

Universidad de Buenos Aires
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



**“Epidemiología molecular de la
tuberculosis bovina”**

Trabajo de tesis para optar al grado de Doctor de la Universidad de
Buenos Aires en el área de Ciencias Biológicas

Bioq. Martín José Zumárraga

Directores: Dr. Angel Adrián Cataldi
Dr. Horacio Esteban Hopp

2007

Instituto de Biotecnología,
CICVyA, INTA Castelar, Buenos Aires, Argentina.

A la memoria de mi padre, Héctor José Zumárraga.

Epidemiología molecular de la tuberculosis bovina

Resumen

La tuberculosis bovina, cuyo agente etiológico es *Mycobacterium bovis*, es una zoonosis crónica que afecta a distintos animales de producción, salvajes y domésticos, provocando a su vez relevantes pérdidas económicas en el sector pecuario. La tipificación molecular de 780 aislamientos de *M. bovis* provenientes de distintos hospedadores (bovinos, humanos, gatos, etc) y de distintos países (Argentina, Brasil, México, Uruguay y Paraguay) se llevó a cabo utilizando el método de polimorfismo en longitud de los fragmentos de restricción (RFLP, sigla en inglés) con las sondas DR (repeticiones directas) y PGRS (secuencias ricas en guanina-citosina), como así también con las técnicas basadas en la PCR, Spoligotyping y MIRUs-VNTR. Se determinó el índice discriminatorio (ID) de Simpson de las distintas técnicas utilizadas, demostrándose que cuando se las combina se incrementa su poder discriminatorio, siendo máximo para el Spoligotyping en conjunto con el RFLP con las sondas DR/PGRS. Debido a la complejidad técnica y de interpretación del RFLP, la incorporación de las técnicas basadas en la PCR, facilitaron sustancialmente la aplicación de la epidemiología molecular de la tuberculosis, debido principalmente a la rapidez, reproducibilidad y sencillez de los métodos. La combinación del Spoligotyping con los MIRUs-VNTR tuvo un buen ID resultando ventajosa para la tipificación de aislamientos de *M. bovis*. Al comparar la distribución de los perfiles genéticos de los aislamientos provenientes de los distintos países considerados, la elevada proporción de patrones predominantes y de familias de patrones altamente relacionados detectadas entre los aislamientos de Argentina, sugerirían la activa transmisión de la enfermedad en nuestro país. Debido a que la región DR se encuentra altamente conservada, podría ser útil para el análisis de distintos aspectos evolutivos. De esta manera si se considera que la evolución de la región DR estuvo regida por la pérdida progresiva y ordenada de espaciadores, podría decirse que los spoligotipos más antiguos serían aquellos con mayor número de espaciadores. Por otra parte la presencia de spoligotipos únicos en hospedadores no bovinos, diferenciados en uno o pocos espaciadores de aquellos detectados en bovinos, indicaría que tales variaciones podrían haber sido favorecidas por la presión selectiva ocasionada por el cambio de hospedador.

La tipificación de aislamientos provenientes de pinnípedos que presentaron patrones de Spoligotyping, MIRUs-VNTR, y RFLP-IS6110, diferenciales de aquellos obtenidos en el complejo *M. tuberculosis* especialmente en *M. bovis*, condujeron a la caracterización de un nuevo taxón dentro del complejo *M. tuberculosis* denominado *M. pinnipedii* sp. nov.

La distribución de los distintos patrones detectados puede deberse a factores estrictamente epidemiológicos como así también a la virulencia de las cepas que se diseminan en la población. Con el objetivo de evaluar dicha virulencia, cepas aisladas de bovinos, de fauna salvaje y de humanos fueron estudiadas en dos modelos murinos distintos de infección (intraperitoneal e intratraqueal). Este análisis permitió demostrar la marcada diferencia en la patogenicidad de una cepa aislada a partir de un jabalí, poniendo de manifiesto el rol de la fauna salvaje en la persistencia y transmisión de *M. bovis*.

Este trabajo permitió incrementar el conocimiento de la epidemiología molecular de la tuberculosis bovina, constituyendo el primer trabajo en su tipo que se realizó en nuestro país.

Palabras clave: tuberculosis, spoligotyping, MIRUs-VNTR, RFLP, epidemiología, virulencia.

Molecular epidemiology of bovine tuberculosis

Abstract

Bovine tuberculosis, which etiologic agent is *Mycobacterium bovis*, is a chronic zoonosis that affects different wild and domestic animals and causing relevant economical losses in livestock. The molecular typing of 780 isolates of *M. bovis* from different hosts (bovines, human, cats, etc) and from different countries (Argentina, Brazil, Uruguay and Paraguay, were performed by the Restriction Fragments Length Polymorphism (RFLP) method using the DR (Direct Repeats) and PGRS (Polymorphic Guanine-Cytosine Rich Sequences) probes. PCR techniques, Spoligotyping and MIRUs-VNTR were also performed. The discriminatory index (DI) of Simpson was calculated for the different techniques, showing that the combination of the methods increase the ID, being the Spoligotyping combined with the RFLP-DR/PGRS probes the most resolutive ones. Due to technical complexity and difficult interpretation of RFLP, the incorporation of techniques based on PCR has facilitated substantially the molecular epidemiology of tuberculosis because of speed, reproducibility and simplicity of these methods. The combination of Spoligotyping with MIRUs-VNTR has a better DI, for the typing of *M. bovis* isolates. The distribution of the genetic patterns among the isolates from the other countries, the high rate of predominant patterns and families of related patterns detected in Argentina, might suggest the active transmission of the disease along the country.

Due to the DR region is highly conserved, could be useful to analyze some evolutive aspects. In this way, if this is taken into consideration that the evolution of the DR region was directed by the progressive and ordered loss of spacers, it could be considered that the oldest spoligotypes might be those with higher number of spacers. The presence of unique spoligotypes in no-bovine hosts, diferenciated in one or few spacers, from those detected in bovines, could indicate that those changes may be induced by selective pressure due to the change of host.

Mycobacteria isolated from marine mammals were also typified. Those isolates showed specific spoligotyping, MIRUs-VNTR and RFLP-IS6110 patterns, different from those characteristic of *M. tuberculosis* complex, particularly those found in *M. bovis* isolates. These

findings led to the description of a new taxon in the *M. tuberculosis* complex named *M. pinnipedii* sp. nov.

The distribution of the different patterns could be due to epidemiological factors and also the virulence of the strain within the population. With the aim of evaluating this virulence, isolates from bovines, wild animals, and humans were analyzed using two different murine models of infection (intratracheal and intraperitoneal). This experiment demonstrated the substantial difference in the pathogenicity of the strain isolated from a wild boar, showing the role of the wild fauna in the persistence and transmission of *M. bovis*.

This work has improved the knowledge of the molecular epidemiology of bovine tuberculosis being the first study in this field in our country.

Key words: tuberculosis, spoligotyping, MIRUs-VNTR, RFLP, epidemiology, virulence.

En primer término quiero agradecer al Dr. Osvaldo Rossetti (Osvaldo) y a la Dra. Elisa Carrillo (Lela), por haberme dado la oportunidad de desarrollar mi trabajo de tesis, profesión y vocación en el Instituto de Biotecnología.

Estoy plenamente agradecido a todos los integrantes del Instituto, porque de un modo u otro siempre estuvieron dispuestos a colaborar. Es el momento de decirles gracias por el apoyo que me dieron en los difíciles momentos que me tocaron vivir...

Gracias Angel por todas las oportunidades que me brindaste, por dejarme formar parte del equipo “tuberculoso”, por tu paciencia y estímulo, y por ser más que director de tesis y jefe... Gracias Marisa R. porque también me abriste la puerta del lab., y supiste encontrar soluciones cuando se acababa alguna beca. Gracias Esteban por su confianza y por aceptar también ser mi director. A Alicia, que me formaste, enseñándome todo con suma paciencia. Gracias a vos la pasantía de tres meses se prolongó por casi diez años...

Fabiana, gracias por jugarte y apoyarme, nunca olvidaré la ayuda de oro que me diste.

A los vecinos brucelosos: Julia por las traducciones, Mariela por el ruido que haces cuando estás de visita y Marco “el samurai”. Silvio, por tus consejos, experiencias y también bromas... Haydeé por ser “La Técnica” (con mayúsculas), gracias por tus soluciones...

Caro, gracias por postergar tus cosas para ayudarme, por estar presente, por ser amiga...

A mis compañeros de laboratorio: Fede (Dr. White), Nacho (*the boton man*), Gaby (la tía) y Virginia, que soportan mis “chistontos” de la tarde y hacen que las tardes pasen pronto.

A Andreita por las tardes que me ayudaste en flujo con los ratones, por tu criterio y amistad. A Kari por los capuchinos compartidos, por tus discusiones y ayudas, por sacarme del eppendorf y tu amistad... A los del central Vero B., por sus relatos, Laura por tu despiste, a Vale R. por tus preparaciones magistrales y tu buena onda...

A Isabel, Rosana, Vilma, Majo y Fabián, porque el trabajo que realizan es fundamental para obtener un buen resultado en un experimento, porque lo hacen bien, porque siempre me reciben con una sonrisa, porque son buena gente... Las secretarías Cintia, Perla, Sandra y Cristina, que siempre están dispuestas a ayudar. Cintia gracias por tus clases de encuadernación. A Jorge por los viajes al centro y a Silvio por cuidar de los ratones. Al grupo de la pizza de los jueves Laurita R., Vale B., Vale P., Tere, etc., a Luis y los muchachos del “Clu” por su compañerismo...

A las hemoparásitas, Paula “mi colega de RLB”, Rosalía “la informática”, Romina “mi salvadora del zip”, Silvina y Marisa F. por darme el empujón que a veces hace falta.

A Ceci V. por tu insistencia para que termine la tesis (aunque a veces te pasabas...). A Oscar por tus consejos y por los INTA Expone que compartimos.

A Laura, por hacerme mirar del otro lado de la pared y demás...

Finalmente quiero darle gracias a mi familia: A mamá, porque siempre hiciste que las cosas fueran más fáciles y simples, por enseñarme a ser un hombre de bien, a ser humilde, por ayudarme, cuidarme y estar pendiente de todo... A mis hermanos Mariasun y Juan, porque simplemente los quiero... A mis sobrinos Belén e Ignacio porque llenaron los corazones de todos...A Ely por abrirme siempre las puertas de la casa...y a Gustavo el nuevo integrante...

A papá, porque siento que estás conmigo y me seguís guiando...

Martín, Septiembre de 2007.

Indice

Resumen	I
<i>Abstract</i>	III
Abreviaturas	VIII
1. Introducción	1
1.1. Generalidades de la tuberculosis	1
1.2. Antecedentes históricos	2
1.3. Características de las micobacterias	4
1.4. Teorías sobre el origen del bacilo de la tuberculosis	5
1.5. El complejo <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	7
1.5.1. El genoma de <i>Mycobacterium bovis</i>	13
1.5.2. Transposones del complejo <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	14
1.5.3. La cepa vacunal <i>Mycobacterium bovis</i> BCG	15
1.6. Diagnóstico	18
1.6.1. Detección directa	18
1.6.1.1. Baciloscopía	18
1.6.1.2. Cultivo	19
1.6.1.3. Amplificación de ácidos nucleicos	20
1.6.2. Detección indirecta	21
1.6.2.1. Prueba intradérmica de tuberculina	21
1.6.3. Diagnóstico en humanos	21
1.6.4. Diagnóstico en bovinos	22
1.7. Tratamiento de la tuberculosis humana y resistencia a drogas	25
1.8. Plan Nacional de Control y Erradicación de la tuberculosis bovina	27
1.9. Panorama de la tuberculosis bovina en Argentina	28
1.9.1. Animales domésticos y de producción afectados por la enfermedad	29
1.9.2. Transmisión zoonótica de <i>Mycobacterium bovis</i> en el país	30
1.10. Breve descripción de la patogénesis de la enfermedad	31
1.11. Modelos animales	33
1.12. Epidemiología molecular	33
1.12.1 Técnicas y aplicaciones de la tipificación molecular de micobacterias	35

2. Hipótesis y objetivos	47
3. Materiales y métodos	48
3.1. Aislamientos estudiados	48
3.1.1. Aislamientos de bovinos de Argentina	48
3.1.2. Aislamientos de hospedadores no bovinos de Argentina	49
3.1.2.1. Caso clínico N° 1: Monoartritis glenohumeral séptica por <i>M. bovis</i>	49
3.1.2.1.1. Investigación epidemiológica del caso	50
3.1.2.2. Caso clínico N° 2: Transmisión persona-persona de <i>Mycobacterium bovis</i> resistente a múltiples drogas.	51
3.1.3. Aislamientos de <i>Mycobacterium bovis</i> de países limítrofes	51
3.1.4. Aislamientos de países distantes	51
3.1.5. Aislamientos de micobacterias de lobos marinos	52
3.2. Protocolos de extracción de ADN	52
3.2.1. Extracción y purificación de ADN de micobacterias	52
3.2.2. Preparación de lisados de colonias	53
3.3. Técnicas de tipificación molecular	53
3.3.1. Spoligotyping	53
3.3.1.1. Amplificación de la región DR	53
3.3.1.2. Hibridación de los productos de PCR	54
3.3.1.3. Revelado	55
3.3.1.4. Deshibridación de la membrana	56
3.3.1.5. Preparación de la membrana filtro de nylon	56
3.3.2. RFLP	58
3.3.2.1. Digestión enzimática de ADN	58
3.3.2.2. Separación de los fragmentos de restricción por electroforesis	58
3.3.2.3. Tratamiento del gel previo a la transferencia	59
3.3.2.4. Transferencia del ADN a la membrana de nylon (Southern Blot)	59
3.3.2.5. Preparación de las sondas	59
3.3.2.6. Hibridación y detección	61
3.4. MIRUs-VNTRs	61
3.4.1. Amplificación de los diferentes MIRUs	61
3.4.2. Separación de los productos de PCR por electroforesis	62
3.4.3. Interpretación	63
3.5. Análisis de las imágenes	65

	Indice
3.6. Nomenclatura de los patrones	65
3.7. Determinación del poder discriminatorio de las técnicas	65
3.8. Estudio de virulencia	66
3.9. Soluciones de trabajo	67
4. Resultados	68
4.1. Tipificación por Spoligotyping	68
4.1.1. Aislamientos de Argentina	68
4.1.1.1. Caso N°1: Monoartritis séptica glenohumeral debido a <i>Mycobacterium bovis</i>	74
4.1.1.2. Caso N° 2: Transmisión persona-persona de <i>M. bovis</i> resistente a múltiples drogas.	75
4.1.1.3. Caso N° 3: Aislamientos de vieja data	76
4.1.1.4. Aislamientos procedentes del interior del país	77
4.1.1.5. Relación entre los spoligotipos únicos con los predominantes en Argentina	78
4.1.1.6. Evolución de los spoligotipos predominantes de Argentina	79
4.1.2. Aislamientos de países limítrofes	80
4.1.3. Aislamientos de países distantes	85
4.1.4. Análisis general de los spoligotipos. Variabilidad de los espaciadores	88
4.1.5. Comparación con otras bases de datos	89
4.2. Tipificación por RFLP DR/PGRS	91
4.3. Determinación del poder discriminatorio del Spoligotyping y RFLP	101
4.4. Tipificación con MIRUs-VNTR	101
4.4.1. Calculo del poder discriminatorio de los MIRUs	106
4.5. Caracterización molecular de aislamientos de micobacterias provenientes de pinnípedos	106
4.5.1. RFLP-IS6110	106
4.5.2. Spoligotyping de las micobacterias aisladas de pinnípedos	107
4.5.3. Análisis con MIRUs	109
4.5.4. Comparación con aislamientos de otros países	111
4.6. Evaluación de la virulencia de cepas de <i>M. bovis</i> en modelo murino	111
5. Discusión	117
6. Conclusiones	132
7. Bibliografía	134
7.1. Referencias bibliográficas	134
7.2. Publicaciones derivadas del trabajo de tesis	153

Abreviaturas

AC	Antes de Cristo
ADN	Acido desoxirribonucleico
ARNr	Acido ribonucleico ribosomal
BAAR	Bacilos ácido-alcohol resistentes
BCG	Bacilo Camette Guérin
CTAB	Bromuro de cetil trimetil amonio
c/u	Cada uno
CRISPR	<i>Clustered Regularly Inter-spaced Short Palindromic Repeats</i> (Repeticiones Palindrómicas Cortas Interespaciadas y Regularmente Agrupadas)
SENASA	Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria
DEFRA	<i>Department for Environment Food and Rural Affairs</i> (Departamento de Medio Ambiente Alimentos y Asuntos Rurales)
DR	Direct Repeat (<i>Repetición Directa</i>)
dNTP	Desoxinucleótidos trifosfato
Dpi	Días postinfección
DU	Duplicaciones en tándem
DVR	<i>Direct Variable Repeat</i> (Repetición Directa Variable)
ETRs	<i>Exact Tandem Repeats</i> (Repeticiones en Tándem Exactas)
EDTA	Sal disódica del ácido etilén diamino tetraacético
EEUU	Estados Unidos de Norteamérica
FAFLP	<i>Fluorescent Amplified Fragment Length Polymorphism</i> (Polimorfismo en Longitud de los Fragmentos Fluorescentes Amplificados)
FDA	<i>Food and Drug Administration</i> (Administración de Drogas y Alimentos)
IFN- γ	Interferón gamma
INTA	Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria
INPPAZ	Instituto Panamericano de Protección de Alimentos y Zoonosis
<i>ipl</i>	<i>IS6110 preferencial locus</i> (locus de inserción preferencial de IS6110)
INER	Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias “Emilio Coni”
IR	<i>Inverted Repeats</i> (Repeticiones Invertidas)
IS	<i>Insertion Sequence</i> (Secuencia de Inserción)
Kb	Kilobase

LB	Luria- Bertani
MDR	<i>Multi Drug Resistance</i> (Resistente a Múltiples Drogas)
min.	Minutos
MIRUs	<i>Mycobacterial Interspersed Repetitive Units</i> (Unidades Repetitivas Esparcidas en Micobacterias)
mL	Mililitro
MST	Mediana del tiempo de supervivencia
MPTRs	<i>Major Polymorphic Tandem Repeats</i> (Principales Repeticiones Polimórficas en Tándem)
μL	Microlitro
nm.	Nanometro
ng	Nanogramo
OADC	Oleico albúmina dextrosa catalasa
pb	Pares de bases
PBS	<i>Buffer</i> fosfato salino
PAES	Acido polianetolsulfónico
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> (Reacción en Cadena de la Polimerasa)
PFGE	<i>Pulsed-Field Gel Electrophoresis</i> (Electroforesis en Campos Pulsados)
PGL	<i>Phenolic Glycolipid</i> (Glicolípidos fenólicos)
PGRS	<i>Polymorphic GC-Rich Sequence</i> (Polimorfismo de Secuencias Ricas en Guanina y Citocina)
PKS	<i>Polyketide synthase</i> (Poliquétido sintetasa)
pmol	Picomol
PRA	<i>PCR-Restriction Enzyme Analysis</i> (Análisis por Enzimas de Restricción de productos de PCR)
PZA	<i>Pyrazinamide</i> (Pirazinamida)
REA	<i>Restriction Endonuclease Analysis</i> (Análisis por Endonucleasas de Restricción)
RFLP	<i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i> (Polimorfismo en Longitud de los Fragmentos de Restricción)
SDS	Dodecil Sulfato de Sodio
SSPE	Fosfato de sodio, cloruro de sodio, EDTA
seg.	segundos
SNPs:	<i>Single Nucleotide Polymorphism</i> (Polimorfismo en un Solo Nucleótido)
SPIDR	<i>Spacer Interspersed Direct Repeat</i> (Repeticiones Directas de Espaciadores Intercalados)
Spoligotyping	<i>Spacer oligo typing</i> (Tipeo con oligonucleótidos espaciadores)
TB	Tuberculosis humana
TBB	Tuberculosis bovina
TBC	Tuberculosis
TBE	Tris borato EDTA
TCH	<i>Thiopen-2-carboxylic acid hydrazide</i> (Hidrazida del ácido tiofeno-2-carboxílico)

TE	Tris EDTA
U	Unidades
UBA	Universidad de Buenos Aires
UFC	Unidades Formadoras de Colonias
UK	<i>United Kindom</i> (Reino Unido)
UL	Universidad del Litoral
UPGMA	<i>Unweighted Pair-Group Method of Arithmetic Average</i> (algoritmo del método de agrupamiento no pesado de las medias aritmética)
USA	<i>United States of America</i> (Estados Unidos de Norteamérica)
UV	Ultra violeta
VNTRs	<i>Variable Number Tandem Repeat</i> (Repeticiones en Tándem de Número Variable)

Introducción

1. Introducción

1.1. Generalidades de la tuberculosis

La tuberculosis (TBC) es una enfermedad infectocontagiosa crónica causada por bacterias del género *Mycobacterium*, que afecta tanto a hombres como a animales desde tiempos remotos. Ocasiona severos trastornos socioeconómicos y de Salud Pública, por continuar siendo una de las principales patologías infecciosas en causar la muerte en la población adulta. Según las proyecciones de la Organización Mundial de la Salud (OMS), *Mycobacterium tuberculosis*, el agente etiológico de la tuberculosis en humanos (TB), infecta a un tercio de la población mundial, constituyendo un enorme reservorio, debido a que entre el 5 % y el 10 % de los infectados desarrollarán la enfermedad en algún período de sus vidas. Además, 9 millones de personas por año contraen la enfermedad activa, mientras que 2 millones mueren por consecuencia de ello (WHO, 2007a). A partir de la década de 1980 la incidencia de tuberculosis se incrementó notablemente, no solo en los países en vías de desarrollo sino también en los más industrializados, situación que motivó a la OMS en marzo de 1993, a declarar por primera vez en su historia la emergencia global de salud (WHO, 2007b). El informe anual de la OMS, indicó que la incidencia mundial de la tuberculosis aumenta aproximadamente un 0,4 % anual, pero lo hace con mayor rapidez en el Africa subsahariana y en los países de Europa del este (antigua Unión Soviética), donde está estrechamente asociada al virus de la inmunodeficiencia humana / síndrome de la inmunodeficiencia adquirida (VIH/SIDA) y a la pobreza (WHO, 2003). En Argentina, la tasa promedio en 2001 fue de 30,6 casos por cada 100.000 habitantes, con una mortalidad registrada en 2000 de 2,64 muertes por cada 100.000 habitantes (INER, 2001). Al considerar la distribución por edad, en ese mismo año se registró una tasa 26% mayor en la población comprendida entre 25 a 29 años respecto a la de 65 años y más, debido en parte a la asociación con VIH/SIDA. La situación de la enfermedad a nivel mundial empeoró con el surgimiento de cepas resistentes a los fármacos empleados en la terapia. En 2004, la OMS señaló que cada año en todo el mundo hay 300.000 nuevos casos de TB resistente a múltiples drogas (MDR, sigla en inglés), siendo el 79% de los casos provocados por cepas resistentes a por lo menos tres de los cuatro fármacos principales utilizados en tratarla. Además, en algunas zonas de Europa del este, Asia central y Africa, los

pacientes con tuberculosis tienen una probabilidad 10 veces mayor de presentar TB-MDR que en el resto del mundo (WHO, 2004).

La tuberculosis bovina (TBB) es causada por *Mycobacterium bovis*, el cual genera en el ganado una enfermedad de características similares a la tuberculosis en humanos. Diversas especies de mamíferos e inclusive el hombre, son también susceptibles a *M. bovis*, convirtiendo a este bacilo en una importante especie zoonótica. La enfermedad provoca relevantes pérdidas económicas en el sector pecuario, que mundialmente alcanzan los 3 billones de dólares anuales (Garnier *et al.*, 2003), que a su vez pueden ser directas al reducir la eficiencia productiva de los animales, o indirectas debido a las dificultades en la comercialización de los productos derivados. La población bovina de América Latina y el Caribe, está constituida aproximadamente por 374 millones de cabezas, de las cuales el 70% se encuentra en áreas con alta prevalencia y 17% en áreas prácticamente libres de la enfermedad (Ritacco y de Kantor, 2006). Brasil y Argentina, con una población de bovinos de 169 y 55 millones respectivamente, cuentan con una prevalencia de TBB estimada entre un 3 y 6%, mientras que Paraguay y Uruguay con 9 y 11,7 millones de bovinos, tienen prevalencias estimadas entre 0,25 y 0,01% respectivamente (Zumárraga *et al.*, 1999b).

M. tuberculosis y *M. bovis*, junto con *M. bovis* BCG, *M. bovis* subsp. *caprae*, *M. africanum*, *M. microti*, *M. canetti* y *M. pinnipedii* sp. nov, forman un grupo particular con características biológicas relacionadas, denominado complejo *Mycobacterium tuberculosis*.

1.2. Antecedentes históricos

El paso de la tuberculosis quedó estampado en esqueletos de momias egipcias y en huesos de la Edad de Piedra (Joklik *et al.*, 1989), estimándose que el origen evolutivo de *M. tuberculosis* ocurrió en los pasados 15.000 - 20.000 años (Sreevatsan *et al.*, 1997; Kapur *et al.*, 1994, Taylor *et al.*, 1999). La prueba más específica sobre la antigüedad de la tuberculosis en seres humanos, lo constituye el hallazgo de un esqueleto egipcio predinástico que exhibía una deformación de la columna vertebral compatible con la enfermedad de Pott (Crubezy *et al.*, 1998). Evidencias arqueológicas, lingüísticas y genéticas, avalan la hipótesis que el hombre llegó a América desde Siberia en dos episodios migratorios ocurridos hace al menos 10.000 años, y a partir de allí se distribuyó por todo el continente. Aquel suceso explicaría la forma en que la tuberculosis fue introducida en el continente americano, mientras que su presencia en dimensiones epidémicas fue comprobada en el desierto peruano y norte de Chile, al identificar secuencias de ADN específicas del complejo *M. tuberculosis* en momias peruanas de 1500 años de edad (Daniel,

2000; Salo *et al.*, 1994). Sin embargo, continúa sin demostrarse el papel de *M. bovis* como agente causal de tuberculosis en la América prehistórica (Daniel, 2000).

Entre los años 400-350 A.C. Hipócrates realizó la primera descripción sistemática de las manifestaciones clínicas y epidemiológicas de la tuberculosis, conocida entonces como “tisis”, del griego *phthisis* “consunción”, calificada como la enfermedad más ampliamente diseminada en aquellos tiempos (Iseman, 2000a). Si bien la naturaleza contagiosa de la lepra fue admitida desde los tiempos bíblicos, la tuberculosis, aunque más contagiosa, recién fue reconocida como enfermedad infecciosa en 1895, cuando Jean Antoine Villemin la reprodujo en un conejo, tras su inoculación con material proveniente de lesiones tuberculosas pulmonares y no pulmonares de humanos (Davis *et al.*, 1978). Sin embargo, la comprensión de la causa de estas lesiones se demoró hasta el año 1882, en el que Robert Koch descubrió el agente causal de la TBC, al encontrar un bacilo asociado constantemente con la enfermedad clínica, que aisló en cultivo puro y con el que reprodujo la enfermedad en cobayos y conejos, recuperándolo a su vez de éstos en cultivo puro. Los precisos requerimientos mencionados anteriormente se conocen con el nombre de postulados de Koch, que proporcionaron los criterios esenciales para la aceptación total de un microorganismo en particular, como la causa de una enfermedad infecciosa específica (Joklik *et al.*, 1989). Desde entonces la TBC es una de las enfermedades infecciosas más intensamente estudiadas. En contraste, durante el Romanticismo Europeo, si bien la tuberculosis era mortal tanto para el campesino como para el poeta, fue considerada como enriquecedora de la acortada vida del paciente, al aumentar notablemente su sensibilidad artística (Davis *et al.*, 1978). Bautizada como la “plaga blanca”, se había instaurado entre los círculos bohemios como la enfermedad en boga. Es así, como músicos, escritores y prostitutas, se reunían para lograr la representación artística y física de la “consunción”. Curiosamente las mujeres se sometían a extenuantes dietas a base de agua y vinagre, con las que sumadas a la falta de sueño lograban un aspecto de palidez sepulcral, ojeroso y delgado, expresando la belleza de la vida consumida prematuramente por la enfermedad de moda (Hernández, 2000).

El primer “tratamiento” para la enfermedad fue establecido por Eduard Trudeau en 1871, cuando logró componerse gracias al efecto del aire puro y fresco, y del sol que predominaban en las montañas donde se había recluso luego del diagnóstico de la “consunción”. A partir de este hecho e inspirado en el trabajo de Koch sobre el origen de la tuberculosis, instaló el primer laboratorio de investigación dedicado al estudio de la enfermedad en América, donde pudo demostrar los efectos beneficiosos de esa terapia (Hatfull y Jacobs, 2000). Esta modalidad también fue implementada en Argentina, donde la ciudad cordobesa de Cosquín fue considerada “terapéutica” debido a su particular microclima, construyéndose importantes pensiones para los

enfermos adinerados. En ese marco, se relacionó a la tuberculosis con los grandes y suntuosos sanatorios construidos en regiones montañosas y boscosas, que pasaron a convertirse en el pilar fundamental del tratamiento de la enfermedad, y donde convivieron la “sociedad” con la enfermedad y la convalecencia.

1.3. Características de las micobacterias

Taxonómicamente las micobacterias se ubican en el orden Actinomycetales, dentro de la familia *Mycobacteriaceae*, género *Mycobacterium*. Son bacilos cortos, aerobios, inmóviles, no formadores de esporas y no flagelados (de Kantor, 1988). El género *Mycobacterium* es uno de los más antiguamente definidos, y con el que se había designado a un grupo de microorganismos que crecían formando una película en medio líquido (Rastogi *et al.*, 2001). Incluyen desde saprófitos inocuos del suelo y las aguas, hasta organismos que son responsables de enfermedades devastadoras como la tuberculosis y la lepra, caracterizadas por su cronicidad y por causar lesiones granulomatosas de evolución lenta que provocan la destrucción tisular (Davis *et al.*, 1978). Poseen una pared celular compuesta por múltiples capas, con abundancia de lípidos complejos, que constituyen entre el 20 y 40 % de su peso seco, diferenciándose químicamente de los microorganismos gram positivos y gram negativos. El esqueleto de la pared está formado por dos polímeros, un glicopéptido y un arabinogalactano, covalentemente unidos por puentes fosfodiéster (Joklik *et al.*, 1989). Entre los lípidos se encuentran los ácidos micólicos, ácidos grasos de alto peso molecular, ramificados e hidroxilados, cuya producción las diferencia del resto de los microorganismos que integran el orden (Rastogi *et al.*, 2001). Con el nombre de “factor cuerda” se conoce al 6-6’ dimicolato de trehalosa, aislado de todas las especies de micobacterias investigadas, y al que se le atribuye la distribución típica en cuerda o trenzas que adoptan las micobacterias cuando se desarrollan en medio líquido (de Kantor, 1988). La compleja estructura de la pared celular micobacteriana, podría desempeñar una función básica en la adaptación de esos microorganismos al crecimiento y supervivencia en el medio intracelular, la modulación inmunitaria y la resistencia a los antibióticos (Rastogi *et al.*, 2001). Una de las propiedades más distintivas de este género es la coloración de Ziehl-Nielsen, ya que una vez que los ácidos micólicos fijan al colorante (fucsina básica fenolada), resisten la decoloración con ácido-alcohol. Por esta característica se los denomina bacilos ácido-alcohol resistentes (BAAR) (Joklik *et al.*, 1989). Aunque se describieron alrededor de 85 especies de micobacterias diferentes, son pocas las que cobran importancia en salud humana y veterinaria, pudiéndolas clasificar de acuerdo a su importancia clínica en los siguientes tres grupos principales: a) patógenos estrictos: incluye los patógenos humanos *M. tuberculosis*, *M. leprae* y *M. ulcerans* y los patógenos animales *M. bovis* y *M. avium* subsp. *paratuberculosis*; b) patógenos oportunistas o potenciales: *M. simiae*, *M. avium*

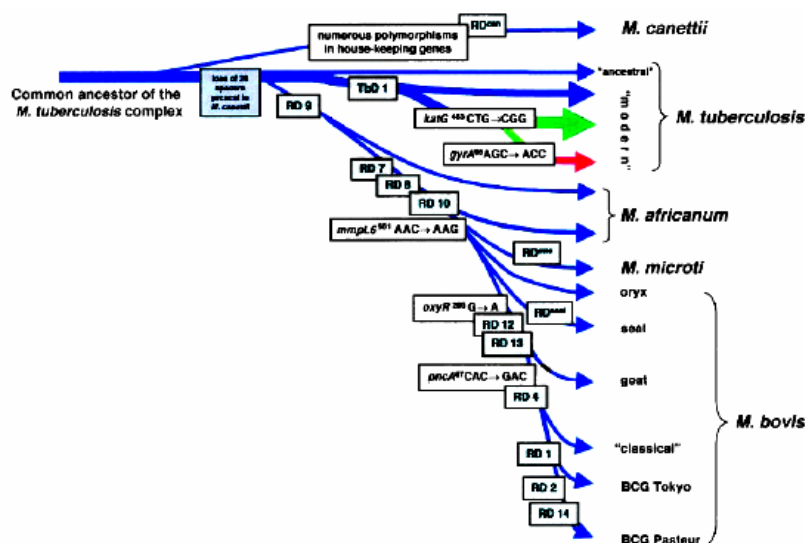
subsp. *avium* y *M. xenopi*; y c) raramente patógenos: incluye a los saprófitos como *M. smegmatis* y *M. phlei* (Rastogi *et al.*, 2001). La mayoría de los integrantes del género pueden cultivarse *in vitro*, siendo una excepción notable *M. leprae*. Los tiempos necesarios para una división celular son muy variables, oscilando entre 2 - 3 horas para *M. phlei* y 14 días para *M. leprae* “*in vivo*”. Las micobacterias patógenas y oportunistas son de crecimiento lento, con un tiempo de división celular entre 12 y 24 horas, requiriendo entre 15 y 28 días para desarrollar en cultivo, mientras que la mayoría de las especies saprófitas o raramente patógenas son de crecimiento rápido, dividiéndose entre 2 y 6 horas, y desarrollándose en cultivo entre 2 y 7 días (Rastogi *et al.*, 2001). Para simplificar su clasificación se dividen en dos grandes grupos: complejo *M. tuberculosis* y micobacterias “atípicas” o “no tuberculosas” que son capaces de dar origen a lesiones semejantes a las provocadas por las primeras (Rastogi *et al.*, 2001). Si bien llamarlas “atípicas” no es correcto, ya que cada una es típica dentro de su especie, constituye la denominación más corriente (de Kantor, 1988). Entre las principales especies de este grupo se incluyen al complejo *M. avium-intracellulare*, *M. chelonae*, *M. fortuitum*, *M. kansasii*, *M. xenopi*, *M. marinum*, *M. scrofulaceum* y *M. szulgai*, que además de causar enfermedad pulmonar, pueden provocar linfadenopatía cervical, localizaciones en piel y lesiones en tejidos blandos (Troesch *et al.*, 1999). Los niños recién nacidos, infantes e individuos inmunosuprimidos, son susceptibles a las infecciones oportunistas causadas por estas micobacterias.

1.4. Teorías sobre el origen del bacilo de la tuberculosis

Gran parte de los miembros del género *Mycobacterium* se encuentran en el suelo o en el agua, con lo cual es razonable la suposición que dicho género tuvo su origen en tales medios (Daniel, 2000). Durante mucho tiempo se creyó que la tuberculosis humana tuvo su origen como una zoonosis, asumiéndose la hipótesis que *M. bovis* habría cambiado de hospedador, adaptándose al hombre durante la domesticación del ganado hace 10.000 o 15.000 años (Montali *et al.*, 2001; Zink *et al.*, 2003). No obstante, en un esqueleto egipcio predinástico se detectó una secuencia de ADN consistente con una micobacteria primitiva, sin poder afirmar que fuera de *M. tuberculosis* o de *M. bovis* (Crubezy *et al.*, 1998). La limitada diversidad alélica, hallada en las secuencias nucleotídicas de genes estructurales, proedentes de aislamientos corrientes de micobacterias del complejo *M. tuberculosis*, condujo a la hipótesis que a partir de un precursor del complejo *M. tuberculosis*, tanto *M. tuberculosis* como *M. bovis* habrían evolucionado paralelamente hasta nuestros días (Sreevatsan *et al.*, 1997). A partir de que la estructura poblacional del complejo *M. tuberculosis* es altamente clonal, sin evidencia de transferencia horizontal (recombinación) entre cepas o especies, un nuevo escenario evolutivo del complejo *M. tuberculosis*, estuvo basado en el

estudio de las pérdidas de material genético en el genoma del bacilo de la tuberculosis (Brosch *et al.*, 2002). De este modo una vez que se pierde una región del cromosoma no es reemplazada, y tal ausencia puede utilizarse como marcador de la célula y de su descendencia (Smith *et al.*, 2006). Estos hallazgos permitieron la clasificación de las cepas en modernas y ancestrales a partir de la presencia o ausencia de una región específica (TbD1), característica de la mayoría de las cepas de *M. tuberculosis*. Además, las sucesivas pérdidas de ADN, mostraron un linaje evolutivo representado por *M. africanum*, *M. microti* y *M. bovis* que divergió de un precursor de *M. tuberculosis*, contraponiéndose así a las hipótesis sostenidas hasta el momento (Brosch *et al.*, 2002; Brosch *et al.*, 2001). Es decir que *M. tuberculosis*, evolutivamente estaría ubicado más cercano de un progenitor común del complejo *M. tuberculosis* que de *M. bovis*. Por otra parte se demostró que una región en particular, denominada Región de Diferencia 9 (RD, sigla en inglés) no está en *M. africanum*, *M. microti* y *M. bovis*, pero sí en *M. tuberculosis* y *M. canettii*. Esta observación sugiere que *M. africanum* pertenece a un linaje evolutivo diferente de *M. tuberculosis*, más cercano a *M. microti* y a *M. bovis* (figura 1) (Brosch *et al.*, 2002).

Figura 1: Esquema propuesto de la evolución del complejo *Mycobacterium tuberculosis*.



Se indican las sucesivas pérdidas de fragmentos ADN en ciertos linajes (Tomado de Brosch *et al.*, 2002).

Sin embargo, Zink y col., sugirieron que si bien *M. tuberculosis* pudo originarse a partir de un precursor del complejo *M. tuberculosis*, se encontraría relacionado más cercanamente a *M. africanum* (Zink *et al.*, 2003). Dicha hipótesis surgió a partir de los estudios realizados con marcadores moleculares, sobre especímenes de momias egipcias de 4000 años de edad, en los que encontraron patrones genéticos de *M. tuberculosis* y *M. africanum*, pero no de *M. bovis* (Zink *et al.*, 2003). Con la concreción de la secuenciación del genoma de *M. bovis*, se confirmaron las hipótesis del nuevo escenario evolutivo del complejo *M. tuberculosis* propuesto por Brosch y col.,

pudiéndose concluir que, *M. bovis* habría evolucionado a partir de un progenitor del complejo *M. tuberculosis* como un clon con distinta preferencia de hospedador (Garnier *et al.*, 2003), descartándose debidamente las demás teorías.

1.5. El complejo *Mycobacterium tuberculosis*

Se conoce con el nombre de complejo *M. tuberculosis* al grupo de micobacterias que se caracterizan por las propiedades genéticas y fenotípicas relacionadas con *M. tuberculosis*. Conformado inicialmente por *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. bovis* BCG, *M. africanum* y *M. microti*, recientemente se sumaron los nuevos taxones *M. canettii*, *M. pinnipedii* *sp. nov.* y *M. bovis* subsp. *caprae*. Estas especies, agentes causales de tuberculosis en animales y humanos, están estrechamente relacionadas a nivel de ADN, con un 99,9% de similitud a nivel nucleotídico e idénticas secuencias de ARNr 16S (Brosch *et al.*, 2002). El polimorfismo en los genes estructurales del complejo *M. tuberculosis* es un evento extremadamente raro, que ocurre en una proporción de 1/10.000 pb, y es utilizado en estudios de virulencia y de resistencia a drogas (Mostowy *et al.*, 2002; Sreevatsan *et al.*, 1997). Por otra parte los miembros del complejo no se diferencian solamente en sus características fenotípicas sino también en su patogenicidad y en la susceptibilidad de los hospedadores (Cousins *et al.*, 2003; Niemann *et al.*, 2000a). Cada miembro del complejo está asociado a un hospedador primario específico, aunque la infección también puede producirse en hospedadores alternativos, indicando que dicha asociación no lo es en un sentido estricto como ocurre con otros patógenos, por ejemplo *Salmonella typhi* (Smith *et al.*, 2006; Cousins *et al.*, 2003). De este modo la posibilidad de transmisión zoonótica de algunas de las micobacterias del complejo, generan una particular atención a nivel de la Salud Pública.

