover el desarrollo de los Laboratorios de Diagnóstico, facilitar la interacción entre ellos y aportar conocimientos y tecnología para mejorar su aporte a la producción pecuaria. Se encuentra a su vez, conformada por distintas Comisiones Científicas las que abordan temáticas y ejes disciplinarios específicos. Entre ellas, se encuentra la Comisión Científica de Micobacterias (CCM) que, desde su constitución en 1988, colabora de manera ininterrumpida en la Asociación. Participan de ella diversos especialistas representando a instituciones públicas y privadas, siendo de carácter interdisciplinario y federal. Una de sus principales tareas es estandarizar metodologías diagnósticas, llevando a cabo actividades de capacitación y divulgación científica. En este sentido, se elaboró el presente trabajo con el objetivo de realizar un recorrido teórico actualizado sobre el diagnóstico de la tuberculosis bovina (TBB), junto al trabajo previamente publicado “Tuberculosis bovina: Aspectos sobresalientes de la enfermedad”.

Esperamos entonces que estos escritos sean un aporte a la comprensión de esta enfermedad compleja, incluyendo las diversas aristas de la misma desde una mirada integral. El carácter zoonótico de la misma, junto al perjuicio sanitario y económico que ocasiona, ameritan sumar esfuerzos para avanzar en el control de la TBB en nuestro país.

Sergio G. Garbaccio

Coordinador Comisión Científica de Micobacterias

GENERALIDADES ACERCA DEL DIAGNÓSTICO

El diagnóstico de la tuberculosis bovina (TBB) es motivo de numerosos trabajos científico-técnicos, cuyo fin es mejorar el entendimiento en esta temática y la obtención de nuevas metodologías para un efectivo control de la enfermedad. Hasta el momento no existen vacunas aprobadas por entes oficiales en Argentina contra la TBB, por lo tanto, disponer de métodos de diagnóstico confiables para la identificación de los animales infectados, resulta de gran relevancia para el saneamiento y control de la enfermedad.

Diversos ensayos basados tanto en la respuesta inmune mediada por células como en la respuesta humoral han sido desarrollados y utilizados para el diagnóstico de la TBB.

Según fue descripto previamente por Pollock y col. [1], la respuesta inmune a la infección ocasionada por *M. bovis* es predominantemente mediada por células [2]. De esta manera, se diseñaron diversas metodologías para evaluar la respuesta por parte de los linfocitos T. La prueba *in vivo* de referencia tanto internacional (utilizada en diversos Programas de Control y Erradicación) como nacional, es la intradermorreacción (IDR) o prueba tuberculínica-PPD^{1 2}. Existe otra prueba, que también evidencia inmunidad mediada por células, que mide la respuesta específica a través de la liberación de gamma Interferón (γ IFN). La misma se emplea en varios países y a diferencia de la IDR se realiza en el laboratorio a partir de una muestra de sangre del animal a testear.

En el caso de los ensayos serológicos, han sido probados como complemento de la IDR, aunque aún resta validar en nuestro país estas metodologías para ser incorporadas como una herramienta adicional en los distintos Programas de Control.

Cabe remarcar que, si bien el diagnóstico de infección y detección de la enfermedad constituyen un pilar importante dentro de los Programas de Control de la TBB, por sí

¹ Plan Nacional de Control y Erradicación de la Tuberculosis Bovina (Senasa; Resol. 128/12). <http://www.senasa.gob.ar/normativas/resolucion-128-2012-senasa-servicio-nacional-de-sanidad-y-calidad-agroalimentaria> (acceso: 11 de enero de 2021)

² Control de la tuberculosis bovina: Un desafío posible. https://inta.gob.ar/sites/default/files/intasp_panorama_ganadero_nro7.pdf. Pág: 14-24 (acceso: 21 de enero de 2021)

solos no son suficientes para lograr el objetivo. Un diagnóstico planificado y sostenido en el tiempo debe estar siempre acompañado de medidas sanitarias como: la eliminación de los bovinos reaccionantes a la IDR a corto plazo, en un tiempo no mayor a 30 días ¹, la utilización de leche pasteurizada, alimento artificial o calostro durante la crianza artificial, la prohibición del ingreso de hacienda sin el debido control sanitario, entre otros. Estas medidas de manejo son tendientes a minimizar los riesgos de transmisión de *Mycobacterium bovis* (*M. bovis*) en el rodeo ².

Las diferentes metodologías diagnósticas vigentes se pueden agrupar en:

Directas: involucran técnicas que permiten observar al agente etiológico o detectar algunas de sus partes constituyentes. Son ejemplos de ellas: bacteriología, histopatología, baciloscopía y las técnicas de biología molecular como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

Indirectas: aquellas en las que se evalúa la respuesta inmune del hospedador ante la presencia del agente etiológico como, por ejemplo: IDR o prueba tuberculínica-PPD, ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA, del inglés *enzyme linked immunosorbent assay*) para la detección de interferón gamma (γ IFN) y ELISA para detección de anticuerpos anti-*M. bovis*.

Algunas de las técnicas arriba mencionadas se emplean a nivel mundial en el diagnóstico de la TBB. Tal es el caso de la bacteriología, como así también el análisis histopatológico, la prueba de la IDR y el ensayo de detección de γ IFN, este último adoptado por algunos países en el marco de sus respectivos planes oficiales de control.

Los otros ensayos mencionados, aún permanecen en etapa de aprobación en nuestro país, debido a la disparidad en los resultados presentados [3-4], lo que requiere la necesidad de llevar adelante un trabajo de validación contextualizado, previa incorporación al Programa Nacional de Control de la TBB [5].

INTRADERMORREACCIÓN (IDR), PRUEBA TUBERCULÍNICA O PRUEBA DE HIPERSENSIBILIDAD RETARDADA

La intradermorreacción (IDR), también conocida como prueba tuberculínica-PPD o prueba de hipersensibilidad retardada, es una prueba considerada indirecta por la OIE dado que detecta la respuesta inmune del animal sensibilizado y se emplea para el diagnóstico *in vivo*.

La técnica de IDR es un ensayo diagnóstico emblemático ya que permitió eliminar la TBB de los bovinos en países como Australia. El desarrollo de una reacción de hipersensibilidad retardada, que es la que se mide durante la prueba de IDR, requiere de un período de sensibilización que varía entre 1 y 3 semanas, tras el primer contacto con el antígeno. Durante este período la subpoblación de linfocitos Th1 se activan al reconocer péptidos presentados en el contexto de las moléculas del Complejo Mayor de Histocompatibilidad de clase II (CMH-II) por células presentadoras, dando inicio así a la expansión clonal de aquellas subpoblaciones celulares específicas.

Tras un segundo contacto con el antígeno, como ocurre cuando se inoculan intradérmicamente proteínas de *M. bovis*, se inicia la fase efectora de la respuesta. Luego de inyectado el antígeno, comienzan a acumularse neutrófilos alrededor de las venas poscapilares. Luego de 12 horas, aparece un infiltrado linfocitario con predominio de linfocitos T (LT) CD4+ y monocitos con una distribución perivascular. Las células endoteliales aumentan su tamaño y dejan pasar macromoléculas del plasma. El fibrinógeno presente en el espacio intersticial, se deposita en forma de fibrina y junto con los monocitos y linfocitos T extravasados, causan el endurecimiento e hinchazón del tejido (induración). Las células que actúan como presentadoras de antígeno son células dendríticas, Langerhans, macrófagos y células endoteliales.

La prueba tuberculínica-PPD empleada en el diagnóstico veterinario de la TBB, consta de la aplicación de manera intradérmica de una compleja mezcla antigénica conocida como “Derivado Proteico Purificado, PPD o tuberculina”, pudiendo ser de tipo bovino (obtenida a partir de la cepa de referencia *M. bovis* AN5 aislada de un bovino) o de tipo aviar (obtenida a partir de la cepa de referencia *M. avium* subsp. *avium* D4ER aislada de aves). El término tuberculina se aplica a un extracto obtenido de filtrados de cultivo

micobacterianos, previamente esterilizados. Para tal fin las micobacterias son cultivadas en medio líquido, muertas por calor y separadas por filtración. El líquido obtenido es precipitado por el agregado de ácido tricloroacético y concentrado hasta un décimo de su volumen original [6]³. La técnica de la IDR tiene su base en la respuesta inmune mediada por células antes mencionada, siendo en el pasado y en la actualidad, el ensayo diagnóstico de referencia mundial más importante para la lucha contra la tuberculosis en animales y en el ser humano (Prueba de Mantoux). Nuestro continente presenta como antecedente de relevancia que aquellas regiones o países considerados libres de la enfermedad, han basado su campaña de lucha contra la TBB, en el uso de este ensayo como técnica principal de tamizaje. Nuestro país no es la excepción, ya que el uso de esta prueba en conjunción con otros factores asociados al manejo, posibilitaron la obtención del *status* de libre de TBB a la provincia de Tierra del Fuego, desde el año 2011 (Resolución 100/2011, Senasa) ⁴.

Durante el desarrollo inicial de la prueba tuberculínica, se observó claramente que su precisión en el diagnóstico de animales individuales variaba por numerosas razones. Sin embargo, transcurrido aproximadamente 120 años de la primera aplicación en el ganado vacuno, la técnica de la IDR continúa siendo un pilar fundamental en el diagnóstico de infección por *M. bovis* en todo el mundo.

Su aplicación y tiempo para la lectura varía de acuerdo a la especie a diagnosticar. En los porcinos se aplica PPD bovina en la base de una oreja y PPD aviar en la otra oreja realizando la lectura a las 48hs *post* aplicación. En los ovinos se aplican ambas tuberculinas una en cada pliegue axilar y la lectura se realiza a las 72hs. En las aves se aplica PPD aviar en la barbilla y se lee a las 48hs.

En el caso específico de los bovinos, la inoculación intradérmica presenta alternativas que varían según las directivas de los distintos planes de control en base al estado sanitario de una región o país. En tal sentido, podemos mencionar las siguientes variantes:

³ <https://www.argentina.gob.ar/sites/default/files/file1011-tuberbov.pdf> (acceso: 26 de octubre 2021)

⁴ <http://www.senasa.gob.ar/senasa-comunica/noticias/el-senasa-declaro-zona-libre-de-brucelosis-y-tuberculosis-bovina-la-provincia-de-tierra-del-fuego> (acceso: 13 enero 2020)

-Cervical o anocaudal: utiliza PPD bovina aplicada en el pliegue anocaudal interno izquierdo (prueba anocaudal) o bien aplicada en la tabla del cuello (prueba cervical) (**Figuras 1A y 1B**).

-Prueba cervical Comparada: se emplean PPD bovina y PPD aviar aplicadas en la tabla del cuello a unos 12cm de distancia una de otra (**Figura 1C**). Se recomienda su aplicación en zonas de erradicación o libres de TBB ya que permite la distinción entre animales sensibilizados a *M. bovis* o a otras micobacterias. ¹

Diversas publicaciones otorgan a la IDR valores variables de sensibilidad y especificidad. En base a una recopilación de trabajos previos, se ha descrito una sensibilidad para la prueba anocaudal que oscila entre 63,2% y 100% y una especificidad entre 75,5% y 99%. En el caso de la prueba cervical comparada, los valores presentados de sensibilidad oscilan entre 52% y 100%, y de especificidad entre 78,8% y 100%. En el caso de utilizarse la prueba cervical los valores son semejantes a la prueba anocaudal [5, 7].

La elección de la variante a utilizar se realiza de acuerdo a las necesidades del programa de control que se ejecute o bien, a la etapa en el que el mismo se encuentre. Cada una de estas variantes puede aportar mayor sensibilidad o especificidad y por lo tanto ser de utilidad ante distintos escenarios. Dada la situación epidemiológica de Argentina en los bovinos, el Plan Nacional de Control y Erradicación de la TBB prevé la aplicación de la prueba en el pliegue anocaudal en regiones donde la TBB es endémica y la aplicación cervical para acelerar el saneamiento, reservando para las zonas de erradicación o libres la aplicación de la prueba cervical comparada.

Otros aspectos claves a tener en cuenta cuando se utiliza la IDR, es el tiempo necesario para detectar una infección reciente, evitar el fenómeno de desensibilización entre pruebas y también la posibilidad de contar con animales anérgicos en el rodeo. En el primer caso, Morrison y col. [8], describieron que la mayoría de los animales desarrollan una respuesta completa a la IDR entre las 3 y 6 semanas *post* infección. Respecto a la desensibilización, la misma perdura en animales sanos durante 60 días posteriores a la inoculación de la PPD. Es por ello que, para evitar este fenómeno y ocasionar posibles resultados falsos negativos, se recomienda respetar este plazo mínimo entre pruebas. En este sentido, Coad y col. [10] demostraron que en ganado bovino naturalmente

infectado con *M. bovis*, la repetición de la prueba en intervalos cortos (aproximadamente 60 días) puede inducir una reducción progresiva en la respuesta a la inoculación intradérmica de la PPD, y esto aumentar la probabilidad de obtención de lecturas de IDR sospechosas. Por tal motivo, en establecimientos con TBB endémica se debe considerar IDR positivo a todo aquel animal que presente al momento de la lectura un engrosamiento del sitio de inoculación igual o superior a 3 milímetros y nunca se debe repetir la prueba a estos animales.