La enfermedad es ocasionada a consecuencia de una infección primaria, reactivación endógena o reinfección. Clásicamente se define la reactivación endógena, como la manifestación de la TBC luego de transcurridos cinco o más años de establecida la infección, en cambio cuando se trata de infección primaria o reinfección, el pasaje al estado de enfermedad ocurre en un tiempo menor (de Boer *et al.*, 2003b). La diferenciación entre los distintos tipos de infección producida es importante para poder proporcionar tratamientos apropiados, sobre todo en casos de recurrencia (de Boer *et al.*, 2003b). Además de la típica manifestación pulmonar de la tuberculosis, puede presentarse en forma extrapulmonar y diseminada. La primera representa el 15% de los casos, con localizaciones en meninges, vejiga, hígado, articulaciones, estómago, testículo, etc., ocasionando más problemas diagnósticos y terapéuticos que la pulmonar, debido a que involucran sitios relativamente inaccesibles y frecuentemente se requieren de prácticas invasivas para establecer el diagnóstico. Asimismo, pocos bacilos pueden provocar mayor daño, como ocurre en las formas

meníngicas y linfáticas que son más comunes en los niños. La tuberculosis diseminada o miliar, se produce como resultado de las fallas del sistema inmunológico del hospedador para contener la infección, y por esta razón es más frecuente en los pacientes con VIH/SIDA. El término miliar surge del parecido de los granos de mijo con las lesiones, nódulos amarillentos de 1 a 2 mm de diámetro, definidos histológicamente como granulomas. La transmisión de *M. tuberculosis* es de humano a humano, aunque también pueden infectarse animales que tienen contacto con personas enfermas que eliminan bacilos a través de las secreciones respiratorias, pudiendo en este caso transmitirse epizooticamente (Oh *et al.*, 2002). En el año 1836, se registró el primer reporte de infección por *M. tuberculosis* en un zoológico de Londres, donde la tuberculosis debida tanto a *M. tuberculosis* como a *M. bovis*, había provocado pérdidas de hasta un 40% en las colecciones de primates. La incidencia de la enfermedad se redujo considerablemente cuando se interpusieron barreras de vidrio entre el público visitante y los primates (Montali *et al.*, 2001). Sumado a este reporte, a mediados de la década del setenta, *M. tuberculosis* era la tercera micobacteria más frecuentemente aislada de los animales de zoológicos y parques de Estados Unidos de Norteamérica (EEUU) (Montali *et al.*, 2001). Sin embargo, fue recién en el año 2000 en Eslovenia, cuando pudo demostrarse la primera transmisión de *M. tuberculosis* de un hombre a un bovino, mediante la tipificación molecular de los respectivos aislamientos (Ocepek *et al.*, 2005).

En Africa subsahariana, el 60% de los aislamientos de humanos con tuberculosis pulmonar son debidos a *M. africanum*, aislado por primera vez de un paciente senegalés en el año 1968 (Niemann *et al.*, 2002; Viana-Niero *et al.*, 2001). Los signos y síntomas de la tuberculosis causada por *M. africanum* son indistinguibles de aquellos producidos por otras micobacterias del complejo, sin embargo, su identificación precisa es epidemiológicamente importante dado que permite la aplicación de medidas de control más apropiadas (Remacha Esteras *et al.*, 2003). En contraste con *M. tuberculosis* y *M. bovis*, *M. africanum* muestra una extensiva heterogeneidad fenotípica (Niemann *et al.*, 2002).

Otra especie del complejo *M. tuberculosis* caracterizada por formar colonias lisas y causar tuberculosis en humanos es *M. canettii* (van Soolingen *et al.*, 1997). En el año 1969, Canetti aisló de un paciente francés una cepa supuestamente de *M. tuberculosis* caracterizada por su aspecto liso, que difería del resto de las cepas rugosas por su gran contenido de lipooligosacáridos (Daffé *et al.*, 1991). Por otra parte, en 1997, van Soolingen y col., estudiaron un aislamiento del año 1993 obtenido de un niño somalí de dos años de edad, que padecía de linfadenitis tuberculosa. La cepa se caracterizó por ser lisa, brillante y de diferir genéticamente de aproximadamente 2000 cepas de *M. tuberculosis* examinadas. Ambos aislamientos, el del paciente francés y el del niño somalí, tuvieron las mismas características fenotípicas y genéticas, constituyendo en 1997 un nuevo taxón

denominado *M. canettii* (Pfyffer *et al.*, 1998). Una tercer cepa de esta especie fue aislada en 1995, a partir de un paciente suizo con SIDA y con compromiso intestinal, que habría vivido durante 21 años en Uganda y Kenia (Pfyffer *et al.*, 1998). La implicancia epidemiológica de *M. canetti* permanece desconocida.

El ratón europeo, conocido como vole (*Microtus agrestis*) y la llama (*Lama vicugna molina*), son los animales de los que se aislaron *M. microti* tipo “vole” y “llama” respectivamente (Niemann *et al.*, 2000b; Kremer *et al.*, 1998). Ambos tipos, que se diferencian en las características moleculares y de crecimiento, también fueron aislados del hombre. Las primeras infecciones en los pequeños mamíferos se registraron hace aproximadamente 70 años en Gran Bretaña con prevalencias entre el 2 y el 31% (van Soolingen *et al.*, 1998). Si bien fue aislado de cerdos, bovinos, llamas y hasta de un perro, debido a las dificultades para el aislamiento primario y subsecuente caracterización por métodos bacteriológicos clásicos, se subestima el rango de hospedador y la prevalencia en hombres y animales (Horstkotte *et al.*, 2001; Deforges *et al.*, 2004). Durante muchos años se desconoció su potencial patogénico en humanos y fue utilizada como vacuna viva contra la tuberculosis humana, aplicándola a aproximadamente 10.000 personas en Gran Bretaña y Rodesia entre los años 1946 y 1961 (Deforges *et al.*, 2004). En cambio, actualmente es considerado un patógeno emergente en humanos debido a que se describieron numerosos casos, sobre todo del tipo “llama”, tanto en individuos inmunosuprimidos como en inmunocompetentes (Niemann *et al.*, 2000b; Horstkotte *et al.*, 2001; Deforges *et al.*, 2004).

Los pinnípedos son los hospedadores primarios del recientemente descrito *M. pinnipedii* sp. nov. (Cousins *et al.*, 2003). Entre los años 1985 y 2000, en Australia, Nueva Zelanda, Argentina, Uruguay y Gran Bretaña, se obtuvieron 30 aislamientos de pinnípedos tuberculosos, cautivos y salvajes, de las siguientes especies: *Arctocephalus australis*, *Arctocephalus forsteri*, *Arctocephalus pusillus doriferus*, *Arctocephalus tropicalis*, *Neophoca cinerea*, y *Otaria flavescens* (Cousins *et al.*, 2003; Alito *et al.*, 1999b; Zumárraga *et al.*, 1999c; Bernardelli *et al.*, 1996; Romano *et al.*, 1995). Al mismo tiempo se registró en Australia un aislamiento de un entrenador de lobos marinos que trabajaba con una colonia afectada por la enfermedad y también otro en Gran Bretaña de un tapir brasileño *Tapirus terrestris* (Cousins *et al.*, 2003). Los aislamientos obtenidos de los cuatro continentes, se caracterizaron por poseer las mismas propiedades fenotípicas y genéticas, formando un único y nuevo taxón del complejo *M. tuberculosis* (Cousins *et al.*, 2003).

Entre los años 1999 y 2001, un tercio de los aislamientos de *M. bovis* de humanos de Alemania fueron debidos a una nueva subespecie llamada *M. bovis* subsp. *caprae* (Kubica *et al.*, 2003). Inicialmente fue aislado de cabras en España (Aranaz *et al.*, 1999) y luego también de

bovinos, cerdos, jabalíes y humanos de Europa Central donde parece prevalecer, pero en otros continentes nunca fue detectado. Clasificado originalmente como *M. tuberculosis* subsp. *caprae* y reclasificado como *M. bovis* subsp. *caprae*, últimamente sugieren elevarlo al nivel de especie y designarlo como *M. caprae* comb. nov., sp. nov., debido a que los estudios evolutivos en base a delecciones del genoma, revelaron que el grupo de aislamientos caprinos es evolutivamente anterior a *M. bovis* o su ancestro (Aranaz *et al.*, 2003).

La tuberculosis bovina a nivel productivo provoca: disminución de hasta un 6% en la fertilidad; disminución de la producción láctea de las vacas en ordeño en un 10%; reducción a la mitad de la duración de las lactancias en la séptima lactancia, el promedio de 270 días en la primera lactancia se reduce a la mitad en la séptima lactancia (131) días; pérdida del 15% en promedio del peso normal del animal, disminuyendo la producción de carne en bovinos y porcinos; y aumento de la susceptibilidad a otras enfermedades como consecuencia de la reducción de la inmunidad (SENASA, 2006). La transmisión de *M. bovis* entre el ganado bovino es principalmente por vía respiratoria (80-90%), seguida de la digestiva (10-20%) por la ingesta de leche, observada fundamentalmente en terneros que maman de vacas con mastitis tuberculosa, que representan el 5% de las vacas infectadas (SENASA, 2006). Esto se debe a que la dosis infectiva por vía respiratoria es significativamente menor a la digestiva, en la que se requieren millones de bacilos para establecer la infección (Phillips *et al.*, 2003). Además, el tamaño de las partículas que conforman los aerosoles también es un factor crítico para establecer la infección, difiriendo a su vez entre animales (Phillips *et al.*, 2003). Otra vía de contagio, aunque menos frecuente, es la congénita. Los sistemas de producción que favorecen el contacto entre el ganado, tales como el engorde en corral (*feedlot* en inglés) y de producción lechera, generalmente tienen una prevalencia de la enfermedad más alta que aquellos en los que el ganado pastorea en grandes extensiones. La causa de ello se debe al prolongado y estrecho contacto entre ganado infectado o susceptible (Perez *et al.*, 2002b). Además, en el ganado de corral, la respuesta a los antígenos de *M. bovis* y la severidad de las lesiones, de localización respiratoria, son mayores a las del que pastorea, cuyas lesiones son digestivas (Ameni *et al.*, 2006). Asimismo, *M. bovis* puede sobrevivir en el agua y permanecer viable en suelos húmedos y oscuros, hasta alrededor de 6 meses, favorecido por ser más resistente a la luz solar que *M. tuberculosis*. De este modo, los animales pueden infectarse tras la ingesta de agua de los bebederos y de tierra, con la cual cubren sus deficiencias minerales (Perez *et al.*, 2002b; Phillips *et al.*, 2003). Por otra parte, el movimiento de ganado es causal del 10 al 15% de los casos ocasionados (Perez *et al.*, 2002b; Phillips *et al.*, 2003).

Si bien el hospedador primario y principal de *M. bovis* es el bovino, una amplia variedad de mamíferos pueden ser afectados por este bacilo. En el hombre la enfermedad es clínica,

radiológica y patológicamente indistinguible de la causada por *M. tuberculosis*, siendo escasa la información disponible del efecto de esta zoonosis a nivel de Salud Pública, porque las prevalencias en algunos países aparecen distorsionadas, tanto por no practicar el cultivo en todos los casos como por la utilización de medios de cultivo inadecuados (Thoen *et al.*, 2006; Wedlock *et al.*, 2002; Cosivi *et al.*, 1998). Los países industrializados tampoco se encuentran al margen de esta situación, como lo indica una encuesta realizada en Reino Unido en 2003, donde el 20% de los laboratorios de Inglaterra y Gales no utilizan los medios apropiados para que desarrolle *M. bovis* (Thoen *et al.*, 2006). La infección ocurre principalmente por la inhalación de aerosoles a partir de la tos del ganado enfermo, ya sea en frigoríficos, galpones o al aire libre; por cortes en las manos durante la faena; o por consumo de leche o derivados contaminados con el bacilo. En las zonas lecheras, su impacto es mayor en los niños que beben leche cruda, y en los peones de campo y veterinarios que están en contacto directo con animales enfermos (Harris *et al.*, 2007; Haddad *et al.*, 2004; Cosivi *et al.*, 1998; Cotter *et al.*, 1996; Latini *et al.*, 1990). Antes de la implementación del proceso de pasteurización de la leche, *M. bovis* era causa frecuente de tuberculosis extrapulmonar, que podía afectar meninges, intestino, linfonódulos cervicales, etc., (Wedlock *et al.*, 2002; Cosivi *et al.*, 1998). Entre 1901 y 1932, en el Reino Unido *M. bovis* provocó el 91% de las localizaciones en linfonódulos cervicales y el 28 % de meningitis, en niños menores de 5 años de edad (Thoen *et al.*, 2006). Luego de la Segunda Guerra Mundial, hasta un 90% de los rodeos de Alemania, estaban infectados, mientras que la prevalencia de *M. bovis* en humanos oscilaba entre el 10 y 30%. Cuando en 1997 lograron erradicar la enfermedad del bovino, los casos en humanos se redujeron a menos del 1%, probablemente atribuidos a reactivaciones de infecciones pasadas, más que adquisiciones recientes (Kubica *et al.*, 2003). En el Reino Unido, en la década de 1930, el 40% de los animales faenados tuvieron lesiones tuberculosas, habiéndose registrado además 50.000 casos en hombres por año y muriendo a causa de ello 2.500. Afortunadamente esa situación fue revertida con la implementación de planes de control y erradicación de la enfermedad en el bovino, y con la pasteurización de la leche, contabilizando actualmente tan solo 40 casos al año que representan alrededor del 1% de los diagnosticados en humanos (DEFRA, 2003; Gibson *et al.*, 2004). Asimismo durante el período 1980 – 1990, la mayoría de los casos en el Reino Unido, se presentaron en ancianos, en individuos infectados en el extranjero que retornaron al mismo y en inmigrantes (Gibson *et al.*, 2004). Sin embargo, en el año 2000 Gran Bretaña registró una incidencia de la enfermedad por rodeo del 2,8%, con un incremento exponencial de casos en el sudoeste de Inglaterra en los pasados 10 años (Garnier *et al.*, 2003). Este hecho obedece a la presencia de reservorios silvestres como el tejón (*Meles meles*) que tanto en Gran Bretaña como en Irlanda dificultan la erradicación de la enfermedad, constituyendo una

de las principales causas de la falla del programa de control iniciado en los años 50' (Smith *et al.*, 2003). Del mismo modo en Nueva Zelanda, a pesar de haber reducido substancialmente la incidencia de la enfermedad, todavía ocurren brotes esporádicos a consecuencia de tener como reservorio a la zarigüeya *Trichosurus vulpecula* (Aranaz *et al.*, 2004; Garnier *et al.*, 2003). Luego de la implementación de un programa de control de vectores, empleando venenos y trampas para reducir el número de zarigüeyas, entre 1994 y 2000 lograron reducir en un 50% los bovinos y ciervos infectados. La misma política también fue implementada por Irlanda con resultados satisfactorios (Wedlock *et al.*, 2002). No obstante, el riesgo que representan esos reservorios en la transmisión de la enfermedad a animales domésticos y al hombre es variable, ya que depende del medio ambiente y de la situación epidemiológica específica de la especie (Aranaz *et al.*, 2004; Gibson *et al.*, 2004). La tuberculosis bovina en las ovejas es poco frecuente, siendo en la mayoría de los casos hallazgos individuales en matadero. Sin embargo, en 1981 se describieron dos grandes brotes en Nueva Zelanda, mientras que en 2003 se reportó el primer brote en un rebaño de Irlanda (Malone *et al.*, 2003). Durante el siglo XVIII y principios del XIX, en EEUU la tuberculosis bovina fue la enfermedad infecciosa, más prevalente en bovinos y cerdos, provocando pérdidas que superaban a las causadas por todas las otras enfermedades en su conjunto (Montali *et al.*, 2001). Pero con su erradicación entre los años 1918 y 1966, pudieron ahorrar un monto mayor al invertido en 49 años de aplicación del programa (INPPAZ, 1997). No obstante, últimamente hubo un incremento de casos en hispanos de ciertas regiones de EEUU, pero asociados al consumo de quesos blandos no pasteurizados provenientes de México (Harris *et al.*, 2007). En otro trabajo realizado en la región de la Baja California, frontera entre EEUU y México, se demostró la presencia de *M. bovis* en el 30% de los cultivos de micobacterias aisladas de niños (Haddad *et al.*, 2004).

La situación de esta zoonosis en los países en vías de desarrollo es aun preocupante, debido a falta de recursos, pruebas diagnósticas inapropiadas, inestabilidad política o a la reticencia social a los métodos y programas de control. Menos de la mitad de los países de Africa, Asia y Latinoamérica tienen medidas de control de la enfermedad basados en pruebas y políticas de notificación y matanza (Wedlock *et al.*, 2002). En Africa, el 85% del ganado y el 82% de los humanos viven en áreas donde la tuberculosis bovina no es controlada o lo es parcialmente, provocando del 10 al 15% de los casos de tuberculosis en humanos (Ameni *et al.*, 2006). Si bien la transmisión de *M. bovis* entre humanos era un evento extremadamente raro, a partir del advenimiento del VIH/SIDA, la epidemiología de la enfermedad cambió rotundamente al establecerse las siguientes relaciones: transmisión humano-humano, corto intervalo entre infección

y desarrollo de la enfermedad y diseminación de cepas resistentes a múltiples drogas (Wedlock *et al.*, 2002; Cosivi *et al.*, 1998; Blázquez *et al.*, 1997).

En los pasados 10 años, según un reporte de la Oficina Internacional de Epizootias (OIE), el 22% de los países detectaron *M. bovis* en fauna salvaje. La infección en la mayoría de los casos se produce cuando la prevalencia de la enfermedad es alta, pero cuando desaparece de su hospedador natural, también tiende a desaparecer de las otras especies (Aranaz *et al.*, 2004). En Sudáfrica, la tuberculosis en búfalos del sur del Parque Nacional Kruger se eleva al 90%, padeciendo además un alto nivel de infección en leones, chitas, leopardos, hienas, zambos, etc. (Haddad *et al.*, 2004). La mejor comprensión del modo de transmisión y de la distribución de la enfermedad en las poblaciones salvajes, permitirá adoptar medidas de control más precisas.

1.5.1. El genoma de *Mycobacterium bovis*

El genoma de *M. bovis* fue recientemente secuenciado, utilizando la cepa virulenta AF2122/97, aislada de un bovino de Gran Bretaña en el año 1977. Su tamaño es de 4.345.492 pares de bases (pb), dispuestos en forma de un cromosoma circular, con un contenido de G-C del 65,3%, conteniendo 3.952 genes que codifican proteínas, incluido un profago y 42 secuencias de inserción (IS, sigla en inglés), (tabla 1) (Garnier *et al.*, 2003).

Tabla 1: Principales diferencias entre los genomas de *M. bovis* y *M. tuberculosis*.

Característica	<i>M. bovis</i> AF2122/97	<i>M. tuberculosis</i> H37Rv	<i>M. tuberculosis</i> CDC1551
Tamaño del genoma, (pb)	4.345.492	4.411.532	4.403.836
G + C, (%)	65,6	65,6	65,6
Genes codificantes de proteínas	3.951	3.995	4.249
Referido a <i>M. bovis</i> :	-		
SNPs	-	2.437	2.423
Transiciones	-	1.649	1.630
Transversiones	-	788	793
Deleciones (≥ 1 pb)	-	205	221
Inserciones (≥ 1 pb)	-	177	245

SNPs: (Polimorfismo en un Solo Nucleótido). Adaptado de Garnier *et al.*, 2003.

A nivel nucleotídico, el genoma de *M. bovis* es 99,95% idéntico al de *M. tuberculosis*, mostrando colinearidad, y sin extensivas traslocaciones, duplicaciones o inversiones, pero de menor tamaño debido a deleciones (Garnier *et al.*, 2003). La composición de la pared celular y de las proteínas secretadas, presentan variaciones, indicando su potencial papel en la interacción bacilo-hospedador o en la evasión de la respuesta inmune (Garnier *et al.*, 2003). Por otra parte, tras la comparación con otros miembros del complejo *M. tuberculosis*, no se detectaron genes

únicos de *M. bovis* “*per se*” (Garnier *et al.*, 2003). Antes de la disponibilidad de la secuencia del genoma *M. bovis*, la genómica comparativa del complejo *M. tuberculosis* se llevaba a cabo mediante la utilización de métodos basados en hibridación, con los que se detectaron 11 deleciones entre 1 y 12,7 kb (Mahairas *et al.*, 1996; Zumárraga *et al.*, 1999d; Rauzier *et al.* 1999), que posteriormente pudieron confirmarse con la concreción de la secuenciación del genoma. No obstante, *M. bovis* contiene un locus llamado TbD1 (delección 1 en tuberculosis), relacionado con el transporte de lípidos específicos de la pared celular, que no se encuentra en la mayoría de las cepas de *M. tuberculosis* (Garnier *et al.*, 2003). A partir del análisis de las deleciones es posible la diferenciación de los miembros del complejo *M. tuberculosis* (Brosch *et al.*, 2002). Sobre 20 regiones variables, 14 (RD1-RD14) están ausentes en BCG Pasteur con respecto a *M. tuberculosis* H37Rv, mientras que 6 (RvD1-RvD5, y TbD1) están ausentes en el genoma de *M. tuberculosis* H37Rv con respecto a otros miembros del complejo *M. tuberculosis* (Brosch *et al.*, 2002; Banu *et al.*, 2004) (figura 1). Por otra parte, según la clasificación de las cepas de *M. tuberculosis* en base a la presencia o ausencia de la región TbD1 como antiguas o modernas, las familias *M. tuberculosis* W-Beijing, Harlem y Africana, responsables de importantes epidemias, pertenecerían al tipo moderno (figura 1) (Banu *et al.*, 2004). Otra serie de características distintivas de *M. bovis* están dadas por los polimorfismos en un solo nucleótido (SNPs), como la mutación puntual en el gen *pncA* que le confiere resistencia a la droga pirazinamida (Garnier *et al.*, 2003). La información contenida en las secuencias de los genomas de *M. tuberculosis* y de *M. bovis*, podrá contribuir a la mejor comprensión de los distintos aspectos que atañen a esta enfermedad.

1.5.2. Transposones del complejo *Mycobacterium tuberculosis*

Los transposones son entidades genéticas, que catalizan su propia movilidad de un sitio a otro de la molécula de ADN, no requiriendo en general homología con la secuencia blanco (McAdam *et al.*, 2000). Los más simples son las secuencias de inserción cuyo tamaño oscila entre 780 pb y 2,5 kb, y solamente codifican para las funciones requeridas en la transposición, inclusive la transposasa que cataliza esta reacción. Por lo general se hallan flanqueadas por repeticiones invertidas (IR, sigla en inglés), secuencias de 10 a 40 pb que unen a la transposasa (McAdam *et al.*, 2000). Una vez transpuesto, las IS generan duplicaciones cortas de la secuencia blanco, generándose repeticiones directas cortas en cualquiera de los lados del transposón (McAdam *et al.*, 2000). Aunque se describieron más de 46 secuencias de inserción en 10 especies de micobacterias diferentes, solamente en seis de ellas se demostró la actividad y capacidad de transposición (McAdam *et al.*, 2000). La mayoría de esas IS tienen un limitado rango de hospedador, indicando que la transferencia horizontal de material genético entre micobacterias es limitada y que debido a

su especificidad de especie, son buenas herramientas para la epidemiología molecular (McAdam *et al.*, 2000). Las secuencias de inserción IS6110 e IS1081, son características del complejo *M. tuberculosis*, siendo su identificación de utilidad diagnóstica, mientras que su localización dentro del genoma de utilidad epidemiológica. La IS6110 forma parte de la familia de transposones IS3, la cual contiene a más de 80 transposones de 40 especies de bacterias diferentes. La mayoría de los aislamientos de *M. tuberculosis* tienen entre 5 y 20 copias de este elemento, mientras que en los de *M. bovis* generalmente tienen una sola (Small y van Embden, 1994). La transposición de IS6110, puede jugar un papel importante en la evolución de *M. tuberculosis* debido a la alteración en la expresión de genes (Sreevatsan *et al.*, 1997). Además, la presencia de este elemento en copias múltiples, puede promover rearrreglos genómicos tales como deleciones (Sampson *et al.*, 1999). Como también está en los otros miembros del complejo, se supone que fue heredada a partir de un organismo precursor ancestral (Warren *et al.*, 2000). Tiene un tamaño de 1361 pb, y aunque su distribución en el genoma es irregular (McAdam *et al.*, 2000; Warren *et al.*, 2000), en *M. tuberculosis* H37Rv, se destacan la existencia de numerosos sitios de integración preferenciales, entre ellos el locus de inserción preferencial de IS6110 (*ipl*, sigla en inglés) y el de Repeticiones Directas (DR, sigla en inglés) presentes solamente en el complejo *M. tuberculosis* (Sampson *et al.*, 2001; McAdam *et al.*, 2000; Fang y Forbes, 1997). Sin considerar los sitios mencionados, a partir de la caracterización de 95 loci de integración de IS6110 en aislamientos clínicos de *M. tuberculosis*, el 60% de las inserciones ocurren en regiones codificantes del genoma, el 33% en no codificantes, mientras que el 7 % restante no fueron localizadas (Sampson *et al.*, 2001). La secuencia de inserción IS1081, integra la familia de transposones IS256, en la cual se identificaron trece IS, formando así la familia de transposones de micobacterias más grande en su tipo (McAdam *et al.*, 2000). Su tamaño es de 1324 pb, con IR de 15 pb en sus extremos. Las micobacterias del complejo *M. tuberculosis* tienen entre 5 y 6 copias de IS1081, con sitios de inserción específicos, pero en contraste a lo observado con IS6110, el polimorfismo en la posición de este elemento es bajo (Mc Adam *et al.*, 1994), sin embargo es posible diferenciar *M. bovis* BCG del resto del complejo *M. tuberculosis*, por tener un patrón exclusivo de RFLP IS1081 (van Soolingen *et al.*, 1992).

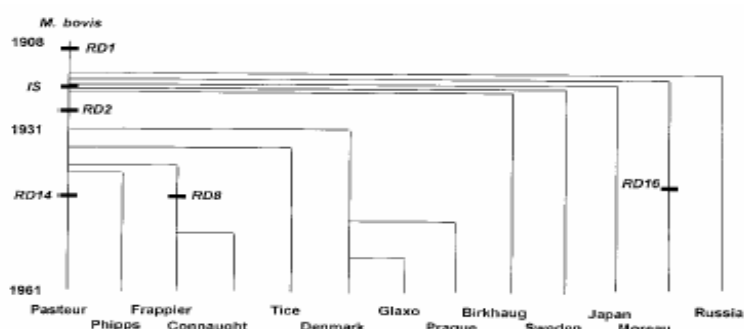
1.5.3. La cepa vacunal *Mycobacterium bovis* BCG

Entre los años 1908 y 1921, el médico Albert Calmette y el veterinario Camile Guérin, obtuvieron una cepa de *M. bovis* atenuada, avirulenta y de preservada inmunogenicidad, luego de 230 pasajes sucesivos de una cepa de *M. bovis* salvaje, en medios a base de papa, bilis y glicerol. La cepa obtenida entonces, *M. bovis* BCG (Bacilo Camette Guérin), fue aplicada por primera vez

a un infante que vivía en un entorno tuberculoso en el año 1921, y desde entonces fue administrada a más de 3 billones de individuos en todo el mundo (Norazmi y Mustaffa, 2004; Behr *et al.*, 1999). Debido a la incapacidad de conservar la cepa por congelación, el mantenimiento de la misma se hizo mediante sucesivos repiques que generaron una serie de subcepas hijas fenotípicamente diferentes, que colectivamente se conocen como BCG (Behr *et al.*, 1999). En consecuencia, desde 1924 y hasta el establecimiento de lotes semilla por liofilización, las cepas BCG se propagaron principalmente por subcultivo en medio de papa o medio Sauton y también por el método de siembra en profundidad (Oettinger *et al.*, 1999). De este modo, entre los años 1924 y 1926, *M. bovis* BCG se distribuyó a por lo menos 34 países, y en 1927 a otros 26 (Behr *et al.*, 1999; Oettinger *et al.*, 1999). Gran parte de las subcepas derivadas dejaron de emplearse como vacunas, siendo las más utilizadas BCG Connaught, Danesa, Glaxo (Merieux), Moreau, Pasteur y Tokio (Oettinger *et al.*, 1999). A consecuencia de la gran diversidad de las cepas vacunales, surgieron variantes con características morfológicas, bioquímicas e inmunológicas marcadamente diferentes, y con niveles de eficiencia de protección variables (entre 0 y 94%) (Oettinger *et al.*, 1999; Norazmi y Mustaffa, 2004) atribuidos a factores operacionales, demográficos, del medio ambiente y genéticos (Brosch *et al.*, 2007). En Gran Bretaña la vacuna BCG tuvo una eficacia del 75%, mientras que en Malawi o sur de la India no fue significativa (van Soolingen *et al.*, 2003; Young y Robertson, 1999). Sin embargo, se estima que en conjunto la vacuna BCG reduce en un 50% el riesgo de contraer la enfermedad y entre un 70 y 80% las manifestaciones más peligrosas, como la meningitis y la diseminación miliar (Mahairas *et al.*, 1996). No obstante en pacientes inmunodeprimidos puede ser causante de enfermedad (Pfyffer 2003). Algunos investigadores sugirieron que la introducción de la vacunación pudo haber provocado cambios en la estructura poblacional de *M. tuberculosis*, como en Asia y Africa Central, y que el grado de protección inducida por la vacuna dependería de la cepa infectante, existiendo genotipos llamados variantes escapes, como el de *M. tuberculosis* Beijing, contra los que no prevendría la enfermedad (Kremer *et al.*, 2004; van Soolingen *et al.*, 2003). Asimismo, la exposición previa a micobacterias ambientales compromete severamente la protección proporcionada por la vacuna, influenciada por la extensa reacción cruzada contra antígenos compartidos (Brosch *et al.*, 2007). Por otra parte, hay quienes postularon que el número de mutaciones y deleciones que ocurrieron en su genoma desde su obtención en 1908, pudieron comprometer su eficacia (Norazmi y Mustaffa, 2004). Hasta el momento, nunca se observó que *M. bovis* BCG revirtiera la virulencia en animales, indicando que las mutaciones producidas en su genoma son estables (Mahairas *et al.*, 1996). Debido a que *M. bovis* BCG es una vacuna segura, de bajo costo y con una potente capacidad inmunoestimulante inespecífica, fue empleada como

vehículo recombinante vivo para el desarrollo de nuevas vacunas multivalentes para otras enfermedades y también en la terapia de algunos tipos de cáncer, como el vesical (Mahairas *et al.*, 1996; Pfyffer, 2003). Si bien la vacuna BCG es ampliamente utilizada, todavía se desconocen muchas de las mutaciones que condujeron a su atenuación (Garnier *et al.*, 2003). Además, debido a que la cepa BCG original se perdió durante la primera Guerra Mundial, no es posible la comparación directa entre la cepa primitiva y las derivadas, y por esta razón el origen de las cepas vacunales actuales puede inferirse solamente a partir de aproximaciones evolutivas (Behr *et al.*, 1999). Inicialmente por hibridación substractiva, se identificaron dos regiones genómicas de diferencia entre *M. bovis* y *M. bovis* BCG Connaught, denominadas RD1 y RD2, (Región de Diferencia) (Mahairas *et al.*, 1996). RD1 consiste en un fragmento de ADN de 9,5 kb perdido al inicio de la atenuación entre los años 1908 y 1921, que no fue encontrado en ninguna de las cepas BCG analizadas y constituye la causa fundamental de la atenuación de la cepa BCG, debido a la pérdida del sistema de secreción de proteínas ESX-1 (Brosch *et al.*, 2007; Garnier *et al.*, 2003; Mahairas *et al.*, 1996). En cambio, RD2 de 10,7 Kb, está ausente solamente en las subcepas derivadas de la original *M. bovis* BCG Pasteur, estimándose que la deleción ocurrió entre 1927 y 1931 (Mahairas *et al.*, 1996). Posteriormente, mediante hibridación comparativa con microarreglos de ADN, se detectaron tres regiones de diferencia adicionales, llamadas RD8, RD14 y RD16. A partir del conocimiento histórico de la distribución y del movimiento de las cepas derivadas, fue elaborado un árbol genealógico denotando las diferencias genéticas encontradas y la estimación temporal de su ocurrencia (figura 2) (Behr *et al.*, 1999).

Figura 2: Arbol genealógico de la cepa vacunal *M. bovis* BCG.



Se indican los orígenes geográficos de las BCG derivadas, como así también las regiones del genoma perdidas durante su obtención y propagación serial (Adaptado de Behr *et al.*, 1999).

Se estima que la pérdida de RD8 sucedió en Montreal entre los años 1937 y 1948, (cepas Frappier y Connaught), y RD14, específica de la cepa Pasteur, entre 1938 y 1961. En cambio, la pérdida de RD16 ocurrida después de 1925, no se sabe si se produjo en Brasil o Uruguay (cepa Moreau) (Behr *et al.*, 1999). En síntesis, durante la obtención y propagación serial de la cepa

BCG, se perdieron las regiones RD1, RD2, RD8, RD14, RD16, de la cepa *M. bovis* progenitora (tabla 2) (Behr *et al.*, 1999).

Tabla 2: Características de las regiones de diferencia entre *M. bovis* y *M. bovis* BCG

Región perdida	Fecha del evento	Cepas BCG	ORFs	Tamaño de la región en (pb)
RD1	1908-1921	Todas las BCG	9	9455
RD2	1927-1931	Danese, Praga, Glaxo, Frappier, Connaught, Phipps, Tice y Pasteur	11	5613
RD8	1937-1948	Frappier y Connaught	8	3428
RD14	1938-1961	Pasteur	8	9069
RD16	Después de 1925	Moreau	6	7609

ORF (*Open Reading Frame*). Adaptado de Behr *et al.*, 1999.

Recientemente fue publicada la secuencia del genoma de la cepa *M. bovis* BCG Pasteur 1173P2 (1173 pasajes, lote 2), con la particularidad de ser aproximadamente 30 Kb más grande que el de la cepa *M. bovis* A212F2/97, como resultado de dos repeticiones en tándem independientes DU1 y DU2, y a pesar de las múltiples deleciones ocurridas en su genoma hasta su obtención (Brosch *et al.*, 2007). En consecuencia BCG Pasteur es diploide para 58 genes codificantes de proteínas y dos genes de tRNAs. Las dos duplicaciones DU1 son idénticas y exclusivas de *M. bovis* BCG Pasteur y tienen un tamaño de 29.667 pb, mientras que de DU2 existen 4 variantes diferentes (DU2 I- DU2 IV) en todas las BCG, de las que la DU2 IV en BCG Pasteur es de 36.163 pb. Además, uno de los tres genes comunes a las cuatro variantes DU2 es *glpD2*, que codifica para la glicerol 3 fosfato deshidrogenasa, denotando que *M. bovis* BCG requiere altos niveles de esta enzima para crecer en presencia de glicerol.

1.6. Diagnóstico

Las técnicas de diagnóstico de la tuberculosis se clasifican en directas, con las cuales se pone en evidencia al bacilo de manera concluyente, e indirectas con las que se mide una respuesta inmunológica del hospedador infectado.

1.6.1. Detección directa

1.6.1.1. Baciloscopía

El examen baciloscópico se realiza mediante la coloración ácido-alcohol resistente con fucsina básica fenolada, la cual puede hacerse por el método de tinción caliente de Ziehl-Neelsen o por el de tinción fría de Kinyoun. La sensibilidad global del método oscila entre el 20 y 80%, ya que se requieren 10^5 bacilos por ml de muestra para poder visualizarlos, mientras que cuando la

concentración baja en un orden, solamente el 60% de los preparados son positivos. Otra alternativa es la utilización de microscopía de fluorescencia, mediante la tinción con auramina O - rodamina. Por otra parte, la especificidad está condicionada a que además de las micobacterias, otros microorganismos, exhiben diversos grados de ácido-alcohol resistencia tal como las siguientes bacterias *Rhodococcus sp.*, *Nocardia sp.*, *Legionella micdadei*; quistes de *Cryptosporidium sp.*, *Isospora sp.*, y *Cyclospora sp.*; y esporas de *Microsporidium sp.* (Pfyffer, 2003).

1.6.1.2. Cultivo

El cultivo y subsiguiente identificación bioquímica, es considerado como “el estándar de oro” del diagnóstico de certeza de la enfermedad, siendo indispensable por proporcionar la biomasa necesaria para la identificación y determinación de la susceptibilidad a los distintos tuberculostáticos (Pfyffer, 2003). La mayoría de las muestras remitidas para cultivo de micobacterias, consisten en una compleja matriz orgánica contaminada con una gran variedad de microorganismos. Para evitar el desarrollo de la flora acompañante, tales especímenes requieren ser homogeneizados y descontaminados previo a su cultivo, utilizando las siguientes soluciones: N-acetil-L-cisteína / NaOH; o dodecilsulfato de sodio (SDS) / NaOH; o NaOH al 4% (método de Petroff) (Pfyffer, 2003). Sin embargo, esta práctica puede matar entre el 20 y 90% de las micobacterias presentes en la muestra, y a su vez un 5% de los cultivos pueden contaminarse durante su transcurso (Pfyffer, 2003; de Kantor, 1998; Thornton *et al.*, 1998). Debido al efecto de estos procedimientos, el desarrollo de una colonia de micobacterias se consigue cuando la muestra contiene una concentración de 10 bacilos vivos / ml (Sommers, 1993). Los medios de cultivo empleados regularmente son sólidos y a base de huevos coagulados, como el Löwenstein Jensen y Stonebrink. Todas las micobacterias cultivables patógenas para el hombre se desarrollan en el primero de ellos, pero en el segundo se consiguen mejores resultados para el aislamiento de *M. bovis*, ya que como fuente de carbono tiene ácido pirúvico en vez de glicerol. Esta clase de medios se componen de combinaciones variables de huevos enteros, harina de papa, sales, glicerina o piruvato y un colorante anilínico como el verde de malaquita, para inhibir el desarrollo de las bacterias gram positivas (Sommers, 1993). Como la calidad de los ingredientes que componen el medio puede afectar la reproducibilidad de los resultados, es recomendable la utilización de medios de composición definida disponibles comercialmente, entre ellos el Middlebrook 7H10 o 7H11 (Becton Dickinson, Sparks, Md., EEUU) (Sommers, 1993). Dado que las micobacterias que producen tuberculosis son de crecimiento lento, se requieren entre cuatro y ocho semanas para obtener resultados, lapso que se puede acortar cuando se las incuba en una atmósfera con una

concentración de CO₂ entre 8 y 12%. Además, existen medios sintéticos líquidos comerciales y métodos de cultivo más avanzados como el método radiométrico BACTEC TB-460, (Becton Dickinson, Sparks, Md., EEUU) que reduce significativamente el tiempo de detección de crecimiento respecto al cultivo tradicional. Como fuente de carbono contine ácido palmítico marcado con el isótopo ¹⁴C, que es metabolizado a ¹⁴CO₂ proporcionalmente a la tasa de crecimiento de los bacilos, siendo detectado por un sensor. Sin embargo está dejando de utilizarse debido al empleo de isótopos radioactivos, surgiendo equipos con dispositivos de detección fluorescentes, como el sistema automatizado MGIT 960 (*Mycobacterial Growth Indicator Tube*) (Becton Dickinson, Sparks, Md., EEUU) (Palomino *et al.*, 2002).

1.6.1.3. Amplificación de ácidos nucleicos

Con los avances en biología molecular y el desarrollo de técnicas basadas en la amplificación de ácidos nucleicos, como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, sigla en inglés), se puso gran énfasis en este tipo de métodos para proporcionar una alternativa rápida, sensible y específica en el diagnóstico temprano de la tuberculosis. En comparación al cultivo, que demora entre 4-8 semanas, es posible reducir el tiempo del diagnóstico a 48hs, con la ventaja adicional de no depender de la viabilidad del bacilo. Numerosos métodos de PCR que utilizan para amplificar diversas secuencias blanco de ADN, fueron desarrollados y evaluados, alcanzando una sensibilidad y especificidad cercana al 100%, en aquellos especímenes con baciloscopía positiva. Algunos de los que están disponibles comercialmente son el “*M. tuberculosis Direct Test*” (*Gen-Probe*, San Diego, California), y el “*Amplicor M. tuberculosis test*” (*Roche Diagnosis System*, Inc., Branchburg, New Jersey) ambos aprobados por la Administración de Drogas y Alimentos de los EEUU (FDA) (Palomino *et al.*, 2002). A pesar de los beneficios de los métodos de amplificación de ácidos nucleicos, éstos no reemplazarán, al menos en un futuro próximo, a los métodos convencionales de diagnóstico, como la microscopía y el cultivo. Esto se debe, a la discordancia en la sensibilidad y especificidad observadas en estudios realizados entre distintos laboratorios de referencia, donde los resultados generados son indicativos de ser más dependientes del operador que del método empleado (Noordhoek *et al.*, 2004). Otro avance en el área son los recientemente desarrollados microarreglos de ADN, que fueron aplicados tanto para la identificación de especies de micobacterias como para la detección de resistencia a rifampicina. El método se basa en la hibridación de los productos amplificados por PCR marcados con un fluorocromo, a un microarreglo de ADN que contiene las sondas específicas fijadas en una matriz de vidrio en miniatura (Palomino *et al.*, 2002; Troesch *et al.*, 1999).

1.6.2. Detección indirecta

1.6.2.1. Prueba intradérmica de tuberculina

La prueba intradérmica con tuberculina, se basa en que los individuos infectados con bacilos tuberculosos, desarrollan hipersensibilidad a las proteínas del microorganismo (Joklik *et al.*, 1989). El reactivo originalmente utilizado era la “vieja tuberculina” descrita por Koch en el año 1881. Consistía en un extracto antigénicamente crudo, preparado a partir de caldos de cultivo de seis semanas de antigüedad, por ebullición, filtrado y concentración. Su purificación parcial por fraccionamiento con sulfato de amonio, dio origen al “Derivado Proteico Purificado” (PPD, sigla en inglés) que consiste en una mezcla de pequeñas proteínas con un peso molecular entre 2000 y 9000 Da. (Joklik *et al.*, 1989). La PPD tuberculina humana, se obtiene a partir de una mezcla de diferentes cepas de *M. tuberculosis*, incluida la cepa de referencia H37Rv, mientras que la bovina lo es a partir de *M. bovis* AN5, cepa aislada originalmente en Inglaterra en 1948 (Paterson, 1948). Desde 1975 fue aceptada como estándar para la producción de tuberculina bovina, debido a que el fenotipo seleccionado por repetidos subcultivos, se caracterizaba principalmente por el alto rendimiento de masa celular obtenido en medio glicerinado.

1.6.3. Diagnóstico en humanos

La baciloscopía es el examen básico para el diagnóstico y control del tratamiento de la tuberculosis humana. La examinación microscópica del esputo es un método simple, rápido, económico y directo del diagnóstico de la tuberculosis broncopulmonar, al permitir la detección de los casos bacilíferos que son los que representan mayor riesgo desde el punto de vista epidemiológico (de Kantor, 1988). También, durante el seguimiento de la respuesta de los pacientes a la terapia medicamentosa, las baciloscopías periódicas proporcionan una medición precoz y objetiva de la evolución del tratamiento, por cuantificar los bacilos en cada muestra. (Sommers, 1993). Antes de la introducción de la estreptomycinina en la terapia, el diagnóstico de la tuberculosis se hacía en base a la baciloscopía y a la sintomatología clínica, que incluye tos, pérdida de peso, sudores nocturnos y radiografía anómala de tórax. El cultivo no siempre era realizado “por no ofrecer ninguna ventaja el aislamiento del microorganismo”, mientras que el tratamiento para las distintas formas de la tuberculosis era esencialmente el mismo y consistía en hacer descansar al paciente y al órgano afectado (Sommers, 1993). En cambio, esta modalidad en el tratamiento y diagnóstico se modificaron a partir de la utilización de la estreptomycinina, ya que se hizo patente la posibilidad de selección de cepas resistentes, que para detectarlas era necesario aislarlas (Sommers, 1993). Los criterios actuales consideran que el orden prioritario de las técnicas bacteriológicas en un programa de control es el siguiente: baciloscopía, reacción a la tuberculina,

cultivo y pruebas de sensibilidad (de Kantor, 1998). La prueba de sensibilidad cutánea con tuberculina es una de las respuestas biológicas más estudiada y más cuestionada, pero es una forma práctica y confiable para demostrar la infección por el bacilo de Koch. Consiste en la aplicación de tuberculina por inyección intradérmica en el antebrazo, método de Mantoux, considerándola positiva cuando se observa una elevación pálida y discreta de la piel de 10mm de diámetro en individuos inmunocompetentes (Joklik *et al.*, 1989) y de 5mm en infectados con VIH (Hopewell, 1994). La positividad indica que el humano en algún momento de su vida tuvo contacto con una micobacteria, ya sea ambiental, tuberculosa o la misma cepa vacunal, denotando una reacción reciente o pasada, con o sin enfermedad. Sin embargo, cuando la positividad es intensa hay más probabilidad que sea debida a una infección tuberculosa señalando la existencia de bacilos vivos en el organismo. Una reacción positiva no determina el diagnóstico, pero una negativa tampoco lo excluye, estimándose que un 25% de las personas con tuberculosis tienen una intradermorreacción negativa (Hopewell, 1994). Si bien la utilidad de la tuberculina es limitada por su incapacidad de distinguir entre enfermedad activa, sensibilización anterior por contacto previo, vacunación y sensibilidad cruzada con otras especies de micobacterias, todavía se la utiliza ampliamente en la detección de la conversión a una reacción positiva en individuos recientemente vacunados, mientras que en los países donde no se vacuna es una prueba tamiz (Shinnick y Jonas, 1994). Esta prueba trascendente en el control de la tuberculosis fue adoptada por la Organización Mundial de la Salud en el año 1952. Aunque los métodos moleculares comerciales son cada vez más utilizados en el diagnóstico de la tuberculosis humana, su uso está aprobado solamente para las muestras respiratorias que tienen baciloscopia positiva. De todos modos, los avances en este campo continúan, habiéndose evaluado la PCR cuantitativa para el monitoreo de la respuesta al tratamiento (Parashar *et al.*, 2006; Desjardin *et al.*, 1998).

1.6.4. Diagnóstico en bovinos

El método primario para la detección de infección tuberculosa en el ganado vivo, es la prueba intradérmica con PPD tuberculina bovina, utilizada desde hace más de 100 años (Monaghan *et al.*, 1994). La prueba consiste en su aplicación en el pliegue anocaudal del animal y examinación del sitio de la inyección 72 horas después. En ese momento se mide la induración generada como consecuencia de la respuesta inmune celular a los antígenos de la PPD tuberculina (Wedlock *et al.*, 2002). Como alternativa algunos países utilizan la prueba doble comparativa, en la que además se aplica PPD tuberculina obtenida de *M. avium* subsp. *avium*, en un sitio diferente que la PPD bovina, estableciéndose posteriormente la diferencia entre las mediciones de las dos induraciones (Wedlock *et al.*, 2002). Los programas de erradicación de la tuberculosis bovina,

establecen que todo animal positivo a la prueba sea separado del rebaño y sacrificado. El estudio bacteriológico se destina a la confirmación de las lesiones compatibles con tuberculosis encontradas durante la inspección en matadero. La prueba de la tuberculina es segura y de bajo costo, con una sensibilidad aproximada que oscila entre 70 y 75% (Wedlock *et al.*, 2002) y una especificidad estimada entre el 96 y 99% (Monaghan *et al.*, 1994). Sin embargo, las PPDs tuberculinas pueden ocasionar reactantes falsos positivos, por estar constituidas por una gran variedad de antígenos, muchos de los cuales están altamente conservados en varias especies de micobacterias (Monaghan *et al.*, 1994). También puede haber reactantes falsos negativos asociados a inmunosupresión inicial, razón por la cual la prueba no debe ser repetida dentro de los 60 días de su aplicación, anergia debido a estados caquéuticos inmunodeficientes, presencia de otras infecciones concomitantes y otros factores como malnutrición, lactancia y gestación (Radunz y Lepper, 1985; Doherty *et al.*, 1995; Wedlock *et al.*, 2002). Además, hay que considerar los problemas de índole técnico como el uso de tuberculinas de baja potencia e incorrecta dosificación, aplicación y lectura. Otros métodos también miden la respuesta inmune celular pero *in vitro*, como el dosaje de interferón gamma (IFN- γ) en sangre entera. Consiste en medir la liberación de IFN- γ al plasma, por parte de los linfocitos sensibilizados, previa estimulación con un antígeno, generalmente PPD tuberculina bovina. Esta prueba tiene una sensibilidad del 85% y una especificidad del 93%, aunque debido al costo su aplicación no es viable como método de tamizaje en países con alta prevalencia de la enfermedad (Wood *et al.*, 1992; Wedlock *et al.*, 2002). En Nueva Zelanda fue aprobada para reevaluar tanto a los animales con reacción negativa a la tuberculina, como a los positivos sospechados de reaccionar inespecíficamente a la intradermoreacción (Wedlock *et al.*, 2002). Presenta una serie de ventajas respecto de la tuberculinización, debido a que no se requiere una segunda inmovilización del ganado para la lectura del resultado, no compromete al sistema inmune del animal por no haber inoculación de antígenos, pudiéndose repetir el ensayo cuando sea necesario y tiene mayor objetividad (Hanna *et al.*, 1992). Las pruebas serológicas desarrolladas para la detección de anticuerpos circulantes de *M. bovis*, no tienen una sensibilidad y especificidad apropiadas, debido a que a el bovino infectado desarrolla una efectiva respuesta inmune celular pero una baja respuesta humoral (Wedlock *et al.*, 2002). Por otra parte, los métodos indirectos de diagnóstico, no pueden aplicarse sobre cualquier tipo de muestra y como se comentó previamente, aunque el método de elección es el cultivo, además de ser extremadamente lento, el proceso de decontaminación de la muestra de la flora acompañante ocasiona hasta un 90% de pérdida en la viabilidad de los bacilos, reduciendo notablemente la recuperación de *M. bovis* sobre todo de aquellas muestras paucibacilares (de Kantor, 1998; Thornton *et al.*, 1998). En este contexto, se desarrollaron distintas variantes de la

técnica de PCR, como alternativa más rápida, sensible y específica de detección de *M. bovis* en este tipo de muestras (Cornejo *et al.*, 1998; Vitale *et al.*, 1998; Zanini *et al.*, 1998; Antognoli *et al.*, 2001; Perez *et al.*, 2002a; Zumárraga *et al.*, 2005; Zumárraga *et al.*, 1999a). Si bien el proceso de pasteurización, asegura la obtención de un producto apto para el consumo porque inactiva al bacilo, éste, aunque muerto, permanece en el alimento. De esta manera, debido a las características inherentes de la técnica de PCR, al no diferenciar entre bacilos vivos o muertos, podría utilizarse en carácter de control de calidad del alimento. Existen distintas estrategias mediante las cuales es posible incrementar la sensibilidad y especificidad de la técnica de PCR. Una ellas, consiste en la modificación del ciclo de amplificación regularmente utilizado, iniciando la reacción con un marcado incremento de la astringencia de la misma. Para esto, se selecciona la temperatura de hibridación de los iniciadores por encima de la óptima, para posteriormente disminuirla progresivamente en los ciclos sucesivos, hasta que finalmente el ciclo de amplificación se completa a la temperatura de hibridación de los iniciadores, calculada según su composición de nucleótidos. Este tipo de programa de ciclado denominado “*Touch-Down*” (Hecker y Roux, 1996; Larsen *et al.*, 2002; Roux, 1994) recientemente fue aplicado para el diagnóstico de la tuberculosis (Zumárraga *et al.*, 2005). Con el incremento de la especificidad de la reacción, también se logra un incremento en la sensibilidad, ya que se enriquece la formación del producto de amplificación específico, posibilitando la eliminación de bandas inespecíficas, que coamplifican ante la presencia de gran cantidad de ADN de células somáticas o de ADN proveniente de purificaciones poco efectivas. Otra táctica es la de PCR anidada (*Nested PCR*, en inglés) en la que se realiza una segunda amplificación con oligonucleótidos iniciadores internos a la secuencia blanco de la primera reacción, utilizando como templado al producto de la primera ronda de PCR. De este modo la sensibilidad de la reacción se incrementa al realizar dos rondas de amplificación consecutivas, mientras que la especificidad al seleccionar otra secuencia blanco. Si bien el procedimiento de manipulación de productos de PCR puede facilitar la contaminación de la reacción, puede adoptarse una estrategia para mantener en un mismo tubo de reacción los reactivos necesarios para las dos rondas de PCR. Para esto, los reactivos para la segunda amplificación se incluyen en cera y se los dispone en la tapa del tubo. Al finalizar la primera PCR, por centrifugación los reactivos se ponen en contacto con el templado, y se dispone el tubo en el termociclador para proseguir con la segunda ronda de amplificación (Antognoli *et al.*, 2001). En consecuencia, los avances en biología molecular, condujeron al desarrollo de técnicas alternativas para el diagnóstico temprano de la tuberculosis, que con el criterio adecuado, podrán resolver aquellos casos dudosos, generados a partir de los métodos de diagnóstico tradicionales.

1.7. Tratamiento de la tuberculosis humana y resistencia a drogas

En el año 1994 la OMS recomendó como componente central de la estructura del plan de control de la tuberculosis en humanos, el tratamiento acortado estrictamente supervisado. Su esquema consiste en la administración simultánea durante una fase intensiva, de tres tuberculostáticos, rifampicina, isoniacida y pirazinamida, seguido de otra fase de sostén con rifampicina e isoniacida, hasta completar seis meses bajo estricta supervisión médica. La monoterapia debe evitarse para prevenir la selección de mutantes, siendo la probabilidad que un bacilo presente resistencia a una droga, el producto de las probabilidades de resistencia a cada una de ellas (Iseman, 2000b). La resistencia a antibióticos en *M. tuberculosis* se debe a mutaciones en genes cromosomales, a diferencia de lo que ocurre en la mayoría de las bacterias patógenas en las cuales es mediada por plásmidos (Sreevatsan *et al.*, 1997). Se considera que una cepa de *M. tuberculosis* es resistente a múltiples drogas o multirresistente, cuando lo es a isoniacida y rifampicina, pudiendo además tener resistencia a otras drogas antituberculosas (Palmero *et al.*, 2001). Por otra parte, las formas de resistencia pueden clasificarse en primaria, observada principalmente en las epidemias de tuberculosis MDR entre pacientes con VIH/SIDA, y adquirida detectada en aquellos que inicialmente tuvieron aislamientos con organismos susceptibles y que por tratamientos inadecuados logran seleccionar mutantes resistentes (Gangadharam *et al.*, 1998; Palmero *et al.*, 2001). Los mecanismos involucrados en la resistencia a las cinco drogas de primera línea, rifampicina, isoniacida, pirazinamida, estreptomycinina y etambutol, se resumen a continuación (tabla 3).

Tabla 3: Mecanismos de resistencia a las drogas tuberculostáticas de primera línea.

Droga	Mecanismos de acción	Genes involucrados	Función	Frecuencia (%) de mutaciones en <i>M. tuberculosis</i> resistente
Rifampicina	Inhibición de la transcripción	<i>rpoB</i>	Blanco de droga	96-100
Isoniacida	Inhibición de biosíntesis de ácidos micólicos y metabolismo de NAD	<i>katG</i> <i>inhA</i> <i>ahpC</i>	Conversión a prodrogas. Blanco de droga Marcador de resistencia	42-58 21-34 10-15
Pirazinamida	Acidificación del citoplasma, inhibición de síntesis de ácidos grasos	<i>pncA</i>	Conversión a prodroga	72-97
Estreptomycinina	Inhibición de síntesis de proteínas	<i>rpsL</i> <i>rrs(16SARN)</i>	Blanco de droga Blanco de droga	52-59 8-21
Etambutol	Inhibición de síntesis de arabinogalactano	<i>embCAB</i>	Blanco de droga	47-65

ND: No Determinado (Adaptado de Zhang y Telenti, 2000).

Entre el 96 y 100 % de los casos de resistencia a rifampicina, se produce por mutaciones específicas en el gen *rpoB*, que codifica para la subunidad beta de la ARN polimerasa ADN

dependiente, impidiendo la formación del ARN mensajero por inhibición de la polimerasa. En la actualidad, es posible detectar rápidamente tales mutaciones por las técnicas de hibridación reversa, Rifoligotyping e “INNO-Lipa *Mycobacteria line probe assay*” (LiPA; Innogenetics, Zwijnaarde, Bélgica) (Palomino *et al.*, 2002; Pfyffer, 2003). Mayormente la resistencia a isoniácida surge como resultado de la pérdida de la actividad catalasa codificada por el gen *katG*, impidiendo la conversión a su metabolito activo. Sin embargo, aunque en menor grado, también se encontraron mutaciones en genes que intervienen en la síntesis de ácidos micólicos de la pared celular como el *inhA*, que codifica para la NADH enoil ACP reductasa. El empleo de la pirazinamida permitió acortar el tiempo de tratamiento, debido a la propiedad de inhibir el desarrollo de la población de bacilos en estado de latencia en un medio ambiente ácido. Para ser activa requiere ser hidrolizada por la enzima pirazinamidasa, codificada por el gen *pncA*. Las mutaciones en dicho gen, causan la pérdida de su actividad, constituyendo el principal mecanismo de resistencia a la droga. Aunque *M. bovis* es resistente natural a la pirazinamida, recientemente se describió la subespecie *M. bovis* subsp. *caprae*, caracterizada por su sensibilidad (Aranaz *et al.*, 2003). La estreptomycinina se une en forma irreversible a la subunidad 30S del ribosoma de la bacteria, inhibiendo así la síntesis de proteínas. La forma principal de resistencia (50%) se debe mutaciones en el gen *rpsL* que codifica para la subunidad 12 (S12) de la proteína ribosomal. El segundo mecanismo de resistencia (20%), involucra al locus *rrs*, que codifica para 16S rARN. Por último, el etambutol inhibe la síntesis de arabinogalactano, el principal polisacárido de la pared celular. Las mutaciones en el operón *embCAB*, que codifica para múltiples arabinosiltransferasas, provocan el 65% de los casos de resistencia a la droga en *M. tuberculosis* (Zhang y Telenti, 2000).

Frente a la presencia de un paciente con tuberculosis multirresistente, el tratamiento se realiza en base a drogas alternativas a las de primera línea, teniendo como criterio de suspensión de la terapia, un año con bacteriología reiteradamente negativa (Palmero *et al.*, 2001). El tratamiento incompleto no solo favorece la selección de cepas resistentes, sino que también extiende el período infeccioso del paciente, que puede conducir a la generación de nuevos casos, por lo que la prioridad en el control de la tuberculosis es incrementar la proporción de curación, para interrumpir la cadena de transmisión (de Boer *et al.*, 2003a). No obstante, los principales grupos poblacionales que son de alto riesgo en abandonar el tratamiento, como los prisioneros, alcohólicos, drogadictos e indigentes, también lo son en la transmisión de la enfermedad (de Boer *et al.*, 2003a). Desde el inicio de la epidemia del VIH/SIDA, se informaron casos de tuberculosis MDR producidos por cepas de *M. tuberculosis* y de *M. bovis*, con baja respuesta a la terapia y elevadísima mortalidad (Blazquez *et al.*, 1997; Samper *et al.*, 1997; Cosivi *et al.*, 1998; Palmero *et al.*, 2001; Rad *et al.*, 2003). Muchos de esos brotes estuvieron asociados a un genotipo particular,

como el caso de las cepas *M. tuberculosis* de la familia “W-Beijing”(Rad *et al.*, 2003). La cepa *M. tuberculosis* W se detectó en aislamientos de Nueva York, en el año 1990, mientras que un grupo similar se identificó en 1995 en Beijing, China, donde se describió una familia de cepas que agrupaba al 85% de los aislamientos de la región (Kremer *et al.*, 2004). Ambos grupos representan una misma familia de cepas de *M. tuberculosis*, con alta asociación entre genotipo y resistencia a drogas, denominada en conjunto familia W-Beijing (Kremer *et al.*, 2004; Bifani *et al.*, 2002). Además se caracteriza por tener mutaciones sin sentido en tres genes, involucrados en la reparación del ADN, lo que podría explicar la capacidad que tienen estas cepas para adaptarse rápidamente a las condiciones de estrés del medio ambiente (Rad *et al.*, 2003). Aparte, dicho polimorfismo, único y característico de este linaje, pudo ser adquirido de manera secuencial, explicando una posible forma de evolución de esta familia. Otro caso relevante de tuberculosis multiresistente pero debida a *M. bovis*, ocurrió en España entre los años 1993 y 1995, cuando se registraron dos brotes epidémicos ocasionados por una cepa resistente a once drogas en pacientes con VIH/SIDA, de dos hospitales diferentes, episodio que se constituyó en el primer reporte de transmisión de *M. bovis* MDR entre humanos (Blazquez *et al.*, 1997; Samper *et al.*, 1997). Para comprender el modo en que se seleccionaron estas mutantes de *M. bovis* MDR, como antecedente, en España, entre los años 1950 y 1960, era común la administración de isoniacida al ganado para promover su crecimiento, práctica que podría haber facilitado la aparición de mutantes resistentes a la droga. Se ha postulado que la transmisión de estas cepas al hombre, identificadas erróneamente como *M. tuberculosis* y la aplicación del tratamiento recomendado para *M. tuberculosis* con isoniacida, rifampicina y pirazinamida (para el cual *M. bovis* es resistente natural), habrían ejercido el mismo efecto que la monoterapia con rifampicina, conduciendo a la selección de cepas de *M. bovis* MDR (Romero *et al.*, 2006).

1.8. Plan Nacional de Control y Erradicación de la tuberculosis bovina

La mayoría de los países desarrollados implementaron campañas para erradicar *M. bovis* del ganado, teniendo por incentivo evitar la transmisión zoonótica y las pérdidas ocasionadas en la producción (Wedlock *et al.*, 2002). Las estrategias de control de la enfermedad en bovinos cuenta con dos herramientas clásicas, la reactividad cutánea a la prueba tuberculínica en el animal en pie y la detección *post-mortem* de lesiones compatibles con tuberculosis en frigoríficos (Ritacco *et al.*, 2005). Además, para que la implementación de un programa de inicio reciente sea satisfactorio, debe contemplarse un enfoque integrador de la enfermedad, donde se coordinen estrechamente los servicios de salud, tanto humana como animal, y exista además una evolución dinámica de las estrategias utilizadas. Asimismo, es necesario complementar los métodos de diagnóstico

tradicionales con otros de mayor eficiencia, aplicados en el contexto de estándares rigurosos. También deben establecerse sistemas de identificación y registro de animales, vigilancia, investigación epidemiológica y laboratorios de referencia (Canal, 2001). Apremiada por problemas zoonosarios agudos, Argentina reaccionó tardíamente frente a esta enfermedad crónica, que no presenta signos alarmantes, como aborto o una caída abrupta en la producción. Como causa y efecto de esta situación, el productor se encuentra mal informado, y cuando consulta a algún servicio sanitario sobre tuberculosis, es común que la incidencia en el rodeo sea muy alta. En el año 1998, entró en vigencia el “Plan Nacional de Control y Erradicación de la Tuberculosis bovina”, según resolución SENASA N° 115/99, cuyo objetivo inicial principal consistió en la erradicación de la tuberculosis en los tambos de las cuencas lecheras, en combinación con las usinas pasteurizadoras. Posteriormente el saneamiento y certificación también se extendieron a los rodeos de cría, pretendiendo así controlar la tuberculosis, en forma regionalizada y por etapas sucesivas hasta su erradicación definitiva de todo el país (Torres, 2006). La prueba oficial del Plan es la intradermorreacción con PPD tuberculina bovina. La certificación de “rodeo libre de tuberculosis bovina”, es otorgada a aquellos cuyos animales hayan reaccionado negativamente a dos pruebas tuberculínicas consecutivas, con un intervalo no menor de 60 a 90 días, independientemente de los resultados. El certificado se renueva anualmente, previa prueba tuberculínica negativa de todos los animales del rodeo. En caso de comprobarse animales reactivos o sospechosos, dicho certificado queda en suspenso hasta tanto se aclare la situación del rodeo por medio de exámenes *post-mortem*, seguidos de la comprobación bacteriológica de *M. bovis* en las muestras seleccionadas (SENASA, 1994). En marzo de 2002, la provincia de Entre Ríos tomó la iniciativa de diseñar un “Plan piloto de vigilancia epidemiológica de tuberculosis bovina en frigoríficos y mataderos de inspección nacional y provincial” con la intervención de diversos organismos oficiales. El mismo establece como objetivo general incorporar al sistema de vigilancia de la provincia, la información provista por los servicios de inspección veterinaria de los frigoríficos con inspección nacional de todo el país. La estrategia consiste en que seguidamente a la detección y confirmación bacteriológica de las lesiones halladas en frigoríficos y mataderos, se utilicen los sistemas de trazabilidad correspondiente para la identificación del rodeo de origen, tuberculizando además a todos los animales considerados como contactos.

1.9. Panorama de la tuberculosis bovina en Argentina

Las primeras evidencias documentadas de la existencia de tuberculosis bovina en Argentina datan de principios del siglo XX (Anónimo, 1906). Las pérdidas anuales que ocasiona la enfermedad en el país, se estiman en 63 millones de pesos en promedio, distribuidas de la

manera siguiente: 9% en decomisos parciales o totales de reses afectadas, 36% en peso de los animales afectados detectados en faena, 18% en peso de los animales no detectados en faena, 12% en la producción de terneros, 13% en la producción de leche, 6% en costos de la pruebas tuberculínicas a campo y 1% en tratamiento de casos humanos (SENASA, 2006). En 1972, se efectuó una encuesta tuberculínica por muestreo a nivel nacional, que arrojó una prevalencia media por animal del 4,3% mientras que por rodeo del 38% (de Kantor *et al.*, 1994); desde entonces no se realizó otro relevamiento de semejante magnitud. La Comisión Nacional de Zoonosis en el año 1982, estimó que en promedio estaban infectados un 4,3% del ganado bovino y un 4,1% del porcino, con variaciones regionales. Por otra parte, en un muestreo realizado en frigoríficos de la provincia de Santa Fe durante 1994, encontraron lesiones macroscópicas compatibles con tuberculosis en el 12 % de los animales faenados (Latini, *et al.*, 1997). No obstante, el hallazgo de lesiones en los frigoríficos con inspección veterinaria federal de todo el país, descendió en forma sostenida, y según la información suministrada por el área estadística de la Dirección de Contralor del SENASA, sobre un promedio de faena anual de 10 millones de bovinos, las tasas de prevalencia de TBB detectada en el período 1969-2005 fluctuó entre 6,7 % y 1,2% respectivamente. Además, los establecimientos libres de tuberculosis bovina, pasaron de sumar 44 en el año 1995, a 5663 en 2005 (Torres, 2006).

1.9.1. Animales domésticos y de producción afectados por la enfermedad

Los porcinos son muy susceptibles a las infecciones por *M. bovis*, complejo *M. avium* y *M. tuberculosis*, aunque en Argentina el 90% de los casos son atribuidos a *M. bovis*. La infección suelen adquirirla por vía oral, a través del consumo de leche bovina cruda, reflejando la prevalencia de la enfermedad de la población bovina local. Entre 1969 y 2005, sobre un promedio de faena anual de 1.5000.000 a 1.700.000 porcinos, la tasa de decomisos por TB en frigoríficos, fluctuó entre el 8,4% y 0,7% respectivamente (Torres, 2006). Esta caída fue debida a los cambios producidos en la producción, pasando de un modelo tradicional de tipo familiar que contemplaba a chacras y pequeños establecimientos, donde convivían distintas especies animales con alto riesgo de contaminación por mal manejo higiénico sanitario, a uno del tipo industrializado y a gran escala, con incorporación de nuevas tecnologías de producción y mejores condiciones sanitarias (Torres, 2006; Ottavianoni *et al.*, 1986).

La tuberculosis en cabras, no fue suficientemente caracterizada en Argentina, debido a que tradicionalmente se sostuvo su “resistencia” a la enfermedad (Underwood *et al.*, 2001). La clásica cría caprina en Argentina, estuvo relegada a regiones áridas y marginales, manejadas con un sistema extensivo y destinada a la producción de carne. Pero en los últimos años se orientó a un

sistema lechero intensivo, incrementándose así la crianza artificial del cabrito alimentado con leche de vaca, situación que aumenta el riesgo de transmisión de la enfermedad, sobre todo cuando la leche proviene de rodeos sospechosos y no recibe tratamiento térmico previo (Martínez Vivot *et al.*, 1999). En estas circunstancias, surge la necesidad de incorporar a esta especie en los planes regionales de control y erradicación de la enfermedad (Torres, 2006).

Entre los animales domésticos, los gatos son los más susceptibles a la tuberculosis de origen bovino (Underwood *et al.*, 1999). El curso de la enfermedad es diferente al que se presenta en los bovinos, llevando a una generalización precoz de la infección conduciendo que conduce a la muerte del animal. Los signos clínicos son inespecíficos y los órganos afectados son diversos: linfónodos, intestino, pulmón, pleura, riñón, hígado y cerebro. Como las normativas del Plan, indican que no debe aplicarse la prueba tuberculínica en estos animales, la confirmación de la sospecha clínica, debe realizarse por cultivo a partir de las distintas secreciones u órganos (Jorge *et al.*, 2004). Se estima que la principal fuente de infección de los gatos domésticos es la ingesta de pulmón bovino “bofe” y de hígado, ya que son administrados sin cocción previa, representando un riesgo adicional para el hombre por la transmisión zoonótica de la enfermedad (Colmegna *et al.*, 2004; Fernández y Morici, 1999; Underwood *et al.*, 1999).

1.9.2. Transmisión zoonótica de *Mycobacterium bovis* en el país

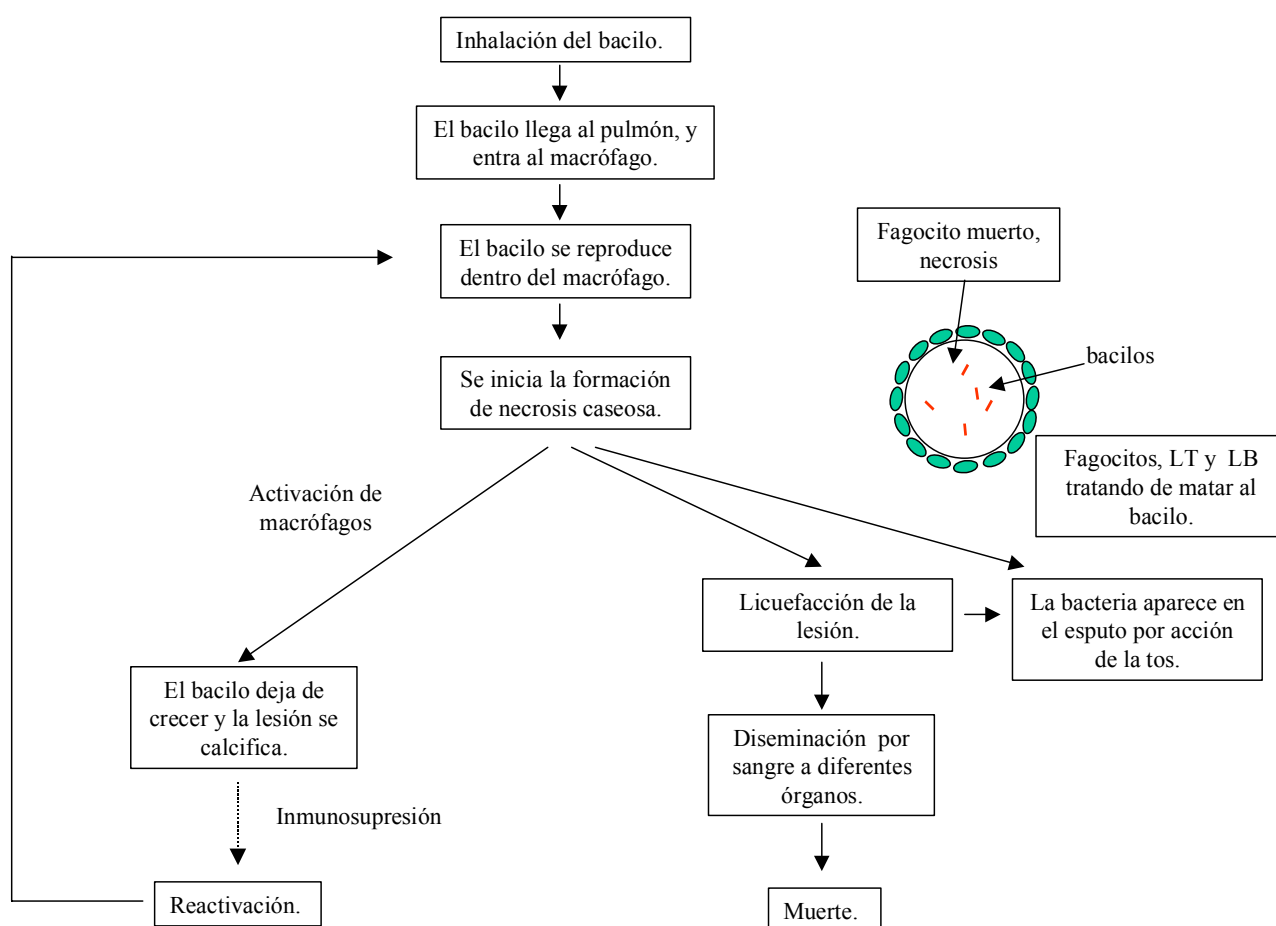
En Argentina se desconoce el total de casos de tuberculosis causada por *M. bovis*, como consecuencia de no realizar cultivo en todas las ocasiones. Sin embargo, la proporción de casos de TBC debida a *M. bovis*, es estimada a partir de la información suministrada por algunos de los laboratorios que conforman la red de tuberculosis, que para determinar la resistencia a antibióticos, realizan los cultivos en forma sistemática a la mayoría de las muestras que reciben, tipificando a su vez todos los aislamientos obtenidos. En un estudio efectuado con la participación de 15 laboratorios de las principales zonas ganaderas del país, se determinó que en el período 1982-1984, el 0,47% de todos los casos de tuberculosis diagnosticados por cultivo eran causados *M. bovis*. El rango osciló entre un 1,97% en la provincia de Santa Fe y un 0,04% en el noreste del país, con un 0,5% en Buenos Aires y sin casos en el noroeste y sur del país. Por otra parte, entre los años 1984 y 1989, *M. bovis* causó del 2,4 al 6% de los casos de tuberculosis en seres humanos de la provincia de Santa Fe, con una considerable diferencia en la prevalencia entre el sexo masculino y femenino, ya que el 83% fueron varones y a su vez el 65% estuvieron vinculados a la actividad pecuaria (peones rurales, empleados de frigorífico, transportistas, veterinarios, etc.) (Latini *et al.*, 1990). Cabe mencionar, que esta provincia concentra al 21% del ganado lechero y genera el 34% de la producción lechera del país. En nuestro país la enfermedad humana tiene

localización pulmonar y se asocia a la exposición laboral, debiéndose considerar no solo el sufrimiento humano, sino también las pérdidas económicas producidas por los costos de atención médica y lucro cesante, por ocurrir en plena edad productiva. Actualmente, la tendencia general en los seres humanos es decreciente, probablemente como efecto del descenso en la prevalencia en bovinos observada en los últimos años (Ritacco y de Kantor, 2006).

1.10. Breve descripción de la patogénesis de la enfermedad

La infección por *M. tuberculosis* es un proceso complejo que ocurre en distintas etapas y es el resultado de las propiedades inherentes de la micobacteria y del hospedador. La principal defensa del pulmón contra el bacilo de la tuberculosis es el macrófago alveolar, ya que cuando son activados por los linfocitos T (LT) y otros efectores pueden matarlo (figura 3).

Figura 3: Etapas de la patogénesis de la tuberculosis



(Adaptado de Salyers y Whitt, 1994).

La interacción inicial entre la micobacteria y el macrófago provoca una respuesta inmune mediada por LT colaboradores CD4⁺ y citotóxicos CD8⁺ (Salyers y Whitt, 1994). La contribución esencial de los LT CD4⁺ proviene de la subpoblación CD4⁺ (Th1), que al liberar INF- γ estimulan la activación de los macrófagos y la unión de las células endoteliales con los LT, que migran desde el torrente sanguíneo a los tejidos adyacentes para converger en el área afectada. Los LT CD8⁺, destruyen a los fagocitos infectados que no pudieron detener el crecimiento de los bacilos, para luego ser ingeridos y matados por los macrófagos activados. En general, la infección por exposición a un número de bacilos relativamente bajo es contenida por los macrófagos activados, antes de que se produzca el daño en el parénquima pulmonar (Salyers y Whitt, 1994). En este estadio de la infección, llamado fase de latencia, el bacilo persiste dentro del hospedador relativamente inactivo, conservando su potencial para su posible reactivación ante una situación de inmunosupresión (Glickman y Jacobs, 2001). Precisamente las infecciones latentes representan uno de los principales obstáculos en el control de la tuberculosis a nivel mundial (Flynn y Chan, 2001). Cuando no es posible desarrollar una rápida respuesta inmune, los macrófagos activados no aparecen sino hasta después instaurado el proceso de la enfermedad y mientras tanto los bacilos continúan creciendo dentro de los macrófagos pulmonares. Como la infección no puede ser resuelta, nuevas células T, polimorfonucleares y macrófagos, se acumulan en torno de los sitios donde se desarrolla el bacilo. Los macrófagos se fusionan y forman células gigantes multinucleadas, rodeadas de una capa de macrófagos y LT, conformando un foco de daño tisular llamado granuloma, que contiene a los bacilos. Si bien el fagocito no es capaz de matar al bacilo, los LT y los macrófagos limitan el crecimiento de la lesión con una delgada cubierta de fibrina, que al calcificarse puede visualizarse con Rayos X. Pero cuando cuando los fagocitos no pueden matar a los bacilos, se provoca cada vez más daño tisular, tanto por la liberación de enzimas lisosomales, como por la producción de factor de necrosis tumoral alfa (Salyers y Whitt, 1994). En consecuencia, muchos de los síntomas de la enfermedad, inclusive la destrucción tisular, son mediados por la respuesta del hospedador contra el bacilo, más que por la bacteria en sí misma (Glickman y Jacobs, 2001). Las áreas donde los bacilos continúan en crecimiento adquieren una consistencia densa como “el queso”, denominada necrosis caseosa, que puede avanzar licuificándose. Mientras que en la lesión caseosa los bacilos se hallan contenidos, en la licuificada pueden alcanzar otras partes del cuerpo dando a lugar a la forma diseminada de la enfermedad. Además, este es el estadio más contagioso por la facilidad de eliminar bacilos a través de la expectoración. Aunque el sistema inmune pudiera contener la infección, como en el granuloma puede haber bacilos en estado de latencia, ante una situación de inmunosupresión pueden desarrollarse nuevamente y ocasionar un nuevo episodio de enfermedad, con los mismos síntomas

y tan contagiosa como la tuberculosis primaria (figura 3) (Salyers y Whitt, 1994). Recientemente se comprobó la variabilidad en la patogenicidad de distintas cepas de *M. tuberculosis*, por la evaluación de la patología y la respuesta inmune en modelo murino (López *et al.*, 2003; van Soolingen *et al.*, 2003). La sobrevivencia de los ratones infectados con una cepa de *M. tuberculosis* del genotipo W-Beijing, fue notoriamente menor respecto a la de las cepas de referencia Erdman y *M. tuberculosis* H37Rv. Además la cepa *M. tuberculosis* genotipo W-Beijing, indujo una severa patología pulmonar aunque una insignificante respuesta inmunológica (van Soolingen *et al.*, 2003). Sumada a esta experiencia, en Indonesia se observó que los pacientes infectados con esta cepa fueron dos veces más propensos a exhibir una respuesta febril (van Soolingen *et al.*, 2003).

1.11. Modelos animales

El estudio del curso de la enfermedad no cuenta con modelos animales adecuados, por no poder reproducirse el estado de latencia (Glickman y Jacobs, 2001). Esto explica la dificultad de crear modelos animales que representen una infección paucibacilar, resultante de la contención del sistema inmune del hospedador (Nuermberger *et al.*, 2004; Flynn y Chan, 2001). Sin embargo, se utiliza al modelo murino por su capacidad de generar respuestas inmunológicas fuertes, su facilidad en el manejo y por la existencia de líneas bien caracterizadas (Glickman y Jacobs, 2001). El otro modelo ampliamente aprovechado es el del cobayo (*Cavia porcellus*) debido a sus semejanzas con los procesos patológicos que ocurren en el humano (Lasco *et al.*, 2004). La fisiología del aparato respiratorio y especialmente la respuesta del pulmón ante un estímulo inflamatorio, es bastante similar a la del humano (Mc. Murray, 1994). Luego de la exposición a la infección, este animal desarrolla una respuesta inflamatoria potente, caracterizada por una afluencia de linfocitos y fagocitos mononucleares, seguido más lentamente por un incremento de necrosis, fibrosis y mineralización de las lesiones, y culmina muriendo transcurridas entre 15 y 20 semanas posteriores a la infección (Lasco *et al.*, 2004). El cobayo es usado regularmente para evaluar la potencia y estandarización biológica de la tuberculina y ensayar nuevas drogas para el tratamiento de la enfermedad (Mc. Murray, 1994).

1.12. Epidemiología molecular

La epidemiología aplicada a la microbiología se ha enriquecido con la utilización de técnicas de biología molecular, destinadas a la tipificación de microorganismos en base a sus características genéticas. Esta disciplina se denomina epidemiología molecular y contempla estudios con distintos enfoques, como la identificación de la distribución de los microorganismos, la vigilancia epidemiológica de las enfermedades infecciosas y la evolución, entre otros.

Los métodos de tipificación clásicos son los fenotípicos, que se basan en las características expresadas por el organismo (susceptibilidad a antimicrobianos, pruebas bioquímicas, serotipificación, tipificación con bacteriófagos, etc.), mientras que los genotípicos estudian directamente su contenido genético, “Análisis por Endonucleasas de Restricción” (REA, sigla en inglés); perfiles plasmídicos; ribotipificación; PCR; “Electroforesis en Campos Pulsados” (PFGE, sigla en inglés); microarreglos; secuenciación; etc.) (Maslow y Mulligan, 1996). El sistema o método de tipificación no debe dar resultados ambiguos, debe ser reproducible, estable y suficientemente discriminativo para poder diferenciar aislamientos no relacionados. Además debe contemplarse el costo, disponibilidad, rapidez y requerimientos de índole técnico (tipo de equipamiento, entrenamiento y facilidad en la interpretación de resultados) (Maslow y Mulligan, 1996). La utilidad de un marcador molecular particular se relaciona con la estabilidad en la cepa y la diversidad dentro de la especie (Maslow *et al.*, 1993). Además, considerando un período de transmisión reciente, la proporción de cambios debe ser suficientemente alta para asegurar que la mayoría de los casos no relacionados tengan patrones diferentes, pero suficientemente baja para asegurar perfiles o patrones idénticos entre aislamientos relacionados (Warren *et al.*, 2002b). Consecuentemente, al detectar esos cambios se identificará un nuevo clon, contrariamente a lo que sucedería si la mutación ocurre en una región del genoma que el método utilizado no contempla (Durr *et al.*, 2000). El número de mutaciones que ocurren entre dos cepas, puede definirse por un índice conocido como distancia genética, que puede utilizarse como indicador del tiempo de evolución transcurrido a partir de la divergencia de un ancestro común. De este modo, si el tiempo transcurrido desde la divergencia es prolongado, la probabilidad de acumulación de mutaciones será alta y la distancia genética será grande, como reflejo de la diferenciación generada durante la evolución (van der Spuy *et al.*, 2003; Warren *et al.*, 2002b). El fundamento de la genotipificación se basa en el modelo de expansión clonal resultante de la reproducción asexual, de modo que una bacteria pasaría a un segundo hospedador reteniendo su mismo perfil genético (Warren *et al.*, 2002b). Con este modelo es razonable aceptar que los casos agrupados en un mismo perfil son parte de la misma cadena de transmisión reciente, vinculados directa o indirectamente a una fuente común, mientras que si la diseminación ocurre a partir de fuentes independientes los perfiles serán diferentes (Durr *et al.*, 2000; Glynn *et al.*, 1999). Al estudiar las cepas aisladas de una misma persona en distintos episodios de enfermedad, puede diferenciarse entre reactivación de una infección latente y reinfección exógena, siempre que en la población exista una diversidad genética suficiente. En la reactivación los aislamientos tendrán el mismo perfil, mientras que en la reinfección, como ocurren eventos de infección independientes, los perfiles serán diferentes (Warren *et al.*, 2002a; Durr *et al.*, 2000). Además, cuando en estudios poblacionales aparecen

perfiles únicos (no detectados en otros aislamientos), se estima que también pueden deberse a reactivaciones de infecciones latentes adquiridas en el pasado (Warren *et al.*, 2002 a y b). En otros casos, las relaciones epidemiológicas no pueden ser dilucidadas, debido a que es imposible establecer todas las conexiones posibles entre los hospedadores involucrados y los contactos casuales (Glynn *et al.*, 1999). La genotipificación de aislamientos de *M. tuberculosis* y *M. bovis*, es ampliamente utilizada como herramienta en investigaciones de transmisión dinámica ante brotes epidémicos, transmisión zoonótica y otros aspectos de la epidemiología de la enfermedad. Entre las diversas aplicaciones, se encuentra la detección de contaminaciones que ocurren durante el proceso de colección y procesamiento de muestras clínicas, o del instrumental médico como broncoscopios, que conducen a la generación de un cultivo positivo (Rodrigues *et al.*, 2007; de Boer *et al.*, 2002; Perfecto *et al.*, 2000; de C. Ramos *et al.*, 1999). Esta situación provoca serios problemas para el paciente, no solo porque es sometido a un tratamiento innecesario con drogas potencialmente tóxicas, sino por lo que respecta a su entorno social, ocasionando además un costo innecesario al sistema sanitario. El criterio para sospechar la existencia de contaminación cruzada, es la presencia de una muestra con baciloscopía negativa y cultivo positivo, que haya sido procesada junto a otras con baciloscopía fuertemente positiva, en el mismo lote y período. En Holanda, durante el período 1993-2000, se registraron un 2,4% de cultivos de *M. tuberculosis* falsos positivos (de Boer *et al.*, 2002). También, mediante estudios poblacionales, es posible vigilar el curso de las campañas de control, pudiendo detectar los cambios en la heterogeneidad de los patrones de los aislamientos estudiados. Así en las regiones donde la tuberculosis no es endémica, los patrones son más polimórficos y menos relacionados, que en aquellas donde la tasa de transmisión es alta (van Soolingen *et al.*, 1991).