Por último, con el uso de IDR se presenta cierta limitación diagnóstica frente a aquellos animales denominados anérgicos, que carecen de la capacidad para montar una reacción alérgica específica contra este antígeno (PPD). Esos animales suelen asociarse a casos de TBB avanzada, representando una seria amenaza para el resto del rodeo [9-11] dado que generalmente son los animales bacilíferos. En nuestro país se realizaron estudios donde se evidenciaron bovinos con presencia de lesiones compatibles con TBB, seguidos de confirmación por bacteriología y PCR, siendo en ambos casos animales IDR negativos [12-13].

De esta manera, se propone el saneamiento utilizando la IDR para la identificación y posterior eliminación de aquellos bovinos positivos, junto a medidas de manejo en los rodeos para minimizar los riesgos de transmisión de *M. bovis*.



Figura 1A. Aplicación de la IDR en el pliegue anocaudal (izq) y en la tabla del cuello (recuadro) en la prueba cervical (der). Fuente: Garro C. y Garbaccio S. IP-IPVet-CICVyA INTA.



Figura 1C. Lectura de la prueba cervical comparada (izq) y negativa (der). Fuente: Bernardelli A. Ceva Salud Animal.

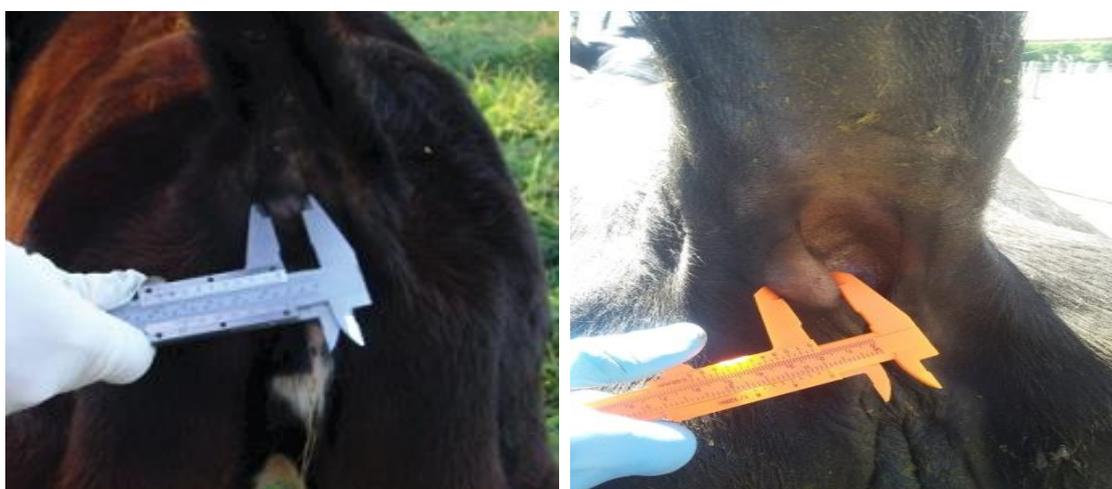


Figura 1B. Bovinos positivos a la prueba anocaudal (lecturas de las reacciones). Fuente: Garro C. IP-CICVyA-INTA y Magnano G. Universidad Nacional de Río Cuarto.

DIAGNÓSTICO MACROSCÓPICO DE LAS LESIONES

Previo a realizar el diagnóstico directo de TBB, es importante contar con muestras biológicas obtenidas de los animales en estudio, pudiendo ser a partir de necropsias y/o de animales sacrificados en frigoríficos. Resultará clave reconocer las lesiones macroscópicas para la obtención de una buena muestra que sirva para el diagnóstico bacteriológico e histopatológico. Las lesiones se caracterizan por ser granulomas con necrosis caseosa y calcificación; pudiendo observarse principalmente en linfonodos, parénquima de órganos y serosas. Su presentación difiere de acuerdo al tiempo de evolución y a la variabilidad de la respuesta inmune. Al inicio de la infección pueden ser de 2 a 5 mm de diámetro, con necrosis caseosa, no enucleable, firme, con arenilla al corte y cápsula delgada (**Figura 2A**). Con la cronicidad, van aumentando en número y uniéndose, formando granulomas de mayor tamaño, que modifican la forma del linfonodo o del órgano afectado (**Figura 2B**); observándose incluso fluidificación del material necrótico. En caso que las muestras provengan de un bovino reaccionante a la IDR y no observarse lesiones típicas, igualmente se debe tomar muestras de linfonodos retrofaríngeos, mediastínicos y mesentéricos y una muestra de parénquima pulmonar para el diagnóstico [14].

Las muestras de tejidos a coleccionar para enviar al laboratorio deben incluir área de necrosis caseosa, cápsula y el tejido u órgano involucrado; colocándose en formol *bufferado* al 10% (pH 7) para histopatología y otra sección de la muestra en colector estéril refrigerado a 4°C (si transcurre menos de 24hs desde el muestreo hasta el arribo al laboratorio). Si el tiempo de traslado es mayor conservar las muestras a -20°C o bien distribuir el material en recipientes de boca ancha con solución saturada de borato de sodio, para aislamiento bacteriológico y PCR, acompañados de la planilla denominada "Remisión de muestras" que consta en el Anexo VII de la Resolución 128/2012.

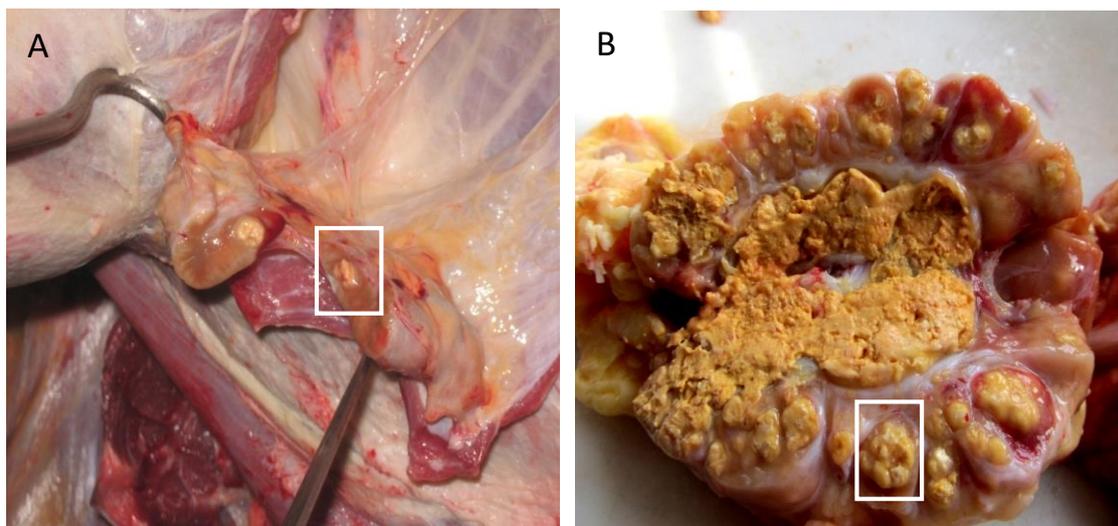


Figura 2. Granulomas macroscópicos registrados en linfonodos: **A.** Prescapular. **B.** Retrofaríngeo con múltiples granulomas. El recuadro blanco en la figura indica el área del tejido a tomar (pueden ser varias).
Fuente: Canal A. Universidad Nacional del Litoral.

BACILOSCOPIA CON COLORACIÓN DE ZIEHL NEELSEN

La baciloscopia directa con la coloración de Ziehl Neelsen (ZN) es considerada un examen básico, rápido y sencillo. En animales puede realizarse a partir de una impronta directa de una lesión compatible. También permite caracterizar el desarrollo micobacteriano en medios de cultivo en el laboratorio (**Figura 3**).

La capacidad de formar complejos coloreados con los derivados del trifenilmetano (fucsina, auramina O), que resisten la acción del etanol-ácido, es considerada una propiedad característica de las micobacterias y es por ello que se denominan bacilos ácido alcohol resistentes (BAAR). A estos colorantes se les agrega fenol acuoso que aumenta la penetración en los lípidos constituyentes de la pared celular, actuando conjuntamente con el calentamiento que ayuda a disminuir la tensión superficial.

La observación microscópica a través de la coloración ácido-alcohol resistente de ZN detecta micobacterias en concentraciones mayores a 10.000 bacilos por mL. [15]; y no logra diferenciar entre las distintas especies de micobacterias.

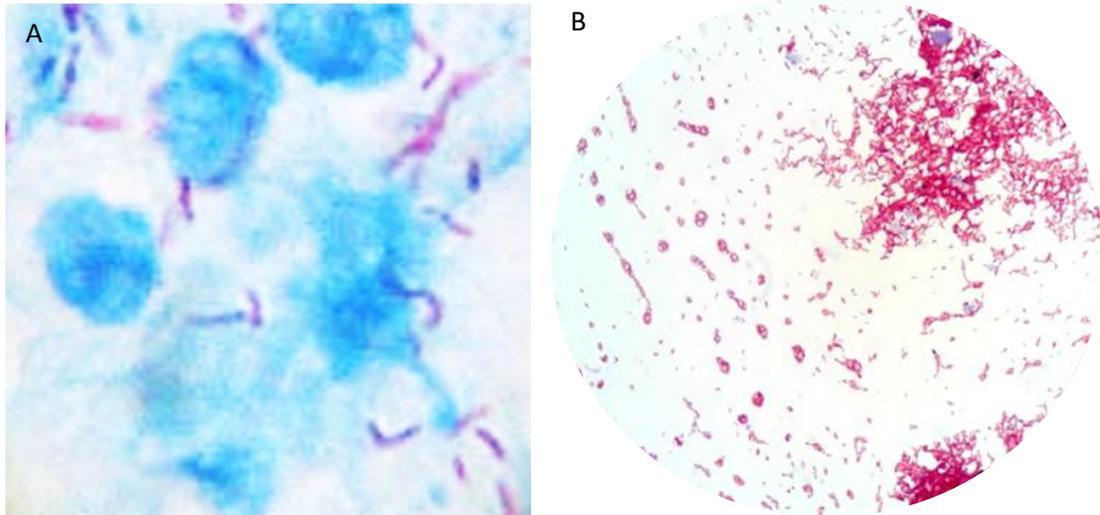


Figura 3. Tinción de Ziehl-Neelsen (ZN). **A.** Impronta teñida por ZN para la detección de *Mycobacterium bovis*. **B.** Cultivo puro en medio líquido de la cepa *Mycobacterium avium* cepa D4 ER teñido con ZN. Fuente: Paolicchi F, EEA Balcarce INTA y Bernardelli A, Ceva Salud Animal.

DIAGNÓSTICO MICROSCÓPICO DE LAS LESIONES

El aspecto microscópico de la lesión tuberculosa presenta una composición celular característica; pudiendo ser de tipo productiva o exudativa.

En el primero de los casos, se observa una marcada presencia de células epitelioides, macrófagos y en menor medida células gigantes de Langhans rodeadas de linfocitos y plasmocitos. En caso de lesión exudativa, se observan abundantes neutrófilos, linfocitos reactivos que, con el tiempo, presenta un centro necrótico que puede llegar a calcificarse. Finalmente, aparece el tejido fibroso caseoso rodeando el granuloma (**Figura 4**).

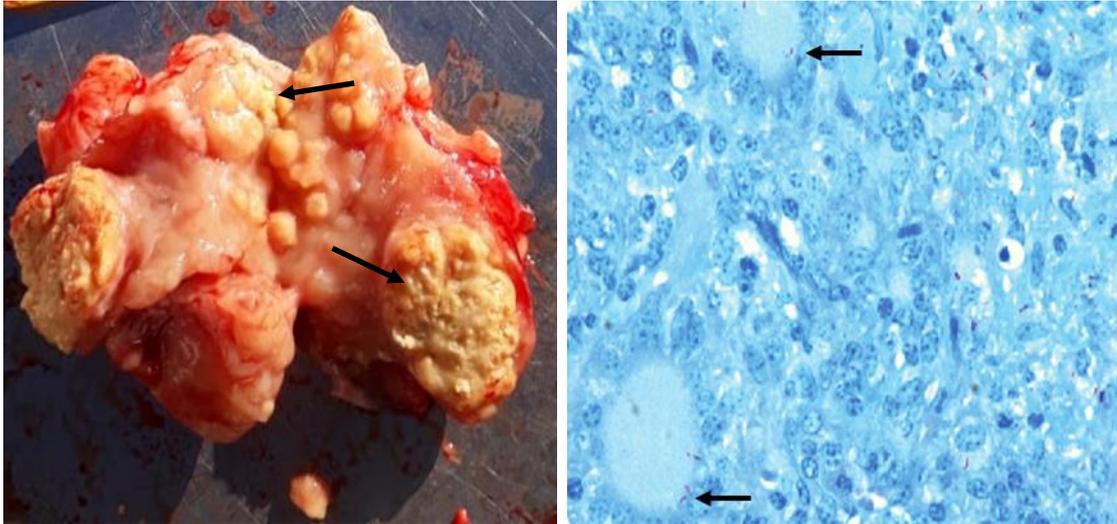


Figura 4. Observación de lesiones granulomatosas. **A.** Lesión macroscópica en la que se observan granulomas con contenido caseoso (flecha). Fuente: Garbaccio S, Garro C. IP-IPVet-CICVyA INTA. **B.** Lesión microscópica característica de TBB (1000X). Presencia de células Gigantes de Langhans y BAAR en su interior (flechas). Fuente: Delgado F. IP-IPVet-CICVyA INTA.