1.12.1. Técnicas y aplicaciones de la tipificación molecular de micobacterias

Tradicionalmente las micobacterias se caracterizaban fenotípicamente, pero las técnicas empleadas para ello, además de dificultosas no eran suficientemente resolutivas y la diferenciación entre cepas era muy limitada (Collins *et al.*, 1994). Estos problemas conducían a distintos tipos de errores, pudiendo citarse como claro ejemplo un brote de tuberculosis en un nosocomio de París provocado por una cepa de *M. tuberculosis* MDR, que fue equivocadamente atribuido a una cepa de *M. bovis*, mal caracterizada fenotípicamente (Bouvet *et al.*, 1993; Gutiérrez *et al.*, 1999; Sales *et al.*, 2001). La primera técnica que pudo detectar diferencias genómicas en aislamientos de *M. bovis* fue el REA (Collins y de Lisle, 1985). Esta consiste en la digestión del ADN con enzimas de restricción de baja frecuencia de corte, para obtener fragmentos de gran tamaño y facilitar la interpretación al separarlos por electroforesis en agarosa, donde el número y tamaño de las bandas

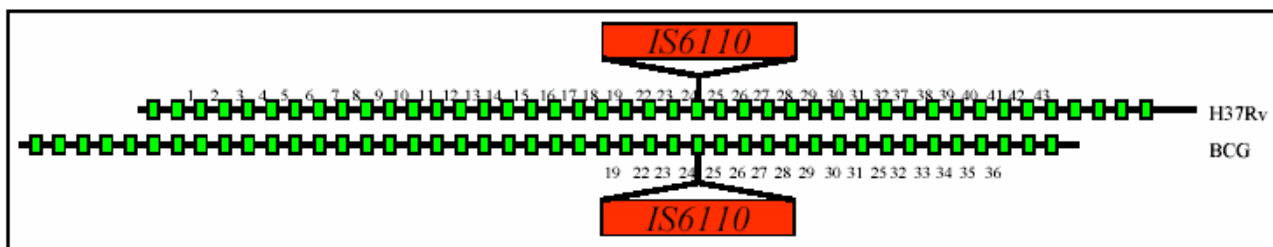
denotan un patrón o perfil de electroforesis, reflejando la distribución y frecuencia de los sitios de restricción de la cepa estudiada. Como alternativa más eficaz, se encuentra el “Polimorfismo en Longitud de los Fragmentos de Restricción” (RFLP, sigla en inglés). Los fragmentos de ADN, separados por electroforesis en agarosa como en el REA, son transferidos a una membrana de nylon para ser hibridados con una sonda de ADN marcada con radioactividad o fluorescencia, para su posterior visualización por autorradiografía. De este modo se detectan solamente las bandas seleccionadas, simplificando aun más la identificación del patrón (van Soolingen *et al.*, 2003). Las sondas utilizadas tienen por secuencia blanco, a elementos genéticos repetitivos, que se encuentran en número variable y en diferente posición del genoma. A partir de la identificación de la secuencia de inserción IS6110 en el año 1990, fue posible la diferenciación entre cepas de *M. tuberculosis*, debido a que la transposición de elementos móviles dirigen una proporción considerable de la diferenciación genómica del complejo *M. tuberculosis* (Sreevatsan *et al.*, 1997; Sampson *et al.*, 1999; Thierry *et al.*, 1990a; 1990b). El patrón de bandas obtenido representaría la localización de IS6110 dentro del genoma, medida en términos de movilidad electroforética (Sampson *et al.*, 1999). La variabilidad en el número de copias de IS6110 observado en aislamientos clínicos, junto con la supuesta naturaleza de transposición al azar, condujeron al establecimiento de un método de tipificación estandarizado para estudios epidemiológicos, que se convirtió en el más utilizado para el complejo *M. tuberculosis* (Warren *et al.*, 2000). La capacidad de transposición de este elemento, se demostró tanto *in vivo* como *in vitro*, a partir de cambios en una sola banda en los patrones de aislamientos seriados (Sampson *et al.*, 1999). El efecto que una inserción puede ocasionar en el fenotipo de una cepa, depende de la naturaleza del dominio donde ocurre, pero en el caso de IS6110 es limitado, porque la mayoría de las regiones codificantes interrumpidas pertenecen a familias de genes, en las que la interrupción en un gen individual no necesariamente altera al fenotipo (Sampson *et al.*, 1999). La epidemiología molecular de la tuberculosis humana, se encuentra muy avanzada con los estudios de polimorfismo por RFLP-IS6110. Las cepas de *M. tuberculosis* se diferencian en el número de copias de IS6110 presentes en su genoma, que oscilan entre 0 y 25, y también en la posición que ocupan en el mismo (van Soolingen *et al.*, 2003). Estas características permitieron distinguir numerosos subtipos de este bacilo, como la familia de cepas W-Beijing, con patrones muy similares y con múltiples bandas, que se usaron como marcador de una familia de cepas peligrosas en particular (Kremer *et al.*, 2004). El RFLP-IS6110 fue ampliamente aplicado a la detección de brotes institucionales, entre los que se destacan la transmisión de cepas de *M. tuberculosis* resistentes a múltiples drogas. Por otra parte, en estudios poblacionales realizados en regiones geográficas con baja y media incidencia de tuberculosis, se pudo identificar una elevada proporción de tuberculosis de

transmisión reciente, no sospechada previamente por los métodos epidemiológicos convencionales (Gutiérrez *et al.*, 1998; Samper *et al.*, 1998; Yang *et al.*, 1995). Sin embargo, la utilidad de IS6110 es menor en aquellas cepas que tienen una o muy pocas copias de este elemento, como en los aislamientos *M. bovis* provenientes de bovinos (Soini *et al.*, 2001; Small y van Embden, 1994). La proporción de cambios en los patrones de RFLP-IS6110, es independiente de la incidencia de la enfermedad en la población, pero depende de la velocidad de crecimiento del bacilo, de la adaptación al medio ambiente del nuevo hospedador y del número de copias de IS6110 en la cepa (van Soolingen *et al.*, 2003; Warren *et al.*, 2002b). En general, la estabilidad de IS6110 puede considerarse buena en aquellas cepas que contienen cinco o menos copias, como en la mayoría de los aislamientos de *M. bovis* (Fisanotti *et al.*, 1998), pero cuando es mayor a cinco como en *M. tuberculosis*, la vida media de IS6110 se calcula entre 2 y 3 años (Haddad *et al.*, 2004; van der Spuy *et al.*, 2003) y hasta 8,74 años (Warren *et al.*, 2002b). La asociación entre estabilidad y número de copias de IS6110, puede relacionarse a la existencia de regiones preferenciales “hot spot”, como el loci *ipl*, que tiene seis sitios para la inserción de IS6110 y la región DR (Haddad *et al.*, 2004). Consecuentemente, cuando el número de copias es bajo, la frecuencia de eventos de transposición también es baja, mientras que cuando se eleva a 6 la estabilidad comienza a disminuir (Haddad *et al.*, 2004), ya que puede promover rearrreglos genómicos tales como deleciones (Sampson *et al.*, 1999). Sin embargo, cuando su número es mayor a 12, los patrones nuevamente son estables, porque aumenta la probabilidad de inserciones en genes vitales, que pueden ser letales (Haddad *et al.*, 2004). Además, otra serie de factores como mutaciones, inserciones, duplicaciones, inversiones y deleciones pueden provocar cambios en los patrones de RFLP (Ijaz *et al.*, 2002). Cuando dos aislamientos contienen un número elevado de bandas y se diferencian en sólo una, no deberían considerarse distintos, especialmente en pacientes infectados por un largo tiempo con una misma cepa de *M. tuberculosis* MDR (Alito *et al.*, 1999a; Niemann *et al.*, 1999). A principios de la década del 90’, en Argentina se caracterizaron varios brotes de TB-MDR asociados al SIDA, con un 70% de resistencia a 5 o más drogas y con una tasa de mortalidad del 87%, originados en grandes conglomerados urbanos. Como antecedente, más del 80% de esos pacientes estuvieron internados en hospitales o instituciones carcelarias. Entre las distintas cepas detectadas, la más sobresaliente fue la llamada cepa M, responsable de un extenso brote que se inició en el Hospital F. J. Muñiz de la ciudad de Buenos Aires, mientras que otros brotes de menor magnitud se identificaron en el Policlínico Carrasco de Rosario y en el Hospital Cetrángolo de Vicente López (Palmero, 2001). El RFLP-IS6110 también permite la detección de cultivos falsos positivos debidos a contaminaciones de laboratorio (de Boer *et al.*, 2002; de C. Ramos *et al.*, 1999). En Holanda, durante el período 1993-2000, se registraron un 2,4% de cultivos

de *M. tuberculosis* falsos positivos (de Boer *et al.*, 2002). Para incrementar el grado de diferenciación en aquellos aislamientos con menos de 5 copias de IS6110, pueden utilizarse otras secuencias blanco repetitivas como las “Secuencias Polimórficas Ricas en Guanina y Citocina” (PGRS, sigla en inglés) empleando como sondas a insertos contenidos en los plásmidos recombinantes pTBN12, pMBA2 o pTB233; o la región DR (van Soolingen *et al.*, 2003; Romano *et al.*, 1999; Martínez Vivot *et al.*, 1996; Yang *et al.*, 1996; Bigi *et al.*, 1995; van Soolingen *et al.* 1993). La técnica de RFLP es de extrema utilidad en la epidemiología molecular de la tuberculosis por presentar buenos niveles de diferenciación, aunque presenta limitaciones tanto en los procedimientos prácticos como en su análisis, ya que requiere gran cantidad de ADN purificado, demora varias semanas debido a la necesidad de realizar un cultivo previo, insume mucho tiempo técnico de recursos humanos entrenados, y también requiere un soporte informático adecuado para el análisis de los patrones obtenidos (Roring *et al.*, 2002; van der Zanden *et al.*, 2002). La necesidad de suplir esas dificultades motivaron el desarrollo de métodos basados en PCR. Entre éstos, la técnica de “Análisis por Enzimas de Restricción de productos de PCR” (PRA, sigla en inglés), permite diferenciar en gran medida las especies del género *Mycobacterium* (Telenti *et al.*, 1993; Devallois *et al.*, 1997). Consiste en la amplificación por PCR del gen *hsp65*, que codifica para la proteína del estrés térmico de 65kDa, seguido de una digestión con dos enzimas de restricción. Luego de la separación de los fragmentos de restricción por electroforesis en agarosa, se obtienen patrones característicos de especie, que son identificados mediante el uso de un algoritmo con los tamaños de los fragmentos de restricción generados con cada una de los dos enzimas utilizadas. Si bien las micobacterias que forman el complejo *M. tuberculosis* tienen el mismo patrón de restricción, se describieron ligeras variantes entre cepas al igual que en *M. scrofulaceum*, *M. intracellulare*, *M. flavescens*, *M. fortuitum*, *M. gordonae*, *M. terrae* y en el complejo *M. avium* (da Silva Rocha *et al.*, 2002 y 1999). Aunque esta no permite la diferenciación de las micobacterias que integran el complejo *M. tuberculosis*, simplifica notablemente la identificación de las micobacterias “atípicas”, y aquellas no cultivables “*in vitro*” como *Mycobacterium leprae* (Zumárraga *et al.*, 2001; Rastogi *et al.*, 1999). Un gran adelanto en la genotipificación del complejo *M. tuberculosis*, se produjo primero con el desarrollo de la técnica de “Tipeo con Oligonucleótidos Espaciadores” (Spoligotyping, sigla en inglés) y luego con la identificación de “Repeticiones en Tándem de Número Variable” (VNTRs, sigla en inglés). El Spoligotyping es una técnica de hibridación reversa, cuyo principio está basado en la detección del polimorfismo de la región DR, específica del genoma de las micobacterias que conforman el complejo *M. tuberculosis* (Kamerbeek *et al.*, 1997). Está constituida por secuencias repetitivas directas, múltiples y bien conservadas, de 36 pares de bases (pb), entre las que se hallan

intercaladas secuencias únicas con alto grado de polimorfismo denominadas “espaciadores”, que poseen una longitud que oscila entre 35 y 41 pb (figura 4).

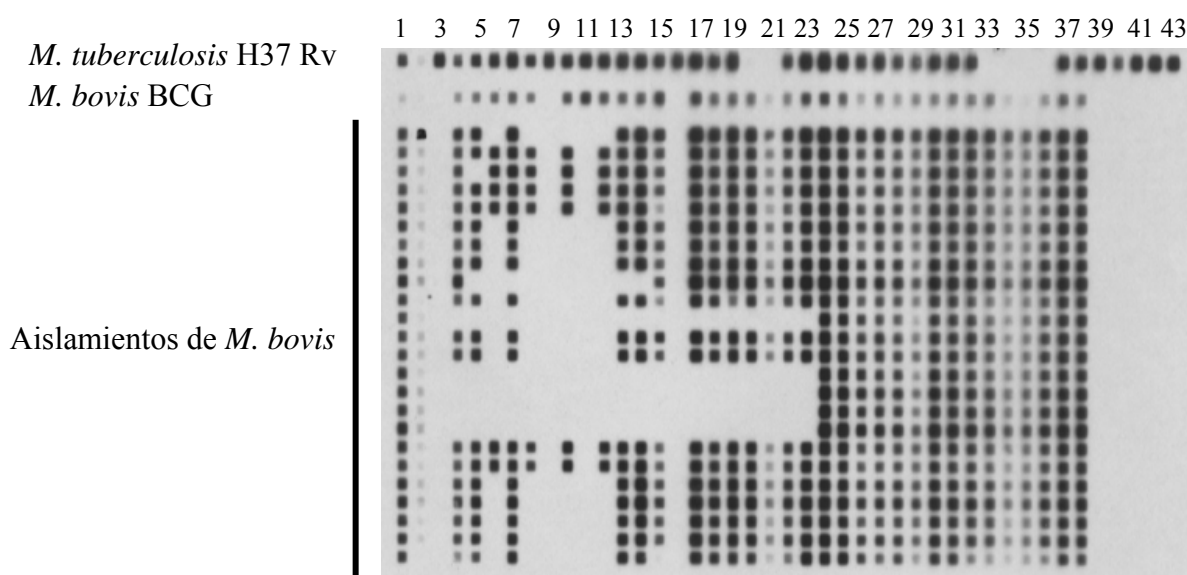
Figura 4: Estructura de la región DR en *M. tuberculosis* H37Rv y en *M. bovis* BCG.



Los rectángulos verdes representan las repeticiones directas (DR), mientras que las pequeñas líneas identificadas con números indican los espaciadores (Tomado de www.isogen-lifescience.com).

Los espaciadores generalmente se encuentran una sola vez en el genoma de la micobacteria, aunque en caso de estar repetidos pueden hallarse en forma consecutiva (Caimi *et al.*, 2001), o separados por uno o varios DR y espaciadores (Kamerbeek *et al.*, 1997). Por otra parte, el orden en que se hallan dispuestos los espaciadores, es el mismo para todas las micobacterias que integran el complejo, pudiendo encontrarse deleciones e inserciones características que son utilizadas para la tipificación de las mismas, ya que éstas alteran la composición de los espaciadores en cada cepa (Kamerbeek *et al.*, 1997). Al DR y a su correspondiente espaciador no repetitivo adyacente se lo denomina “Repetición Directa Variable” (DVR, sigla en inglés) (Aranaz *et al.*, 1996; Warren *et al.*, 2002c). El locus DR también fue llamado locus de “Repeticiones Directas de Espaciadores Intercalados” (SPIDR, sigla en inglés) y renombrado recientemente como locus de “Repeticiones Palindrómicas Cortas Interspaciadas Regularmente Agrupadas” (CRISPR, sigla en inglés) (Jansen *et al.*, 2002; van der Zanden *et al.*, 2002; Groenen P., *et al.*, 1993; Hermans *et al.*, 1991). Aunque hasta el momento fueron identificados 94 espaciadores diferentes en el locus DR (van Embden *et al.*, 2000), los oligonucleótidos espaciadores utilizados ordinariamente en la técnica son 43 (Kamerbeek *et al.*, 1997). La región DR constituye un blanco preferencial del elemento de inserción IS6110, que se localiza entre los espaciadores 25 y 26 (Kamerbeek *et al.*, 1997), aunque hay cepas de *M. tuberculosis* que carecen de IS6110 pero conservan el locus DR (Cave *et al.*, 2005). Tanto en el genoma de *M. tuberculosis* H37Rv como en el de *M. bovis* BCG, la secuencia de inserción IS6110 se encuentra en la misma posición dentro del locus DR, lo cual motivó a postular que, tal evento pudo ocurrir antes de su divergencia, hace aproximadamente 15.000 años (Warren *et al.*, 2000; Sampson *et al.*, 1999). La función que cumple la región DR en el complejo *M. tuberculosis* no se conoce. Por otra parte, en otros géneros de bacterias también fueron encontradas regiones de

características similares pero sin homología con la región DR del complejo *M. tuberculosis* (van Embden *et al.*, 2000). En *M. bovis* el mayor grado de polimorfismo se observa entre los espaciadores 1 y 25, contrariamente a lo que ocurre entre los espaciadores 26 y 43 que representarían a una región más conservada del genoma. Para estudiar el polimorfismo de la región DR, la técnica se divide en tres etapas. La primera consiste en la amplificación por PCR de las secuencias “espaciadoras”, utilizando oligonucleótidos iniciadores dirigidos a las secuencias DR, uno de los cuales está biotinilado (Kamerbeek *et al.*, 1997; van Soolingen *et al.*, 2003). Los productos obtenidos son de distinta longitud, debido a que los oligonucleótidos iniciadores se fijan a distintos DR, adyacentes o no, y a su vez cada uno de los productos generados puede actuar, como secuencia blanco o como nuevos iniciadores de la reacción (Kamerbeek *et al.*, 1997). La segunda contempla la hibridación de los productos de PCR desnaturalizados, con las secuencias de 43 oligonucleótidos “espaciadores” que se encuentran fijados covalentemente en una membrana filtro de nylon y dispuestos paralelamente entre sí. Debido a que el producto amplificado se siembra en sentido perpendicular al de los “espaciadores”, en caso de haber completa homología dará lugar a un cuadrado de hibridación (figura 5; materiales y métodos ítem 3.3.2). Las secuencias de los espaciadores incluidos en la membrana, se obtuvieron a partir de la región DR de la cepa de referencia *M. tuberculosis* H₃₇RV y de la cepa vacunal *M. bovis* BCG Pasteur, lote 3. La tercera y última etapa consiste en la detección del producto de PCR hibridado a la membrana, que se logra tras la incubación con un conjugado que desencadena una reacción quimioluminiscente detectada con un film sensible a la luz (Kamerbeek *et al.*, 1997; van Soolingen *et al.*, 2003). La presencia o ausencia de “espaciadores” de secuencia conocida, definen patrones de hibridación o “spoligotipos”, que se caracterizan por su composición de cuadrados negros (figura 5).

Figura 5: Imagen de un film de Spoligotyping

La imagen corresponde a un film obtenido en el laboratorio del Instituto de Biotecnología del CICVyA, INTA Castelar. Se indican los spoligotipos de *M. tuberculosis* H37Rv, *M. bovis* BCG y *M. bovis* de aislamientos de campo. Los números en la parte superior de la figura indican el orden de ubicación de los “espaciadores” en la membrana.

La sensibilidad del método se corresponde con la sensibilidad de una PCR, pudiendo detectar hasta diez fentogramos de ADN cromosomal, una cantidad equivalente a dos genomas de micobacteria. Esto se ve favorecido por el elevado número de copias DR, que actúan como secuencias blanco de la reacción de amplificación. Si bien el promedio del peso molecular del ADN amplificado es dependiente de la concentración del ADN blanco, los patrones de hibridación son independientes del mismo, siempre y cuando su concentración no sea inferior a un genoma de micobacteria (Kamerbeek *et al.*, 1997). La naturaleza del polimorfismo que caracteriza a la región DR, contempla a deleciones de unidades DVR que pueden ser causadas por recombinaciones homólogas entre DR adyacentes o distantes, duplicaciones de unidades DVR por “*strand slippage*” durante la replicación del ADN y transposiciones de la secuencia de inserción IS6110, que da lugar a deleciones, duplicaciones e inversiones (Groenen *et al.*, 1993 ; van der Zanden *et al.*, 2002; Warren *et al.*, 2002b). Por otra parte, la inserción de IS6110 en un DR no siempre ocurre de forma simétrica, quedando entonces flanqueada por fragmentos de distinto tamaño que alteran el spoligotipo, porque uno de los oligonucleótidos iniciadores empleados en la amplificación de la región DR pierde su secuencia blanco (Legrand *et al.*, 2001; Filliol *et al.*, 2000). En un contexto filogenético, habría que diferenciar aquellos aislamientos que realmente carecen de un espaciador, de aquellos en los cuales está presente, pero no es posible su detección con la técnica ordinaria (Legrand *et al.*, 2001; Filliol *et al.*, 2000). El Spoligotyping permite la adecuada identificación y diferenciación de las micobacterias que integran el complejo *M.*

tuberculosis (Erler *et al.*, 2004), por ejemplo *M. bovis*, se caracteriza por la ausencia de los espaciadores 3, 9, 16 y 39-43 (figura 6) (Caimi *et al.*, 2001; Zumárraga *et al.*, 1999).

Figura 6: Spoligotipos de las micobacterias del complejo *Mycobacterium tuberculosis*.

1	3	5	7	9	11	13	15	17	19	21	23	25	27	29	31	33	35	37	39	41	43		
■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	<i>M. tuberculosis</i> H37Rv
■	□	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	□	□	<i>M. bovis</i> BCG
■	■	■	■	□	□	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	<i>M. africanum</i>
□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	<i>M. microti</i>
□	■	□	□	□	□	□	□	□	□	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	<i>M. bovis</i> subsp. <i>caprae</i>
□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	■	□	□	<i>M. canettii</i>
□	□	■	■	■	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	■	■	■	■	■	■	■	■	<i>M. pinnipedii</i>

Los cuadrados negros y vacíos denotan la presencia o ausencia de espaciadores respectivamente. Los números en la parte superior de la figura indican el orden de ubicación de los espaciadores en la membrana.

La técnica tiene la ventaja de poder aplicarse sobre diversos tipos de muestras, como el material obtenido de los preparados destinados a estudios baciloscópicos por tinción de Ziehl Nielsen, combinándose de manera ventajosa, el diagnóstico con la tipificación molecular sin la necesidad del aislamiento previo por cultivo (van der Zanden *et al.*, 1998; van der Zanden *et al.*, 2003). Además, puede utilizarse en estudios paleontológicos y retrospectivos, a partir de colecciones de tejidos fijados en formol e incluidos en parafina ya que como los fragmentos de ADN que se amplifican por PCR son pequeños la probabilidad de obtener patrones definidos es alta (Zink *et al.*, 2003; Qian *et al.*, 1999; van der Zanden *et al.*, 1998).

A partir de las bondades de la técnica, diversos hallazgos epidemiológicos de tuberculosis fueron realizados con Spoligotyping. En España, se demostró que un aislamiento particular de *M. bovis* MDR causó un brote entre 16 pacientes con SIDA de un hospital de Madrid (Blazquez *et al.*, 1997). La comparación de los spoligotipos obtenidos con los incluidos en la base de datos de la Universidad de Zaragoza, permitió la identificación del mismo spoligotipo en Holanda, en un aislamiento de un paciente con SIDA que había muerto de TB-MDR, pero que previamente había estado hospitalizado en España, en un nosocomio diferente al primero y donde estaba ocurriendo otro brote de *M. bovis* MDR entre 20 pacientes con VIH/SIDA (Samper *et al.*, 1997). Como los aislamientos tuvieron el mismo spoligotipo, pudo demostrarse por primera vez la transmisión de *M. bovis* MDR entre humanos y entre hospitales. En un estudio realizado en Argentina con aislamientos de *M. bovis* principalmente de bovinos, se relacionó la activa transmisión de la enfermedad con la presencia de presencia de spoligotipos en grandes agrupamientos (Zumárraga *et al.*, 1999b). En otro trabajo, se aplicó la técnica para establecer el origen y fuente de infección de la tuberculosis en un tambo caprino de la provincia de Buenos Aires. Al comparar los patrones

aislados de las cabras con los aislados de bovinos, se estimó que la infección se habría producido por la administración de leche vacuna en los primeros días de vida de los animales (Martínez Vivot *et al.*, 1999). En comparación al RFLP-IS6110, el grado de diferenciación de las cepas por Spoligotyping es superior para aquellas que contienen un bajo número de copias de la secuencia de inserción IS6110, incluido *M. bovis* (Aranaz *et al.*, 1996; Goguet de la Salmoniere *et al.*, 1997; van der Zanden *et al.*, 2002) pero en las que existen múltiples copias, no se logran mejores resultados (Goyal *et al.*, 1997). El Spoligotyping es simple de llevar a cabo y de interpretar, permitiendo la detección y tipificación simultánea de las micobacterias del complejo *M. tuberculosis* (van der Zanden *et al.*, 2002). Por otra parte, en aquellas regiones donde la prevalencia de tuberculosis bovina es alta y el riesgo de transmisión zoonótica también es alto, el Spoligotyping podría ser una herramienta práctica para distinguir rápidamente *M. bovis* de *M. tuberculosis*, ya que por las pruebas bioquímicas convencionales utilizadas en bacteriología clásica es dificultoso. Aunque el poder discriminatorio del Spoligotyping es menor al obtenido por RFLP con distintas sondas combinadas, el Spoligotyping continúa siendo de gran importancia para la genotipificación de aislamientos en estudios con diferentes enfoques epidemiológicos, como la identificación rápida de contaminación de laboratorio (Warren *et al.*, 2002b). En particular, recientemente en nuestro laboratorio pudieron detectarse tres casos de contaminación intralaboratorio entre las muestras remitidas por colegas que realizan cultivo y que colaboran con el grupo. En el primero, el aislamiento remitido fue de un hisopado nasal de un bovino y su spoligotipo fue el de la cepa de referencia *M. tuberculosis* H37Rv. Otro caso fue de un humano que estaba cursando una tuberculosis pulmonar con una cepa resistente a rifampicina, pero en el último cultivo le fue aislada una cepa sensible, cuyo spoligotipo correspondió al de la cepa de referencia *M. tuberculosis* H37Rv, confirmándose así la contaminación. El tercero de los casos fueron aislamientos de búfalos y gallinas, tipificados bacteriológicamente como *M. bovis*, sin obtenerse patrón alguno por Spoligotyping. Al analizar las muestras por la técnica de PRA pudo identificarse un perfil del complejo *M. avium* en todas las muestras.

Como se describió anteriormente, la epidemiología molecular permitió identificar patrones característicos de cepas, asociados significativamente con la resistencia a las drogas empleadas en el tratamiento. Este es el caso del grupo de cepas que constituyen la familia W-Beijing, que presentan idénticos patrones de Spoligotyping fácilmente detectables, gran similitud en los patrones de RFLP-IS6110 y alta asociación a resistencia a múltiples drogas (Kremer *et al.*, 2004). Esta familia se distribuyó por distintos lugares del mundo originando diferentes brotes epidémicos en EEUU (Nueva York, Texas, California, Carolina del Sur y Nueva Jersey), Sudáfrica, Rusia, España y Azerbaijan, donde el 82% de las cepas MDR aisladas de una prisión pertenecieron a esta

familia (Rad *et al.*, 2003). Recientemente en Argentina, en un estudio poblacional realizado en la región norte del gran Buenos Aires, se describió por primera vez este genotipo en cinco aislamientos (0,85%) que aparentemente no tuvieron conexión epidemiológica alguna (figura 7) (Morcillo *et al.*, 2005).

Figura 7: Spoligotipo de *Mycobacterium tuberculosis* familia “W-Beijing”

1	3	5	7	9	11	13	15	17	19	21	23	25	27	29	31	33	35	37	39	41	43		
□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	■
																						<i>M. tuberculosis</i> familia W-Beijing	

Los números en la parte superior de la figura indican el orden de ubicación de los “espaciadores” en la membrana.

El poder discriminatorio de la técnica fue incrementado luego de la evaluación de 51 nuevos oligonucleótidos espaciadores de la región DR (van der Zanden *et al.*, 2002; van Embden *et al.*, 2000), de los cuales 5 habían sido previamente detectados (Caimi *et al.*, 2001; Beggs *et al.*, 1996). Estas secuencias resultaron del estudio de la región DR de las cepas de *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. bovis* BCG, *M. microti*, *M. canettii* y *M. pinnipedi* sp. nov. Algunos autores sugieren continuar la utilización de la membrana de primera generación sin variación alguna, y cuando se requiera un mayor grado de diferenciación emplear una membrana de segunda generación con los espaciadores más polimórficos (van der Zanden *et al.*, 2002). A partir del año 1996, se comenzó a utilizar el Spoligotyping en la República Argentina, en el Instituto de Biotecnología del CICVyA, INTA Castelar, para la tipificación de aislamientos de *M. bovis*.

El hallazgo de los VNTRs abrió una nueva perspectiva en la tipificación molecular del complejo *M. tuberculosis*. Constituyen fragmentos de ADN repetitivos y dispuestos en tándem, que conforman la base del mapeo genético, siendo ampliamente utilizadas en estudios de filiación y en medicina forense humana (Frothingham *et al.*, 1998). La inestabilidad anormal en micro o minisatélites puede asociarse a enfermedades neurodegenerativas, epilepsia y cáncer, aunque muchos de los aspectos de los mecanismos implicados, su rol biológico y su papel en procesos evolutivos, permanecen aun sin esclarecerse (Supply *et al.*, 2000). La utilización de estas secuencias en estudios de tipificación molecular, se basan en la variabilidad en el número de las unidades repetitivas, siendo los eventos recombinatorios del ADN una de las causas de su variabilidad (Phillip *et al.*, 2000; Supply *et al.*, 2000). Este tipo de polimorfismo también es el resultado de cambios en la secuencia entre las unidades repetitivas (Roring *et al.*, 2002). Cada locus VNTR, representa una porción diferente del genoma independiente entre sí, proporcionando múltiples caracteres independientes, de utilidad tanto en investigaciones epidemiológicas como en análisis filogenéticos (Frothingham *et al.*, 1998). Diversos autores identificaron secuencias de este

tipo en el complejo *M. tuberculosis*, que denominaron de manera diferente: “Principales Repeticiones Polimórficas en Tándem” (MPTRs, sigla en inglés) (Frothingham *et al.*, 1998); “Repeticiones en Tándem Exactas” (ETRs, sigla en inglés) (Roring *et al.*, 2002; Skuce *et al.*, 2002; Frothingham *et al.*, 1998); y “Unidades Repetitivas Esparcidas en Micobacterias” (MIRUs, sigla en inglés) (Magdalena *et al.*, 1998 a y b; Supply *et al.*, 2000). Las MPTRs consisten en repeticiones de 15pb con una sola secuencia consenso, pero con variabilidad substancial de la secuencia entre repeticiones adyacentes. Las ETRs contienen repeticiones en tándem que oscilan entre 53 y 79pb, de idéntica secuencia de ADN entre repeticiones adyacentes (Frothingham *et al.*, 1998). Los MIRUs, consisten en secuencias repetitivas que oscilan entre 40 y 100 pb, dispuestas en tándem y distribuidas en regiones intergénicas de las micobacterias que integran el complejo *M. tuberculosis* (Magdalena *et al.*, 1998a ; Supply *et al.*, 2000). El polimorfismo se determina por la diferencia en tamaño de los fragmentos amplificados, que es inherente al número de unidades repetitivas por loci. Las secuencias MIRUs, se describieron por primera vez en la región intergénica que codifica para un sistema regulador de dos componentes, denominado *senX3-regX3*, presente tanto en las micobacterias que integran el complejo *M. tuberculosis* como en *M. leprae* (Magdalena *et al.*, 1998b; Supply *et al.*, 1997). En el genoma de *M. tuberculosis* H37Rv, se identificaron 41 MIRU diferentes, 12 de los cuales fueron polimórficos entre los aislamientos estudiados del complejo *M. tuberculosis* (Supply *et al.*, 2000). Considerando el tamaño de las unidades repetitivas, los MIRUs son clasificados en tres tipos principales: Tipo I, secuencias que contienen aproximadamente 77pb; tipos II y III, caracterizados por tener en las posiciones 3' y 5' de las secuencias del tipo I, ausencias de 24 y 15 pb respectivamente. También se encontraron combinaciones entre los tipos III y II conteniendo ausencias de ambos tipos, como en los MIRUs 8 y 20 (Supply *et al.*, 2000). Los 12 loci MIRUs polimórficos contienen al menos dos repeticiones idénticas o muy semejantes en por lo menos una cepa. Por el contrario, 28 de los 29 loci MIRUs no polimórficos contienen, o bien una sola copia en todas las cepas analizadas, o dos pero de diferente tipo, como los MIRU 8 y 13. La excepción es el MIRU 33 el cual contiene dos copias del tipo III, que difieren una de la otra por cuatro sustituciones y tres deleciones/inserciones (Supply *et al.*, 2000). La mayoría de los MIRUs contienen un marco abierto de lectura que se superpone con los codones de iniciación y terminación de sus genes flanqueantes (Supply *et al.*, 2000). Los resultados pueden expresarse mediante un número, en el cual cada dígito representa el número de unidades repetitivas de un MIRU en particular facilitando notablemente la comparación de los patrones entre laboratorios (van Soolingen *et al.*, 2003). Para simplificar la técnica pueden realizarse amplificaciones con PCRs múltiples, utilizando oligonucleótidos iniciadores marcados con un fluorocromo distinto para cada MIRU. Los productos de PCR

obtenidos son sometidos a electroforesis en secuenciador automático y los tamaños de los fragmentos amplificados son determinados con un programa adecuado, simplificando la técnica y reduciendo además los errores de interpretación de los geles de agarosa (Supply *et al.*, 2001). La disponibilidad reciente de las secuencias de los genomas de *M. avium* subsp. *avium* y de *M. avium* subsp. *paratuberculosis*, posibilitaron la identificación de MIRUs conservados, que condujeron al desarrollo de un método simple para diferenciar MAP de otras micobacterias del complejo *M. avium* (Romano *et al.*, 2005; Bulla *et al.*, 2003).

En el presente trabajo se utilizaron las técnicas de Spoligotyping, RFLP y MIRUs-VNTR para la tipificación de aislamientos de *M. bovis* procedentes de bovinos y otros hospedadores con orígenes geográficos diversos, y de aislamientos de *M. pinnipedii* sp. *nov* de pinnípedos, evaluándose también la virulencia de cepas seleccionadas en modelo murino.

Hipótesis y objetivos

2. Hipótesis y objetivos

2.1. Hipótesis

Debido a que las principales cuencas lecheras de Argentina concentran hasta el 50% de la población bovina existente, que los rodeos lecheros tienen una vida prolongada, que la práctica de la lechería favorece el agrupamiento del ganado y que el 38% de los rodeos están infectados por *M. bovis*, la alta incidencia de tuberculosis bovina en el país está asociada a la expansión clones predominantes.

2.2. Objetivo general

Tipificación de aislamientos de *M. bovis* provenientes de bovinos y otros hospedadores, con orígenes geográficos diferentes.

2.3. Objetivos parciales:

- Determinar la composición clonal de aislamientos de *M. bovis* colectados en las principales regiones pecuarias del país.
- Detectar la presencia de aislamientos originarios de Argentina con genotipos similares a los de países limítrofes y distantes.
- Evaluación del grado de diferenciación de los distintos marcadores moleculares utilizados.
- Incorporación de los patrones descriptos en una base de datos internacional.
- Evaluación en modelo murino, de la virulencia de cepas de *M. bovis* aisladas en el país.

Materiales y métodos

3. Materiales y métodos

3.1. Aislamientos estudiados

Se tipificaron 780 aislamientos de *Mycobacterium bovis* de distintos hospedadores (672 bovinos, 57 humanos, 19 gatos, 13 cerdos, 7 búfalos, 4 ciervos, 3 cabras, 3 jabalíes, 1 armadillo y 1 mono), y de distintos orígenes geográficos (542 de Argentina, 144 de Brasil, 6 de Paraguay, 5 de Uruguay, 82 de México, y uno de Costa Rica) recolectados entre los años 1996 y 2005, según un muestreo por conveniencia. Además se estudiaron 10 aislamientos de micobacterias de lobos marinos (9 de Argentina y 1 de Uruguay). La cantidad de muestras se correspondió con el número de los individuos a partir de los cuales fueron obtenidas. Los cultivos se realizaron en medio Stonebrink y los aislamientos se identificaron como *M. bovis* por la morfología de las colonias, la propiedad de crecer en presencia de piruvato, pruebas enzimáticas y bioquímicas (reducción de nitratos, catalasa, ureasa, pirazinamidas), y susceptibilidad a la hidracida del ácido tiofeno 2 carboxílico (TCH) y al ácido p-amino salicílico (PAS). Estas últimas se realizaron en medio sólido a base de huevo con glutamato y glicerol. Por razones de bioseguridad, algunos colaboradores e investigadores remitían ADN en lugar de cultivos.

3.1.1. Aislamientos de bovinos de Argentina

Se colectaron 444 aislamientos de *M. bovis* de bovinos de Argentina, procedentes de las provincias de Santa Fe (127), Chaco (124), Buenos Aires (82), Corrientes (68), Córdoba (14), Formosa (10), Entre Ríos (9), Misiones (4), La Pampa (2) y de la región patagónica (4). Dichos aislamientos fueron remitidos por las Dras. María E. Cicuta, de la Facultad de Veterinaria de la Universidad del Litoral (UL); Ana Canal, del Ministerio de la Producción de Santa Fe; Marcela Vivot, de la Facultad de Veterinaria de la Universidad de Buenos Aires (UBA); Amelia Bernardelli, del Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria (SENASA); Isabel de Kantor del Instituto Panamericano de Protección de Alimentos y Zoonosis (INPPAZ) y los Dres. Sergio Garbaccio de INTA, Castelar; Fernando Paolicchi, de la Estación Experimental INTA Balcarce; y Manuel Schneider, de la Facultad de Veterinaria de la Universidad de Río IV.

Entre los aislamientos de *M. bovis* estudiados, se incluyeron 11 de bovinos la provincia de Buenos Aires cultivados en medio de glicerol-papa y conservados en los tubos primitivos,

pertenecientes al cepario de colección del Instituto Rosenbusch, del año 1930 a 1960, remitidos por la Dra Marcela Vivot de la Facultad de Veterinaria de la UBA. Los 11 cultivos se repicaron en los medios de Löwenstein-Jensen y de Stonebrink, a 37°C y se examinaron a intervalos semanales durante ocho semanas. Por otro lado se inocularon cobayos por vía intramuscular profunda con 1 mL de una suspensión en solución fisiológica estéril de 0,001mg de peso húmedo de las colonias de *M. bovis* de cada tubo, siendo observados durante 2 meses hasta posterior sacrificio para la realización de las necropsias respectivas (práctica realizada por la Dra. Marcela Vivot).

3.1.2. Aislamientos de hospedadores no bovinos de Argentina

Se reunieron 98 aislamientos de *M. bovis* de hospedadores no bovinos de Argentina. Comprendieron a 56 de humanos (28 de Buenos Aires y 28 de Santa Fe) correspondientes a pacientes sintomáticos que desarrollaron tuberculosis pulmonar y vinculados a la actividad pecuaria, aunque solamente dos estuvieron vinculados entre sí, y de una mujer de Buenos Aires con monoartritis séptica glenohumeral por *M. bovis*. Los restantes fueron de 19 gatos de Buenos Aires, 11 cerdos (7 de Buenos Aires y 4 de Santa Fe), 4 ciervos (3 de Buenos Aires y 1 del Chaco), 3 cabras de Buenos Aires, 3 jabalíes de La Pampa; y un armadillo y un mono de Corrientes. Los aislamientos fueron remitidos por las Dras. Nora Morcillo, del Hospital Dr. A. Cetrángolo de Vicente López; Beatriz Ricchi, del Instituto de Rehabilitación Psicofísica de la Ciudad Autónoma de Buenos Aires (IREP); Marita Latini, del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias Emilio Coni de Santa Fe (INER); Marcela Vivot de la Facultad de Veterinaria de la UBA; Amelia Bernardelli del SENASA; y María E. Cicuta, de la Facultad de Veterinaria de la UL. Tres de los humanos y un gato, todos de la provincia de Buenos Aires, formaron parte de dos casos clínicos que se detallan a continuación:

3.1.2.1. Caso clínico N° 1: Monoartritis glenohumeral séptica por *M. bovis*

Este caso involucró a una mujer de 47 años de edad caucásica, oriunda de la Ciudad Autónoma de Buenos Aires, que presentaba la enfermedad de Charcot–Marie–Tooth. La misma constituye un desorden neurológico hereditario, autosómico dominante, que a consecuencia de la degeneración de las terminaciones nerviosas, conduce a la pérdida progresiva del normal uso de las extremidades y a la pérdida de función nerviosa sensitiva. Al momento, no existe cura para la misma (Charcot-Marie-Tooth Association, 2005) (www.charcot-marie-tooth.org). En enero de 2002, la paciente realiza una consulta al IREP, por un cuadro de dolor y tumefacción del hombro derecho de más de 6 semanas de evolución. Como antecedente, en abril de 2001 había presentado un síndrome febril asociado a derrame pleural masivo izquierdo de resolución espontánea, aunque sin diagnóstico etiológico (Colmegna *et al.*, 2004). Los resultados más relevantes de las pruebas

entonces realizadas fueron: eritrosedimentación 80mm/h, PPD negativa (5mm) (registro de vacunación con BCG en su infancia), serología de VIH, sífilis, y hepatitis negativa. También le habían realizado toracocentesis con citología negativa; y cultivo de líquido pleural para gérmenes comunes con resultado negativo. En 2002, al momento de la consulta, la paciente estuvo afebril, no registrándose ningún episodio de trauma o de procedimientos intra-articulares. Por artrocentesis obtuvieron un líquido sinovial hemorrágico, con predominancia linfocítica, y tanto las tinciones de Ziehl Nielsen, Kinyoun, Gram y Giemsa, como los cultivos para gérmenes comunes fueron negativos. La eritrosedimentación fue de 57 mm y la PPD fue positiva (11mm). Le realizaron una resonancia magnética nuclear (RMN) del hombro, que evidenció un moderado derrame articular asociado a edema de partes blandas e irregularidades en la cabeza humeral. Dada la imposibilidad del adecuado drenaje articular, y la ausencia de diagnóstico, procedieron a realizar una artroscopía. El análisis microscópico de un fragmento sinovial evidenció marcado edema, infiltrado linfocitario disperso, exudado fibrinoso y múltiples granulomas histiocitarios, algunos con células gigantes tipo Langhans, pero no encontraron BAAR. La presencia de una monoartritis glenohumeral crónica, sumado al antecedente del derrame pleural, la reactividad positiva a la PPD, los resultados del estudio del líquido sinovial y la anatomía patológica, hicieron que consideraran como diagnóstico más probable el de una monoartritis séptica por micobacterias. Con ese cuadro, inician tratamiento antituberculoso empírico con isoniacida, rifampicina, pirazinamida y etambutol, pero su evolución fue mala. Luego de 6 semanas de iniciado el tratamiento, obtuvieron un cultivo de micobacteria positivo, resistente a pirazinamida, caracterizado posteriormente por Spoligotyping como *M. bovis*. De esta manera la terapia con pirazinamida se cambió por estreptomycin, ya que *M. bovis* es resistente natural a la primera, continuando el tratamiento durante un año. Luego de 3 meses de tratamiento, su evolución fue favorable, resolviéndose la sinovitis y recuperando la movilidad del hombro. El aislamiento fue remitido por la Dra. Beatriz Ricchi del IREP.

3.1.2.1.1. Investigación epidemiológica del caso

La paciente convivía con aproximadamente 20 gatos dentro de su casa, distribuidos entre las distintas habitaciones, y a los que alimentaba diariamente con pulmón bovino (bofe), sin cocción previa. Además, en 2001 dos ellos habían muerto por “problemas respiratorios”, pero no consultó con ningún profesional. El caso fue notificado a las autoridades sanitarias, y agentes del Instituto Pasteur de Buenos Aires, practicaron biopsias de pulmón y lavajes bronqueoalveolares en el resto de los animales, sin encontrarles infección por *M. bovis*. El muestreo continuó hasta que finalmente en 2003, a partir de una secreción respiratoria de uno de los gatos, fue aislado *M. bovis*.

El aislamiento fue remitido por el Dr. Ricardo Iachini, del Instituto Pasteur de Buenos Aires; y también fue tipificado por Spoligotyping en INTA-Castelar.

3.1.2.2. Caso clínico N° 2: Transmisión persona-persona de *Mycobacterium bovis* resistente a múltiples drogas.

Los afectados en este caso fueron una mujer de 28 años de edad y su padre de 50, oriundos de la ciudad de Bahía Blanca. La mujer en noviembre de 1999 había recibido tratamiento completo para tuberculosis, pero en 2005, a causa de una recaída fue derivada al Hospital Dr. A. Cetrángolo, de Vicente López. Tanto las baciloscopías como los cultivos de tres muestras de esputo fueron positivos, detectándose *M. bovis* sensible a estreptomycin y etambutol pero resistente a isoniazida y rifampicina. El padre, empleado de frigorífico, había padecido tuberculosis recurrentemente desde 1987, habiéndosele aislado por cultivo *M. bovis*. A pesar de haber sido tratado con isoniazida, rifampicina, pirazinamida, etambutol, estreptomycin y ofloxacina, fallece en 2003 por hemoptisis masiva. Los aislamientos fueron remitidos por la Dra. Nora Morcillo del Hospital Dr. A Cetrángolo, de Vicente López, Buenos Aires.

3.1.3. Aislamientos de *Mycobacterium bovis* de países limítrofes

Se reunieron 155 aislamientos de *M. bovis* provenientes de Brasil (144), Paraguay (6) y Uruguay (5). Los aislamientos de Brasil fueron de 134 bovinos, 7 búfalos, 2 cerdos y un humano. La distribución según el origen de los mismos fue la siguiente: 1 de Goias (bovino); 1 de Mato Grosso (bovino); 44 de Minas Gerais (43 bovinos y 1 humano); 1 de Paraná (cerdo); 9 de Para (8 bovinos, 1 búfalo); 16 de Río Grande del Sur (bovinos); 1 de Santa Catalina (cerdo); y 71 de San Pablo (70 bovinos, 1 búfalo). Los procedentes de Uruguay y Paraguay fueron de bovinos sin identificación de su origen geográfico. Los aislamientos fueron remitidos por la Dra. Angélica Zollin de Almeida, del Instituto Desiderio Finamor, Puerto Alegre; los Dres. Sidnei Sakamoto y César Rosales de la Facultad de Veterinaria de la Universidad de San Pablo; y los Dres. Carlos Salas y Marcos Zanini de la Universidad de Minas Gerais.

3.1.4. Aislamientos de países distantes

Se juntaron 83 aislamientos de *M. bovis* de bovinos de los siguientes países distantes: Costa Rica (1) y México (82), provenientes de los siguientes estados: Aguascalientes (1) Chihuahua (57), Hidalgo (2), Jalisco (6), Tamaulipas (4), Veracruz (8) y 4 sin identificación del origen geográfico. Fueron remitidos por la Dra. Laura Cobos, de la Universidad Autónoma de México y el Dr. Ciro Estrada, de la Facultad de Veterinaria de la Universidad de Hidalgo, México.

3.1.5. Aislamientos de micobacterias de lobos marinos

Se estudiaron 10 casos de tuberculosis en pinnípedos de 3 especies diferentes. Nueve fueron de lobos marinos de dos pelos, *Arctocephalus tropicalis* y *Arctocephalus australis*, encontrados en la costa Argentina entre los años 1991 y 1996. Estos animales fueron capturados para tratarlos en el Centro de Rehabilitación de la Fundación Mundo Marino de la ciudad de Santa Clemente del Tuyú (Zumárraga et al., 1999c). El restante fue de un brote de tuberculosis en lobos marinos de un pelo, conocidos también como leones marinos (*Otaria flavescens*), del zoológico de Montevideo, Uruguay, del que se incluyó un solo aislamiento del año 1987 (Castro Ramos et al., 1998). Los aislamientos fueron remitidos por la Dra. Amelia Bernardelli (SENASA); y por el Dr. Miguel Castro Ramos, (DILAVE, Uruguay). Las muestras colectadas durante las necropsias de los animales, fueron de lesiones pulmonares, exudado torácico, linfonódulo peritoneal y bazo. Se procesaron por el método de decontaminación de Petroff, se inocularon en los medios de cultivo Stonebrink y Löwenstein-Jensen. Bacteriológicamente fueron clasificados como pertenecientes al complejo *M. tuberculosis* con propiedades típicas tanto de *M. tuberculosis* como de *M. bovis*. Los aislamientos se caracterizaron por ser BAAR, no formadores de esporas, inmóviles, con formación débil de factor cuerda, desarrollaron dentro de las 3-6 semanas de incubación a 36°C-37°C. Las colonias fueron rugosas, planas y no cromogénicas, negativas a la reducción de nitrato y generalmente negativas a la acumulación de niacina y sensibles a la pirazinamida. La inoculación experimental en cobayos produjeron lesiones generalizadas y significantes. A su vez, la inoculación de los mismos con PPD tuberculina bovina, produjo una fuerte reacción positiva, que fue de 6 a 16 veces mayor a la observada con PPD tuberculina aviar. (Estas prácticas fueron realizadas por la Dra. Amelia Bernardelli, del SENASA).

3.2. Protocolos de extracción de ADN

3.2.1. Extracción y purificación de ADN de micobacterias

La extracción de ADN de micobacterias se realizó según el protocolo descrito por van Embden y col. (van Embden et al., 1992). Se resuspendió una anzada de micobacterias desarrolladas en medio sólido en 400µL de solución reguladora de pH (*buffer*) TE 1x (Tris 10mM, EDTA 1mM, pH 8) contenidos en un tubo de 1,5mL de capacidad y se inactivó por calentamiento a 80°C durante 20 minutos (min.). Luego de enfriar hasta alcanzar la temperatura ambiente, se agregaron 50µL de Lisozima (10mg/mL) y se incubó a 37°C durante 12 horas. Posteriormente se agregaron 75µL de SDS (10%) y 10µL de Proteinasa K (10mg/mL) incubándose a 65°C durante 10 min. Luego se agregaron 100µL de NaCl 5M y 100µL de CTAB, se agitó en vortex hasta que la emulsión tomara un aspecto lechoso, y nuevamente se incubó a 65°C durante 10 minutos.

Luego se agregaron 750 μ L de cloroformo: alcohol isoamílico (24:1), se agitó durante 10 segundos (seg.) y se centrifugó a 12.000g durante 5 minutos. La fase acuosa se transfirió a otro tubo de 1,5 mL de capacidad, y el ADN se precipitó con 0,6 volúmenes de alcohol isopropílico a -20°C durante 12 horas. Luego se centrifugó a 12.000g a temperatura ambiente durante 15 min., y se descartó el sobrenadante. Se agregó 1mL. de etanol 70% frío, se mezcló por inversión del tubo, se centrifugó a 12.000g durante 5 min. y se descartó el sobrenadante. Luego de centrifugar nuevamente durante 10 seg., el etanol remanente se eliminó con pipeta, y el precipitado se dejó evaporar a temperatura ambiente durante 10 min. Una vez seco, se resuspendió en 20 μ L de *buffer* TE 1x y se conservó a -20°C . La integridad y concentración del ADN se estimó por comparación de 1 μ L de la solución de ADN con un patrón de concentración conocida, mediante electroforesis horizontal en gel de agarosa al 0,8% en *buffer* TBE1x, teñido con bromuro de etidio y posterior exposición a una fuente de luz UV de 302nm (transiluminador *Hoefler MacroVue* UV-20, Amersham Pharmacia Biotech).

3.2.2. Preparación de lisados de colonias

La extracción simplificada de ADN para ser utilizado en reacciones de PCR, se llevó a cabo mediante la lisis de micobacterias por calor, según el protocolo descrito por Supply y col. (Supply *et al.*, 2000). Se resuspendió una anizada de micobacterias en 100 μ L de *buffer* TE 1x contenidos en un tubo de 1,5mL de capacidad con tapa a rosca, y se incubó a 100°C durante 30 min. Luego se centrifugó a 12.000g durante 5 min., y el sobrenadante se transfirió a otro tubo de 1,5 mL de capacidad. El mismo protocolo puede realizarse reemplazando el *buffer* TE por agua destilada apirogénica estéril.

3.3. Técnicas de tipificación molecular

3.3.1. Spoligotyping

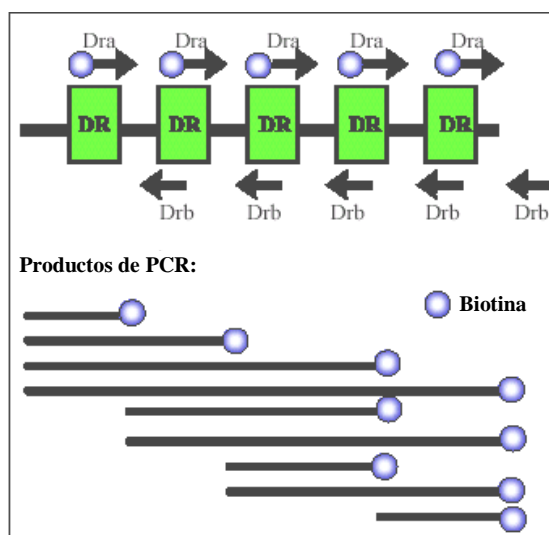
La técnica se llevó a cabo según el protocolo descrito por Kamerbeek y col. (Kamerbeek *et al.*, 1997).

3.3.1.1. Amplificación de la región DR

La primera etapa consistió en la amplificación por PCR de la región DR, utilizando los oligonucleótidos iniciadores Dra, biotinilado en el extremo 5,' (5' GGTTTTGGGTCTGACGAC 3') y DRb (5' CCGAGAGGGGACGGAAAC 3'). Como los iniciadores pueden hibridarse en DRs contiguos o distantes, los productos amplificados son variados y de tamaño diferente (figura 8). La mezcla de reacción para la amplificación de la región DR consistió en: *buffer* (Tris-HCl 10mM, pH 9,0; KCl 50mM y Tritón X-100 al 0,1%), 2mM de MgCl_2 , 0,2mM de cada dNTP, 20 pmoles

de cada oligonucleótido iniciador (Dra- Drb), 10ng de templado y 1,25U de Taq Polimerasa (Go Taq^R, Promega Corp., USA) en un volumen final de 50μL. Como templado se utilizaron tanto ADN purificado (protocolo 3.2.1) como lisados de micobacterias (protocolo 3.2.2). La reacción se llevó a cabo en un termociclador modelo PTC-100 (*Programmable Thermal Controller*, M.J. Research, Inc., USA), con el siguiente programa: desnaturalización inicial a 96°C por 3 min. seguido de 25 ciclos de desnaturalización, hibridación y extensión de 96°C por 1 min., 55°C por 1 min. y 72°C por 30 seg. respectivamente. Cuando la amplificación se llevó a cabo a partir de lisados de micobacterias, el número de ciclos de la reacción se incrementó a 30. Los productos de PCR se conservaron a -20°C hasta su utilización.

Figura 8: Amplificación de la región DR



Dra: Oligonucleótido iniciador directo biotilado; Drb: Oligonucleótido iniciador reverso; DR: Repetición Directa. Los rectángulos verdes denotan las DRs, mientras que las líneas comprendidas entre los rectángulos indican los espaciadores. Se muestran los productos amplificados de distinto tamaño (Adaptado de www.isogen-lifescience.com).

3.3.1.2. Hibridación de los productos de PCR

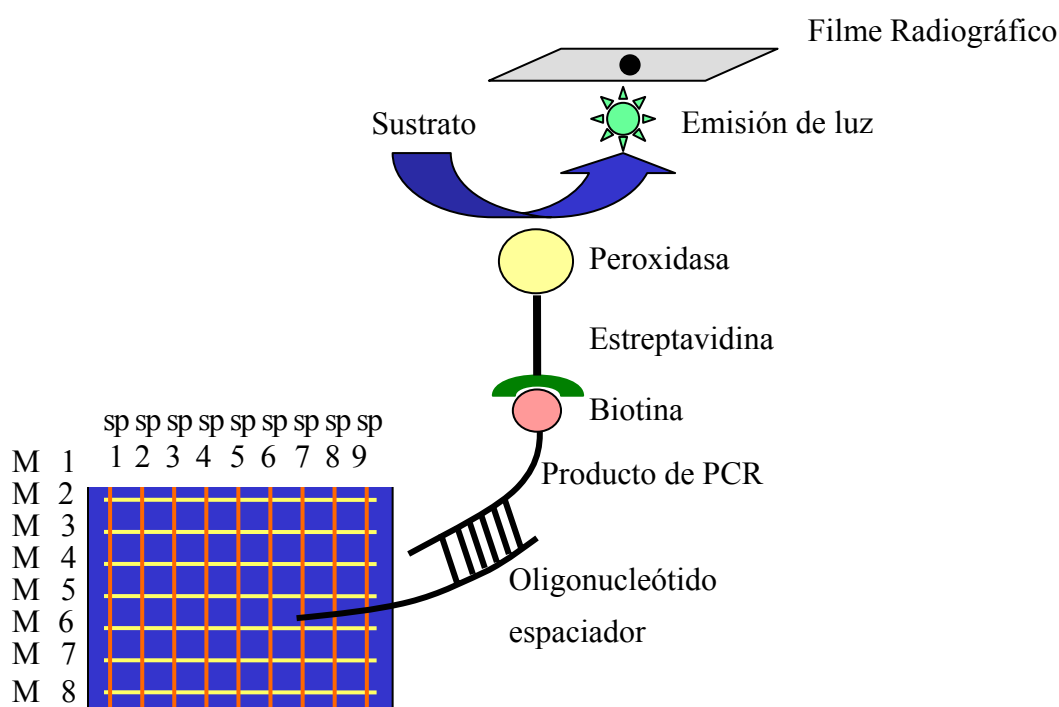
El segundo paso, consistió en la hibridación de los productos de PCR a los oligonucleótidos espaciadores de la región DR, que se encuentran fijados covalentemente y dispuestos como líneas paralelas en una membrana filtro de nylon, (*Isogen Life Science B.V.*, Maarsse, Holanda). Las secuencias de los oligonucleótidos espaciadores son derivadas de la región DR de las cepas *M. tuberculosis* H37Rv y *M. bovis* BCG P3 (tabla 4). Como el sentido de siembra del producto de PCR es perpendicular al que se encuentran dispuestos los oligonucleótidos espaciadores, la hibridación es puntiforme (figuras 9 y 10).

Se agregaron 20μL de los productos de PCR a 150μL de SSPE 2x /SDS 0,1%, contenidos en un tubo de 1,5 mL de capacidad. Se desnaturalizaron por incubación a 100°C durante 10min.,

colocándolos inmediatamente después en hielo. La membrana fue lavada en un contenedor plástico con 250mL de buffer SSPE 2x /SDS 0,1% a 60°C, durante 5 min. con agitación y luego se la colocó sobre una almohadilla sintética (*Isogen Life Science B.V.*, Maarseen, Holanda) en un dispositivo de acrílico formado por una base y una tapa con 45 ranuras *miniblotter*, (*Isogen Life Science B.V.*, Maarseen, Holanda) de tal manera que los espaciadores quedaran dispuestos perpendiculares al sentido de siembra de los productos de PCR. El *buffer* residual contenido en el *miniblotter* fue quitado por acción de vacío. Las ranuras del *miniblotter* fueron llenadas por los orificios de los extremos, con los productos de PCR diluidos y desnaturalizados, evitando la formación de burbujas, y se incubó a 60°C en horno de hibridación (Amersham Pharmacia Biotech, UK) durante 1 hora. Luego se removieron las muestras sembradas por aspiración, se desarmó el *miniblotter*, se colocó la membrana en un contenedor plástico y se realizaron dos lavados con 250mL de SSPE 2x / SDS 0,5% a 60°C, durante 10min. c/u con agitación. Posteriormente la membrana se colocó en una botella de hibridación (Amersham Pharmacia Biotech, UK), donde luego de dejarla enfriar, se la incubó con estreptavidina-peroxidasa (1:4000) en 10mL de SSPE 2x / SDS 0,5% a 42°C, en horno de hibridación, durante 40-60 min. con rotación constante. Terminada la incubación, se colocó la membrana en un contenedor plástico, realizándose dos lavados con 250mL de SSPE 2x / SDS 0,5%. a 42°C, durante 10min. c/u con agitación, y otros dos con 250mL de SSPE 2x a temperatura ambiente durante 5 min. c/u.

3.3.1.3. Revelado

La tercera y última etapa de la técnica consiste en la detección de la hibridación por quimioluminiscencia y revelado por autorradiografía (figura 9). La membrana se incubó durante 1 min. con 20mL del reactivo de quimioluminiscencia (*ECL*, Amersham Biosciences, UK). Luego se la cubrió con una lámina de plástico transparente y se la expuso a un filme sensible (*Hyperfilm*, Amersham Biosciences, UK) en un cassette durante, 5- 15 min. El revelado del filme se realizó en cuarto oscuro con revelador radiográfico (G-150, Agfa Gevaert) y fijador radiográfico (G-334, Agfa Gevaert) (figura 9).

Figura 9: Esquema de la técnica de Spoligotyping

Las líneas rojas indican el sentido en que se encuentran los oligonucleótidos espaciadores fijados en la membrana filtro de nylon, mientras que las amarillas denotan el sentido de siembra de los productos amplificados por PCR. M: muestra amplificada por PCR; sp: espaciadores fijados en la membrana.

3.3.1.4. Deshibridación de la membrana

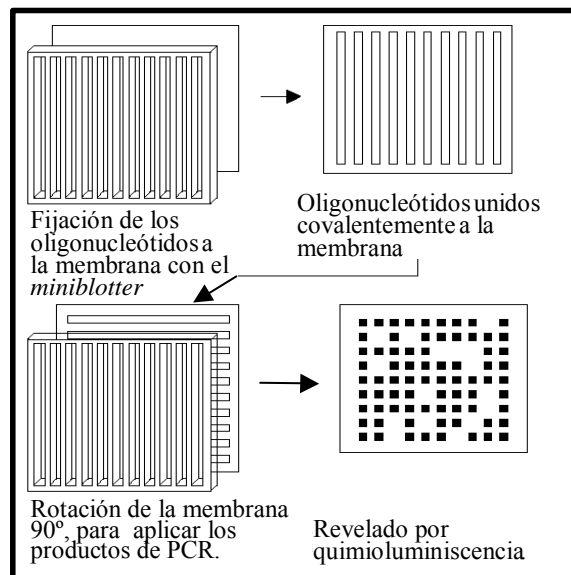
Para reutilizar la membrana, se removieron los productos de PCR hibridados a la misma, mediante dos lavados con un 1 litro de SDS 1% a 80°C durante 30 min. c/u, con agitación. Luego se estabilizó con 250mL de EDTA 20mM pH 8, a temperatura ambiente durante 15 min. La membrana se selló con un nylon para evitar su deshidratación y se conservó a 4°C hasta su utilización.

3.3.1.5. Preparación de la membrana filtro de nylon

Si bien la membrana filtro de nylon, que tiene fijados los oligonucleótidos espaciadores, está disponible comercialmente, puede prepararse siguiendo el procedimiento descrito por Kamerbeek *et al.*, 1997. Los oligonucleótidos espaciadores se sintetizan con la adición de un grupo amino terminal en el extremo 5' del mismo, para lograr su unión covalente a la membrana de nylon, cargada negativamente. La concentración y secuencia de los mismos se detallan en la tabla 4. Se diluyen en la concentración adecuada en un volumen final de 150 µL de NaHCO₃ 500mM, pH 8,4. Se corta una membrana de nylon del tamaño del *miniblotter*, y se activa por incubación con 10mL de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carboimida (EDAC) 16%, durante 10 min, con agitación. Posteriormente se enjuaga con agua y se ubica en el *miniblotter*. La primera y la última

ranura se llenan con tinta de lapicera diluída 1:100 en *buffer* SSPE 2x, mientras que las restantes con 150µL de la solución de los oligonucleótidos. Luego de incubar durante 1 min., la solución de los oligonucleótidos se quita por aspiración, se remueve la membrana del *miniblotter* y se inactiva por incubación con NaOH 100mM durante 10 min., en una botella de hibridación (Amersham Pharmacia Biotech, UK) con rotación. Posteriormente, se coloca en un contenedor plástico y se lava con 250mL. de *buffer* SSPE 2 x / SDS 0,1% a 60°C, durante 5 min. con agitación, y luego con 100mL de EDTA pH 8 durante 15 min. a temperatura ambiente también con agitación. La membrana se conserva a 4°C hasta su utilización sellada en nylon para evitar su deshidratación (figura 10).

Figura 10: Esquema de las etapas de la técnica de Spoligotyping.



(Adaptado de www.isogen-lifescience.com)

Tabla 4: Secuencias y concentraciones correspondientes a cada uno de los 43 oligonucleótidos espaciadores fijados en la membrana de nylon.

Oligo N°	Secuencia 5' - 3' (5'aminado)	pmol/150µl	Oligo N°	Secuencia 5' - 3' (5'aminado)	pmol/150µl
1	ATAGAGGGTCGCCGGTTCTGGATCA	12,5	23	AGCATCGCTGATGCGGTCCAGCTCG	50
2	CCTCATAATTGGGCGACAGCTTTTG	30	24	CCGCCTGCTGGGTGAGACGTGCTCG	50
3	CCGTGCTTCCAGTGATCGCCTTCTA	12,5	25	GATCAGCGACCACCGCACCTGTCA	25
4	ACGTCATACGCCGACCAATCATCAG	12,5	26	CTTCAGCACCACCATCATCCGGCGC	12,5
5	TTTTCTGACCACTTGTGCGGGATTA	12,5	27	GGATTCGTGATCTCTTCCC GCGGAT	25
6	CGTCGTCATTTCCGGCTTCAATTC	12,5	28	TGCCCCGGCGTTTAGCGATCACAAC	12,5
7	GAGGAGAGCGAGTACTCGGGGCTGC	25	29	AAATACAGGCTCCACGACACGACCA	12,5
8	CGTGAAACCGCCCCAGCCTCGCCG	50	30	GGTTGCCCCGCGCCCTTTTCCAGCC	12,5
9	ACTCGGAATCCCATGTGCTGACAGC	12,5	31	TCAGACAGGTTTCGCGTCGATCAAGT	12,5
10	TCGACACCCGCTCTAGTTGACTTCC	15	32	GACCAAATAGGTATCGGCGTGTTCA	25
11	GTGAGCAACGGCGGCGGCAACCTGG	30	33	GACATGACGGCGGTGCCGCACTTGA	100
12	ATATCTGCTGCCCGCCCGGGAGAT	60	34	AAGTCACCTCGCCACACCGTCGAA	25
13	GACCATCATTGCCATTCCCTCTCCC	12,5	35	TCCGTACGCTCGAAACGCTTCCAAC	12,5
14	GGTGTGATGCGGATGGTTCGGCTCGG	30	36	CGAAATCCAGCACCACATCCGCAGC	12,5
15	CTTGAATAACGCGCAGTGAATTCG	30	37	CGCGAACTCGTCCACAGTCCCCCTT	12,5
16	CGAGTTCCCGTCAGCGTCGTAAATC	12,5	38	CGTGGATGGCGGATGCGTTGTGCGC	25
17	GCGCCGGCCCCGCGGGATGACTCCG	100	39	GACGATGGCCAGTAAATCGGGGTGG	25
18	CATGGACCCGGGCGAGCTGCAGATG	12,5	40	CGCCATCTGTGCCTCATAAGGTCC	12,5
19	TAAGTGGCTTGGCGCTGATCCTGGT	12,5	41	GGAGCTTTCCGGCTTCTATCAGGTA	12,5
20	TTGACCTCGCCAGGAGAGAAGATCA	12,5	42	ATGGTGGGACATGGACGAGCGCGAC	25
21	TCGATGTGATGTCCAATCGTCTGA	25	43	CGCAGAATCGCACCGGGTGCGGGAG	50
22	ACCGCAGACGGCACGATTGAGACAA	12,5			

3.3.2. RFLP

La técnica de RFLP se realizó según el protocolo descrito por van Embden *et al.*, 1993.

3.3.2.1. Digestión enzimática de ADN

Se digirieron por separado dos alícuotas de un microgramo de ADN, extraído según el protocolo detallado en el punto 3.2.1, a 37°C durante 3hs., con 5U de las enzimas de restricción *PvuII* (Promega Corp., USA) y *AluI* (Promega Corp., USA), y en un volumen final de 20µL, para hibridar luego con las sondas IS6110 o DR y PGRS respectivamente.

3.3.2.2. Separación de los fragmentos de restricción por electroforesis

La separación de los fragmentos de restricción se realizó mediante electroforesis horizontal en agarosa al 0,8% en *buffer* TBE 1x, con bromuro de etidio (0,025 µl/mL), a un voltaje de 0,8 Voltios/cm, durante aproximadamente 16 horas. Los marcadores de peso molecular que se utilizaron fueron λ DNA /*HindIII* Fragments (Gibco BRL^R, Corp. USA), *Supercoiled DNA ladder-*

PvuII, (Gibco BRL^R, Corp. USA), y *PhiX174-HaeIII* (Gibco BRL^R, Corp. USA.). Como referencia de separación adecuada de los fragmentos de restricción se utilizó la distancia de corrida de la banda de 2Kb del marcador de peso molecular, que se considera óptima cuando se desplaza 7cm (+/- 0,4), medidos a partir del lugar de siembra de la muestra.

3.3.2.3. Tratamiento del gel previo a la transferencia

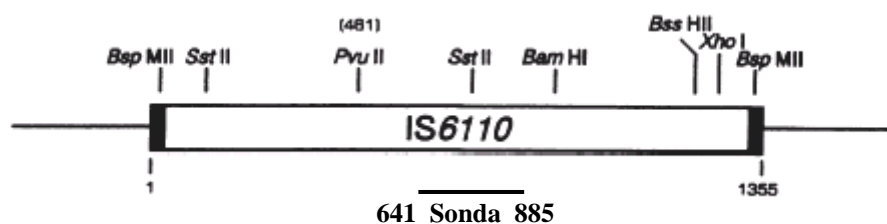
Se expuso el gel a una fuente de luz UV de una longitud de onda de 254nm, (transiluminador *Hoefer MacroVue* UV-20, Amersham Pharmacia Biotech, UK) hasta la pérdida de la percepción de la fluorescencia de los fragmentos de ADN (aproximadamente 20min.). Posteriormente se lo colocó en un contenedor plástico cubriéndolo con HCl 0,25M durante 12min. Luego se enjuagó con agua bidestilada, y se realizaron dos incubaciones con NaOH / NaCl (0,5M / 1,5M) de 20 min. c/u con agitación, seguido de otras dos con *buffer* Tris-HCl / NaCl (0,5M / 1,5M pH 7,5) de 15 min. c/u también con agitación.

3.3.2.4. Transferencia del ADN a la membrana de nylon (*Southern Blot*)

Los fragmentos de ADN separados en el gel de agarosa se transfirieron a una membrana de nylon, *Hybond N+* (Amersham Biosciences, UK), por aplicación de vacío mediante el dispositivo *Milliblot-V transfer system* (Millipore Corp., Bedford, USA), utilizándose como *buffer* SSC 10x pH 7. Posteriormente se fijó el ADN a la membrana por exposición a una fuente de la luz UV con una energía de 0,012 Joules/cm².

3.3.2.5. Preparación de las sondas

Se utilizaron tres sondas diferentes: *IS6110*, DR y PGRS. La sonda *IS6110* es un fragmento de 245pb correspondientes a los residuos 641 a 885 de la secuencia de inserción *IS6110* obtenido por PCR de ADN cromosomal con los oligonucleótidos iniciadores INS1 (5'CGTGAGGGCATCGAGGTGGC3') e INS2 (5'GCGTAGGCGTCGGTGACAAA3') (Hermans *et al.*, 1990). Esta secuencia se localiza a la derecha del sitio de restricción de la enzima *PvuII* en *IS6110* (figura 11).

Figura 11: Representación esquemática de la secuencia de inserción IS6110

Se indica el único sitio de corte de la enzima *PvuII* en IS6110, como así también los de otras enzimas de restricción. Por debajo se indica con una línea el fragmento del cual se obtuvo la sonda (adaptado de van Embden *et al.*, 1993).

Como templado se utilizó ADN extraído de la cepa de colección, *M. bovis* BCG Pasteur. La mezcla para la amplificación por PCR consistió en: *buffer* (Tris-HCl 10mM, pH 9, KCl 50mM, y Tritón X-100 0,1%) 1x; MgCl₂ 2,5mM, dNTP 0,2mM c/u, 1μM de cada oligonucleótido iniciador (INS 1 - INS 2), 10ng de templado y 1,25U de Taq Polimerasa (Go Taq^R, Promega Corp., USA), en un volumen final de 50 μL. La reacción se llevó a cabo en un termociclador modelo PTC-100 (*Programmable Thermal Controller*, M.J. Research, Inc. USA), con el siguiente programa: desnaturalización inicial a 94°C por 3 min. seguido de 30 ciclos de desnaturalización, hibridación y extensión de 94°C por 1min., 65°C por 1min. y 72°C por 2min. respectivamente, finalizando con una extensión final a 72°C durante 8 min. Diez microlitros del producto de PCR se sometieron a electroforesis horizontal en agarosa 0,8% en *buffer* TBE 1x. Luego de la separación de la banda de interés, se purificó con *GFXTM PCR DNA and Gel Band Purification Kit* (Amersham Biosciences, UK) según especificaciones del fabricante y 20ng del ADN purificado se marcaron con α³²P dCTP, mediante marcación al azar con *Prim A Gen Labelling kit* (Promega Corp.USA), según las instrucciones del fabricante.

La sonda DR consistió en un oligonucleótido de 36pb de la que existen múltiples copias en la región de inserción preferencial de IS6110 y cuya secuencia es la siguiente 5'GTCGTCAGACCCAAAACCCCGAGAGGGGACGGAAAC (Hermans *et al.*, 1991). El oligonucleótido DR fue marcado con [γ-³²P] ATP usando T4 polinucleótido kinasa (Ausubel *et al.*, 1994).

La sonda PGRS utilizada fue un inserto de 0,75 kb *SmaI* contenido en el plásmido recombinante pMBA2 (Bigi *et al.*, 1995) cuyo vector es el plásmido pBluescript (Stratagene). La secuencia nucleotídica del inserto está registrada en la base de datos EMBL con el número de acceso Z34236, caracterizándose por la presencia de 15 repeticiones de la secuencia consenso de 24 bp CCGCCGTTGCCGCGTTGCCGCG y 27 copias de la secuencia GCCGCC. Células *Escherichia coli* DH5α (Gibco) transformadas con el plásmido pMBA2 y conservadas en 30% de glicerol a -80°C, fueron utilizadas como inóculo para realizar un cultivo en 5mL de medio Luria-Bertani (LB) a 37°C, en agitación durante la noche. El plásmido fue aislado a partir de 1,5 mL del

cultivo de bacterias mediante la minipreparación de ADN utilizando el *kit* de Wizard (Promega Corp., USA) según las especificaciones del fabricante. Posteriormente para liberar el inserto, 5µL del plásmido fueron digeridos con 1µL de la enzima de restricción *Sma*I, en presencia de 2µL del *buffer* adecuado 10x, en un volumen final de 20µL a 37°C. La purificación y marcación fue realizada del mismo modo que se describió para la sonda IS6110.

3.3.2.6. Hibridación y detección

Las membranas se colocaron en botellas de hibridación (Amersham Pharmacia Biotech, UK) y se prehibridaron e hibridaron en horno con rotación constante (Amersham Pharmacia Biotech, UK) con una solución compuesta por SDS 1%; SSPE 2,5x; pirofosfato de sodio 0,01% y ácido polianetolsulfónico (PAES) 0,1%, en un volumen final de 10mL.

La prehibridación se realizó a 65°C durante 2 horas, mientras que la hibridación con las sondas marcadas con α -³²P y desnaturalizadas con 1 volumen de NaOH 4M, fue durante 12 horas a la misma temperatura. Transcurrido el tiempo establecido, se realizaron dos lavados con agitación a temperatura ambiente con SSC 1x /SDS 0,1%, de 5 min. cada uno; seguidos de otros dos también en agitación con SSC 0,1x / SDS 0,1%, a 65°C de 15 min. cada uno.

Con la sonda pMBA2 las membranas se prehibridaron a 40°C durante 2hs. e hibridaron a 40°C durante 12hs. Luego se realizaron dos lavados de 5 min c/u a 37°C con SSC3x/ SDS 0,1%.

Las membranas se expusieron a una película sensible (*X-Ray film*, Kodak), en un cassette *Hyper cassette* (Amersham Bioscience, UK) y se colocaron a -80°C durante 3 días. Luego se procedió al revelado de las películas en cuarto oscuro con revelador radiográfico (G150, Agfa Gevaert) y fijador radiográfico (G 334, Agfa Gevaert).

3.4. MIRUs-VNTRs

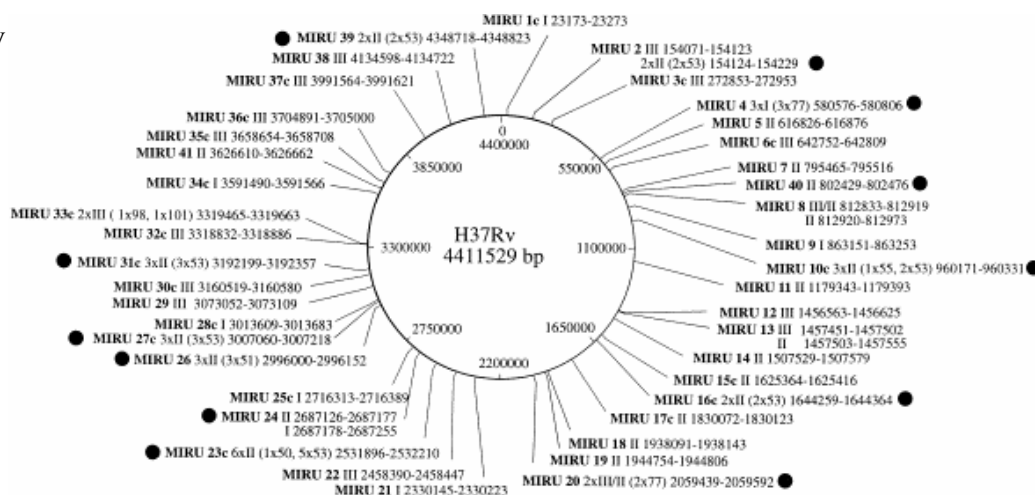
La técnica se llevó a cabo según el protocolo descrito por Supply *et al.*, 2000.

3.4.1. Amplificación de los diferentes MIRUs

La mezcla de reacción para la amplificación de los distintos loci consistió en: *buffer* (Tris-HCl 10 mM, pH 9,0; KCl 50mM, y Tritón X-100 al 0,1%) 1x, suplementado con *buffer* Q (Qiagen) 1x; MgCl₂ 2,5 mM para los MIRUs 23 y 39; MgCl₂ 2mM, para los MIRUs 2, 4, 10, 16, 31 y 40; MgCl₂ 1,5 mM para los MIRUs 20, 24, 26 y 27; dNTPs 0,25 mM c/u; 0,1 µM de cada oligonucleótido iniciador (figura 12, tabla 5); 5 µL de una dilución 1/10 de templado (lisado de micobacterias según protocolo 3.2.2) y 1,25U de Taq Polimerasa (*Hot Star*, Qiagen), en un volumen final de 50 µL. La reacción de PCR se llevó a cabo en un termociclador PTC-100 (*Programmable Thermal Controller*, M.J. Research, Inc.), con el siguiente programa:

desnaturalización inicial a 95°C 15 min. seguido de 40 ciclos de desnaturalización, hibridación y extensión de 94°C por 1 min; 59°C por 1 min; y 72°C por 1 min 30 seg respectivamente, con una extensión final a 72°C durante 10 min.

Figura 12: Esquema de la distribución de los MIRUs en el genoma de *M. tuberculosis* H37Rv



Se destacan con un punto los 12 MIRUs-VNTR seleccionados (tomado de Supply *et al.*, 2000).

Tabla 5: Secuencia de cada uno de los oligonucleótidos iniciadores (D- directo y R-reverso) empleados para la amplificación de los 12 MIRUs polimórficos.