Con la tinción de ZN pueden observarse, en el contexto celular arriba descrito; bacilos dentro de macrófagos, de células epitelioides o bien libres en el espacio extracelular. Sin lugar a dudas, el estudio histopatológico permite identificar la presencia de micobacterias de manera más rápida que el cultivo y a su vez categorizar y cuantificar los hallazgos con el fin de ponderar los mismos [16-17]. Presenta como desventaja que otros agentes etiológicos son capaces de inducir un cuadro semejante a aquellos vistos en animales con TBB (actinobacilosis, neumonías ocasionadas por bacterias o parásitos, quistes parasitarios, leucosis enzoótica bovina, entre otros). En este sentido, la asociación de la histopatología seguida de la tinción de ZN sobre la lesión microscópica posibilita avanzar en un diagnóstico diferencial [16].

CULTIVO Y AISLAMIENTO DE *M. bovis*

Esta técnica es considerada la prueba de oro o *gold standard* del diagnóstico de la enfermedad, por ello es la prueba de referencia. Se lleva a cabo en laboratorios especializados en esta disciplina y que cuentan con instalaciones y personal entrenado ya que el trabajo implica la adopción de medidas de bioseguridad apropiadas por tratarse de un agente zoonótico. Allí se procesan diversas muestras clínicas para el aislamiento y caracterización de *M. bovis*. Previo al cultivo se realiza un proceso de descontaminación, con el fin de eliminar la microbiota que acompaña al material en estudio. Posteriormente se siembra en medios sólidos a base de huevo, específicos para el género *Mycobacterium*, tales como Löwenstein Jensen y Stonebrink (**Figura 5**). Este último es el indicado para el aislamiento de *M. bovis* a partir de diferentes muestras clínicas (tejidos, leche, secreción nasal, entre otras) [18].



Figura 5. Cultivo en medio sólido Stonebrink a base de huevo específico para el aislamiento de especies del género *Mycobacterium*. Fuente: Magnano G. Universidad Nacional de Río Cuarto.

El cultivo es un proceso lento que puede insumir entre 2 y 3 meses. Su sensibilidad no es del 100%, pudiendo obtener resultados falsos negativos. La sensibilidad de detección depende de varios factores, entre ellos de la calidad de la muestra remitida, ya que en caso de presentar micobacterias no viables (por falencias de transporte o en la remisión y acondicionamiento del material), dará resultado negativo [19]. Existen alternativas en la labor bacteriológica, relacionadas con: el protocolo utilizado para la descontaminación,

los métodos de macerado de tejidos, en los medios de cultivo (los sintéticos) o procesos que revelan un desarrollo micobacteriano incipiente por métodos fluorométricos. En el caso particular de *M. bovis*, crece en medios con contenido de piruvato de sodio (Stonebrink), siendo el crecimiento disgónico en presencia de glicerina (Löwenstein Jensen). Durante el desarrollo de las colonias en los medios de cultivo, resulta de importancia tener en cuenta: tiempo de desarrollo (a partir de tres semanas aproximadamente), morfología de la colonia (lisa y de color blanco amarillento), temperatura de crecimiento, entre otros [18-21]. En un estudio inter-laboratorios realizado en nuestro país, se observó concordancia del 24% en el resultado del aislamiento bacteriológico al analizar un panel de 25 muestras de linfonodos bovinos con lesiones compatibles y confirmadas por bacteriología. En este estudio, se evidenció que los protocolos de descontaminación y la forma de macerar los tejidos variaron según el laboratorio. Estos hallazgos refuerzan la importancia de estandarizar los protocolos empleados en el aislamiento bacteriológico [19].

La identificación de *M. bovis* en los aislamientos se determina por sus características culturales, bioquímicas y moleculares. Los desarrollos micobacterianos obtenidos en los medios de cultivo que contienen piruvato de sodio, presentan colonias lisas, de color beige, que desarrollan lentamente a 37°C, pero que no lo hacen a 22°C ni a 45°C. Las cepas presentan reacciones negativas frente a las pruebas de: niacina, nitrato reducción, catalasas, hidrólisis de tween, reducción del telurito, β-glucosidasa, β-galactosidasa, crecimiento en presencia de cloruro de sodio al 5%, toma de hierro, arilsulfatasa y reacción ureasa positiva.⁵

M. bovis es sensible a la hidrazida del ácidotiofeno-2-carboxílico, a la hidrazida del ácido isonicotínico, al ácido para-aminosalicílico y a la estreptomina.

⁵Manual de procedimientos: Clasificación fenotípica de micobacterias.
http://nuevaweb.senasa.gob.ar/sites/default/files/ARBOL_SENASA/ANIMAL/BOVINOS_BUBALINOS/PRO_D_PRIMARIA/SANIDAD/ENF_Y_ESTRAT/TUBERCULOSIS/file1443-mlab.pdf (acceso: 26 de octubre 2021)

REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)

Durante la década del 80' se desarrolló una innovación tecnológica llamada *Polymerase Chain Reaction* (PCR). Esta técnica permite obtener un gran número de copias de un fragmento de ADN específico, lo que facilita la detección del genoma de los microorganismos con mayor sensibilidad y rapidez en diversos tipos de muestras [22], sin necesidad de que los mismos estén viables. Entre ellas, se distingue la técnica de PCR de punto final y la técnica de PCR en tiempo real, ampliamente utilizadas en el diagnóstico de TBB [23-24].

En el primer caso, se trata de un protocolo que requiere equipamiento y reactivos menos costosos. Sin embargo, la visualización del producto de amplificación se realiza al final del proceso, mediante una electroforesis en gel de agarosa, lo cual implica un mayor tiempo en la obtención del resultado y la necesidad de la manipulación del producto de amplificación obtenido con potencial riesgo de contaminación (**Figura 6**).

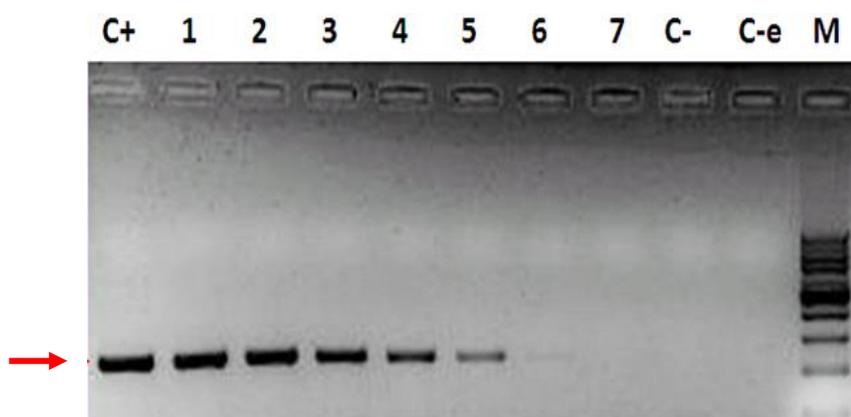


Figura 6. Gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio y expuesto a la luz ultravioleta que muestra la amplificación de un fragmento de 245pb (flecha roja) de la secuencia de inserción IS6110, característica de las especies pertenecientes al Complejo *Mycobacterium tuberculosis*. C+: Control positivo; 1-6: Muestras positivas; 7: Muestra negativa. C-: Control negativo de reactivos de PCR; C-e: Control negativo de extracción de ADN; M: Marcador de peso molecular de 100pb. Fuente: Zumárraga M. IABIMO, CICVyA, CNIA, INTA-CONICET.

En contraposición, la técnica de PCR en tiempo real permite el seguimiento del avance de la reacción y la cuantificación en simultáneo a la reacción de amplificación. Es posible incrementar la sensibilidad y especificidad mediante la utilización de sondas y al constituir

un sistema cerrado disminuye el riesgo de contaminación. En la **Figura 7** se muestra el avance de la reacción de amplificación en ciclado de PCR en tiempo real.

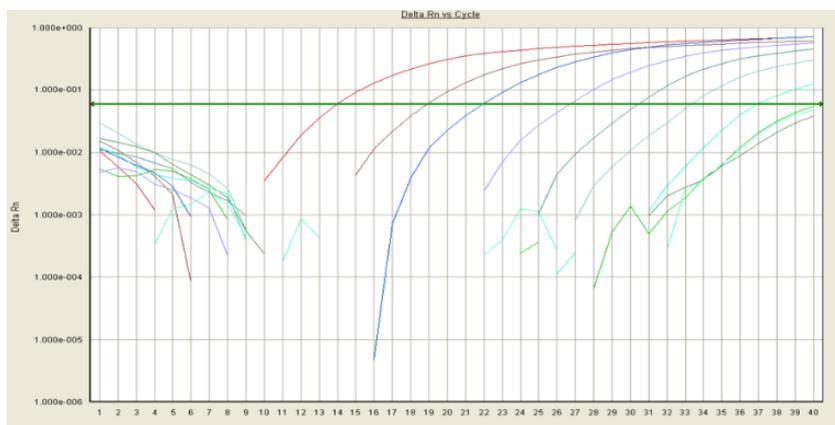


Figura 7. Intensidad de fluorescencia en función al número de ciclos. Fuente: Zumárraga M. IABIMO, UEDD INTA-CONICET.

Ambas se emplean globalmente en el diagnóstico de TBB y dependerá del equipamiento y la existencia de un operador entrenado en una u otra técnica la aplicación de alguna de ellas.

Cualquiera sea la técnica de PCR empleada, la obtención del ADN micobacteriano presente en la muestra a procesar será clave en la sensibilidad y reproducibilidad de la prueba. Resulta esencial la estandarización de la metodología a utilizar de acuerdo a la muestra clínica a procesar, ya que difieren en la complejidad de su matriz y en la presencia de inhibidores de la polimerasa [24-25-26-27]. Se han descrito en diversos trabajos científicos [28-29-30-31], variantes metodológicas en torno a la extracción y recuperación del ADN en alto grado de pureza, sin embargo, el empleo de protocolos comerciales adaptados al uso en diferentes muestras biológicas facilita esta tarea.

Entre las múltiples ventajas que presenta la técnica de PCR en comparación con el cultivo, se destaca la celeridad ya que permite obtener resultados que incluyen la identificación de la especie micobacteriana en cortos plazos de tiempo. Esto posibilitaría la intervención inmediata de los Servicios Sanitarios provinciales y/o nacionales, ante casos particulares. Para ello se requiere de técnicas diagnósticas rápidas, prácticas, económicas, sensibles y específicas; como podría ser el caso de la técnica de PCR [24]. Sin embargo, existen potenciales limitaciones como la presencia de inhibidores en la muestra clínica, lo cual

podría arrojar resultados falsos negativos [32], o las contaminaciones por una inadecuada manipulación del producto amplificado, cuya presencia puede generar resultados falsos positivos.

Para evitar la contaminación, es conveniente el laboreo en habitáculos separados en cada una de las etapas del proceso (extracción del ADN, preparación de la mezcla de reacción, siembra del templado, amplificación propiamente dicha y visualización del producto); utilizando reactivos, instrumental, insumos y vestimenta propios de cada sector. Es imprescindible sumar certezas al procedimiento, adicionando controles positivos y negativos para cada etapa, además de contar con personal entrenado para su realización [32].

Entre las muestras más ampliamente utilizadas en el diagnóstico de TBB por PCR se pueden enumerar las muestras de tejidos y la leche cruda bovina [33-34].

Existen dificultades en el procesamiento de tejidos bovinos ya que las lesiones suelen presentar escasa cantidad de bacilos, y una marcada fibrosis y calcificación que limita la liberación del material genético [35-36]. Estudios realizados en nuestro país proponen el uso de la técnica de PCR directa a partir de tejidos como complemento del diagnóstico rutinario (bacteriología e histopatología) [28-30]. No obstante, existe un amplio rango en cuanto a la sensibilidad diagnóstica del ensayo (53%- 91%), asociado a múltiples factores que involucran desde la extracción hasta la amplificación [24-25-37-38]. Este hecho enfatiza la necesidad de contar con un esquema estandarizado en los laboratorios que ofrezcan la técnica de PCR como servicio diagnóstico de TBB, los cuales optimicen el valor de sensibilidad analítica de la técnica [39].

Courcoul y col. [40] compararon la sensibilidad y especificidad de la bacteriología, histopatología seguido con coloración de Ziehl Neelsen y la técnica de PCR en tiempo real basada en la amplificación de la secuencia *IS6110* en 5.211 bovinos en Francia. Se detectó que la técnica de PCR fue más sensible que la bacteriología (87.7% [82.5–92.3%] versus 78.1% [72.9–82.8%]), mientras que la especificidad fue de 97.0% para la técnica de PCR [94.3–99.0%] y 99.1% para la bacteriología [97.1–100.0%]). En relación a la histopatología seguido de Ziehl Neelsen, resultó tan sensible como la técnica de PCR

(93.6% [89.9–96.9%]) pero con una especificidad asociada menor que la técnica de PCR y la bacteriología (83.3% [78.7– 87.6%]).