MIRUs	Secuencia 5' – 3'
MIRU 2	2D- TGGACTTGCAGCAATGGACCAACT 2R- TACTCGGACGCCGGCTCAAAT
MIRU 4	4D- GCGCGAGAGCCCGAACTGC 4R- GCGCAGCAGAAACGTCAGC
MIRU 10	10D-GTTCTTGACCAACTGCAGTCGTCC 10R-GCCACCTTGGTGATCAGCTACCT
MIRU 16	16D-TCGGTGATCGGGTCCAGTCCAAGTA 16R-CCCGTCGTGCAGCCCTGGTAC
MIRU 20	20D- TCGGAGAGATGCCCTTCGAGTTAG 20R- GGAGACCGCGACCAGGTACTTGTA
MIRU 23	23D- CTGTGCATGGCCGCAACAAAACG 23R- AGCTCAACGGGTTGCCCCTTTTGTC
MIRU 24	24D- GGGCGAGTTGAGCTCACAGAA 24R- CGACCAAGATGTGCAGGAATACAT
MIRU 26	26D- TAGGTCTACCGTCGAAATCTGTGAC 26R- CATAGGCGACCAGGCGAATAG
MIRU 27	27D- TCGAAAGCCTCTGCGTGCCAGTAA 27R- GCGATGTGAGCGTGCCACTCAA
MIRU 31	31D- ACTGATTGGCTTCATACGGCTTTA 31R- GTGCCGACGTGGTCTTGAT
MIRU 39	39D- CGCATCGACAACTGGAGCCAAAC 39R- CGGAAACGTCTACGCCCCACACAT
MIRU 40	40D- GGGTTGCTGGATGACAACGTGT 40R- GGGTGATCTCGGCGAAATCAGATA

3.4.2. Separación de los productos de PCR por electroforesis

Cinco microlitros de los productos de amplificación de cada loci MIRU, se sometieron a electroforesis horizontal, en agarosa al 3% (Agarose-1000, InvitrogenTM, Life Technologies), en *buffer* TBE 1x, con bromuro de etidio 0,7µg/mL, durante 5 horas a 100 voltios. Como marcadores peso molecular se utilizaron el 50 pb y 100 pb *DNA Ladder* (Promega, Corp., USA). La visualización se realizó por exposición del gel a una fuente de luz UV de 302nm, (transiluminador *Hofer MacroVue* UV-20, Amersham Pharmacia Biotech,UK), y el registro fotográfico se realizó utilizando el programa *Collage*TM, con un digitalizador de imágenes (*Fotodyne incorporated*, USA)

3.4.3. Interpretación

El tamaño de cada producto de amplificación, se determinó por comparación ocular con los marcadores de peso molecular de ADN y los patrones definidos de la cepa de referencia *M. tuberculosis* H37Rv, y complementariamente se utilizó el programa de análisis de patrones de electroforesis *Gel Compar*, versión 4.1, Applied Maths, Bélgica. El número de repeticiones en cada MIRU, se determinó a partir del tamaño de los productos amplificados, mediante el empleo de una tabla de referencia (tablas 6 y 7). De este modo el resultado se expresó mediante un patrón numérico, resultante de la combinación de los 12 MIRU, en el que cada dígito representa el número de repeticiones de cada unidad por loci. Por otra parte, como los MIRUs son conservados, hasta el momento no se detectaron cepas que carezcan de algún MIRU, razón por la que siempre se obtiene amplificación. El tamaño del producto amplificado, depende del tamaño de los oligonucleótidos iniciadores directo y reverso, y del tamaño de la unidad repetitiva (figura 12), expresándolo mediante la ecuación siguiente:

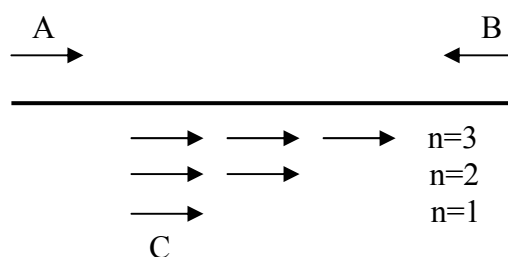
$$A + B + n \times C = \text{tamaño (pb)}$$

donde: A: Tamaño del oligonucleótido iniciador directo.

B: Tamaño del oligonucleótido iniciador reverso.

n: número de repeticiones.

C: tamaño de la unidad repetitiva.

Figura 13: Esquema de la amplificación de un MIRU

A: Oligonucleótido iniciador directo; B: Oligonucleótido iniciador reverso; C: unidad repetitiva; n: número de repeticiones.

Tabla 6: Número de repeticiones en la cepa de referencia *M. tuberculosis* H37Rv

MIRU	MIRU	MIRU	MIRU	MIRU	MIRU	MIRU	MIRU	MIRU	MIRU	MIRU	MIRU
2	4	10	16	20	23	24	26	27	31	39	40
2	3'	3	2	2	6	1	3	3	3	2	1

En el MIRU 4 pueden encontrarse 4 variantes diferentes en las cepas *M. tuberculosis* H37Rv y *M. bovis* BCG.

Alelo	MIRU 4
0'	122
1'	199
2'	276
3'	353

Tabla 7: Número de repeticiones en cada MIRU (alelos) dependiendo de tamaño del producto amplificado expresado en pares de bases (Tomado de www.ibl.fr/mirus/mirus.html)

Alelos	MIRU	MIRU	MIRU	MIRU	MIRU	MIRU	MIRU	MIRU	MIRU	MIRU	MIRU	MIRU
	2	4	10	16	20	23	24	26	27	31	39	40
0	402	175	482	565	437	150	395	285	498	492	540	354
1	455	252	537	618	514	200	447	336	551	545	593	408
2	508	329	590	671	591	253	501	387	604	598	646	462
3	561	406	643	724	668	306	555	438	657	651	699	516
4	614	483	696	777	745	359	609	489	710	704	752	570
5	667	560	749	830	822	412	663	540	763	757	805	624
6	720	637	802	883	899	465	717	591	816	810	858	678
7	773	714	855	936	976	518	771	642	869	863	911	732
8	826	791	908	989	1053	571	825	693	922	916	964	786
9	879	868	961	1042	1130	624	879	744	975	969	1017	840
10	932	945	1014	1095	1207	677	933	795	1028	1022	1070	894
11	985	1022	1067	1148	1284	730	987	846	1081	1075	1123	948
12	1038	1099	1120	1201	1361	783	1041	897	1134	1128	1176	1002
13	1091	1176	1173	1254	1438	836	1095	948	1187	1181	1229	1056
14	1144	1253	1226	1307	1515	889	1149	999	1240	1234	1282	1110
15	1197	1330	1279	1360	1592	942	1203	1050	1293	1287	1335	1164

3.5. Análisis de las imágenes

Los patrones de RFLP fueron comparados por inspección ocular y para determinar su relación se utilizó el programa NTSYS-pc v 2.01 (*Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System computer software, Exeter Software, Setauket, Nueva York, EEUU*). Para esto se construyó una matriz de similitud a partir de una matriz básica de datos binarios empleando el coeficiente de Jaccard. El dendrograma se generó con el algoritmo del método de agrupamiento no pesado de las medias aritméticas (UPGMA, sigla en inglés). Las imágenes de los *films* de Spoligotyping se analizaron con el programa de análisis de patrones de electroforesis *Gel Compar*, versión 4.1, Applied Maths, Bélgica. El dendrograma se construyó con el algoritmo UPGMA utilizando el coeficiente de Dice. Los registros se realizaron con este programa y con Windows XP, Microsoft^R Office Excel 2003.

3.6. Nomenclatura de los patrones

La designación de cada uno de los patrones obtenidos con cada método fue arbitraria. De este modo, los patrones de Spoligotyping se denominaron spoligotipos (Spo) y se identificaron con un número, mientras que los patrones de RFLP se designaron con letras y/o números para cada sonda (DR y PGRS). La combinación de los patrones obtenidos con ambas sondas se identificaron con la combinación de las letras o números respectivos, donde primero se indicó el patrón obtenido con la sonda DR, y detrás separado por una barra el obtenido con la sonda PGRS. Los patrones de los MIRUs se expresaron mediante un número en el que cada dígito representó el número de repeticiones por loci.

La descripción de la relación y distribución de los distintos patrones encontrados se realizó con los términos definidos a continuación: a) agrupamiento: dos o más aislamientos con el mismo patrón; b) patrones únicos: aquellos detectados solamente en un aislamiento; c) patrones exclusivos: aquellos detectados en una región geográfica o especie en particular; d) patrones únicos y exclusivos: aquellos que además de haberlos detectado en una región geográfica en particular tuvieron un solo aislamiento.

3.7. Determinación del poder discriminatorio de las técnicas

La determinación del poder discriminatorio de las técnicas utilizadas se realizó mediante la aplicación del índice discriminatorio de Simpson (ID) (Hunter y Gaston, 1998) según la siguiente fórmula:

$$ID = 1 - 1/N(N-1) \sum_{j=1}^S n_j (n_j - 1)$$

Donde N es el número total de muestras, S es el número total de patrones descriptos y n_j es el número total de muestras agrupadas en el patrón j .

Este índice indica la probabilidad que dos aislamientos de una población tomados al azar sean clasificados en dos tipos distintos.

3.8. Estudio de virulencia

Se procedió a la comparación de la virulencia en modelo murino, de 5 cepas diferentes, tipificadas por Spoligotyping y MIRUs-VNTR, respecto de la cepa patógena de referencia *M. bovis* AN5. Los aislamientos fueron de 1 humano (02-2B), 2 jabalíes (04-302 y 04-303) y 2 bovinos (534 y V-2). Las cepas seleccionadas fueron crecidas en medio Bacto Middlebrook 7H9 broth (Difco, Detroit, MI) enriquecido con piruvato de sodio 0,4%; albúmina 0,5% y glucosa 0,4%, en agitación a 37°C. Una vez alcanzada la fase estacionaria, las suspensiones de bacterias fueron alicuotadas y congeladas a -70°C hasta su utilización. Se inocularon por vía intraperitoneal 5 grupos de 16 ratones hembras BALB/c de 2 meses de edad, con 10^6 UFC en un volumen de 100 μ L en PBS 1x. Como control negativo se inyectó un grupo con PBS 1x. Al primer día post-inoculación (dpi), se sacrificaron 2 ratones por grupo para evaluar la eficiencia de la infección. Posteriormente a los 20, 55 y 190 dpi se sacrificaron 3 animales por grupo. Al cabo de los tiempos indicados, se les extirpó el bazo, se pesaron y seguidamente se disgregaron y homogeneizaron en *potters* con 1 mL de *buffer* PBS 1x. Luego se realizaron diluciones seriadas 1/10 en un volumen final de 1 mL en ese mismo *buffer*, y se cultivaron 30 μ L de cada dilución en placas de petri con agar Bacto Middlebrook broth 7H10, suplementado con piruvato de sodio 0,4%; albúmina 0,5% y glucosa 0,4%, para el recuento de colonias y cálculo de UFC/mL. Los resultados se expresaron como el promedio de los animales por grupo.

El ensayo también se realizó en un modelo murino de tuberculosis pulmonar experimental (López *et al.*, 2003), para evaluar la patogenicidad de cuatro de las cepas anteriores (04-302; 04-303; V2; 02-2B) respecto de la cepa de referencia *M. bovis* AN5. Esta experiencia se llevó a cabo en el Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición “Salvador Zubirán” de la ciudad de México, por el Dr. Raymundo Oropeza, y bajo la supervisión del Dr. Rogelio Hernández-Pando. Se inocularon por vía intratraqueal a través de una cánula, grupos de 50 ratones machos BALB/c de 6 a 8 meses de edad, con $2,5 \times 10^5$ bacterias resuspendidas en 100 μ L PBS, de cada una de las diferentes cepas de *M. bovis*. Al cabo de 3, 14, 21, 28, 60 y 120 días post infección, 6 ratones de cada grupo fueron sacrificados y los pulmones fueron homogeneizados en un homogeneizador Polytron^R (Kinematica, Luzern, Suiza) con 3 mL de PBS. Se realizaron cuatro diluciones seriadas

1/10 y 50 μ L se cultivaron en medio Middlebrook 7H11 (Difco Laboratories, Detroit, MI, USA) enriquecido con 10% de OADC (ácido oleico, albúmina, dextrosa y catalasa) (Becton Dickinson, Cockysville, MD), para realizar el recuento de colonias. Se utilizaron los tests de Student considerando las diferencias significativas cuando tuvieron un $p < 0,05$.

3.9. Soluciones de trabajo

Buffer de siembra 5x (glicerol 50%, Tris/HCl 50mM, pH 7,5; EDTA 5mM; azul de bromofenol 0,05%).

Buffer PBS 1x: (NaCl 137mM; KCl 2,7 mM; KH_2PO_4 1,5 mM; Na_2HPO_4 8 mM)

Buffer SSC 20x: Citrato de sodio 0,3M; Cloruro de sodio 3M; pH7

Buffer SSPE 10x : $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ 0,1 M; NaCl 1,8 M; EDTA 10mM; pH 7,4.

Buffer TAE 50x: Trizma Base 2M; ácido acético 0,65 mM; EDTA 0,1M.

Buffer TBE (Tris borato EDTA)1x: Tris 89mM; ácido bórico 89mM; EDTA 2 mM).

Buffer TE 10 x: Tris/HCl 100mM, pH8; EDTA 10mM.

CTAB (bromuro de N-cetil-N,N,N, trimetil amonio) 0,27M /NaCl 0,83M.

EDAC: [1-etil-3-(3 dimetilaminopropil carbodiimida] 16% (en agua)

Lisozyma 10mg/mL (en agua).

Proteinasas K 10mg/mL (en agua).

SDS (dodecil sulfato de sodio) 10% (en agua).

Solución de Prehibridación y Hibridación: SSPE 2,5x; PAES (polianetholsulfonato de sodio) 0,1%; Pirofosfato de sodio 0,01%; SDS 1%.

Resultados



4. Resultados

4.1. Tipificación por Spoligotyping

La tipificación por Spoligotyping de los 780 aislamientos de *Mycobacterium bovis* (542 de Argentina, 144 de Brasil, 6 de Paraguay, 5 de Uruguay, 82 de México, y uno de Costa Rica), permitió la identificación de 85 patrones o spoligotipos (Spo), de los cuales 41 fueron únicos y los restantes 44 formaron agrupamientos.

Los spoligotipos de las cepas de referencia utilizadas *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv; *Mycobacterium bovis* BCG Pasteur, Danesa, Rusa, Moreau, Glaxo y Brasil; y *Mycobacterium bovis* AN5 de Argentina, Holanda y Francia, se muestran en la figura siguiente:

Figura 14: Spoligotipos de las cepas de referencia.

1	3	5	7	9	11	13	15	17	19	21	23	25	27	29	31	33	35	37	39	41	43	Cepa	
■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	<i>M. tuberculosis</i> H37Rv
■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	<i>M. bovis</i> BCG Spo12
■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	<i>M. bovis</i> AN5 Spo25
■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	<i>M. bovis</i> AN5 Spo55

Los números de la parte superior de la figura indican los espaciadores.

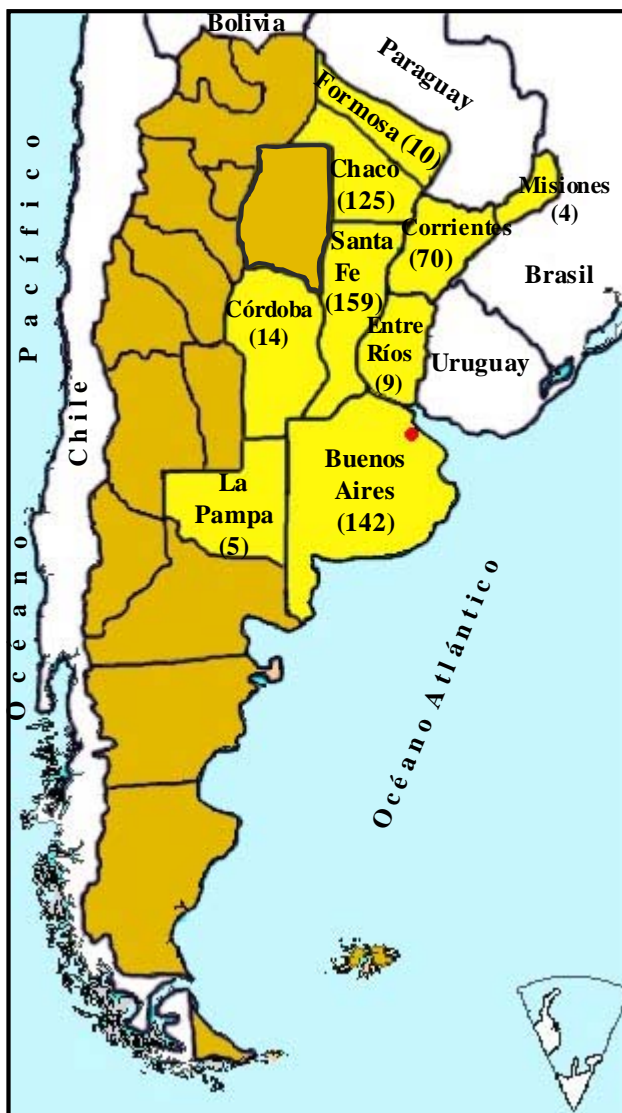
Entre las 3 cepas de *M. bovis* AN5 que se analizaron, se encontraron 2 spoligotipos diferentes, uno fue el Spo 25 de la cepa originaria de Holanda, mientras que el otro fue el Spo 55 identificado tanto en la cepa de Francia como en la de Argentina. En cambio, todas las cepas de *M. bovis* BCG tipificadas, tuvieron el mismo spoligotipo, Spo 12.

4.1.1. Aislamientos de Argentina

Entre los 542 aislamientos de *M. bovis* de Argentina, provenientes de las provincias de Santa Fe (159), Buenos Aires (142), Chaco (125), Corrientes (70), Córdoba (14), Formosa (10), Entre Ríos (9), La Pampa (5), Misiones (4) y de la región patagónica (4) (sin identificación específica de provincia), se detectaron 51 patrones diferentes, que conformaron 5 familias relacionadas, identificadas del I al V, e integradas por 24, 20, 4, 3 y 2 spoligotipos respectivamente (figuras 15 y 16). Veinticinco spoligotipos formaron agrupamientos mientras que

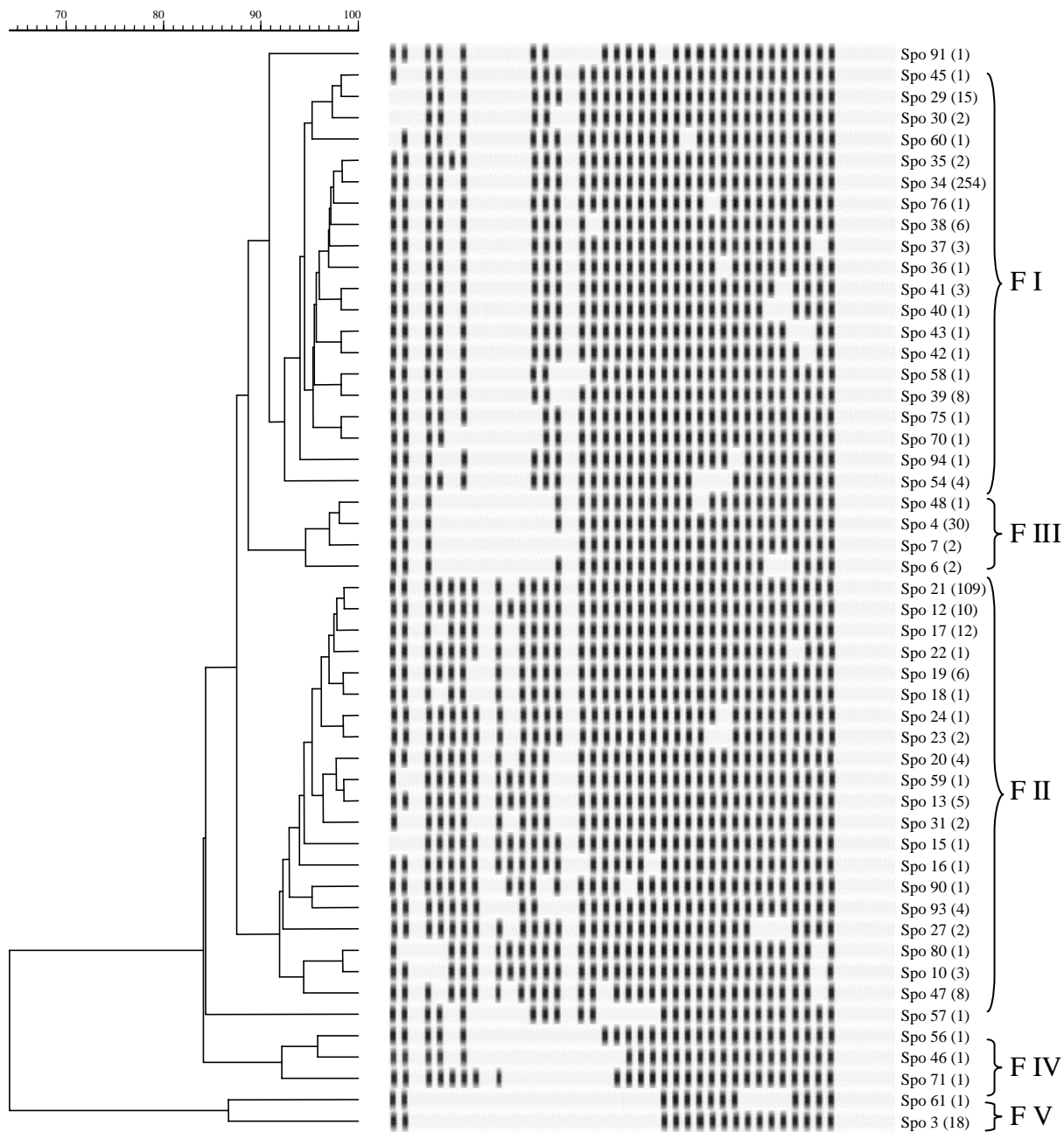
26 fueron únicos, de los cuales 15 correspondieron a bovinos y 11 a hospedadores no bovinos (tabla 8). Por otra parte los spoligotipos exclusivos sumaron 34 y se distribuyeron del siguiente modo: Buenos Aires 20, Santa Fe 5, Chaco 1, Córdoba 2, Corrientes 5 y Formosa 1.

Figura 15: Mapa de Argentina indicando las provincias de las que se obtuvieron aislamientos



En amarillo se destacan las provincias de las que provinieron los aislamientos de *M. bovis* estudiados. Entre paréntesis se indica el número de aislamientos de cada provincia.

Figura 16: Dendrograma mostrando la relación entre los 51 spoligotipos detectados entre los 542 aislamientos de Argentina.



Seguido de cada spoligotipo (Spo), se indica entre paréntesis el número de aislamientos. Las llaves encierran a los spoligotipos agrupados en familias (F).

El patrón predominante entre los aislamientos estudiados de Argentina, fue el Spo 34 perteneciente a la familia I, el cual agrupó al 46,9% de los aislamientos (254/542) y se halló presente en todas las provincias. El segundo spoligotipo mayoritario fue el Spo 21, encontrado en 109 aislamientos (20,1%) y perteneciente a la familia II, que se relaciona con el patrón de la cepa *M. bovis* BCG (Spo 12), típico por tener todos los espaciadores de *M. bovis* (tabla 8 y figura 16). A continuación le siguieron el Spo 4 con 30 (5,5%); el Spo 3 con 18 (3,3%); el Spo 29 con 15 (2,8%); el Spo 17 con 12 (2,2%); el Spo 12 con 10 (1,8%); los Spo 39 y 47 con 8 c/u (1,5%); los Spo 38 y 19 con 6 c/u (1,1%); el Spo 13 con 5 (0,9%); los Spo 20, 54 y 93 con 4 c/u (0,7%); los Spo 10, 37 y 41 con 3 c/u (0,5%) y los Spo 6, 7, 23, 27, 30, 31 y 35 con 2 c/u (0,4%) (figura 16). Los patrones que agruparon a 10 o más aislamientos de Argentina tuvieron un coeficiente de similitud entre el 0,70 y 0,98% (figuras 17 y 18).

Figura 17: Spoligotipos más frecuentes de Argentina

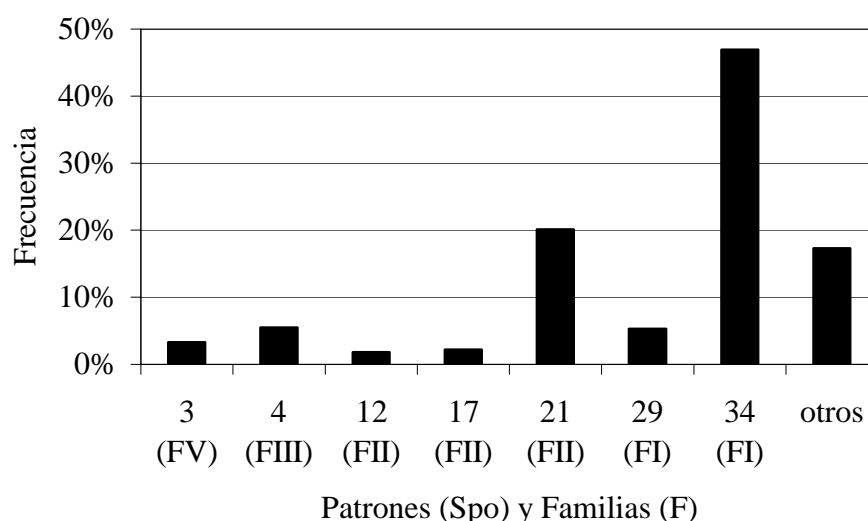


Figura 18: Dendrograma mostrando la relación entre los 7 spoligotipos predominantes en Argentina.



Se indica el patrón, el número de aislamientos separados por una barra y entre paréntesis el porcentaje de los mismos. Las familias se identificaron con la letra F.

Los aislamientos de hospedadores no bovinos sumaron 98, de los cuales 56 fueron humanos y los restantes 42 se distribuyeron entre animales domésticos, salvajes y de producción. Se detectaron 21 patrones diferentes, 11 (5 de gatos, 5 de humanos y 1 de ciervo) fueron únicos y exclusivos de tales especies, mientras que los 10 restantes fueron encontrados tanto en bovinos como en otros animales. Dos aislamientos de animales silvestres, un mono y un armadillo, tuvieron los spoligotipos Spo 34 y 21, el primero y segundo en frecuencia respectivamente, indicando el contacto que existe entre en este tipo de fauna y los bovinos, y el papel que pueden representar en la transmisión de la enfermedad. El 81,8 % de los cerdos (9/11), el 57,9 % de los gatos (11/19) y el 37,5% de los humanos (21/56), tuvieron el patrón mayoritario Spo 34. Por otra parte, el 61% (11/18) de los aislamientos con el Spo 3 correspondieron a humanos no relacionados, pudiéndose de este modo asociarlo a la transmisión entre humanos. Entre los casos de tuberculosis humana de origen bovino, uno perteneció a una paciente procedente de Buenos Aires con diagnóstico de monoartritis séptica glenohumeral por *M. bovis* (caso 1) y los restantes 55 correspondieron a pacientes sintomáticos que desarrollaron tuberculosis pulmonar (27 de Buenos Aires y 28 de Santa Fe). En este grupo solamente dos de los pacientes de Buenos Aires estuvieron vinculados (padre e hija) (caso 2), mientras que los otros se caracterizaron por vivir o desarrollar su actividad laboral en el ámbito pecuario. Entre los humanos se detectaron 13 spoligotipos, de los cuales 8, fueron encontrados en aislamientos de bovinos, mientras que los 5 restantes, además de ser exclusivos de humanos fueron únicos. En la provincia de Santa Fe predominaron los spoligotipos Spo 34 y 21, con 12 y 10 aislamientos respectivamente, mientras que en Buenos Aires los Spo 34 y 3, con 9 y 8. Por otra parte en Buenos Aires, 9 spoligotipos fueron únicos y entre éstos 5, además exclusivos de humanos (Spo 56 a 60), mientras que en Santa Fe solamente un spoligotipo fue único (Spo 17) (tabla 8 y 9).

Tabla 9: Spoligotipos de aislamientos de humanos de las provincias de Buenos Aires y Santa Fe.

Provincia	N° aisl.	N° de aislamientos de humanos por spoligotipo												
		3	4	13	17	21	34	39	47	<u>56</u>	<u>57</u>	<u>58</u>	<u>59</u>	<u>60</u>
Bs. As.	28	8	2	1		1	9	1	1	1	1	1	1	1
Santa Fe	28	3	2		1	10	12							
TOTAL	56	11	4	1	1	11	21	1	1	1	1	1	1	1

Los spoligotipos exclusivos de humanos se encuentran subrayados.

Entre los 19 aislamientos de gatos analizados, todos procedentes de la ciudad de Buenos Aires, se detectaron 9 spoligotipos diferentes, de los cuales solamente uno, el Spo 34, formó un agrupamiento con 11 aislamientos. Los 8 patrones restantes fueron únicos, aunque solamente tres, los Spo 3, 21 y 29 estuvieron en bovinos, mientras que los otros 5, además fueron exclusivos de los gatos y de la ciudad de Buenos Aires. El resto de los aislamientos de *M. bovis* de hospedadores no bovinos, comprendieron a 11 cerdos (7 de Buenos Aires y 4 de Santa Fe) , 4 ciervos (3 de Buenos Aires y 1 del Chaco), 3 cabras de Buenos Aires, 3 jabalíes de La Pampa, y 1 mono y 1 armadillo de Corrientes, entre los que detectaron 7 patrones diferentes. Con excepción de un spoligotipo único y exclusivo de un ciervo de la provincia de Buenos Aires (Spo36), los restantes se correspondieron con los patrones comunes a bovinos. En el caso de los cerdos, los únicos patrones que se detectaron fueron los 2 spoligotipos más frecuentes en bovinos de Argentina, los Spo 21 y 34, con 2 y 9 aislamientos respectivamente (tabla 8).

En los 142 aislamientos de la provincia de Buenos Aires se identificaron 29 patrones diferentes, de los cuales 14 formaron agrupamientos y 15 fueron únicos. Por otro lado se encontraron 20 exclusivos de la provincia (tabla 8). El spoligotipo que agrupó a más aislamientos fue el Spo 34 con 54 (38%). Le siguieron en orden de frecuencia los patrones Spo 21 con 19 aislamientos (13,4%); Spo 3 con 13 (9,15%); Spo 4 y 29 con 10 (7%); Spo 93 con 4 (2,8%); Spo 17 con 3 (2,1%); y Spo 6, 7, 13, 27, 30, 31 y 39 con 2 c/u (1,4%). Los patrones únicos involucraron a 3 bovinos Spo 61, 91 y 94; 6 humanos Spo 47, 56, 57, 58, 59 y 60 ; 5 gatos Spo 48, 70, 71, 75, 90 y un ciervo Spo 36. Entre éstos, con excepción del Spo 47, detectado también en Córdoba, además de únicos fueron exclusivos. El resto de los patrones exclusivos de la provincia de Buenos Aires, Spo 6, 7, 27, 30, 31 y 93, formaron agrupamientos y provinieron de bovinos.

Quince de los aislamientos de la provincia de Buenos Aires formaron parte de tres casos de estudio particulares que se detallan a continuación:

4.1.1.1. Caso N°1: Monoartritis séptica glenohumeral debido a *Mycobacterium bovis*

Este caso involucró a una paciente con diagnóstico de monoartritis séptica glenohumeral debido a *M. bovis*, y cuya epidemiología condujo al estudio de los gatos que tenía como mascotas. Se tipificaron por Spoligotyping dos aislamientos, uno de la paciente (aislamiento del año 2001), y el otro proveniente de uno de sus animales (aislamiento del año 2003). El spoligotipo del aislamiento de la paciente fue el Spo 60, no detectado en la base de datos de INTA (figura 19).

Figura 19: Comparación de los spoligotipos del aislamiento del caso, y las cepas de referencia *M. tuberculosis* H37Rv y *M. bovis* BCG, y de *M. bovis* Spo 34.

1	3	5	7	9	11	13	15	17	19	21	23	25	27	29	31	33	35	37	39	41	43	Cepas	
■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	<i>M. tuberculosis</i> H37Rv
■	□	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	<i>M. bovis</i> BCG
○	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	Aislam. del caso <i>M. bovis</i> Spo 60
●	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	Aislam. del gato <i>M. bovis</i> Spo 34

Los números en la parte superior de la figura indican el orden de ubicación de los “espaciadores” en la membrana. Los círculos rojos encierran a los espaciadores que diferencian a ambos aislamientos. Aislam.:(Aislamientos).

Por otra parte, el aislamiento proveniente del gato obtenido en 2003 a partir de una secreción respiratoria, presentó el Spo34, el más frecuente entre los aislamientos estudiados de Argentina. Los spoligotipos de los dos aislamientos, el de la paciente (año 2001) y el del gato (año 2003), se diferenciaron por los espaciadores 1 y 26, concluyéndose que los eventos de infección fueron independientes entre sí.

4.1.1.2. Caso N° 2: Transmisión persona-persona de *M. bovis* resistente a múltiples drogas.

Este caso involucró a dos pacientes, padre e hija. El primero, trabajador de la industria frigorífica, fallece en 2003 por hemoptisis masiva luego de un historial de recurrencias de TBC por *M. bovis* desde 1987. La hija también se enferma de tuberculosis en 1999, y luego de recibir tratamiento completo en 2005 le es aislado *M. bovis* resistente a isoniacida y rifampicina. Por Spoligotyping se detectó en ambos casos al patrón Spo 3, (figura 20) que representa el 3,3% del total de los aislamientos estudiados de Argentina, mientras que agrupa al 19,6% de los aislamientos de humanos.

Figura 20: Patrón de Spoligotyping detectado en los pacientes

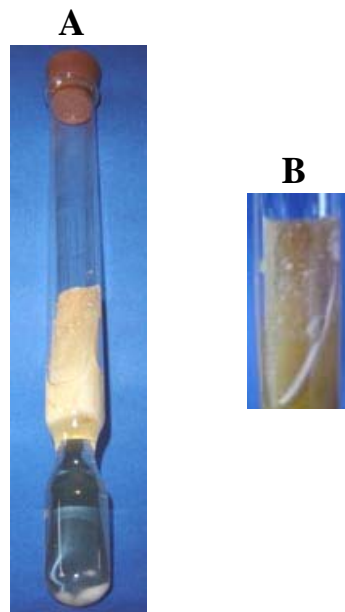
Spoligotipo	Patrón N° (Spol)	N° aislam
■ ■ □ ■ ■ ■ ■ ■ ■ ■ ■ ■ ■ ■ ■ □ □ □ □ □ □	3	2

Posteriormente ambos aislamientos también se tipificaron por MIRUs-VNTR obteniéndose un único patrón (tabla 20). A partir de estos resultados se concluye que existiría una alta probabilidad que la vía de contagio haya sido de padre a hija.

4.1.1.3. Caso N° 3: Aislamientos de vieja data

El tercer caso comprende un grupo de 11 aislamientos de *M. bovis*, pertenecientes al cepario del Instituto Rosenbusch, colección de 1930 (4) a 1960 (7). Fueron obtenidos de bovinos, cultivados en medio de glicerol-papa y conservados en los tubos primitivos (figura 21). Debido a las características de conservación se decidió a la tipificación por Spoligotyping

Figura 21: a) Fotografía de uno de los tubos de cultivo con medio glicerol-papa.
b) Fotografía de colonias de *M. bovis* sobre papa.



Se detectaron dos grupos, integrados por 7 y 4 aislamientos que tuvieron los patrones Spo 21 y Spo 93 respectivamente (figura 22). Este último no se había detectado entre los aislamientos tipificados hasta el momento, diferenciándose del Spo 21 por la carencia de los espaciadores 10, 14 y 15.

Figura 22: Spoligotipos de los aislamientos del caso estudiado.

Spoligotipo	Patrón N° (Spol)	N° aislam
<p style="text-align: center;">10 14-15</p>	21	7
	93	4

Los cuatro aislamientos de 1930 tuvieron el mismo spoligotipo, (Spo21), que se corresponde con el segundo patrón en frecuencia (20,1%) detectado entre los aislamientos de Argentina, mientras que los restantes 7 del año 1960, 3 tuvieron al Spo 21 y 4 al Spo 93. Por otra parte, ninguno de los aislamientos presentó crecimiento en los medios de cultivo convencionales.

Además, para intentar recuperar la cepa se inocularon cobayos, ninguno de los cuales desarrollaron enfermedad ni presentaron lesiones compatibles con tuberculosis en la necropsia, indicando que las cepas de *M. bovis* estarían muertas.

4.1.1.4. Aislamientos procedentes del interior del país

De la provincia de Santa Fe se tipificaron 159 aislamientos entre los que se detectaron 15 spoligotipos diferentes, de los cuales 8 formaron agrupamientos, 7 fueron únicos y 5 exclusivos de la provincia (tabla 8). El patrón con más aislamientos fue el Spo 34 que agrupó a 86 aislamientos (54%). Le siguieron en orden de frecuencia los patrones Spo 21 con 41 aislamientos (25,8%); Spo 4 y 17 con 6 c/u (3,7%); Spo 12 y 3 con 4 c/u (2,5 %); Spo 29 con 3 (1,9%); y el Spo 23 con 2 (1,2%). Los 5 patrones exclusivos de la provincia fueron todos de bovinos Spo 18, 23, 42, 43 y 45 y con excepción del Spo 23 el resto fueron únicos (tabla 8).

En la provincia del Chaco se identificaron 12 spoligotipos diferentes entre los 125 aislamientos estudiados, 6 formaron agrupamientos, 6 fueron únicos y 1 exclusivo (tabla 8). El patrón con más aislamientos fue el Spo 34 que agrupó a 76 aislamientos (60,8%). Le siguieron en orden de frecuencia los patrones Spo 21 con 22 aislamientos (17,6%); Spo 4 con 11 (8,8%); y Spo 38 y 54 con 4 c/u (3,2%), siendo este último además exclusivo. Los patrones únicos fueron de bovinos Spo 3, 10, 19, 20, 35 y 39.

Los 70 aislamientos de Corrientes se clasificaron en 15 spoligotipos diferentes, de los cuales 9 formaron agrupamientos, 6 fueron únicos y 5 exclusivos (tabla 8). El 32,8% de los aislamientos (23) tuvieron el Spo 21, siguiendo en orden de frecuencia los patrones Spo 34 con 19 aislamientos (27,1%); el Spo 12 con 6 (8,6%); el Spo 19 con 5 (7,1%); el Spo 4 con 3 (4,2%) y los Spo 17, 20, 39 y 41 con 2 c/u (2,9%). Los patrones únicos Spo 15, 16, 38, 40, 46 y 76 fueron todos de bovinos. A excepción del Spo 38, el resto además fueron exclusivos de la provincia. Los aislamientos de un armadillo y de un ciervo, tuvieron por spoligotipos al Spo 21 y al 34 respectivamente.

Entre los 14 aislamientos de bovinos de la provincia de Córdoba se detectaron 5 spoligotipos diferentes, 2 formaron agrupamientos, 3 fueron únicos y 2 exclusivos de la provincia (tabla 8). El patrón con más aislamientos fue el Spo 47 con 7 aislamientos (50%), seguido en orden de frecuencia por el patrón Spo 34 que agrupó a 4 aislamientos (28,6%). Los patrones únicos fueron los Spo 21, 22 y 24, de los cuales el 22 y 24 además fueron exclusivos de la provincia.

En la provincia de Entre Ríos se detectaron 4 spoligotipos diferentes entre los 9 aislamientos de bovinos, 3 formaron agrupamientos y uno fue único, mientras que ninguno fue

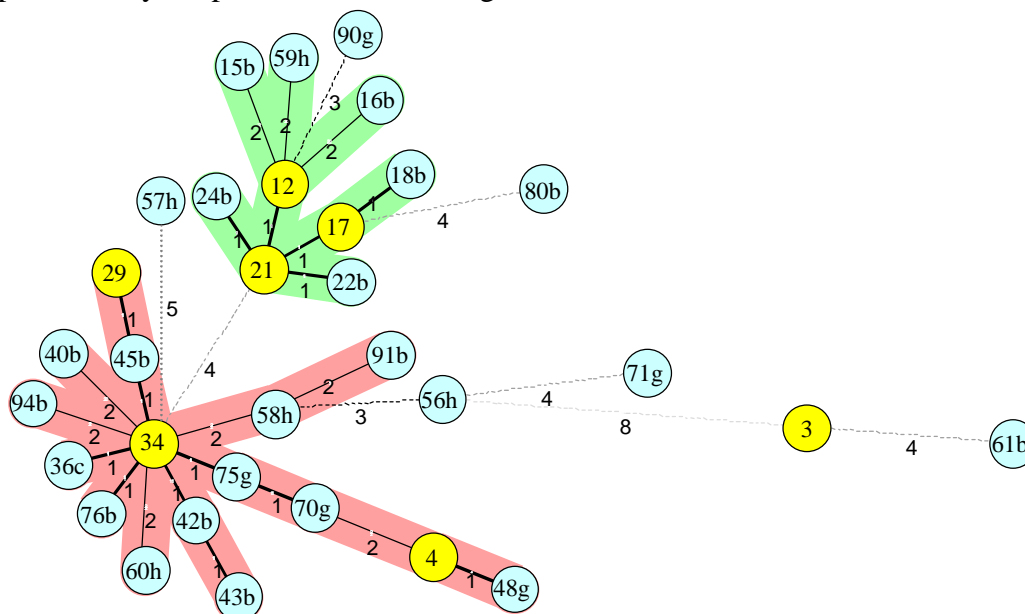
exclusivo de la provincia (tabla 8). El patrón con más aislamientos fue el Spo 34 con 4 aislamientos (44,4%), seguido en orden de frecuencia por los Spo 21 y 37 con 2 c/u (22,2%). El spoligotipo único fue el Spo 17. Diez aislamientos de bovinos de Formosa se distribuyeron en 4 spoligotipos diferentes, de los cuales uno, el Spo 34, formó un agrupamiento de 7 aislamientos (70%). De los restantes, 3 fueron únicos, Spo 21, 38 y 80, y a su vez el Spo 80 además fue exclusivo de la provincia. En la provincia de Misiones se detectaron 3 spoligotipos diferentes, entre los 4 aislamientos de bovinos estudiados. Entre ellos 2 fueron únicos, Spo 20 y 41, y el otro agrupó a 2 aislamientos Spo 34. No hubo patrones exclusivos (tabla 8).