A nivel local, Barandiaran y col. [41] demostraron que la técnica de PCR de punto final para la amplificación de la secuencia de inserción IS6110, presentó una sensibilidad (82%) levemente mayor que el aislamiento bacteriológico (79,9%); mientras que la especificidad fue similar (88,5% y 89%, respectivamente). La aplicación en paralelo de ambas técnicas permitió incrementar la sensibilidad sustancialmente (96,6%) con compromiso moderado de la especificidad (78,8%).

Los resultados demuestran que la prueba de PCR a partir de muestras de tejido, en combinación con otras pruebas que corroboran la presencia del agente, constituye una herramienta eficaz para realizar el diagnóstico de *M. bovis* en bovinos y cerdos.

Esta técnica está contemplada en el artículo N°63 de la Resolución N° 128/2012 que reglamenta el Plan Nacional de Control y Erradicación de la TBB en la República Argentina. En este artículo se describe que los laboratorios de diagnóstico en zonas de control “deben poseer la capacidad de diagnóstico histopatológico y/o bacteriológico y/o eventualmente de biología molecular con fines confirmatorios de las pruebas tuberculínicas de campo, a partir de muestras de material tomado en necropsias o de lesiones sospechosas y/o compatibles con tuberculosis en el frigorífico”. Además, se indica el posible envío de muestras de tejidos, en el marco de un sistema de vigilancia, a los laboratorios para el diagnóstico bacteriológico, histopatológico y con métodos de amplificación enzimática del ADN si así correspondiese”, o su empleo en el diagnóstico de la TBB como parte de un sistema de vigilancia para zonas libres.

Una alternativa complementaria de diagnóstico es la aplicación de la técnica de PCR en leche de tanque de tambos para la identificación de rodeos infectados, de acuerdo a lo descrito por Zumárraga y col. [42]. Tiene la ventaja de poder auditar rápidamente distintos establecimientos mediante una simple toma de muestra de leche. Uno de los limitantes es que no todas las vacas infectadas eliminan micobacterias por leche, y cuando lo hacen es oscilante, y no todas las vacas del rodeo lo hacen al mismo tiempo [42]. A su vez la leche es una muestra compleja por la presencia de grasa y calcio que pueden comportarse como inhibidores de la técnica de PCR. Se estimó que el valor

predictivo negativo en rodeos cuyos animales son no reaccionantes a la prueba intradérmica fue del 95% [42]. Teniendo en cuenta esta fortaleza, esta estrategia se ha implementado como prueba oficial complementaria en el marco del Plan Regional de Control y Erradicación de la TBB de la provincia de Santa Fe (Resolución 949/12), para la vigilancia epidemiológica en los rodeos de leche con certificación oficial de libres de TBB. De este modo, durante las inspecciones oficiales provinciales en establecimientos lácteos con certificado oficial de libres se extrae una muestra de leche del tanque para su posterior análisis por la técnica de PCR. En estas inspecciones también se audita la realización de la prueba IDR a todo el rodeo.

Tipificación molecular

La utilidad de un estudio de genotipificación clásica permite interpretar y comprender la presencia, magnitud y distribución de un determinado genotipo. Si bien los estudios de tipificación no son habituales, poseen distintas aplicaciones como la caracterización de los microorganismos en base a sus propiedades genéticas, la detección de fuentes de infección, el estudio de la distribución y diseminación de los microorganismos, la detección de brotes epidémicos, la distinción acerca de la causa de un rebrote, la vigilancia epidemiológica, la detección de contaminaciones cruzadas en los laboratorios y también estudios evolutivos.

El principio de la tipificación molecular o genotipificación se basa en el modelo de expansión clonal, el cual establece que una bacteria se transmite entre diferentes hospedadores reteniendo su mismo perfil genético. Para esto se utilizan marcadores moleculares [43]. Los métodos utilizados deben ser reproducibles y a su vez es necesario contemplar otros factores como costo, disponibilidad, rapidez y requerimientos de índole técnico (tipo de equipamiento, entrenamiento, facilidad en la interpretación de resultados). Cada técnica tiene un poder discriminatorio diferente (entre 0 y 1), que representa la probabilidad del método de tipificación para considerar diferentes a dos aislamientos epidemiológicamente no relacionados elegidos al azar en una población [44]. Para la tipificación molecular de las micobacterias que integran el complejo *M. tuberculosis* se destaca el método de hibridación reversa en línea de *Spoligotyping* [45]

y las repeticiones en tándem de número variable (VNTR del inglés: *Variable Number Tandem Repeats*), unidades repetitivas intercaladas de micobacterias (MIRUs del inglés: *Mycobacterial Interspersed Repetitive Unit*) [46], repeticiones exactas en tándem (ETRs del inglés: *Exact Tandem Repeats*) [47], (QUB del inglés: *Queens`University of Belfast*) [48-49]. La conformación de bases de datos de genotipos locales e internacionales es un proceso esencial y progresivo. Estas bases serán el sustento para explicar situaciones actuales en base a la información generada en el pasado. En un estudio realizado en cinco países de Latinoamérica, Argentina, Brasil, Chile, Venezuela y México [50], se identificaron espoligotipos característicos y comunes en la región. Como ejemplo, los genotipos predominantes en Brasil, no son frecuentes en Argentina y viceversa, mientras que Chile y Argentina comparten los mismos genotipos predominantes. La tipificación de cepas de *M. bovis* de los países limítrofes con Argentina permitirá generar una valiosa información que podría explicar posibles brotes generados a consecuencia del comercio y/o tráfico de ganado. En relación a las micobacterias no tuberculosas, conocidas también como MOTT (del inglés *Mycobacteria other than tuberculosis*) o atípicas, se utiliza la secuenciación de distintos genes (16S ARNr; *hsp65*; *rpoB*, *sodA*) y posterior comparación de las secuencias génicas en bases de datos, resultando ser la opción más adecuada para la tipificación molecular. Para una caracterización certera se requiere del análisis combinado de las secuencias de ADN obtenidas para diferentes genes resultando, en muchos casos, una mejor opción que la utilización de kits comerciales [51].

DETECCIÓN DE LA PRODUCCIÓN ESPECÍFICA DE γ INF

Existe una prueba *ante mortem* que detecta *in vitro* la respuesta inmune mediada por células del animal, utilizando una muestra de sangre para determinar la liberación de la citoquina Interferón Gamma (γ INF), por esto es considerada una prueba indirecta. Por tratarse de un ensayo *in vitro*, a diferencia de la prueba de IDR, no interfiere con el estado inmunológico del animal analizado y puede realizarse a pocos días de aplicada la prueba de intradermorreacción con PPD bovina.

Su fundamento se basa en la estimulación de linfocitos presentes en la sangre anticoagulada del animal a testear con diferentes antígenos específicos derivados de micobacterias y la posterior determinación de γ INF en el plasma recuperado mediante una prueba de ELISA tipo sándwich [52]. El rendimiento diagnóstico de esta técnica ha sido evaluado en diversos estudios llevados a cabo en Australia, Brasil, Etiopía, Gran Bretaña, República de Irlanda, Italia, Nueva Zelanda, Irlanda del Norte, España y Estados Unidos entre otros países [53], incorporándose posteriormente en sus programas de control de la enfermedad como técnica complementaria a la prueba de la IDR. En Sudamérica, Chile se ha sumado a esta iniciativa.

Las pruebas iniciales en Australia mostraron valores de 93,6% y 96,2% de sensibilidad y especificidad, respectivamente [54]. Estudios adicionales indicaron otros valores con rangos de sensibilidad que variaron entre 73% y 100% y de especificidad entre 85% y 99,6% con un valor medio de 87,6% y 96,6%, respectivamente [53]. Así, la disparidad en los resultados mencionados estaría relacionada con características disímiles de los bovinos y los sistemas productivos estudiados, diferentes puntos de corte empleados según la región, los diferentes tipos de PPD bovina utilizadas para la IDR y la técnica de oro considerada como *estándar* para determinar el estado sanitario de los rodeos, entre otros. La OIE reconoció en 2012, su uso diagnóstico como complemento de la prueba intradérmica.

El empleo de esta técnica debe ser estratégico, es decir, debe emplearse en consonancia con el cuadro epidemiológico del establecimiento o región en la que se incorporará su uso y de forma complementaria a la IDR. Así, se plantea la utilización de la prueba de liberación de γ INF, frente a dos posibles escenarios epidemiológicos:

- En áreas geográficas donde existen rodeos bovinos persistentemente infectados, como ocurre en nuestro país, se sugiere su utilización en “**paralelo**” a la prueba de la IDR, con el fin de aumentar la sensibilidad diagnóstica y, por lo tanto, controlar más rápidamente la enfermedad [5-54-55-56]. En este sentido, se aplica en aquellos rodeos luego de realizar la prueba de la IDR e identificar animales NO REACCIONANTES. Entre los 3 y 30 días posteriores, en este grupo de animales se realiza el testeo mediante la prueba de liberación de γ IFN, con el objetivo de detectar posibles falsos negativos a la prueba de la IDR.
- En países o regiones libres o con muy baja prevalencia de TBB (como EEUU y Australia o en la provincia de Tierra del Fuego), se propone su utilización en “**serie**” es decir, analizando aquellos animales REACCIONANTES a la prueba de la IDR, sospechados de ser falsos positivos a causa de una sensibilización inespecífica con MOTT [57-58]. Es de vital importancia comprender que en el contexto epidemiológico en el que se enmarca Argentina, siendo la TBB una enfermedad endémica, no se indica el empleo de esta modalidad. Una excepción de esto podría ser su potencial uso como herramienta de vigilancia epidemiológica para rodeos bovinos negativos que habitan la provincia de Tierra del Fuego, la cual tiene la certificación de libre de TBB desde el año 2011 (Resolución 100/2011, Senasa)³.

Existen varias pruebas comerciales disponibles en el mercado para el diagnóstico de TBB animal. Algunas de ellas solo utilizan antígenos estándar como PPD bovina y PPD aviar. Otros han incorporado el uso de antígenos recombinantes de *M. bovis* para estimulación de la sangre a testear, ofreciendo diferentes alternativas en relación a la sensibilidad y especificidad de detección. Al presente, el Plan Nacional de Control y Erradicación de la TBB vigente en nuestro país (Resol. 128/2012, Senasa), no contempla su uso como técnica oficial de detección de la infección. El Senasa exige la validación de pruebas de este tipo a nivel nacional, a fin de optimizar los parámetros de sensibilidad/especificidad y ajustar el valor del punto de corte en el contexto epidemiológico preponderante en la región. Desde el año 2019 se encuentra presentado en Senasa un estudio realizado por el INTA, en la EEA Balcarce, mediante una articulación público privada para validación de una prueba comercial que permite la detección de γ IFN en bovinos. La validación fue

realizada con estudios sobre bovinos pertenecientes a rodeos de la provincia de Tierra del Fuego y de zonas continentales con un nivel de prevalencia media y alta, contrastado estos resultados con identificación de lesiones compatibles en carcasas y con pruebas de aislamiento de *M. bovis* en más de 100 animales enviados a faena. Además, este test permite concomitantemente la identificación diferencial con bovinos infectados con *Mycobacterium avium* subsp *paratuberculosis* (paratuberculosis). El trabajo se encuentra finalizado con resultados *ad hoc* según exigencias del mencionado organismo y cuyo informe técnico se ha presentado ante las autoridades del mismo [59]. A su vez, otro estudio de similares características cuyo objetivo es la evaluación de otra prueba comercial se encuentra actualmente en curso. La evaluación de los resultados obtenidos en estos estudios de validación en Argentina por parte del organismo oficial, permitirá valorar la importancia del aporte de dos equipos comerciales diferentes ambos aprobados por la OIE a nivel mundial para el diagnóstico *ante mortem* de la TBB mediante la determinación de γ IFN en los rodeos del país.

Si bien la IDR y la detección de γ IFN son técnicas de diagnóstico basadas en la determinación de la respuesta inmune mediada por células del animal a testear, los resultados obtenidos no deben necesariamente coincidir. Esto se debe a la diferente reactividad de las poblaciones celulares que componen el sistema inmune frente a los antígenos empleados de acuerdo a la prueba que se utilice. Según la OIE, existe un 70% de concordancia entre los resultados que se puedan observar entre la prueba de la IDR y el test de detección *in vitro* de γ IFN ⁶. Cuando se realizan ambas técnicas, pueden registrarse diferentes situaciones, aun cuando los animales estén infectados:

- IDR positiva/ γ IFN positivo (animales positivos)
- IDR positiva/ γ IFN negativo (animales positivos)
- IDR negativa/ γ IFN positivo (animales positivos anérgicos)
- IDR negativa/ γ IFN negativo (verdaderos negativos y animales anérgicos)

Este hecho puede complejizar la toma de decisiones si el empleo de la técnica de γ IFN no se realiza considerando como referencia el resultado de la técnica oficial de

⁶ <https://www.oie.int/es/nuestra-experiencia-cientifica/registro-de-los-kits-de-diagnostico/registro-de-kits-de-diagnostico/> (acceso: 13 de enero de 2021)

diagnóstico, la prueba de la IDR. Entonces, en aquellos rodeos donde se emplee la técnica de liberación de γ IFN en paralelo con la prueba de la IDR, vale decir, en el grupo de animales NO REACCIONANTES, aquellos que exhiban un resultado IDR negativo / γ IFN positivo se deberán considerar como animales positivos, debiendo eliminarse del rodeo en saneamiento. No obstante, podría permanecer un grupo de animales que no reaccionen a ninguna de las dos pruebas, los cuales se ha demostrado en rodeos locales que pueden tener lesiones tuberculosas con riesgo de excreción y diseminación de infección dificultando el saneamiento [12-13].

En caso que se emplee la técnica de detección de γ IFN en serie (en Argentina este criterio solamente es aplicable al territorio de Tierra del Fuego), existen tres posibles escenarios:

- IDR positiva/ γ IFN negativo
- IDR positiva/ γ IFN positivo (detección de infección por *M. bovis*)
- IDR positiva/ γ IFN positivo a PPD aviar (detección de infección por micobacterias no tuberculosas al presentar respuesta frente al antígeno aviar (PPD aviar) en animales con paratuberculosis)

En este sentido, considerando que se emplea este esquema en rodeos libres de tuberculosis o zonas de baja prevalencia donde se sospecha reacciones falso positivas inespecíficas, se sugiere en el primer caso (IDR positivo/ γ IFN negativo) investigar la presencia de lesiones compatibles con TBB en la faena del animal reaccionante. En el segundo caso (IDR positiva/ γ IFN positivo) el animal se considera infectado por *M. bovis* y debe ser eliminado del rodeo. En el tercer caso (IDR positiva/ γ IFN positivo a PPD aviar), al detectarse una sensibilización inespecífica (niveles altos de γ IFN al estimular la sangre con PPD aviar) el animal se considera negativo para la infección por *M. bovis*. Nuevamente, es importante evaluar estos resultados en el contexto epidemiológico del rodeo (presencia de *M. avium* subesp. *paratuberculosis*, historia de hallazgos de lesiones en faena durante los últimos 5 años, registro de datos de IDR del rodeo, denuncia de casos clínicos de paratuberculosis o diagnóstico por aislamiento de *M. avium* subsp *paratuberculosis*). El uso de la prueba de γ IFN ha demostrado su utilidad en la detección de enfermedades producidas por MOTT, como es el caso de paratuberculosis bovina en

regiones libres de TBB como ha sido identificado en la provincia de Tierra del Fuego, Argentina [59].

En los laboratorios donde se realice la prueba, debe tenerse en cuenta que la misma se efectúa en dos etapas: a) la primera consiste en la estimulación *in vitro* de la sangre anticoagulada de reciente extracción (no más de 12 hs) con antígenos específicos y la cosecha del plasma luego de esta estimulación. La segunda etapa se centra en la realización de una prueba de ELISA tipo sándwich para determinar la cantidad de γ IFN producido durante la estimulación, la cual insume al menos 18hs de incubación a una temperatura de 37°C. Se debe utilizar como anticoagulante heparina. Un paso importante es homogeneizar invirtiendo suavemente 10 veces la sangre junto con la heparina evitando la coagulación, ya que **el suero no sirve** para realizar la estimulación con antígenos y posterior determinación de γ IFN. La muestra debe mantenerse a temperatura ambiente en climas templados a cálidos (10-30°C), o en conservadoras térmicas en casos donde las temperaturas sean inferiores a los 10°C. No se deben refrigerar las muestras antes de su procesamiento. Dicho material deberá arribar al laboratorio dentro de las primeras 12hs posteriores al muestreo en lo posible, para iniciar la estimulación antigénica de la muestra con la mayor vitalidad de los linfocitos de la sangre obtenida (los test de IFN cuentan con procedimientos estándar usando mitógenos para verificar viabilidad celular), y asegurar la liberación de γ IFN al plasma en animales infectados. Para ello, es importante contar con la logística adecuada que asegure que se realice el estímulo de la sangre en tiempo adecuado. Esto hay que considerarlo ya que pueden ocurrir imprevistos relacionados con condiciones climáticas, distancias geográficas o dinámicas propias del muestreo. Es importante que el usuario esté al tanto del margen de tiempo con el que cuenta para que las muestras arriben al laboratorio correctamente. De lo contrario, se puede comprometer la eficacia de la prueba diagnóstica, ya que a medida que transcurre el tiempo entre estas dos operaciones (muestreo-estimulación), decrece significativamente el número de linfocitos viables (insumo básico para la liberación de γ IFN) arrojando posibles resultados falsos negativos. Teniendo en cuenta las dimensiones de países como Argentina y las dificultades para la comunicación entre regiones y laboratorios de referencia, debe ser considerado este aspecto clave al momento de ser evaluado el uso

de la técnica *in vitro* de liberación de γ IFN y su adopción como alternativa diagnóstica. El test probado permite la utilización de las tuberculinas elaboradas en Argentina como estímulo específico.

Esta prueba es realizada en el laboratorio por personal entrenado en la aplicación e interpretación de los resultados, mientras que requiere además equipamiento específico como una estufa de 37°C, centrífuga (ideal para placas de ELISA), pipetas automáticas y un lector de placas de ELISA, siendo fundamental a la hora de dar resultados la interpretación de los mismos en forma individual para cada animal y en el contexto del rodeo analizado.

La prueba *in vitro* de liberación de γ IFN ha demostrado ser una herramienta diagnóstica muy útil en países con presencia de la enfermedad y en regiones libres para efectuar vigilancia epidemiológica. Su uso racional y su incorporación como técnica de diagnóstico complementaria a la prueba de la IDR en el marco de un plan de control, permitió dar batalla a este flagelo en varios países del mundo. A partir de los datos que se generen en los estudios de validación, ya finalizados y en curso, se podrá evaluar su empleo adaptado a la dinámica del contexto epidemiológico regional y al Plan Nacional de Control de la TBB.

DETECCIÓN DE LA PRODUCCIÓN ESPECÍFICA DE ANTICUERPOS

Existe una prueba *ante mortem* que detecta *in vitro* la respuesta inmune humoral del animal utilizando una muestra de suero para determinar la presencia de anticuerpos, por esto es considerada una prueba indirecta. Este ensayo diagnóstico se denomina técnica de ELISA y fue incorporado exitosamente por distintos países en sus programas de control y erradicación de enfermedades infecciosas.

En el caso de la TBB, fue evaluado en diferentes trabajos [12-13-60-61-62-63-64-65], adoptando un rol complementario a la técnica de la IDR en los programas de control. Al igual que otras pruebas serológicas su utilidad fue propuesta fundamentalmente para la identificación de aquellos animales que a pesar de estar infectados por alguna causa, no producen una respuesta alérgica específica frente a la inoculación intradérmica de la tuberculina [66]. También fue descripto su utilización potencial en la detección de animales recientemente infectados donde se incorporan al ensayo diversos antígenos

inmunodominantes específicos, capaces de revelar la presencia del agente etiológico [67]. Otros trabajos realizados en bovinos experimentalmente infectados con *M. bovis* indican que la respuesta inmune humoral es baja o está ausente en la etapa inicial de la infección, incrementándose a medida que la enfermedad progresa [66-68-69-70]. En este sentido Vordermeier y col. [71], al igual que De la Rúa Domenech [5], sugirieron que la respuesta mediada por anticuerpos resulta evidente en estadios avanzados de la enfermedad, asociada a cuadros patológicos severos y a un incremento en la carga micobacteriana (**Figura 10**). En el segmento derecho de esta figura se representa la infección avanzada o generalizada donde los bovinos no suelen responder a las pruebas que detectan la inmunidad mediada por células (prueba de IDR o detección de γ IFN), pero demuestran una elevada presencia de anticuerpos en sangre [72-73]. Aquellos animales que presentan este perfil inmunológico se denominan “anérgicos” y representan un gran riesgo por tratarse de bovinos enfermos y bacilíferos (altamente contagiosos). En muchos casos estos animales retrasan las tareas de saneamiento de la TBB en los rodeos porque se convierten en fuente de infección continua.

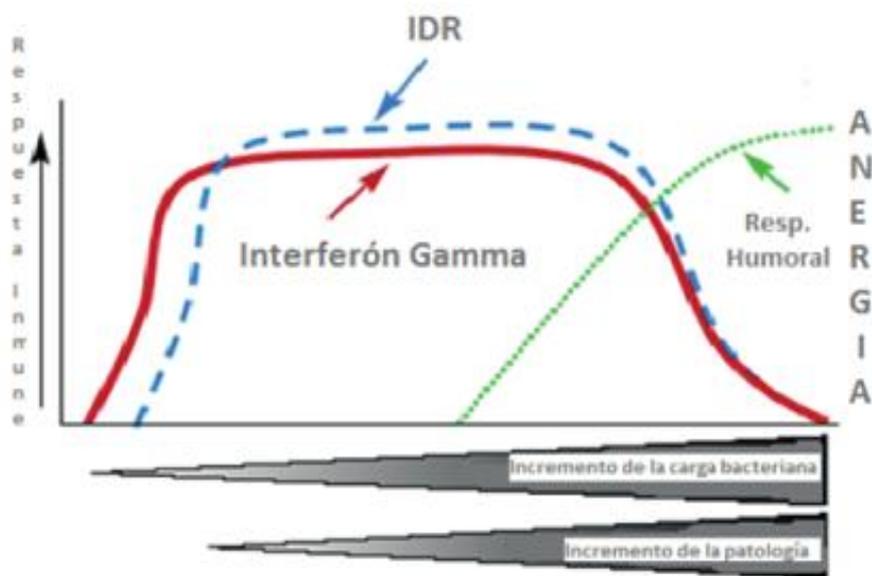


Figura 10. Respuesta inmune del bovino frente a la infección por *M. bovis* (Esquema adaptado de Vordermeier y col. [73])

En las pruebas de ELISA para detección de anticuerpos, diversos autores describieron el uso de un panel multiantígeno, capaz de abarcar diversos estadios a lo largo de la enfermedad de manera sensible y específica [67-74-75]. La incorporación de antígenos específicos de *M. bovis* inmunodominantes como MPB70 y MPB83 fueron propuestos para mejorar la técnica en cuanto a su especificidad [76]. Otros trabajos optaron por una estrategia basada en un solo antígeno capaz de identificar correctamente bovinos con TBB [77-78-79]. En función de los antígenos utilizados en la prueba de ELISA, la sensibilidad de la misma presenta un amplio rango según diferentes factores [61-62-63-64-80-81-82-83-84]. Entre ellos: I) los antígenos utilizados, II) el contexto epidemiológico de la muestra de suero evaluada (sueros de bovinos reactivos a la prueba tuberculínica-PPD, bacteriológicamente positivo, con presencia de lesiones compatibles con TBB o las distintas combinaciones de ellos), III) estadio de la enfermedad a detectar (infección reciente, etapa avanzada), IV) edad de los bovinos (terneros, bovinos adultos), V) momento de la recolección de la muestra, en relación con la aplicación de la técnica de IDR y su posible efecto *booster*. Waters y col. [63] describieron a través de una prueba comercial de diagnóstico serológico, diversos valores de sensibilidad alcanzados, de acuerdo a las muestras pertenecientes a colecciones de sueros. Estos autores obtuvieron un 74% de sensibilidad a partir de un panel de sueros provenientes de rodeos de Gran Bretaña (n=184), 69% para sueros de Irlanda (n=130), 46% en el caso de Estados Unidos (n= 122) y 40% para Nueva Zelanda (n= 42). Trost y col. [85] hallaron diferencias en la sensibilidad de la prueba serológica mencionada, aplicada en Reino Unido, Estados Unidos y México siendo ésta del 77% (n= 126), 45% (n= 146) y 9% (n= 128), respectivamente.

Harboe y col. [86] mencionaron el efecto que ocasiona la aplicación de la técnica de la IDR, estimulando la producción de anticuerpos en bovinos infectados. Estudios más recientes han demostrado que las respuestas de anticuerpos frente a *M. bovis*, se potencian a partir de la aplicación de la prueba tuberculínica-PPD, generando una respuesta anamnésica. Este concepto fue profundizado luego por Casal y col. [65], quienes demostraron el efecto *booster* ocasionado por la aplicación de la técnica de la IDR sobre los niveles de anticuerpos circulantes en sangre de bovinos con TBB. Tomando en cuenta dicho efecto, consiguieron un aumento significativo en la sensibilidad del ELISA, cuando las muestras fueron colectadas 15 días posteriores a la aplicación de la técnica de la IDR, incrementándose de un 24% a un 70%. Waters y col. [87] mencionan

el efecto *booster* como un factor relevante relacionado con el diagnóstico serológico, en consonancia con el progreso de la enfermedad en el individuo. En este trabajo, se describe un aumento en la respuesta humoral específica en las semanas posteriores a la aplicación de la prueba de IDR, prolongándose dicho efecto por los próximos 2-3 meses. Este fenómeno anamnésico estaría asociado a la acción de linfocitos B de memoria generados originalmente durante la infección micobacteriana, pudiéndose luego reactivarse rápidamente a partir de una aplicación de la PPD [88].