De La Pampa se tipificaron 5 aislamientos, 2 de bovinos que tuvieron el Spo 39, y 3 de jabalíes de los cuales 2 tuvieron el Spo 10 y 1 el Spo 34. Los aislamientos de Patagonia tuvieron dos spoligotipos, el Spo 13 agrupó a 2 y el Spo 34 fue único (tabla 8).

4.1.1.5. Relación entre los spoligotipos únicos con los predominantes en Argentina

Para visualizar la relación entre los 25 spoligotipos únicos (14 de bovinos, 5 de gatos y 1 de ciervo) y los 7 predominantes entre los aislamientos estudiados de Argentina, se construyó un árbol filogenético de distancias mínimas, en el que el nodo raíz es la muestra que tiene mayor número de muestras relacionadas (figura 23, tabla 8).

Figura 23: Arbol filogenético de distancias mínimas mostrando la relación entre los spoligotipos únicos y los predominantes en Argentina.



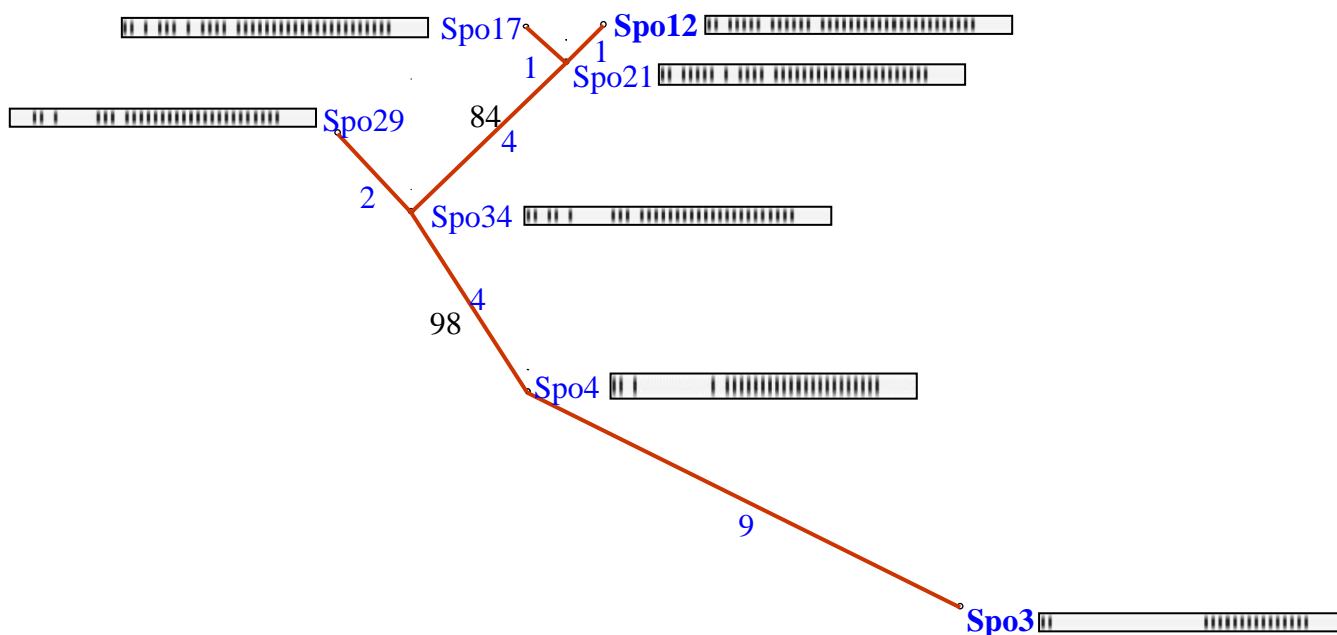
Árbol filogenético de distancias mínimas realizado con el programa Bionumerics, Applied Maths, Kortrijk, Bélgica. Los círculos amarillos destacan los spoligotipos predominantes en Argentina mientras que los celestes a los únicos. En rosa se identifica el agrupamiento en torno al spoligotipo 34 y en verde el correspondiente al Spo 21. Seguido del número de spoligotipo único, se indica con una letra el hospedador del cual provino el aislamiento (b: bovino; h: humano; g: gato; c: ciervo). Los números sobre las ramas corresponden a las distancias (números de cambios) entre los spoligotipos.

En la figura se observa que la mayoría de los spoligotipos únicos se disponen en torno a los predominantes en el país, diferenciándose de ellos en uno o dos espaciadores, representados por el número de cambios indicados sobre las ramas del árbol (figura 23). Por otra parte, el grupo relacionado al Spo 34 es más numeroso que el vinculado al Spo 21, el segundo spoligotipo en frecuencia. Si bien el muestreo realizado ha cubierto parcialmente la totalidad de población bovina con tuberculosis, los spoligotipos únicos de bovinos podrían corresponder a hallazgos nuevos y recientes que no alcanzaron a diseminarse en la población. Pero en el caso de los no bovinos, también habría que considerar el efecto de la presión selectiva debido al escape del hospedador primario, provocando mutaciones en la región DR y dando como resultado variantes con spoligotipos relacionados cercanamente con los predominantes. Como se dijo en párrafos anteriores, el 61 % de los aislamientos con el spoligotipo Spo 3 corresponden a humanos, y según la distribución del árbol presentado estaría relacionado a otros spoligotipos únicos de humanos y también a uno bovino.

4.1.1.6. Evolución de los spoligotipos predominantes de Argentina

Brosch y col., a partir del estudio del polimorfismo de las regiones de diferencia (RD), postularon que la principal forma de evolución del complejo *M. tuberculosis* estuvo regida por la pérdida progresiva de material genético (Brosch *et al.*, 2002; 2007). La región DR también habría sido alcanzada por esta forma de evolución y en consecuencia los spoligotipos con mayor número de espaciadores serían más antiguos que aquellos con menos, los cuales se habrían originado por deleciones sucesivas y ordenadas de espaciadores de la región. De este modo se estableció la relación evolutiva entre los 7 spoligotipos predominantes en los aislamientos estudiados de Argentina, mediante un árbol filogenético realizado por el método de la máxima parsimonia (figura 24).

Figura 24: Arbol filogenético indicando la evolución de los spoligotipos predominantes en el país.



Arbol filogenético construido con el programa Bionumerics, Applied Maths, por el método de la máxima parsimonia, con un valor de *bootstrap* de 100. Sobre las ramas se indican las respectivas distancias en azul y valores de *bootstrap* en negro.

El Spo12, caracterizado por tener la totalidad de los espaciadores de *M. bovis* y corresponder al spoligotipo de la cepa *M. bovis* BCG, al perder el espaciador N° 11 habría dado origen al Spo 21 (el segundo en predominancia en Argentina). A partir de éste habrían derivado el Spo 17 por la pérdida del espaciador N° 5 y el Spo 34 al perder los espaciadores 8, 10 y 12. De la pérdida de los espaciadores N° 1 y 2 del Spo 34, se habría originado el Spo 29, mientras que de la pérdida de los espaciadores N° 5, 7, 13 y 14 habría resultado el Spo 4. Finalmente, a partir del Spo 4 se habría formado el Spo 3 mediante la pérdida de los espaciadores N° 4, 5, 15 y del N° 17 al 23. Este último spoligotipo tiene el menor número de espaciadores y sería evolutivamente el más reciente (figura 24).

4.1.2. Aislamientos de países limítrofes

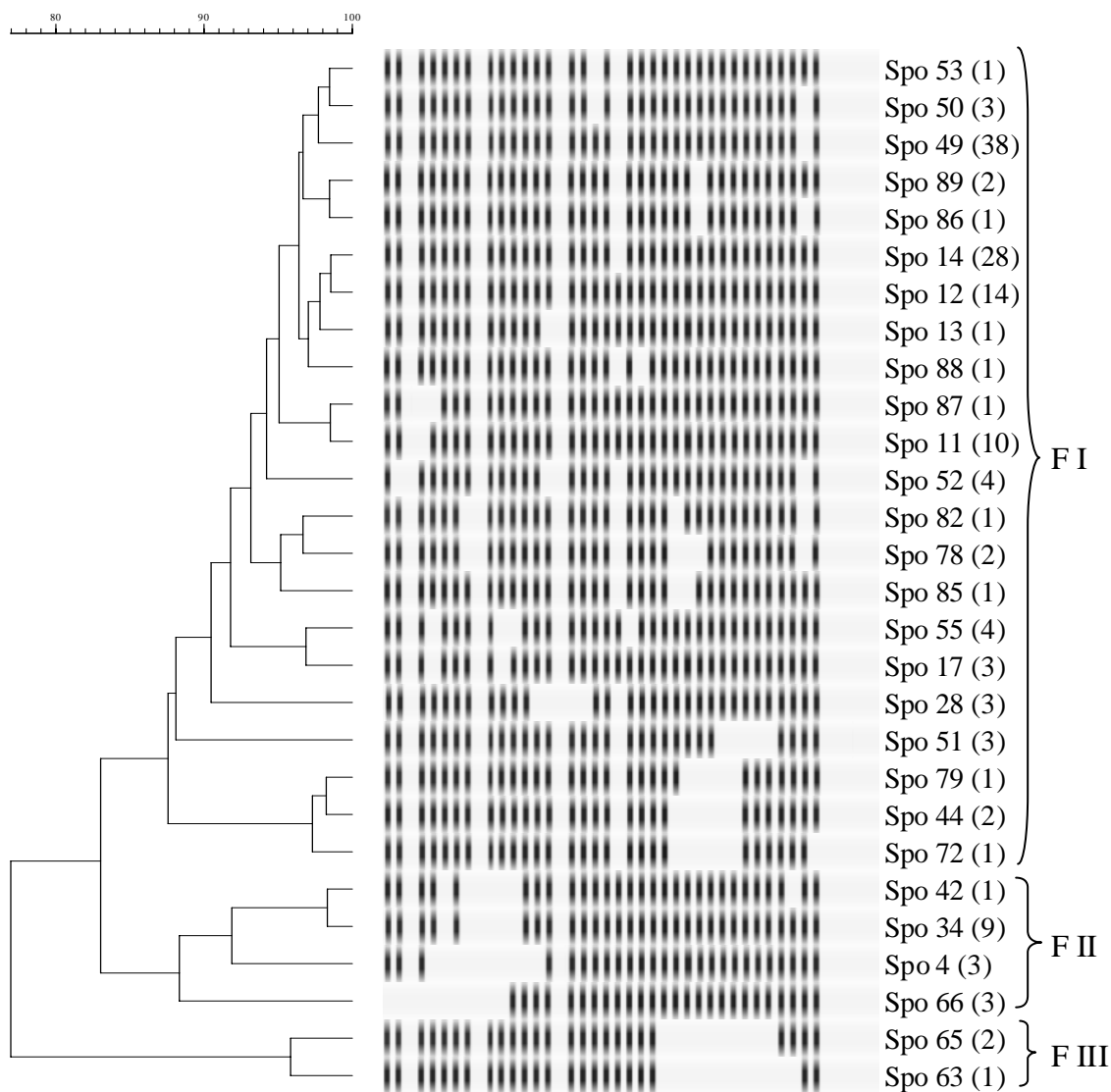
Se tipificaron 144 aislamientos de Brasil (134 bovinos, 7 búfalos, 2 cerdos y 1 humano), 6 de bovinos de Paraguay y 5 de bovinos de Uruguay. Entre los aislamientos de Brasil, se detectaron 28 patrones diferentes, de los cuales 17 formaron agrupamientos y 11 fueron únicos, mientras que se identificaron 20 spoligotipos exclusivos de los estados brasileños, entre los que a su vez 11 fueron únicos y exclusivos (figuras 25 y 26, tabla 10).

Figura 25: Mapa de Brasil indicando el origen de los aislamientos



En amarillo se destacan los estados de Brasil de los cuales provinieron los aislamientos de *M. bovis* estudiados. El resto de los estados brasileños se encuentran en color ocre. Entre paréntesis se indica el número de aislamientos por estado.

Figura 26: Dendrograma indicando la relación entre los 28 spoligotipos de los aislamientos de Brasil.



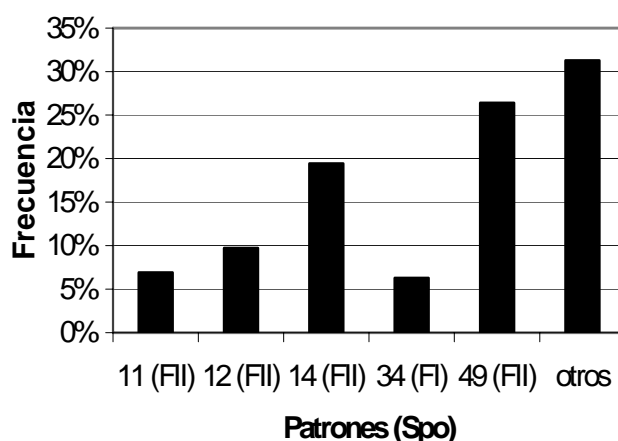
Se indica el Spoligotipo (Spo) y entre paréntesis el número de aislamientos. Las llaves encierran los spoligotipos de cada familia (F).

Tabla 10: Número de aislamientos por cada spoligotipo, en cada estado y hospedador.

Estado (N° aisl.)	N° aisl. por hosp.	N° de aislamientos por spoligotipo																											
		4	<u>11</u>	12	13	14	<u>17</u>	<u>28</u>	34	42	44	<u>49</u>	<u>50</u>	51	<u>52</u>	<u>53</u>	<u>55</u>	63	65	66	72	78	79	<u>82</u>	<u>85</u>	<u>86</u>	<u>87</u>	<u>88</u>	<u>89</u>
Goias	1 bovino												1																
Mato Grosso / Mato Grosso del Sur	1 bovino				1																								
Minas Gerais (44)	43 bovinos		2	9		5	3		1		15		2	3	1	2													
	1 humano								1																				
Paraná	1 cerdo		1																										
Para (9)	3 bovinos		1			2																							
	6 búfalos		5			1																							
Río Grande del Sur	16 bovinos	3		1		4			1		7																		
Santa Catalina	1 cerdo		1																										
San Pablo (71)	70 bovinos			4	1	15		2	7		2	16	3		1		2	1	2	3	1	2	1	1	1	1	1	1	2
	1 búfalo								1																				
TOTAL	144	3	10	14	1	28	3	3	9	1	2	38	3	3	4	1	4	1	2	3	1	2	1	1	1	1	1	2	

Los spoligotipos exclusivos Brasil se encuentran subrayados.

El patrón predominante entre los aislamientos estudiados de Brasil fue el Spo 49, que agrupó al 26,4% de los aislamientos (38/144) y a su vez también fue exclusivo del país. En orden de frecuencia le siguieron el Spo 14 con 28 aislamientos (19,5%); el Spo 12 con 14 (9,7%); el Spo 11 con 10 (6,9%); el Spo 34 con 9 (6,3%); los Spo 52 y 55 con 4 c/u (2,8%); los Spo 4, 17, 28, 50, 51 y 66 con 3 c/u (2,08%); y los Spo 44, 65, 78 y 89 con 2 c/u (1,4%) (figura 27).

Figura 27: Frecuencia de los principales spoligotipos entre los aislamientos de Brasil.

Todos los spoligotipos de aislamientos de hospedadores no bovinos tales como, Spo 11, 14 y 28 de búfalos; Spo 11 de cerdos; y Spo 34 de humanos, también fueron detectados en bovinos. Entre los 5 patrones encontrados con más frecuencia, Spo 49 (26,4%); Spo 14 (19,5%); Spo 12 (9,7%); Spo 11 (6,9%) y Spo 34 (6,3%), los spoligotipos encontrados solamente en Brasil fueron los Spo 49 y 11, mientras que el Spo 14 si bien fue exclusivo de Brasil en la región, también fue encontrado en México. Los patrones de Brasil encontrados también en Argentina fueron los Spo 4, 12, 13 y 34, de aislamientos originarios del sur de Brasil y los Spo 17 y 42 del sudeste (tabla 10 y 11).

En los 6 aislamientos de bovinos de Paraguay se registraron 3 patrones diferentes Spo 34, 10 y 26 (figura 28) que agruparon a 3, 2 y 1 aislamientos respectivamente, siendo solo el Spo 26 único y exclusivo de Paraguay, mientras que el Spo 34 constituye el patrón detectado con más frecuencia en Argentina, y el Spo 10 fue detectado en un aislamiento de un bovino de Chaco y en un jabalí de La Pampa.

Figura 28: Spoligotipos de los aislamientos de Paraguay

Spoligotipo	Patrón N° (Spol)	N° aislam.
■ ■ □ □ □ ■ ■ ■ □ ■ □ ■ □ □ □ □ □ □	10	2
■ ■ □ □ □ ■ ■ ■ □ □ □ ■ ■ ■ □ ■ □ □ □ ■ ■ ■ □ □ □ □ □ □	26	1
■ ■ □ ■ ■ ■ □ □ □ □ □ □ □ ■ ■ ■ □ ■ □ □ □ □ □ □	34	3

Los 5 aislamientos de Uruguay que se tipificaron, se dividieron en 3 spoligotipos diferentes, Spo 34, 21 y 42, que agruparon a 2, 2 y 1 aislamientos respectivamente, sin que ninguno de los 3 fuera exclusivo del país, ya que también se detectaron en Argentina.

Al comparar los patrones de Brasil, Paraguay y Uruguay con los de Argentina, se detectaron 8 spoligotipos comunes a dos o más de estos países (tabla 11).

Tabla 11: Patrones comunes entre los aislamientos de Argentina y de los países limítrofes

País	Total de aislamientos tipificados	Porcentaje de cada spoligotipo en los respectivos países							
		4	10	12	13	17	21	34	42
Argentina	542	5,5	0,5	1,8	0,9	2,2	20,1	46,9	0,18
Brasil	144	2,8	-	9,7	0,69	2,08	-	6,3	0,69
Paraguay	6	-	33,3	-	-	-	-	50	-
Uruguay	5	-	-	-	-	-	40	40	20

Solamente hubo un solo patrón presente en Argentina, Brasil, Paraguay y Uruguay que fue el Spo 34, el cual en Argentina agrupó al 46,9% de los aislamientos y fue el predominante del país, mientras que en Brasil agrupó al 6,9 % de los aislamientos, en tanto que en Paraguay y Uruguay al 50 y 40% respectivamente (tabla 11). Por otra parte, el Spo 42 estuvo presente en Argentina, Brasil y Uruguay mientras que los 6 patrones restantes estuvieron presentes en dos de los 4 países comparados.

Figura 29: Dendrograma de los spoligotipos detectados en dos o más de los países limítrofes con Argentina.



Se indica el spoligotipo (Spo), y la inicial del país en el que fue detectado.
A: Argentina; B: Brasil; P: Paraguay; U: Uruguay.

Los patrones detectados en dos o más de los países mencionados estuvieron relacionados entre un 89% y 98% (figura 29).

En los aislamientos de Argentina, Brasil y Paraguay se detectaron patrones exclusivos de esos países en la región. De este modo, el 84,3% (43/51) de los spoligotipos fueron exclusivos de Argentina; el 78,6% (22/28) de Brasil; y el 33,3% (1/3) de Paraguay. Por otra parte, entre los patrones exclusivos de Brasil en la región, los Spo 49 y 14, también fueron los predominantes agrupando al 26,4 y 19,5 % de los aislamientos de ese país respectivamente, mientras que los patrones exclusivos de Argentina con mayor cantidad de aislamientos fueron los Spo 3 y 29 que agruparon el 3,3 y 2,8% de los mismos.

4.1.3. Aislamientos de países distantes

Se tipificaron 82 aislamientos de *M. bovis* de bovinos de México y uno de Costa Rica. Los provenientes de México fueron de los siguientes estados: Aguascalientes (1), Chihuahua (57), Hidalgo (2), Jalisco (6), Tamaulipas (4) y Veracruz (8), mientras que 4 no tuvieron identificación de origen (figura 30). Entre ellos se detectaron 14 spoligotipos diferentes, de los cuales 10 formaron agrupamientos y 4 fueron únicos, mientras que los exclusivos del país se elevaron a 10

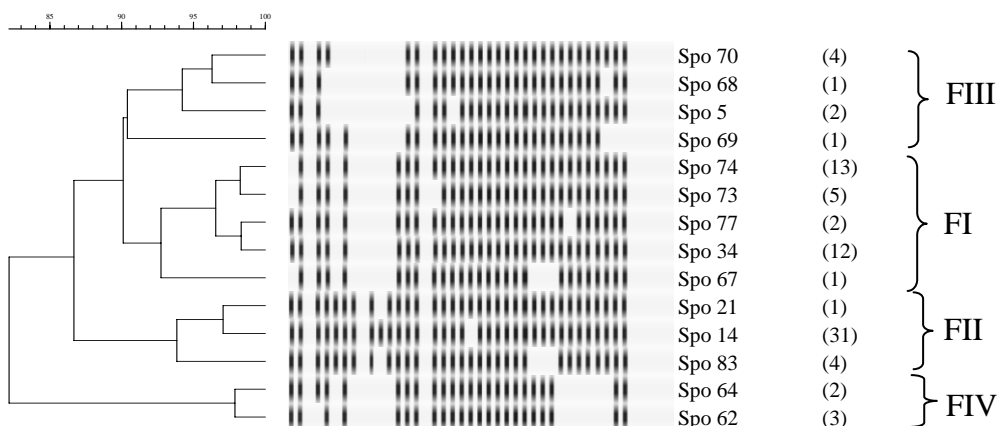
representando el 71,4 % de los spoligotipos (10/14). Por otra parte los patrones conformaron 4 familias, I a IV, con 5, 4, 3, y 2 spoligotipos respectivamente (figura 31, tabla 12).

Figura 30: Origen de los aislamientos de México



En amarillo se destacan los estados de los cuales provinieron los aislamientos tipificados. El resto de los estados de México están en color terracota. Entre paréntesis se indica el número de aislamientos por estado.

Figura 31: Dendrograma mostrando la relación entre los patrones detectados en los aislamientos de México.



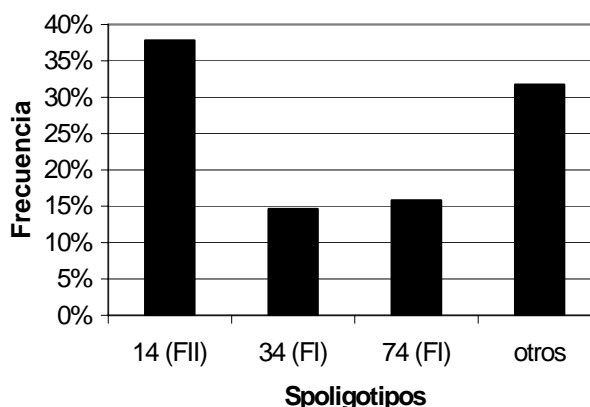
Se indica el Spoligotipo (Spo) y entre paréntesis el número de aislamientos. Las llaves encierran los spoligotipos de cada familia (F).

Tabla 12: Número de aislamientos de México de cada spoligotipo por estado.

Estado	N° aisl.	N° de aislamientos por spoligotipo													
		<u>5</u>	14	21	34	<u>62</u>	<u>64</u>	<u>67</u>	<u>68</u>	<u>69</u>	70	<u>73</u>	<u>74</u>	<u>77</u>	<u>83</u>
Aguascalientes	1						1								
Chihuahua	57		31		8	3						5	5	2	3
Hidalgo	2												2		
Jalisco	6			1	1		1				2		1		
Tamaulipas	4												4		
Veracruz	8				3					1	2		1		1
Sin Datos	4	2						1	1						
TOTAL	82	2	31	1	12	3	2	1	1	1	4	5	13	2	4

Los spoligotipos exclusivos de México se encuentran subrayados.

Teniendo en cuenta que la mayoría de los aislamientos provinieron del estado de Chihuahua, que se encuentra bajo el programa de erradicación de tuberculosis bovina de México con una tasa de reactores positivos del 0,4%, el patrón predominante entre los aislamientos de México tipificados fue el Spo 14, que agrupó al 37,8% de los aislamientos (31/82) y se correspondió con la familia de spoligotipos a la que pertenece *M. bovis* BCG (familia II). En orden de frecuencia le siguieron el Spo 74 con 13 aislamientos (15,8%); el Spo 34 con 12 (14,6%); el Spo 73 con 5 (6,1%); el Spo 70 y 83 con 4 c/u (4,9%); el Spo 62 con 3 (3,6%); y los Spo 5, 64 y 77 con 2 c/u (2,44%) (figura 32). El resto de los patrones, Spo 21, 67, 68 y 69 fueron únicos.

Figura 32: Frecuencia de los principales spoligotipos entre los aislamientos de México

Sobre el eje de las x se indican los spoligotipos y entre paréntesis las respectivas familias.

Por otra parte, se observó que el patrón predominante en México Spo 14 (37,8%), fue encontrado también en Brasil, donde constituyó el segundo spoligotipo en frecuencia agrupando al 19,5% de los aislamientos de ese país. El resto de los spoligotipos que se encontraron en otros países fueron el Spo 21, en Argentina y Uruguay, el Spo 34, en Argentina Brasil, Paraguay y Uruguay, y el Spo 70 en Argentina en un aislamiento de un gato de la ciudad de Buenos Aires. Los aislamientos que tuvieron el patrón mayoritario Spo 14, fueron provenientes de un solo estado, mientras que los que estuvieron agrupados con el segundo patrón en frecuencia Spo 74 provinieron de 5 estados diferentes Chihuahua, Tamaulipas, Hidalgo, Jalisco y Veracruz. Los patrones que agruparon más aislamientos, Spo 14, 74 y 34, tuvieron un coeficiente de similitud del 0,86% (figura 30).

Por último, de Costa Rica solamente se tipificó un aislamiento de un bovino de origen geográfico desconocido, cuyo spoligotipo (Spo 8) fue exclusivo de ese país (figura 33).

Figura 33: Spoligotipo del aislamiento de *M. bovis* de Costa Rica.

Spoligotipo	Patrón N° (Spol)	N° aislam
■ ■ ■ ■ □ □ ■ □ ■ □ □ □ □ □ ■ ■ ■ ■ ■ ■ ■ ■ ■ □ □ ■ ■ ■ ■ ■ ■ ■ ■ □ □ □ □ □ □	8	1

4.1.4. Análisis general de los spoligotipos. Variabilidad de los espaciadores

La ausencia de los espaciadores 3, 9, 16 y 39 a 43 fue característico de todos los aislamientos de *M. bovis* analizados (figuras 16, 26, 28, 31 y 33). Por otra parte se observó una mayor variabilidad en los espaciadores 1-25 ubicados río arriba de IS6110 (1-25) respecto de los 26-43 presentes río abajo de dicha secuencia. Los espaciadores menos variables fueron el 24, 35 y 38 con frecuencias superiores al 99%, mientras que el 6, 8, 10, 11 y 12 tuvieron frecuencias inferiores al 45% (figura 34). Sin embargo, al considerar el análisis por país separadamente, se observó que la frecuencia de cada uno de los espaciadores en los aislamientos de Argentina y México siguieron la tendencia del análisis global, contrariamente a lo que ocurrió en los aislamientos de Brasil en los que se observó alta homogeneidad y conservación (figuras 26, 34 y 35). Los espaciadores de spoligotipos de Brasil más variables fueron el 21 con una frecuencia del 36% y el 37 con 66%, mientras que los restantes tuvieron frecuencias superiores al 84%. Además, al considerar en cada país las familias de spoligotipos con más espaciadores, se observó que en Argentina el 39,2% (20/51) integró la familia que contiene al segundo patrón predominante (familia II) (figuras 16 y 17), en Brasil el 78,6% (22/28) se agrupó en la familia en la que se encuentran los cuatro spoligotipos más frecuentes (familia I) (figuras 26 y 27), mientras que en

México el 21,4% (3/14) de los spoligotipos se agrupó en la familia que tiene el patrón más frecuente (familia II) (figuras 31 y 32).

Figura 34: Frecuencia de los 43 espaciadores en los 780 aislamientos de *M. bovis* analizados

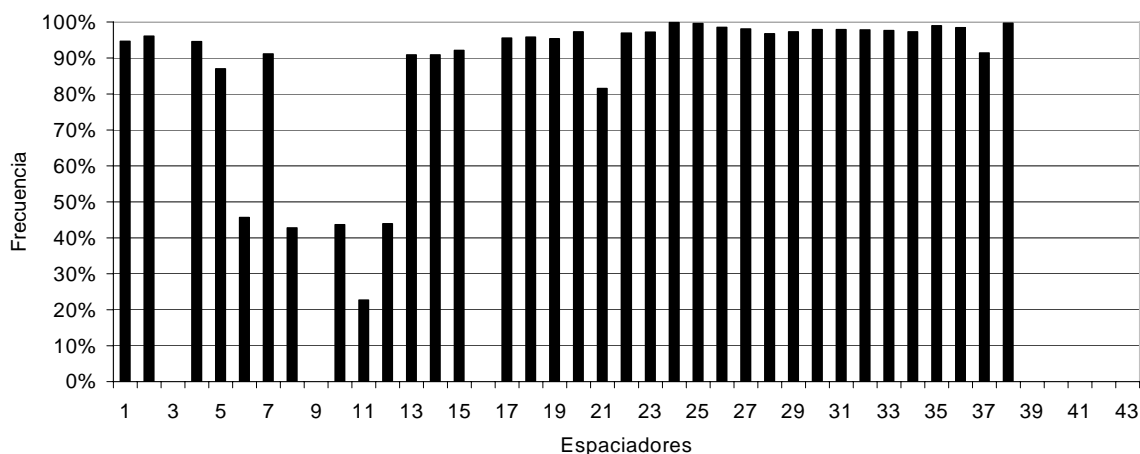
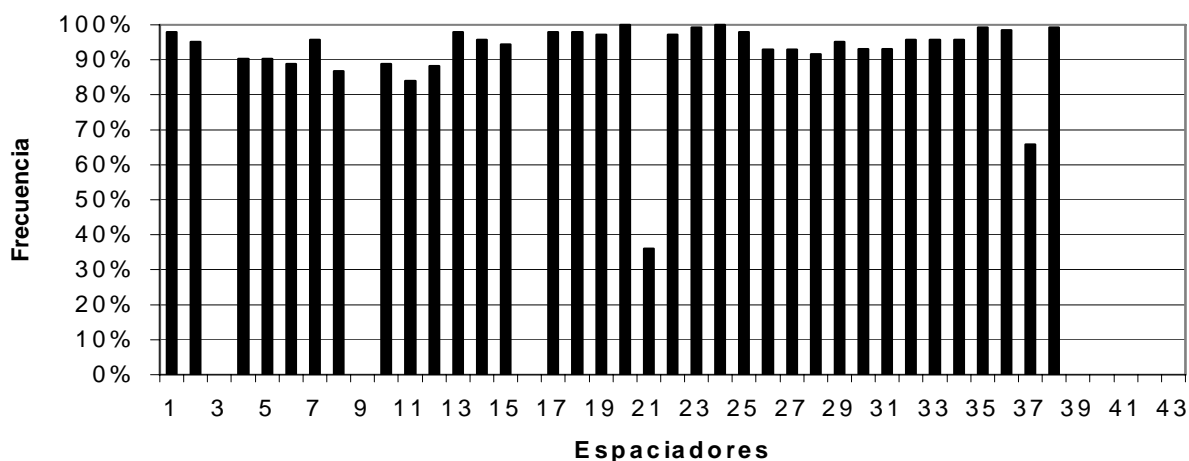


Figura 35: Frecuencia de los 43 espaciadores en los 144 aislamientos de *M. bovis* de Brasil.



4.1.5. Comparación con otras bases de datos

Los spoligotipos fueron comparados con los incluidos en la bases de datos de la Universidad de Sussex, Reino Unido (www.mbovis.org) y del Instituto Pasteur de Guadalupe (www.pasteur-guadeloupe.fr:8081/SITVITDemo/index.jsp), a las cuales también fueron incorporados. Cabe destacar que algunos de los spoligotipos clasificados previamente como exclusivos de países, fueron reconocidos en las bases de datos en aislamientos de otras partes.

Entre los 51 spoligotipos de los aislamientos de Argentina, 18 (5 agrupados y 13 únicos) no fueron reportados por otros países, constituyéndose así en característicos de Argentina. Los que formaron agrupamientos fueron los Spo 47, 38, 54, 93 y 23 con 8, 6, 4, 4 y 2 aislamientos respectivamente (tabla 8 y figura 16). Entre éstos, se destacan el Spo 47 por corresponder a aislamientos de un rodeo de Córdoba y el Spo 93 por tratarse de aislamientos que provinieron de cultivos en medio glicerol papa del año 1960. Con respecto a los patrones únicos, 4 fueron de aislamientos procedentes de gatos y uno de un humano, todos de la ciudad de Buenos Aires, mientras que los 8 restantes fueron de bovinos de Buenos Aires, Córdoba, Corrientes y Santa Fe. Por otra parte, los siete spoligotipos más frecuentes en Argentina fueron detectados en otros países. Los dos spoligotipos predominantes, los Spo 34 y 21, de los que se hallan registrados en la base de datos del Instituto Pasteur, 884 y 157 aislamientos respectivamente, también predominaron en el Reino Unido. A su vez fueron hallados principalmente en Irlanda, Australia y Nueva Zelanda. El Spo 34 también fue detectado en pocos casos en EEUU, Sudáfrica, Paraguay y Francia, mientras que del Spo 21, hubo registros en Brasil, Paraguay, México, EEUU, Suecia, España y Sudáfrica. El tercer spoligotipo en frecuencia el Spo 4, del que existen registrados 64 aislamientos, fue detectado en Brasil, México, EEUU, Reino Unido, Francia, Irlanda e Italia. Le siguen en orden frecuencia el Spo 3 detectado en Brasil, México y EEUU; el Spo 12 en Brasil, Nueva Zelanda y México, el Spo 17 detectado en Reino Unido, Irlanda, Nueva Zelanda y Sudáfrica, y el Spo 29 hallado en México y Brasil entre los aislamientos tipificados en este trabajo. Ocho spoligotipos considerados exclusivos de Argentina fueron registrados en aislamientos en Brasil. Estos son los Spo 19 con un aislamiento de Chaco y 5 de Corrientes, los Spo 27 y 31 de Buenos Aires con 2 aislamientos c/u, los Spo 56, 57 y 58 de humanos de Buenos Aires con un aislamiento c/u, y los Spo 76 y 80 con un aislamiento c/u de Corrientes y Formosa respectivamente.

De los 28 spoligotipos de Brasil, solamente 12 fueron reportados únicamente en este país. Entre éstos 5, los Spo 11, 65, 89, 78 y 65, formaron agrupamientos de 10, 3, 2, 2 y 2 aislamientos respectivamente. Los restantes fueron únicos (Spo 63, 72, 79, 82, 85, 86 y 88) (tabla 10 y figura 26). El spoligotipo más frecuente Spo 49, también fue encontrado en Holanda y Francia, mientras que el segundo en frecuencia, el Spo 14 fue reportado en Bélgica, Francia y España, y detectado en México entre los aislamientos estudiados en este trabajo. En México se registraron 7 spoligotipos distintivos de ese país, los Spo 5, 62, 67, 68, 69, 73 y 83, de los cuales 3 fueron únicos y los restantes formaron agrupamientos comprendidos entre 2 y 5 aislamientos (tabla 12 y figura 31). El spoligotipo mayoritario fue el Spo 14, cuya distribución fue detallada en el párrafo anterior, mientras que el segundo en frecuencia (Spo 74), también fue detectado en Reino Unido y

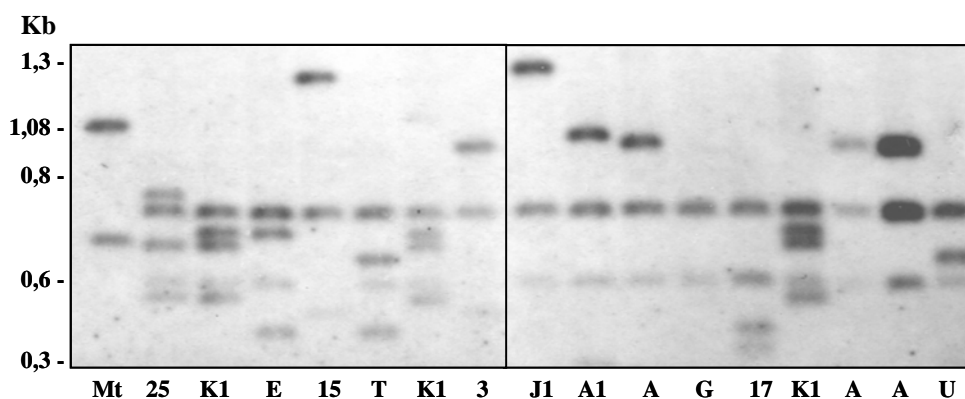
EEUU. El Spo 26 de Paraguay (figura 27) también fue registrado en Brasil y México, mientras que el spoligotipo del aislamiento procedente de Costa Rica (figura 32) también fue hallado en Brasil.

4.2. Tipificación por RFLP DR/PGRS

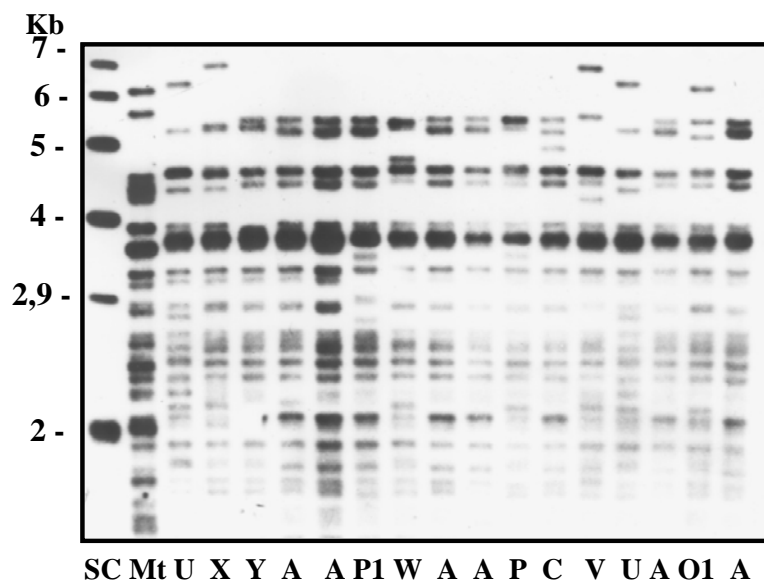
Para evaluar el poder discriminatorio del Spoligotyping y del RFLP, se compararon los resultados de la tipificación por Spoligotyping y RFLP con las sondas DR (Hermans *et al.*, 1991) y PGRS (pMBA2) (Bigi *et al.*, 1995), de 154 aislamientos de *M. bovis* (130 de Argentina, 6 de Brasil, 4 de Paraguay, 2 de México, 1 de Costa Rica y 1 cepa de referencia *M. bovis* AN5 de Holanda) (Zumárraga *et al.*, 1999).

La hibridación con la sonda DR de los productos de digestión obtenidos con la enzima de restricción *AluI*, permitió la detección de 42 patrones diferentes, de los cuales uno, denominado arbitrariamente A, agrupó al 37,7% de los aislamientos, y representó el patrón hallado con más frecuencia entre los aislamientos estudiados (tabla 13 y figura 36). Cuando los mismos digestos se hibridaron con la sonda PGRS (pMBA2), se identificaron otros 40 patrones diferentes, algunos de los cuales no estuvieron asociados con los patrones obtenidos con la sonda DR. El 31,8% de los aislamientos se agrupó en el patrón más frecuentemente detectado, denominado también A (tabla 13 y figura 37).

Figura 36: Imagen de dos films mostrando patrones RFLP-DR



Las letras y/o números al pie de la figura identifican los patrones DR. Mt.: *M. tuberculosis* H37Rv. Los números de la izquierda corresponden a los pesos moleculares expresados en Kb, determinados con el marcador PhiX 174-*Hae* III, (Gibco, BRL, USA).

Figura 37: Imagen de un film mostrando patrones RFLP-PGRS

Las letras y/o números al pie de figura identifican los patrones PGRS. Mt.: *M. tuberculosis* H37Rv. SC Marcador de peso molecular Supercoiled DNA ladder- *PvuII*, (Gibco, BRL USA). Los números de la izquierda corresponden a los pesos moleculares expresados en Kb.