La detección de la respuesta inmune humoral a través de la técnica de ELISA posee potencial si se utiliza complementariamente a la IDR, porque permitiría detectar los animales falsos negativos o anérgicos en establecimientos con antecedentes de TBB [89]. En nuestro país se llevaron adelante diferentes estudios en cuanto al uso de esta estrategia sobre bovinos no reaccionantes a la IDR provenientes de establecimientos con TBB [12-13]. Garbaccio y col. [12] analizaron 33 bovinos no reaccionantes a la IDR anocaudal y ELISA positivo para la respuesta inmune humoral, de los cuales 30 (91%) presentaron lesiones compatibles con TBB (**Figura 11**), siendo luego confirmadas a través de bacteriología, PCR y/o histopatología. Griffa y col. [13] encontraron 43 bovinos positivos al ELISA que detecta anticuerpos, pero no identificados por la técnica de la IDR anocaudal. De ellos 36 (83%) fueron confirmados como infectados a través de histopatología y/o por la técnica de PCR a partir de tejido. En ambos trabajos se sugiere el uso complementario del ELISA para detección de respuesta inmune humoral en bovinos no reaccionantes a la prueba intradérmica pertenecientes a establecimientos con TBB. Dicho diagnóstico podría mejorar en términos de sensibilidad diagnóstica la identificación de bovinos infectados.

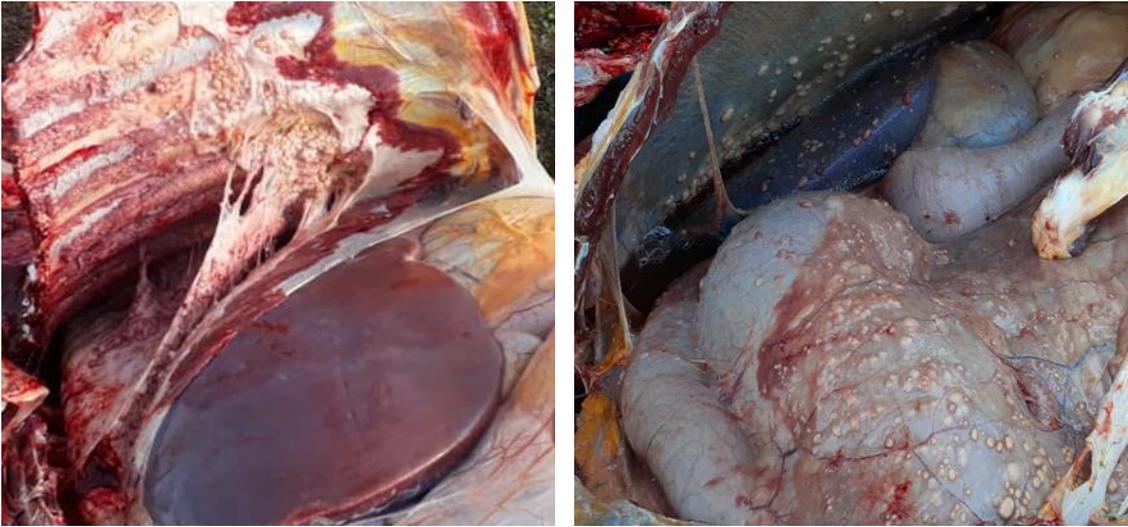


Figura 11: TBB generalizada en bovinos no reaccionantes a la prueba tuberculínica-PPD/ELISA positivo para detección de respuesta inmune humoral: Izq. cavidad torácica, der. cavidad abdominal. Fuente: Delgado F., Garro C. y Garbaccio S. IP-IPVet-CICVyA INTA.

Si bien existen diversos trabajos de investigación llevados a cabo en nuestro país acerca del uso estratégico del ELISA [12-13-75], es necesario realizar un proceso de validación bajo la supervisión de organismos oficiales. Esto permitirá, al igual que lo mencionado en el caso del ensayo de γ IFN, poder determinar los valores de sensibilidad y especificidad del ensayo junto a la definición del punto de corte más apropiado de acuerdo al contexto epidemiológico-sanitario.

SINTESIS

La TBB desencadena predominantemente una respuesta inmune mediada por células durante las fases temprana e intermedia de la infección, siendo los linfocitos Th1 los protagonistas de esta respuesta. Por lo tanto, la prueba intradérmica continúa siendo el pilar fundamental del diagnóstico de la enfermedad en los bovinos en pie. En el mismo sentido, el ensayo de γ IFN resulta una herramienta útil para revelar dicha respuesta inmune. A medida que la enfermedad progresa, un cambio del perfil de respuesta inmune de Th1 a Th2 se asocia con una disminución de la respuesta inmune mediada por células, dando lugar a la respuesta inmune humoral tal como se graficó en la **Figura 10**. A pesar de ello, las pruebas serológicas, aunque relativamente económicas y de fácil realización en el laboratorio; no son consideradas en los actuales programas de control

de la TBB, aunque en los últimos años se ha retomado el interés sobre esta alternativa diagnóstica generando resultados parciales promisorios.

La prueba intradérmica continúa siendo la protagonista del diagnóstico de la TBB y herramienta esencial para avanzar en el control de la enfermedad. Junto a este ensayo, el análisis *post mortem* realizado a partir del muestreo de tejidos con lesiones compatibles, suele aportar una valiosa información que permite caracterizar un caso, dando el contexto epidemiológico al mismo. Si bien un diagnóstico positivo, a partir de muestras de leche, puede brindar información de utilidad, teniendo en cuenta la presencia intermitente del microorganismo en este fluido, un resultado negativo no da certezas acerca de la verdadera situación de los animales en estudio en cuanto a la tuberculosis. Tal vez, su aplicación podría enriquecer estudios de patogenia de la TBB, no así para el diagnóstico individual en bovinos. Tal como se mencionó a lo largo de este trabajo, tanto el ensayo de dosaje de γ IFN como un testeo a través de la técnica de ELISA para detección de respuesta humoral, requerirán de estudios locales de validación que permitan fundamentar su potencial uso estratégico, como complemento de la prueba tuberculínica-PPD, en el marco de un Programa Nacional de Control de la enfermedad. De acuerdo a lo desarrollado en este documento, podemos encontrar distintos ensayos diagnósticos y su posible aplicación frente a diversas muestras biológicas tales como leche [42-90-91], tejidos [24-25-28-92-93], plasma y suero [63-64-65], algunos de ellos ampliamente estudiados e incorporados en los Programas de Control de la TBB y otros en fase de experimentación y/o validación. Por lo tanto, existe un progresivo interés en el ámbito científico, académico y productivo, por reforzar o innovar en las capacidades diagnósticas ya establecidas, con el fin de optimizar el diagnóstico de la infección y detección de la enfermedad, y a su vez generar conocimientos acerca de la patogenia o de la transmisión de la infección. Un mejor entendimiento de estos aspectos, permitiría el preciso diagnóstico y remoción y envío a faena de los bovinos infectados con *M. bovis* y además posibilitaría la toma de decisiones a nivel establecimiento o bien, delinear o establecer estrategias regionales y/o nacionales tendientes al control y erradicación de esta enfermedad.

REFERENCIAS

1. Pollock JM, Welsh MD, McNair J. 2005. Immune responses in bovine tuberculosis: Towards new strategies for the diagnosis and control of disease. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 108, 37–43.
2. Pollock JM, Buddle BM, Andersen P. 2001. Towards more accurate diagnosis of bovine tuberculosis using defined antigens. *Tuberculosis*; 81 (1-2): 65-69.
3. Daniel TM. 1996. The serodiagnosis of tuberculosis using the 38 kDa antigen of *Mycobacterium tuberculosis*. *Tuber. Lung. Dis*; 78 (1): 85.
4. Gormley E, Doyle MB, McGill K, Costello E, Good M, Collins JD. 2004. The effect of the tuberculin test and the consequences of a delay in blood culture on the sensitivity of a gamma interferon assay for the detection of *Mycobacterium bovis* infection in cattle. *Vet. Immunol. Immunopathol.* Dec. 28; 102 (4):413-420.
5. De la Rúa-Domenech R, Goodchild AT, Vordermeier HM, Hewinson RG, Christiansen KH, Clifton-Hadley RS. 2006. Ante mortem diagnosis of tuberculosis in cattle: a review of the tuberculin tests, gamma-interferon assay and other ancillary diagnostic techniques. *Res Vet Sci.* Oct; 81(2):190-210.
6. Palmer MV, Waters WR. 2011. Bovine tuberculosis and the establishment of an eradication program in the United States: role of veterinarians. *Veterinary Medicine International*: 1-12.
7. Schiller I, Oesch B, Vordermeier HM, Palmer MV, Harris BN, Orloski KA, Buddle BM, Thacker TC, Lyashchenko KP, Waters WR. 2010. Bovine tuberculosis: a review of current and emerging diagnostic techniques in view of their relevance for disease control and eradication. *Transbound Emerg Dis.* 2010 Aug 1;57(4):205-20.
8. Morrison WI, Bourne FJ, Cox DR, Donnelly CA, Gettinby G, McInerney JP, Woodroffe R. 2000. Pathogenesis and diagnosis of infections with *Mycobacterium bovis* in cattle. *Veterinary Record* 146, 236–242.
9. Palmer MV, Waters WR. 2006. Advances in bovine tuberculosis diagnosis and pathogenesis: What policy makers need to know. *Vet. Microbiol.* 112: 181-190.
10. Coad M, Clifford D, Rhodes SG, Hewinson RG, Vordermeier HM, Whelan AO. Repeat tuberculin skin testing leads to desensitisation in naturally infected tuberculous cattle which is associated with elevated interleukin-10 and decreased interleukin-1 beta responses. *Vet Res.* 2010 Mar-Apr; 41(2): 14.
11. Adams LG. 2001. In vivo and in vitro diagnosis of *Mycobacterium bovis* infection. *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.* (1): 304-3024.
12. Garbaccio SG, Garro CJ, Delgado F, Tejada GA, Eirin ME, Huertas PS, Leon LA, Zumárraga MJ. 2019. Enzyme-linked immunosorbent assay as complement of intradermal skin test for the detection of *Mycobacterium bovis* infection in cattle. *Tuberculosis (Edinb).* 2019, 117, pag: 56-61.
13. Griffa N, Moyano RD, Canal AM, Travería GE, Santangelo MP, Alonso N, Romano MI. 2020. Development and diagnostic validation of an ELISA based on an antigenic mixture for the detection of bovine tuberculosis. *Vet J.* 2020 Feb; 256: 105426.
14. Corner LA, 1994. Post mortem diagnosis of *Mycobacterium bovis* infection in cattle. *Vet. Microbiol.* May;40(1-2):53-63. Review.
15. Wards BJ, Collins DM, de Lisle GW. 1995. Detection of *Mycobacterium bovis* in tissues by polymerase chain reaction. *Vet Microbiol.* 43:227-240.
16. Canal AM, Pezzone N, Cataldi A, Zumarraga MJ, Larzabal M, Garbaccio S, Fernandez A, Dominguez L, Aranaz A, Rodriguez-Bertos A. 2017. Immunohistochemical detection of pro-inflammatory and anti-inflammatory cytokines in granulomas in cattle with natural *Mycobacterium bovis* infection. *Research in Veterinary Science* 110: 34–39.
17. Wangoo A, Johnson L, Gough J, Ackbar R, Inglut S, Hicks D, Spencer Y, Hewinson G, Vordermeier M. 2005. Advanced granulomatous lesions in *Mycobacterium bovis* infected cattle are associated with increased expression of type I procollagen, $\gamma\delta$ (WC1C) T cells and CD 68C cells. *J. Comp. Pathol.* 133: 223–234.
18. Manual de diagnóstico de micobacterias de importancia en medicina veterinaria. 2005. Comisión Científica de Micobacterias, Asociación Argentina de Veterinarios de Laboratorio de Diagnóstico. 20-28.
19. Garbaccio SG, Barandiaran S, Fernandez A, Macias A, Magnano G, Martinez Vivot M, Peyrú M, Cataldi A. Interlaboratory test: Isolation of *Mycobacterium bovis* from granulomatous lesions in bovine. *Rev Argent Microbiol.* 2016 Apr-Jun; 48(2): 161-5.

20. Payeur JB. 1993. Métodos de laboratorio en micobacteriología veterinaria. Departamento de Agricultura de los Estados Unidos, Servicio de Inspección en Salud Animal y Vegetal. Laboratorios Nacionales de Servicios Veterinarios. Ames, Iowa.
21. Wards BJ, Collins DM, de Lisle GW. 1995. Detection of *Mycobacterium bovis* in tissues by polymerase chain reaction. *Vet Microbiol.* 43:227-240.
22. Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G, Erlich H. 1986. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.* 51 Pt 1:263-73.
23. Zumarraga MJ, Meikle V, Bernardelli A, Abdala A, Tarabla H, Romano MI, Cataldi A. 2005. Use of touch-down polymerase chain reaction to enhance the sensitivity of *Mycobacterium bovis* detection. *J. Vet. Diagn. Invest.* 17: 232-238.
24. Parra A, García N, García A, Lacombe A, Moreno F, Freire F, Moran J, Hermoso de Mendoza J. 2008. Development of a molecular diagnostic test applied to experimental abattoir surveillance on bovine tuberculosis. *Vet. Microbiol.* Vol.18; 127(3-4):315-24.
25. Taylor GM, Worth DR, Palmer S, Jahans K, Hewinson RG. 2007. Rapid detection of *Mycobacterium bovis* DNA in cattle lymph nodes with visible lesions using PCR. *BMC Vet Res.* Jun 13 (3):1-12.
26. Stewart LD, McNair J, McCallan L, Thompson S, Kulakov LA, Grant IR. 2012. Production and evaluation of antibodies and phage display-derived peptide ligands for immunomagnetic separation of *Mycobacterium bovis*. *J. Clin. Microbiol.* May;50(5):1598-605.
27. Brennan PJ, Nikaido H. 1995. The envelope of mycobacteria. *Annu. Rev. Biochem.* 64:29-63.
28. Garbaccio SG, Cataldi AA. 2010. Evaluation of an immunomagnetic capture method followed by PCR to detect *Mycobacterium bovis* in tissue samples from cattle. *Rev Argent Microbiol.* Oct-Dec; 42(4):247-53
29. Antognoli MC, Salman MD, Triantis J, Hernández J, Keefe T. 2001. A one tube Nested PCR for the detection of *Mycobacterium bovis* in spiked milk samples: an evaluation of different concentration and lytic techniques for *M. bovis*. *J. Vet. Diagn. Invest.* 13:111-116.
30. Zumarraga MJ, Paolicchi F, Garbaccio SG, Gioffre A, Caimi K, Bigi F, Alito A, Romano M, Cataldi A. 2001. "Aplicación de la PCR en la detección de *Mycobacterium bovis* en muestras de tejido de terneros". *Vet. Arg.* Vol XVIII. Nº179. 668-676.
31. Miller JM, Jenny A, Rhyan J, Saari D, Suarez D. 1997. Detection of *Mycobacterium bovis* in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues of cattle and elk by PCR amplification an IS6110 sequence specific for *Mycobacterium tuberculosis* complex organisms. *J. Vet. Diagn. Invest.* 9:244-249.
32. Hawkey PM. 1994. The role of polymerase chain reaction in the diagnosis of mycobacterial infections. *Rev. Med. Microbiol.* 5: 21-32.
33. Vitale F, Capra G, Maxia L, Reale S, Vesco G, Caracappa S. 1998. Detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex in cattle by PCR using milk, lymph node aspirates and nasal swabs. *J. Clin. Microbiol.* 36: 1050-1055.
34. Cousins DV, Wilton SD, Francis BR, Gow BR. 1992. Use of Polymerase Chain Reaction for rapid diagnosis of tuberculosis. *J. Clin. Microbiol.* Vol 30, n° 1. p. 255-258.
35. Liébana E, Aranaz A, Mateos A, Vilafranca M, Gomez-Mampaso E, Tercero JC, Alemany J, Suarez G, Domingo M, Dominguez L. 1995. Simple and rapid detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex organisms in bovine tissue samples by PCR. *J. Clin. Microbiol.* Jan; 33 (1): 33-6.
36. Cassidy JP, Bryson DG, Pollock JM, Evans RT, Forster F, Neill SD. 1998. Early lesion formation in cattle experimentally infected with *Mycobacterium bovis*. *J. Comp. Pathol.* Jul; 119(1):27-44.
37. Stewart LD, McNair J, McCallan L, Gordon A, Grant IR. 2013. Improved detection of *Mycobacterium bovis* infection in bovine lymph node tissue using immunomagnetic separation (IMS)-based methods. *PLoS One.* 2013; 8(3): e58374.
38. Estrada-Chávez C, Otero FD, Díaz CA, Villegas-Sepúlveda N, González RP, Salazar DG. 2004. Concordancia de la PCR y métodos rutinarios para el diagnóstico de tuberculosis bovina. *Vet. Mex.* 35, 225-236.
39. OIE: Principios y métodos de la validación de las pruebas de diagnóstico de las enfermedades infecciosas. Capítulo 1.1.2. Versión adoptada en la Asamblea Mundial de Delegados de la OIE en mayo de 2009. http://www.oie.int/esp/normes/fmanual/1.1.02_VALIDATION.pdf (Acceso, 13 de diciembre de 2020).

40. Courcoul A, Moyen JL, Brugère L, Faye S, Hénault S, Gares H, Boschiroli ML. 2014. Estimation of sensitivity and specificity of bacteriology, histopathology and PCR for the confirmatory diagnosis of bovine tuberculosis using latent class analysis. *PLoS One*. 2014; 9 (3): e90334.
41. Barandiaran S, Pérez Aguirreburualde MS, Marfil MJ, Martínez Vivot M, Aznar N, Zumárraga M, Perez AM. 2019. Bayesian Assessment of the Accuracy of a PCR-Based Rapid Diagnostic Test for Bovine Tuberculosis in Swine. *Front Vet Sci*. 2019 Jun 26; 6:204.
42. Zumárraga MJ, Soutullo A, García MI, Marini R, Abdala A, Tarabla H, Echaide S, López M, Zervini E, Canal A, Cataldi AA. 2012. Detection of *Mycobacterium bovis*-infected dairy herds using PCR in bulk tank milk samples. *Foodborne Pathog Dis*. 2012 Feb;9(2):132-7.
43. Warren, R. M., M. Richardson, S. L. Sampson, G. D. van der Spuy, W. Bourn, J. H. Hauman, H. Heersma, W. Hide, N. Beyers, and P. D. van Helden. 2001. Molecular evolution of *Mycobacterium tuberculosis*: phylogenetic reconstruction of clonal expansion. *Tuberculosis (Edinburgh)* 81:291-302.
44. Hunter PR, Gaston MA. 1988. Numerical index of the discriminatory ability of typing systems: an application of Simpson's index of diversity. *Journal of clinical microbiology*. 1988; 26:2465–2466.
45. Kamerbeek L, Schouls A, Kolk M, van Agterveld D, van Soolingen S, Kuijper A, Bunschoten H, Molhuizen R, Shaw M, van Embden GJ. 1997. Simultaneous detection and strain differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* for diagnosis and epidemiology. *J. Clin. Microbiol.* 35:907–914.
46. Supply P, Mazars E, Lesjean S, Vincent V, Gicquel B, Locht C. 2000. Variable human minisatellite-like regions in the *Mycobacterium tuberculosis* genome. *Mol Microbiol*. 2000 May;36(3):762-71.
47. Frothingham R. & Meeker-O'Connell W.A. 1998. Genetic diversity in the *Mycobacterium tuberculosis* complex based on variable numbers of tandem DNA repeats. *Microbiology*, 144, 1189–1196.
48. Roring S, Scott A, Brittain D, Walker I, Hewinson G, Neill S, Skuce R. 2002. Development of variable-number tandem repeat typing of *Mycobacterium bovis*: comparison of results with those obtained by using existing exact tandem repeats and spoligotyping. *J Clin Microbiol*. 2002 Jun;40(6):2126-33.
49. Skuce RA, McCorry TP, McCarroll JF, Roring SMM, Scott AN, Brittain D, Hughes SL, Hewinson RG, Neill SD. 2002. Discrimination of *Mycobacterium tuberculosis* complex bacteria using novel VNTR-PCR targets. *Microbiology (Reading)*. 2002 Feb;148(Pt 2):519-528.
50. Zumarraga MJ, Arriaga C, Barandiaran S, Cobos-Marín L, de Waard J, Estrada-García I, Figueiredo T, Figueroa A, Giménez F, Gomes HM, Gonzalez-Y-Merchand JA, Macías A, Milián-Suazo F, Rodríguez CA, Santillán MA, Suffys PN, Trangoni MD, Zárraga AM, Cataldi A. 2013. Understanding the relationship between *Mycobacterium bovis* spoligotypes from cattle in Latin American countries. *Res. Vet. Sci.* Feb; 94(1):9-21.
51. Monteserin J, Paul R, Lopez B, Cnockaert M, Tortoli E, Menéndez C, García MJ, Palomino JC, Vandamme P, Ritacco V, Martin A. 2016. Combined approach to the identification of clinically infrequent non-tuberculous mycobacteria in Argentina. *Int J Tuberc Lung Dis*. 2016 Sep; 20 (9): 1257-62.
52. Wood PR, Corner LA, Rothel JS, Baldock C, Jones SL, Cousins DB, McCormick BS, Francis BR, Creeper J, Tweddle NE. 1991. Field comparison of the interferon gamma assay and the intradermal tuberculin test for the diagnosis of bovine tuberculosis. *Aust. Vet. J.* 68: 286-290.
53. Wood P R, Jones SL. 2001. BOVIGAM: an *in vitro* cellular diagnostic test for bovine tuberculosis. *Tuberculosis (Edinb)*. Review.Volumen; 81(1-2):147-55.
54. Wood PR, Rothel JS. 1994. In vitro immunodiagnostic assays for bovine tuberculosis. *Veterinary Microbiology*. 40: 125–135.
55. Whipple DL, Bolin CA, Davis AJ, Jarnagin JL, Johnson DC, Nabors RS, Payeur JB, Saari DA, Wilson AJ, Wolf MM. 1995. Comparison of sensitivity of the caudal fold skin test and commercial gamma-interferon assay for diagnosis of bovine tuberculosis. *American Journal of Veterinary Research* 56, 415–419.
56. Gonzalez Llamazares OR, Gutiérrez Martín CB, Nistal DA, Redondo VADP, Domínguez Rodríguez L, Rodríguez Ferri EF. 1999. Field evaluation of the single intradermal cervical tuberculin test and the interferon-gamma assay for detection and eradication of bovine tuberculosis in Spain. *Veterinary Microbiology*. 70: 55–66.
57. Buddle BM, Ryan TJ, Pollock JM, Andersen P, de Lisle GW. 2001. Use of ESAT-6 in the interferon- γ test for diagnosis of bovine tuberculosis following skin testing. *Veterinary Microbiology*. 80: 37–46.
58. Anon. 2005. Annual Report for the Year Ending 30 June 2005. Animal Health Board, Wellington.

59. Paolicchi, F; Morsella, C; Mendez, L; Zumarraga, M; Eirin, M; Frers, E.; Disalvo, V. "Evaluación de un kit de gamma interferón bovino para el diagnóstico de tuberculosis bovina en la Argentina". Reunión Científica Técnica de la AAVLD. Rio Cuarto, Córdoba, Argentina. 16 al 17 de noviembre de 2018.
60. Ritacco V, López B, Barrera L, Nader A, Fliess E, de Kantor IN. 1990. Further evaluation of an indirect enzyme-linked immunosorbent assay for the diagnosis of bovine tuberculosis. *J. Vet. Med.* 37, 19–27.
61. Lightbody KA, Skuce RA, Neill SD, Pollock JM. 1998. Mycobacterial antigen-specific antibody response in bovine tuberculosis: an ELISA with potential to confirm disease status. *Vet. Rec.* 142, 295–300.
62. Lilenbaum W, Fonseca L. 2006. The use of Elisa as a complementary tool for bovine tuberculosis control in Brazil. *Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.* 43, 256–261.
63. Waters WR, Buddle BM, Vordermeier HM, Gormley E, Palmer MV, Thacker TC, Bannantine JP, Stabel JR, Linscott R, Martel E, Milian F, Foshaug W, Lawrence JC. 2011. Development and evaluation of an enzyme-linked immunosorbent assay for use in the detection of bovine tuberculosis in cattle. *Clin. Vaccine Immunol.* 18, 1882–1888.
64. Souza II, Melo ES, Ramos CA, Farias TA, Osório AL, Jorge KS, Vidal CE, Silva AS, Silva MR, Pellegrin AO, Araujo FR. 2012. Screening of recombinant proteins as antigens in indirect ELISA for diagnosis of bovine tuberculosis. *Springerplus.* 1(1): 77.
65. Casal C, Díez-Guerrier A, Alvarez J, Rodriguez-Campos S, Mateos A, Linscott R, Martel E, Lawrence JC, Whelan C, Clarke J, O'Brien A, Domínguez L, Aranaz A. 2014. Strategic use of serology for the diagnosis of bovine tuberculosis after intradermal skin testing. *Veterinary Microbiology.* 170: 342–351.
66. Plackett P, Ripper J, Corner LA, Small K, de Whitte K, Melville L, Hides S, Wood PR. 1989. An ELISA for the detection of anergic tuberculous cattle. *Australian Veterinary Journal.* 66: 15-19.
67. Lyashchenko KP, Pollock JM, Colangeli R, Gennaro ML. 1998. Diversity of Antigen Recognition by Serum Antibodies in Experimental Bovine Tuberculosis. *Infect. Immun.* Vol. 66 (11): 5344–5349.
68. Amadori M, Lyashchenko KP, Gennaro ML, Pollock JM, Zerbini I. 2002. Use of recombinant proteins in antibody tests for bovine tuberculosis. *Vet. Microbiol.* 85 (4): 379-387.
69. Fifis T, Costopoulos C, Corner LA, Wood PR. 1992. Serological reactivity to *Mycobacterium bovis* protein antigens in cattle. *Vet. Microbiol.* 30: 343-354.
70. Waters R, Stevens GE, Schoenbaum MA, Orloski KA, Robbe-Austerman S, Harris NB, Hall SM, Thomsen BV, Wilson AJ, Brannian RE, Nelson JT, Schafer S, Esfandiari J, Dutton M, Greenwald R, Lyashchenko K. 2011. Bovine tuberculosis in a Nebraska herd of farmed elk and fallow deer: A failure of the tuberculin skin test and opportunities for serodiagnosis. *Veterinary Medicine International.* Volume 2001, p:1-8.
71. Vordermeier M, Goodchild A, Clifton-Hadley R, de la Rua Domenech R. 2004. The interferon-gamma field trial: background, principles and progress. *Veterinary Record.* 155, 37–38.
72. Lepper AW, Pearson CW, Corner LA. 1977. Serological responses in experimental bovine tuberculosis. *Australian Veterinary Journal.* Vol. 53, (7), p. 301-305.
73. Yearsley D, O'Rourke J, O'Brien T, Egan J. 1998. Comparison of three methods for the isolation of mycobacteria from bovine tissue lesions. *Vet Rec.* Oct 24; 143(17):480-1.
74. Lyashchenko KP, Singh M, Colangeli R, Gennaro ML. 2000. A multiantigen print immunoassay for the development of serological diagnosis of infectious diseases. *J. Immunol. Methods.* 242: 91-100.
75. Ritacco V, López B, de Kantor IN, Barrera L, Errico F, Nader A. 1991. Reciprocal cellular and humoral responses in bovine tuberculosis. *Res. Vet. Sci.* 50, 365–367.
76. Waters WR, Palmer MV, Thacker TC, Bannantine JP, Vordermeier HM, Hewinson RG, Greenwald R, Esfandiari J, McNair J, Pollock JM, Andersen P, Lyashchenko KP. 2006. Early antibody responses to experimental *Mycobacterium bovis* infection of cattle. *Clin. Vaccine Immunol.* 13:648–654.
77. Shakibamehr N, Mosavari N, Babaie M, Reshady S. 2016. Evaluate the efficiency of Antigen 60 (A60) protein from BCG strain of *Mycobacterium bovis* as a diagnostic antigen. *Int. J. Mycobacteriol.* Dec; 5 Suppl. 1:226-227.
78. Bigi F, Espitia C, Alito A, Zumarraga MJ, Romano MI, Cravero S. and Cataldi A. 1997. A novel 27 kDa lipoprotein antigen from *Mycobacterium bovis*. *Microbiology.* 143, 3599-3605.
79. Green LR, Jones CC, Sherwood AL, Garkavi IV, Cangelosi GA, Thacker TC, Palmer MV, Waters WR, Rathe CV. 2009. Single-antigen serological testing for bovine tuberculosis. *Clin. Vaccine Immunol.* Sep; 16(9):1309-13.

80. Koo HC, Park YH, Ahn J, Waters WR, Palmer MV, Hamilton MJ, Barrington G, Mosaad AA, Park KT, Jung WK, Hwang IY, Cho SN, Shin SJ, Davis WC. 2005. Use of rMPB70 protein and ESAT-6 peptide as antigens for comparison of the enzyme-linked immunosorbent, immunochromatographic, and latex bead agglutination assays for serodiagnosis of bovine tuberculosis. *J. Clin. Microbiol.* 43 (9): 4498-506.
81. Greenwald R, Esfandiari J, Lesellier S, Houghton R, Pollock J, Aagaard C, Andersen P, Hewinson G, Chambers M, Lyashchenko K. 2003. Improved serodetection of *Mycobacterium bovis* infection in badgers (Melesmeles) using multiantigen test formats. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease.* 46 197–203.
82. Jeon HS, Shin AR, Son YJ, Kim JM, Jang Y, Kim S, Lee KI, Choi CH, Park JK, Kim HJ. 2015. An evaluation of the use of immunoglobulin A antibody response against mycobacterial antigens for the diagnosis of *Mycobacterium bovis* infection in cattle. *J. Vet. Diagn. Invest.* May; 27(3): 344-51.
83. Wood PR, Corner LA, Rothel JS, Ripper JL, Fifis T, McCormick BS, Francis B, Melville L, Small K, De Witte K, Tolson J, Ryan TJ, de Lisle GW, Cox JC, Jones SL. 1992. A field evaluation of serological and cellular diagnostic tests for bovine tuberculosis. *Veterinary Microbiology* 31, 71–79.
84. Ritacco V, de Kantor IN, Barrera L, Nader A, Bernardelli A, Torrea G, Errico F, Fliess E. 1987. Assessment of the sensitivity and specificity of Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) for the detection of Mycobacterial antibodies in bovine tuberculosis. *Journal of Veterinary Medicine.* 34, 119–125.
85. Trost B, Stuber T, Surujballi O, Nelson J, Robbe-Austerman S, Smith NH, Desautels L, Tikoo SK, Griebel P. 2016. Investigation of the cause of geographic disparities in IDEXX ELISA sensitivity in serum samples from *Mycobacterium bovis* infected cattle. *Sci. Rep.* Mar 7; 6:22763.
86. Harboe M, Wiker HG, Duncan JR, Garcia MM, Dukes TW, Brooks BW, Turcotte C, Nagai S. 1990. Protein G-based enzyme-linked immunosorbent assay for anti-MPB70 antibodies in bovine tuberculosis. *J. Clin. Microbiol.* May; 28 (5): 913-21.
87. Waters WR, Thacker TC, Nelson JT, DiCarlo DM, Maggioli MF, Greenwald R, Esfandiari J, Lyashchenko KP, Palmer MV. 2014. Virulence of two strains of *Mycobacterium bovis* in cattle following aerosol infection. *J. Comp. Pathol.* 151:410–419.
88. Waters WR, Palmer MV, Stafne MR, Bass KE, Maggioli MF, Thacker TC, Linscott R, Lawrence JC, Nelson JT, Esfandiari J, Greenwald R, Lyashchenko KP. 2015. Effects of serial skin testing with Purified Protein Derivative on the level and quality of antibodies to complex and defined antigens in *Mycobacterium bovis* Infected Cattle. *Clin. Vaccine Immunol.* Jun; 22(6):641-9.
89. Waters WR, Vordermeier HM, Rhodes S, Khatri B, Palmer MV, Maggioli MF, Thacker TC, Nelson JT, Thomsen BV, Robbe-Austerman S, Bravo Garcia DM, Schoenbaum MA, Camacho MS, Ray JS, Esfandiari J, Lambotte P, Greenwald R, Grandison A, Sikar-Gang A, Lyashchenko KP. Potential for rapid antibody detection to identify tuberculous cattle with non-reactive tuberculin skin test results. *BMC Vet Res.* 2017 Jun 7;13 (1): 164.
90. Zumarraga MJ, Cataldi A, Bigi F, Alito A, Romano MI. 1999. Aplicación de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) en la detección de micobacterias en leche. *Rev. Arg. de Microbiol.* 31 (Supl.1):4-5.
91. Zarden CFO, Marassi CD, Figueiredo EES, Lilenbaum W. 2014. *Mycobacterium bovis* detection from milk of negative skin test cows. *Short Communications. Veterinary Record* veterinaryrecord.bmj.com.
92. Romero RE, Garzón DL, Mejía GA, Monroy W, Patarroyo ME, Murillo LA. 1999. Identification of *Mycobacterium bovis* in Bovine Clinical Samples by PCR Species-Specific Primers. *Can. J. Vet. Res.* 63: 101-106.
93. Roring S, Hughes MS, Skuce RA, Neill SD. 2000. Simultaneous detection and strain differentiation of *Mycobacterium bovis* directly from bovine tissue specimens by spoligotyping. *Vet. Microbiol.* 70: 227-236.

FILIACIONES INSTITUCIONALES DE LOS AUTORES

Sergio G. Garbaccio garbaccio.sergio@inta.gob.ar IPVet, CICVyA, INTA. N. Repetto y De Los Reseros s/n, (B1686IGC) Hurlingham, Buenos Aires, Argentina

Fernando A. Paolicchi paolicchi.fernando@inta.gob.ar Laboratorio de Bacteriología, Grupo de Sanidad Animal INTA, EEA Balcarce, Ruta 226 Km 73,5, (7620), Balcarce, Buenos Aires, Argentina.

Ana M. Canal acanal@fcv.unl.edu.ar Cátedra de Patología Veterinaria. Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional del Litoral. R. P. Kreder 2805, (3080), Esperanza, Santa Fe, Argentina

Marcela E. Martinez Vivot mvivot@fvvet.uba.ar Cátedra de Enfermedades Infecciosas, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad de Buenos Aires, Av. Chorroarín 280, (C1427CWO), CABA, Buenos Aires, Argentina

Martín J. Zumárraga zumarraga.martin@inta.gob.ar IABIMO, CICVyA, CNIA, INTA-CONICET, Dr. N. Repetto y Los Reseros s/n, (1686), Hurlingham, Buenos Aires, Argentina

Delia S. Oriani orianids@yahoo.com.ar Laboratorio de Micobacterias, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Pampa, Calle 5 esq. 116, (6360), General Pico, La Pampa, Argentina

Gabriel Magnano gmagnano@ayv.unrc.edu.ar Enfermedades transmisibles y tóxicas de los rumiantes, Departamento de Patología Animal, Facultad de Agronomía y Veterinaria, Universidad Nacional de Río Cuarto, Ruta Nac. 36 - Km. 601, (X5804BYA), Río Cuarto, Córdoba, Argentina

Angel A. Cataldi cataldi.angeladrian@inta.gob.ar Instituto de Agrobiotecnología y Biología Molecular (IABIMO), CICVyA, CNIA, INTA-CONICET, Dr. N. Repetto y Los Reseros s/n, (1686) Hurlingham, Buenos Aires, Argentina

Nora Morcillo nora_morcillo@yahoo.com.ar Laboratorio de Referencia del Programa de Control de Tuberculosis de la Provincia de Buenos Aires, Hospital Dr. Cetrangolo, Italia 1750, (B1602), Florida, Buenos Aires, Argentina

María J. Traversa mjt@vet.unicen.edu.ar Área Medicina Preventiva. Laboratorio de Micobacterias. Dto. SAMP, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional del Centro de la Provincia de Buenos Aires, CIVETAN, CIC, CONICET, Campus Universitario, Tandil, Buenos Aires, Argentina

Alejandro A. Abdala abdala.alejandros@inta.gob.ar Grupo de Sanidad Animal. E.E.A. INTA Rafaela, Ruta 34 Km 227, EEA, (S2300), Rafaela, Provincia de Santa Fe, Argentina

Alejandra Colombatti colombatti.alejandra@inta.gob.ar IABIMO, CICVyA, CNIA, INTA-CONICET, Dr. N. Repetto y Los Reseros s/n, (1686) Hurlingham, Buenos Aires, Argentina

Gabriel Travería traveria@fcv.unlp.edu.ar CEDIVE, Facultad Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Plata, Calle 49 y 115 s/n 1er piso Edificio ex Liceo, (1900), La Plata, Buenos Aires, Argentina

Amelia Bernardelli amelia.bernardelli@ceva.com Ceva Salud Animal, Camila O'Gorman 412, Piso 12, (1107), Puerto Madero, CABA, Buenos Aires, Argentina

Francisco Gentile franciscogentile@hotmail.com Centro Diagnóstico Veterinario S.A., Parque Industrial de Pilar, calle 9 N°523 (1629), Pilar, Buenos Aires

Carlos J. Garro garro.carlos@inta.gob.ar Instituto de Patobiología Veterinaria (IPVet), CICVyA, CNIA, INTA, Dr. N. Repetto y Los Reseros s/n, (1686) Hurlingham, Buenos Aires, Argentina

Claudia A. Tortone ctortone@yahoo.com.ar Laboratorio de Micobacterias, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Pampa, Calle 5 esq. 116, (6360), General Pico, La Pampa, Argentina

Bernardo Alonso balonso@senasa.gob.ar Senasa – Laboratorio Central, Martínez, Buenos Aires, Argentina

Soledad Barandiaran solebarandiaran@hotmail.com Cátedra de Enfermedades Infecciosas, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad de Buenos Aires, Av. Chorroarín 280, (C1427CWO), CABA, Buenos Aires, Argentina

María E. Eirin eirin.maria@inta.gob.ar (IABIMO), CICVyA, CNIA, INTA-CONICET, Dr. N. Repetto y Los Reseros s/n, (1686) Hurlingham, Buenos Aires, Argentina

María F. Cipollini mfcipolini@vet.unne.edu.ar Cátedra de Enfermedades Infecciosas, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional del Nordeste, Sargento Cabral 2139, (3400), Corrientes, Corrientes, Argentina



2