Tabla 13: Matriz de caracteres de los patrones DR y PGRS

Patrón DR	Matriz DR	Nº de aislam	Patrón PGRS	Matriz PGRS	Nº de aislam
A	00000000100001000001000000000000	58	A	0000000010010001001000011000011010	49
A1	0000000010000010000010000000000000	1	B	00000000100000001000010011000011010	4
A2	0000000000100010000010000000000000	2	C	0000000010100101001000011000011010	8
B	0011000010000100000100000000000000	8	D	0000100010001101001000011000011010	2
C	000000000000010000110000000000001	1	E	0010000100110001001000101000011010	1
D	000000001000010000000010000000000	5	F	0000000010010001001010011000011010	2
E	00000000000001100001000000010000	11	H	0000000010010011001000011000011010	1
F	001100101000010000010000000000000	1	H1	0000000010010011001000011010011010	1
G	0000000000000010000010000000000000	12	I	00100100100000001001000011000011010	1
H	0000000000000000000011000000000100	1	J	0000100010100001000001011000011010	1
I	00000000000000100001000001000000	2	M	1100101010010001001000011000001010	1
J	000001000000010000010000000000000	1	O1	0000001010010001001000011000011010	7
J1	001000000000010000010000000000000	1	O2	0000100010010001001000011000011010	5
K	00000000000001100001001000000000	7	O3	0001000010010001001000011000111010	1
K1	00000000000001110001001000000000	2	P	0000000010010001001000011001011010	11
L	01000010000001100001000001000000	3	P1	0000000010010001001000011001010100	1
N	00000000000001000010001000000000	1	Q	0010100110010001001010001000011010	2
O	0000000000000010011000001000000	2	R	000000001000001001000011000011010	6
P	00001000100000000000000000000000	1	R2	000000001000001001001011000011010	1
Q	01000010000001000011000001000000	1	S	0000000010000001001000011000011010	5
R	00100000100000000010000000000000	1	T	0000000010001001001000011000011010	1
T	00000000000001000011000000010000	6	U	0000010000010001000010011000011011	5
U	00000000000001000011000000000000	1	V	0000100010000001001001011000011010	9
V	00000100000000000100000000000000	1	W	0000000001100010110000011000011010	1
W	10001000100001000000000000000000	1	X	0000100000010001001000011000011010	2
Y	10001000000001100001000000001000	2	Y	0000000010100001010000110000011010	2
1	00000010000001000000000000010000	1	1	0000000010011001001000011000011010	6
2	000000001000010000000000000000100	1	2	0010000010010001001010001000011010	1
3	00000000100001000000000000000000	4	3	0000000000011001001000011000011010	2
5	0000000000000110000001010000000	1	5	0000000101000001000001011000001010	1
6	00010100001001000000001000000000	1	7	0000100010100001001010011010011010	1
8	0000000000100000000001100000000	1	71	0000100010010001001000011100011010	2
9	00000000000000001001000000000000	1	8	0000100010000001000110011000011010	1
11	00000000000000001001010000000000	1	10	0000100010010101001000000010011010	1
13	00000000000001000001000000001000	1	16	0000100110000001001010011000011010	2
14	00000000000101000001000000000000	1	19	0000001001001001001000011010011010	3
15	00010000100001000000000001000000	2	21	0000000010001001001000011010010010	1
17	00000000000001000001000001010000	2	23	0000000010010001001000011010011010	1
18	00000000000000110001001000000010	1	24	0000000000010001001000011010011010	1
19	00000000100000000001100000000000	1	25	0000000010010001001010010010001010	1
24	00000000100100000001000000000000	1			
25	00000000000011010001001000000000	1			
Total		154	Total		154

La combinación de los patrones obtenidos con ambas sondas rindieron un total de 79 patrones DR/PGRS, de los cuales 57 fueron únicos y los restantes 22 formaron agrupamientos que involucraron al 63% de los aislamientos. Entre éstos el patrón A/A agrupó al 20% de los mismos,

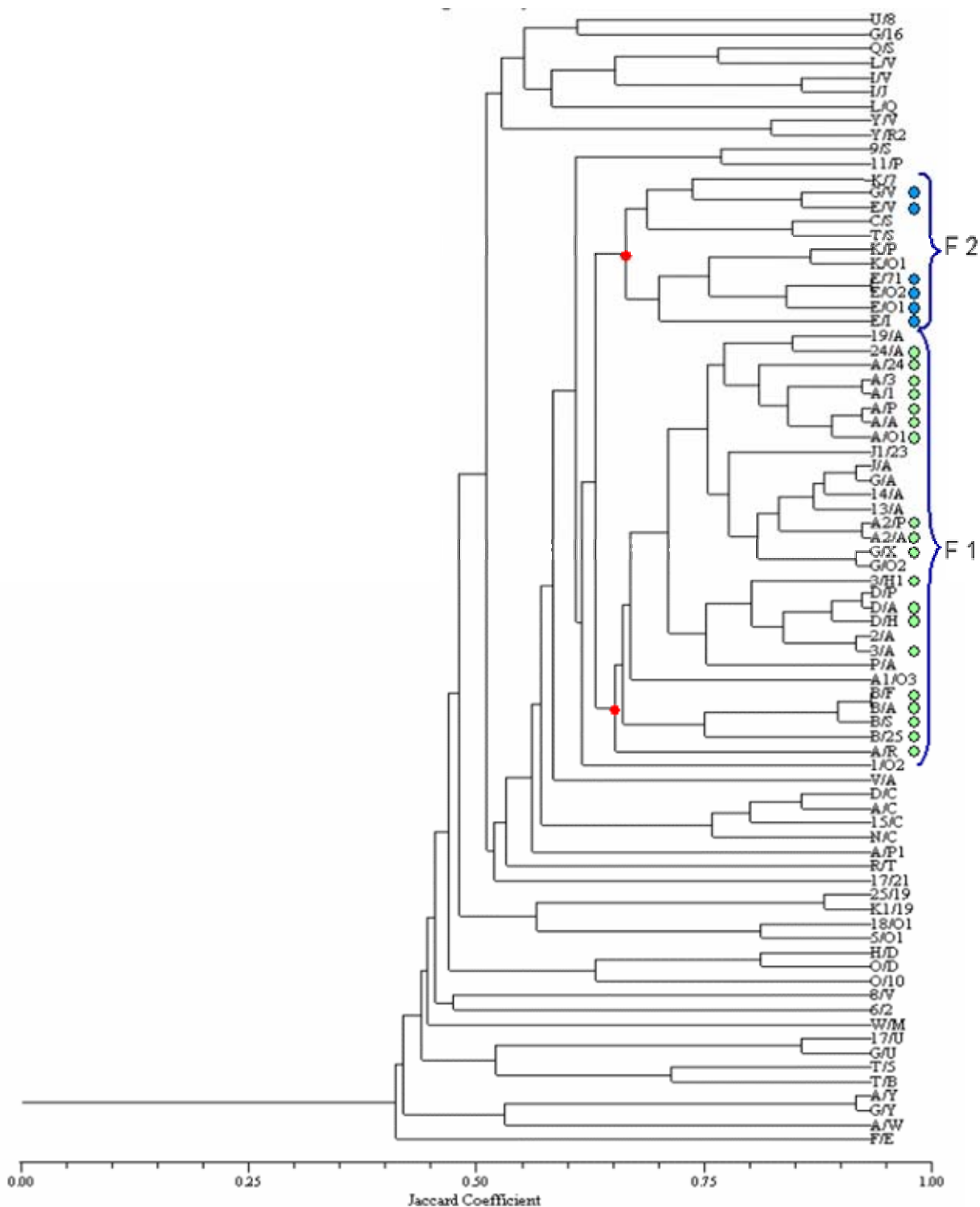
seguido en orden de frecuencia por los patrones A/R y A/1 con 6 aislamientos c/u, representando el 3,9% del total (tabla 14)

Tabla 14: Matriz de caracteres de los patrones DR y PGRS combinados

Patrón DR/PGRS	Nº de aislam	Matriz DR	Matriz PGRS
1/O2	1	00000010000001000000000000100000	0000100010010001001000011000011010
11/P	1	00000000000000001001010000000000	0000000010010001001000011001011010
13/A	1	00000000000001000001000000001000	0000000010010001001000011000011010
14/A	1	00000000000101000001000000000000	0000000010010001001000011000011010
15/C	2	00010000100001000000000001000000	0000000010100101001000011000011010
17/21	1	00000000000001000001000001010000	0000000010001001001000011010010010
17/U	1	00000000000001000001000001010000	0000010000010001000010011000011011
18/O1	1	0000000000000110001001000000010	0000001010010001001000011000011010
19/A	1	00000000100000000001100000000000	0000000010010001001000011000011010
2/A	1	00000000100001000000000000000100	0000000010010001001000011000011010
24/A	1	00000000100100000001000000000000	0000000010010001001000011000011010
25/19	1	00000000000011010001001000000000	0000001001001001001000011010011010
3/A	3	00000000100001000000000000000000	0000000010010001001000011000011010
3/H1	1	00000000100001000000000000000000	0000000010010011001000011010011010
5/O1	1	00000000000000110000001010000000	0000001010010001001000011000011010
6/2	1	00010100001001000000001000000000	0010000010010001001010001000011010
8/V	1	00000000001000000000001100000000	0000100010000001001001011000011010
9/S	1	00000000000000000100100000000000	0000000010000001001000011000011010
A/1	6	00000000100001000001000000000000	0000000010011001001000011000011010
A/24	1	00000000100001000001000000000000	0000000000010001001000011010011010
A/3	2	00000000100001000001000000000000	0000000000011001001000011000011010
A/A	31	00000000100001000001000000000000	0000000010010001001000011000011010
A/C	3	00000000100001000001000000000000	0000000010100101001000011000011010
A/O1	3	00000000100001000001000000000000	0000001010010001001000011000011010
A/P	3	00000000100001000001000000000000	0000000010010001001000011001011010
A/P1	1	00000000100001000001000000000000	0000000010010001001000011001010100
A/R	6	00000000100001000001000000000000	0000000001000001001000011000011010
A/W	1	00000000100001000001000000000000	0000000001100010110000011000011010
A/Y	1	00000000100001000001000000000000	0000000010100001010000110000011010
A1/O3	1	00000000100001000001000000000000	0001000010010001001000011000111010
A2/A	1	00000000010001000001000000000000	0000000010010001001000011000011010
A2/P	1	00000000010001000001000000000000	0000000010010001001000011001011010
B/25	1	00110000100001000001000000000000	0000000010010001001010010010001010
B/A	4	00110000100001000001000000000000	0000000010010001001000011000011010
B/F	2	00110000100001000001000000000000	0000000010010001001010011000011010
B/S	1	00110000100001000001000000000000	0000000010000001001000011000011010
C/S	1	00000000000001000011000000000001	0000000010000001001000011000011010
D/A	1	00000000100001000000001000000000	0000000010010001001000011000011010
D/C	2	00000000100001000000001000000000	0000000010100101001000011000011010
D/H	1	00000000100001000000001000000000	0000000010010011001000011000011010
D/P	1	00000000100001000000001000000000	0000000010010001001000011001011010
E/71	2	00000000000001100001000000010000	0000100010010001001000011100011010
E/I	1	00000000000001100001000000010000	0010010010000001001000011000011010
E/O1	1	00000000000001100001000000010000	0000001010010001001000011000011010
E/O2	3	00000000000001100001000000010000	0000100010010001001000011000011010

Patrón DR/PGRS	Nº de aislam	Matriz DR	Matriz PGRS
E/V	4	000000000000110000100000010000	0000100010000001001001011000011010
F/E	1	00110010100001000001000000000000	0010000100110001001000101000011010
G/16	2	00000000000001000001000000000000	0000100110000001001010011000011010
G/A	1	00000000000001000001000000000000	0000000010010001001000011000011010
G/O2	1	00000000000001000001000000000000	0000100010010001001000011000011010
G/U	4	00000000000001000001000000000000	0000010000010001000010011000011011
G/V	1	00000000000001000001000000000000	0000100010000001001001011000011010
G/X	2	00000000000001000001000000000000	0000100000010001001000011000011010
G/Y	1	00000000000001000001000000000000	0000000010100001010000110000011010
H/D	1	000000000000000000011000000000100	0000100010001101001000011000011010
I/J	1	00000000000000100001000001000000	0000100010100001000001011000011010
I/V	1	00000000000000100001000001000000	0000100010000001001001011000011010
J/A	1	00000100000001000001000000000000	0000000010010001001000011000011010
J1/23	1	00100000000001000001000000000000	0000000010010001001000011010011010
K/7	1	00000000000001100001001000000000	0000100010100001001010011010011010
K/O1	1	00000000000001100001001000000000	0000001010010001001000011000011010
K/P	5	00000000000001100001001000000000	0000000010010001001000011001011010
K1/19	2	00000000000001110001001000000000	0000001001001001001000011010011010
L/Q	2	01000010000001100001000001000000	0010100110010001001010001000011010
L/V	1	01000010000001100001000001000000	0000100010000001001001011000011010
N/C	1	00000000000001000010001000000000	0000000010100101001000011000011010
O/10	1	00000000000000010011000001000000	0000100010010101001000000010011010
O/D	1	00000000000000010011000001000000	0000100010001101001000011000011010
P/A	1	00001000100000000000000000000000	0000000010010001001000011000011010
Q/S	1	01000010000001000011000001000000	0000000010000001001000011000011010
R/T	1	00100000100000000010000000000000	0000000010001001001000011000011010
T/5	1	00000000000001000011000000010000	0000000101000001000001011000001010
T/B	4	00000000000001000011000000010000	0000000100000001000010011000011010
T/S	1	00000000000001000011000000010000	0000000010000001001000011000011010
U/8	1	00000000000001000011000000000000	0000100010000001000110011000011010
V/A	1	00000100000000000100000000000000	0000000010010001001000011000011010
W/M	1	10001000100001000000000000000000	1100101010010001001000011000001010
Y/R2	1	10001000000001100001000000001000	0000000001000001001001011000011010
Y/V	1	10001000000001100001000000001000	0000100010000001001001011000011010
TOTAL	154		

Para analizar la relación entre los patrones DR/PGRS combinados se realizó un dendrograma con el programa NTSYS-pc. v 2.01. Al considerar un coeficiente de similitud de 0,65 se identificaron dos grandes familias con coeficientes iguales o mayores éste. Las familias 1 y 2 estuvieron conformadas por los patrones K/7 a E/I y 19/A a A/R, respectivamente (figura 38).

Figura 38: Dendrograma mostrando la relación entre los patrones de RFLP-DR/PGRS

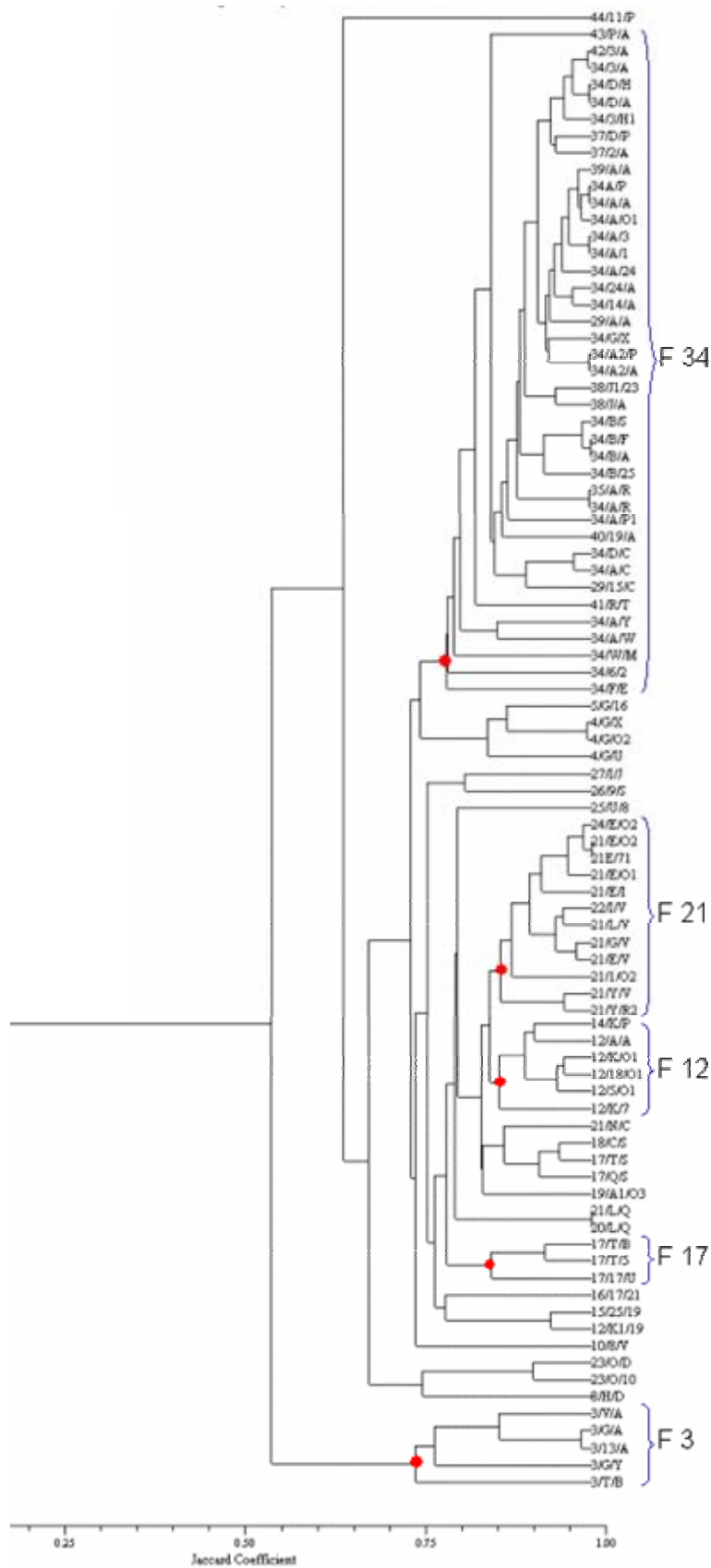
En rojo se resaltan los nodos que definen las dos familias (F 1 y F 2). A la derecha de los patrones DR/PGRS los puntos azules y verdes indican los spoligotipos 21 y 34 respectivamente. La correlación de la matriz fue de 0,81067.

El 84% (65/77) de los aislamientos de *M. bovis* con el spoligotipo predominante Spo 34, tuvieron patrones de RFLP-DR/PGRS correspondientes con la familia 1, mientras que el 64% (11/17) de los aislamientos con el segundo spoligotipo en frecuencia, Spo 21 tuvieron patrones

DR/PGRS que se correspondieron con la familia 2 (figura 38). Dentro de la familia 1 los patrones B/F y B/A se relacionaron en un 93%.

Entre los aislamientos tipificados por RFLP, se identificaron 31 spoligotipos, de los cuales el Spo 34, agrupó al 50% de los mismos. Por otra parte, el 90% de los aislamientos (28/31) que tuvieron el patrón combinado predominante RFLP-DR/PGRS A/A, también estuvieron agrupados con el spoligotipo Spo 34, mientras que 75 aislamientos originarios de Argentina (10 de la provincia de Buenos Aires, 57 de la región centro y 8 de la región noreste) y 2 de Paraguay, todos con el spoligotipo Spo 34, estuvieron agrupados en 11 patrones DR y 20 patrones PGRS diferentes, que combinados sumaron 28 patrones DR/PGRS diferentes. La combinación de los 79 patrones DR/PGRS con los 31 spoligotipos detectados entre los 154 aislamientos de *M. bovis* analizados, arrojaron un total de 88 patrones diferentes, como resultado de la subdivisión por Spoligotyping de 7 patrones DR/PGRS (A/A, T/B, E/O2, L/Q, A/R, G/X y 3/4) que generaron 9 patrones adicionales. La relación entre los 88 patrones combinados fue establecida mediante la construcción de un dendrograma (tablas 14, 15 y 16; figura 39).

Figura 39: Dendrograma mostrando la relación entre los spoligotipos y patrones RFLP-DR/PGRS



Se indican los spoligotipos separados por una barra de los patrones DR/PGRS. Las llaves encierran a las familias (F) de patrones relacionados designadas según el spoligotipo predominante, cuyos nodos se destacan en rojo.

Como resultado se obtuvieron familias de patrones combinados, caracterizadas por el predominio de un spoligotipo en particular, con cuyo número fueron identificadas las más representativas. La familia F 34, con un coeficiente de similitud de 0,74, agrupó al 100 % de los aislamientos con spoligotipo 34 y al 96,7% de los que tuvieron patrón DR/PGRS AA. Además, el 70% de los patrones combinados que la integran tuvieron el Spo 34. La familia F 3, integrada por 5 aislamientos con el Spo 3 y patrones DR/PGRS diferentes, tuvo un 73% de similitud, conformando un grupo distante respecto de las otras con las que se vinculó en un 52%. Las restantes familias tuvieron un coeficiente de similitud superior a 0,84. La F 21 agrupó al 88% de los aislamientos con Spo 21, mientras que las F 12 y 17 al 71% c/u (figura 39). Estos resultados indican que los aislamientos con los spoligotipos predominantes (Spo 34 y 21) tuvieron patrones de RFLP-DR/PGRS relacionados, mientras que aquellos no relacionados y de países distantes tales como Costa Rica, México y Holanda tuvieron patrones DR/PGRS diferenciados del resto. Así, los aislamientos de Brasil, México y Costa Rica, algunos de Paraguay y la cepa *M. bovis* AN5 de Holanda, tuvieron patrones combinados que no se encontraron en los aislamientos analizados de Argentina, indicando que fueron exclusivos de esos países. De este modo el spoligotipo Spo 44 y patrón DR/PGRS 11/P, se encontró solamente en los aislamientos de Brasil, el Spo 26 y DR/PGRS 9/S, solamente en los aislamientos de Paraguay, el Spo 5 y DR/PGRS G/16 en los aislamientos de México; el Spo 8 y DR/PGRS H/D en los aislamientos de Costa Rica, y el Spo 25 y DR/PGRS U/8 se encontró solamente en la cepa *M. bovis* AN5 de Holanda. Por otra parte, se encontraron patrones combinados comunes a distintas regiones de Argentina y de otros países. El spoligotipo Spo 34 y patrón DR/PGRS A/A, se detectó en Argentina (Santa Fe, Corrientes y Formosa con 24, 2 y 1 aislamientos respectivamente) tanto como en Paraguay (un aislamiento); el Spo 34 y DR/PGRS A/C en dos aislamientos de Buenos Aires y uno de Santa Fe; Spo 34 y DR/PGRS A/1 en un aislamiento de Paraguay y en cinco de Santa Fe; Spo 34 y DR/PGRS A/R en 4 aislamientos de Santa Fe y en uno de Formosa; Spo 34 y DR/PGRS B/A en 3 aislamientos de Buenos Aires y uno de Santa Fe; y el Spo 17 DR/PGRS T/B en 2 aislamientos de la provincia de Buenos Aires y en uno de Santa Fe (tabla 15).

Tabla 15: Resultados de la tipificación por Spoligotyping y RFLP-DR/PGRS de los 154 aislamientos de *M. Bovis*.

Origen geográfico	Spoligotipos	Nº de aislamientos	Patrón RFLP-DR/PGRS (Nº de aislamientos)
Argentina			
-Buenos Aires	3	4	G/A (1), G/Y (1), T/B (1), V/A (1)
	17	2	T/B (2)
	21	1	E/I (1)
	27	1	I/J (1)
	34	10	A/C (2), B/A (3), B/25 (1), B/S (1), D/A (1), D/H (1), F/E (1)
-Santa Fe	3	1	13/A (1)
	4	5	G/O2 (1), G/U (4)
	12	4	K/7 (1), 5/O1 (1), A/A (1), 18/O1 (1)
	17	3	T/B (1), T/5 (1), 17/U (1)
	18	1	C/S (1)
	21	13	E/O1 (1), E/O2 (2), E/V (4), G/V (1), L/Q (1), L/V (1), N/C (1), Y/R2 (1), Y/V (1)
	23	2	O/D (1), O/10 (1)
	29	3	A/A (1), 15/C (2)
	34	56	A/A (24), A/C (1), A/O1 (3), A/P (3), A/P1 (1), A/R (4), A/W (1), A/Y (1), A/1 (5), A/3 (2), A2/A (1), B/A (1), D/C (2), G/X (1), W/M (1), 3/A (2), 6/2 (1), 14/A (1), 24/A (1)
	35	1	A/R (1)
	37	1	2/A (1)
	39	1	A/A (1)
	42	1	3/A (1)
	43	1	P/A (1)
-Corrientes	4	1	G/X (1)
	12	3	K/O1 (1), K1/19 (2)
	15	1	25/19 (1)
	16	1	17/21 (1)
	17	1	Q/S (1)
	19	1	A1/03 (1)
	20	1	L/Q (1)
	21	3	E/71 (2), 1/O2 (1)
	34	3	A/A (2), B/F (1)
	40	1	19/A (1)
-Córdoba	22	1	I/V (1)
	24	1	E/O2 (1)
-Entre Ríos	17	1	T/S (1)
	34	2	A2/P (1), A/24 (1)
	37	1	D/P (1)
-Formosa	34	3	A/A (1), A/R (1), B/F (1)
	38	1	J/A (1)
-Misiones	34	1	3/H1 (1)
	38	1	J1/23 (1)
	41	1	R/T (1)
Brasil	14	5	K/P (5)
	44	1	11/P (1)
Costa Rica	8	1	H/D (1)
México	5	2	G/16 (2)
Paraguay	10	1	8/V (1)
	26	1	9/S (1)
	34	2	A/A (1), A/1 (1)
Holanda AN5	25	1	U/8 (1)
Total		154	

AN5, cepa de referencia de *M. bovis*. Los patrones de RFLP-DR/PGRS están indicados con diferentes números y/o letras, separados por una barra. En negrita se destacan los aislamientos pertenecientes a la familia 1 RFLP-DR/PGRS con Spo 34 (figura 38).

4.3. Determinación del poder discriminatorio del Spoligotyping y RFLP

Para la determinación del poder discriminatorio de las técnicas se utilizó el índice discriminatorio de Simpson (ID) según la fórmula:

$$ID = 1 - 1/N(N-1) \sum_{j=1}^S n_j (n_j - 1)$$

Donde N es el número total de muestras, S es el número total de patrones descriptos y n_j es el número total de muestras agrupadas en el patrón j. (Hunter y Gaston, 1998).

Tabla 16: Índice discriminatorio de Simpson de los métodos utilizados

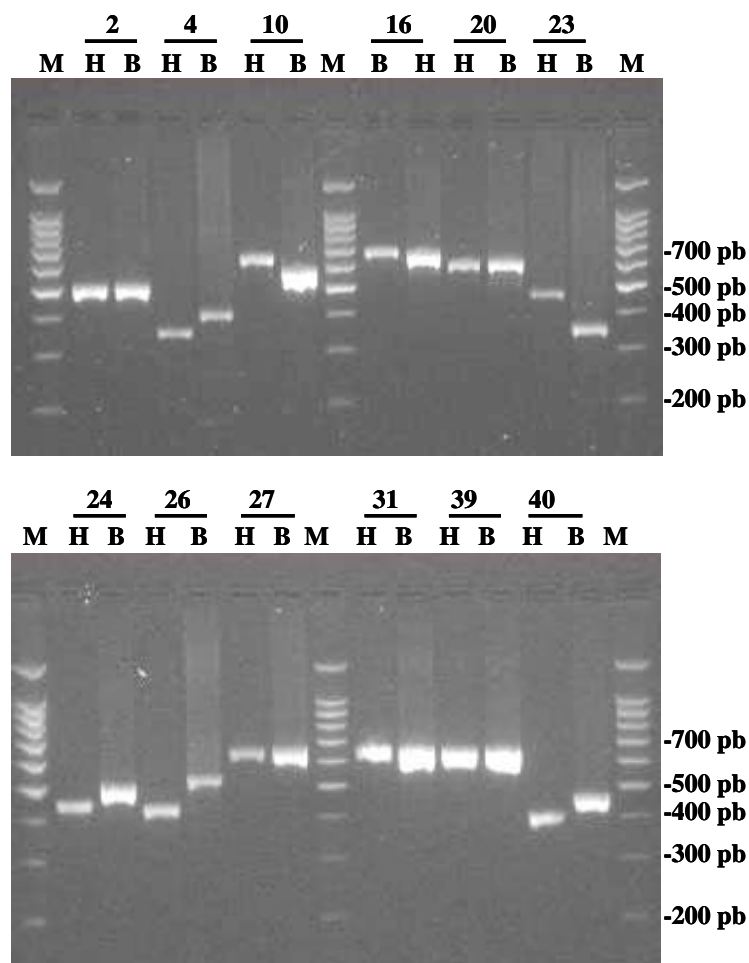
Método	Nº de patrones	Aislamientos (%) con el patrón mayoritario	Patrón mayoritario	Índice discriminatorio de Simpson
Spoligotyping	31	50	34	0,733
RFLP-DR	42	37,67	A	0,842
RFLP-PGRS	40	31,8	A	0,882
RFLP- DR/PGRS	79	20,13	A/A	0,954
Spoligotyping RFLP- DR/PGRS	88	18,2	34/A/A	0,961

Estos resultados denotan que conforme a los índices discriminatorios calculados para las distintas técnicas, los grandes agrupamientos detectados por spoligotyping pueden llegar a subdividirse por RFLP-DR/PGRS, indicando por otra parte que aunque sus relaciones epidemiológicas no sean inmediatas, están vinculados en alto grado. Además, a medida que se combinaron las distintas técnicas se incrementó el ID.

4.4. Tipificación con MIRUs-VNTR

Para evaluar preliminarmente el poder discriminatorio de los 12 MIRUs-VNTR (Supply *et al.*, 2000) en aislamientos de *M. bovis*, se estudiaron 44 muestras tipificadas por Spoligotyping (26 de Argentina y 18 de Brasil), de las cuales 10 de Argentina también fueron tipificadas por RFLP con las sondas DR-PGRS (figura 40 y tabla 19). Como controles se utilizaron las cepas *M. tuberculosis* H37Rv, *M. bovis* BCG y *M. bovis* AN5 (figura 40 y 41, tabla 17).

Figura 40: Electroforesis horizontal en agarosa al 3% mostrando los productos de PCR en cada uno de los MIRUs amplificados de las cepas de referencia *M. tuberculosis* H37Rv y *M. bovis* BCG.

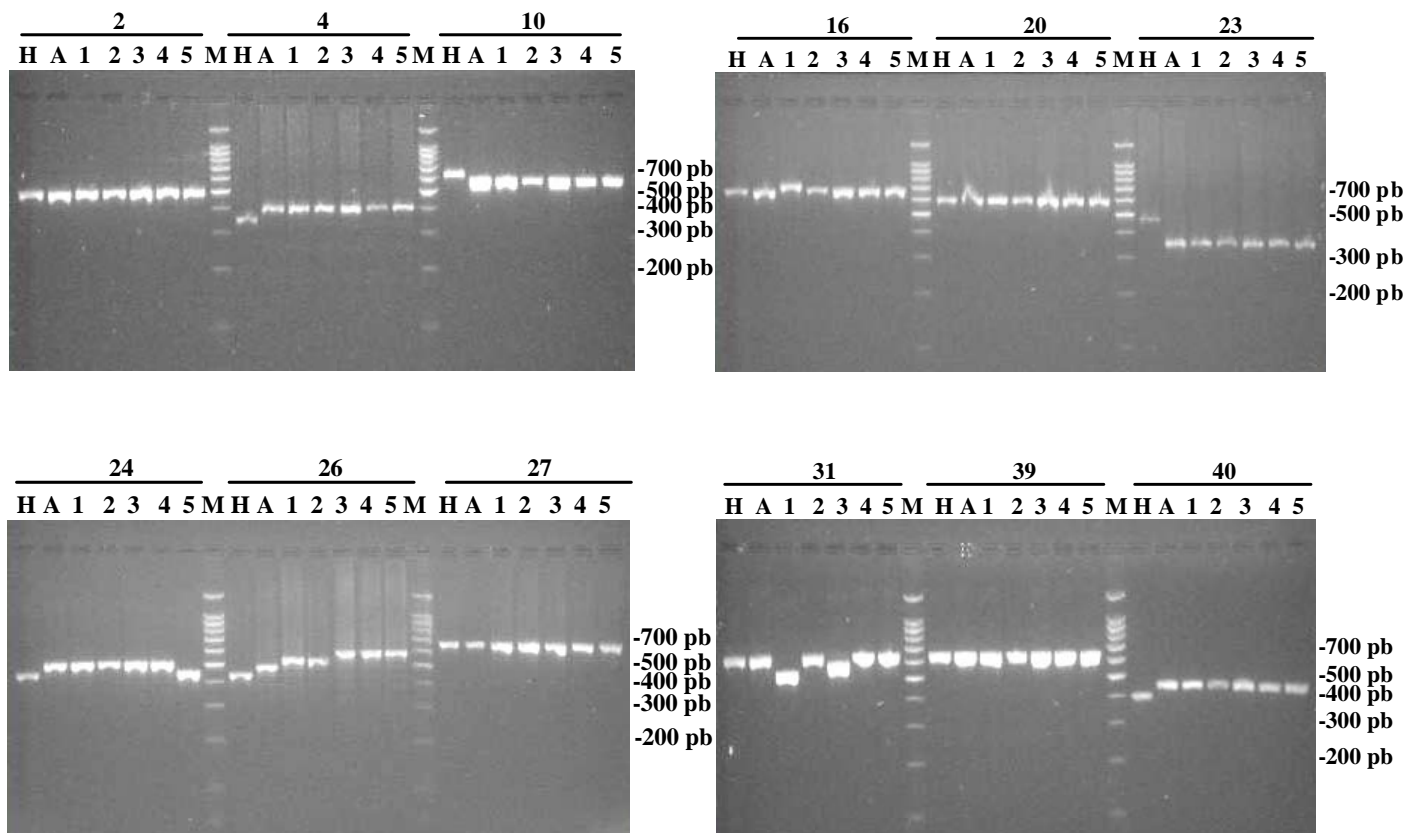


H: *M. tuberculosis* H37Rv; B: *M. bovis* BCG; M: Marcador de peso molecular 100pb DNA Ladder (Promega). A la derecha se indican los tamaños de los fragmentos del marcador de peso molecular en pares de bases (pb). Sobre las calles se indican los distintos MIRUs amplificados.

Tabla 17: Tamaño de los fragmentos amplificados en cada MIRU con las cepas de referencia *M. tuberculosis* H37Rv y *M. bovis* BCG

Cepa	MIRUs											
	2	4	10	16	20	23	24	26	27	31	39	40
M. t H37Rv	508	353	643	671	591	465	447	438	657	651	646	408
M. b BCG	508	406	590	724	591	359	501	540	657	651	646	462
M. b AN5	508	406	590	671	591	359	501	489	657	651	646	462

Mt: *M. tuberculosis*; Mb: *M. bovis*. En los casilleros se indican los tamaños de los fragmentos en pb. Adaptado de www.ibl.fr/mirus/mirus.html

Figura 41: Productos amplificados de cada MIRU de algunos de los aislamientos de *M.**bovis* estudiados.

H: *M. tuberculosis* H37Rv; A: *M. bovis* AN5; M: Marcador de peso molecular 100pb DNA Ladder (Promega). 1-5 diferentes aislamientos de *M. bovis*. A la derecha se indican los tamaños de los fragmentos del marcador de peso molecular en pares de bases (pb). Sobre las calles se indican los distintos MIRUs amplificados.

A partir de los tamaños de los fragmentos se determinó el número de repeticiones de cada unidad MIRU, utilizando la tablas 6 y 7 detalladas en materiales y métodos.

Tabla 18: Tamaño de los fragmentos amplificados en cada MIRU y número de unidades repetitivas.

Nº de repeticiones	MIRUs											
	2 (53)	4 (77)	10 (53)	16 (53)	20 (77)	23 (53)	24 (54)	26 (51)	27 (53)	31 (53)	39 (53)	40 (54)
1		-	-	618	514	-	336	-	551	545	-	-
2	508	329	590	671	591	253	501	387	-	598	646	462
3	-	406	-	724	-	-	-	438	657	651	-	516
4	-	-	-	777	-	359	-	489	-	-	-	-
5	-	-	-	-	-	-	-	540	-	757	-	-
6	-	-	-	-	-	-	-	591	-	-	-	-
7	-	-	-	-	-	-	-	642	-	-	-	-

Se indica entre paréntesis el tamaño de cada unidad MIRU en pares de bases (pb) y en las casillas el tamaño total del fragmento amplificado con cada MIRU en las distintas muestras (tablas 6 y 7). Adaptado www.ibl.fr/mirus/mirus.html

Tabla 19: Número de unidades que se repiten por MIRU.

País	Patrón	N° de aislamientos	MIRUs											
			2	4	10	16	20	23	24	26	27	31	39	40
Brasil	Spo 34	6	2	3	2	2	2	4	2	4	3	3	2	2
		1	2	3	2	2	2	4	1	5	3	3	2	2
		1	2	3	2	2	2	4	2	5	3	3	2	2
	Spo 14	2	2	3	2	3	2	4	2	5	3	3	2	2
		1	2	3	2	3	2	4	2	4	3	3	2	3
		1	2	3	2	3	2	4	2	3	3	3	2	2
		5	2	3	2	3	2	4	2	4	3	3	2	2
1	2	3	2	4	2	4	2	4	3	3	2	2		
Argentina	Spo 34	8	2	3	2	2	2	4	2	5	3	3	2	2
	DR-PGRS	1	2	3	2	2	2	4	2	7	3	3	2	2
	AA	1	2	3	2	2	2	4	2	6	3	3	2	2
	Spo 34	1	2	3	2	2	2	4	2	6	3	3	2	2
		1	2	3	2	2	2	4	2	5	3	3	2	2
		1	2	3	2	2	2	4	1	6	3	3	2	2
	Spo 3	2	2	3	2	2	2	4	2	5	3	3	2	2
	Spo 4	2	2	3	2	2	2	4	2	5	3	3	2	2
	Spo 21	1	2	2	2	2	2	2	2	6	3	3	2	2
		1	2	3	2	2	2	4	2	5	3	3	2	2
	Spo 12	1	2	3	2	2	2	4	2	5	3	3	2	2
		1	2	3	2	3	2	4	2	5	1	2	2	2
	Spo 10	1	2	3	2	2	2	4	2	6	3	2	2	2
	Spo 38	1	2	3	2	2	2	4	2	5	3	3	2	2
	Spo 41	1	2	3	2	2	2	4	2	2	3	5	2	2
Spo 54	1	2	3	2	2	2	4	2	5	3	3	2	2	
Spo 60	1	2	3	2	2	2	4	2	5	3	1	2	2	
Total		44												

En color se resaltan los MIRUs que fueron polimórficos.

Un patrón MIRU queda determinado por la combinación del número de unidades que se repiten en cada MIRU amplificado. Entre los 44 aislamientos analizados clasificados en 11 spoligotipos, se detectaron un total de 16 patrones MIRUs diferentes, de los cuales 11 fueron únicos y los restantes 5 formaron agrupamientos con 18, 6, 5, 2 y 2 aislamientos respectivamente (tabla 20). A la inversa, un grupo de 18 aislamientos con el mismo patrón MIRU, pudo subdividirse en 7 spoligotipos diferentes. Además, 21 aislamientos que tuvieron el spoligotipo Spo 34, 8 de Brasil, y 13 de Argentina (10 de los cuales con el mismo patrón RFLP DR-PGRS AA), pudieron ser subdivididos en 6 patrones MIRUs diferentes, mientras que 10 aislamientos de Brasil con el Spo 14, fueron subdivididos en 5 patrones MIRUs (tabla 19). La combinación de los spoligotipos con los patrones MIRUs rindieron 22 patrones en conjunto.

Tabla 20: Patrones MIRU y de Spoligotyping en los aislamientos estudiados

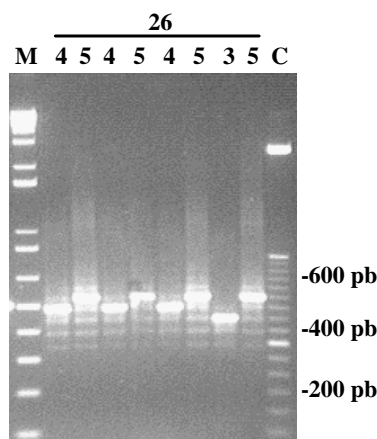
Patrón MIRU	Nº de aislamientos	Spoligotipos (Nº de aislamientos)
232224253322	18	Spo 34 (10); Spo 4 (2); Spo 3 (2); Spo 12 (1); Spo 21 (1); Spo 38 (1); Spo 54 (1)
232224243322	6	Spo 34 (6)
232224263322	2	Spo 34 (2)
232224153322	1	Spo 34 (1)
232224163322	1	Spo 34 (1)
232224273322	1	Spo 34 (1)
232324243322	5	Spo 14 (5)
232324253322	2	Spo 14 (2)
232324233322	1	Spo 14 (1)
232324243323	1	Spo 14 (1)
232424243322	1	Spo 14 (1)
222222263322	1	Spo 21 (1)
232224223522	1	Spo 41 (1)
232224253122	1	Spo 60 (1)
232224263222	1	Spo 10 (1)
232324251222	1	Spo 12 (1)
Total	44	

A la derecha de cada spoligotipo se indica entre paréntesis la cantidad de aislamientos

Las dos muestras con el Spo 3 y patrón MIRU 232224253322, corresponden a los aislamientos de humanos del Caso N° 2, “transmisión de *M. bovis* de padre a hija”.

La amplificación del MIRU 26 estuvo acompañada por múltiples bandas adicionales a la principal (de mayor intensidad), que corresponden a fragmentos que se diferencian entre sí en el tamaño de una unidad repetitiva (figura 42). La presencia de estos artefactos puede atribuirse a errores de la polimerasa durante la amplificación de secuencias repetitivas.

Figura 42: Gel de agarosa al 3% mostrando las múltiples bandas obtenidas en la amplificación del MIRU 26.



M: Marcador de peso molecular 100pb DNA Ladder (Promega); C: marcador de peso molecular 50pb Promega. A la derecha se indican los tamaños de los fragmentos de los marcadores de peso molecular en pares de bases (pb). Sobre las calles se indica el número de repeticiones correspondiente a la banda más intensa.

El MIRU 26 a su vez resultó ser el más polimórfico entre los aislamientos analizados, con 6 variantes diferentes, seguido por el 31 con 4, el 16 con 3, y los MIRUs 4, 23, 24, 27 y 40 con 2 variantes c/u. Por el contrario, no se observó polimorfismo en los MIRUs 2, 10, 20 y 39.

4.4.1. Cálculo del poder discriminatorio de los MIRUs

Para determinar el poder discriminatorio de los MIRUs respecto del Spoligotyping se aplicó el índice de Simpson (Hunter y Gaston, 1998).

Tabla 21: Índice discriminatorio de Simpson para MIRUs y Spoligotyping

Método	Nº de patrones	Aislamientos (%) con el patrón mayoritario	Índice discriminatorio de Simpson
Spoligotyping	11	47,7	0,73
MIRUs	16	40,9	0,81
Spoligotyping + MIRUs	22	22,7	0,92

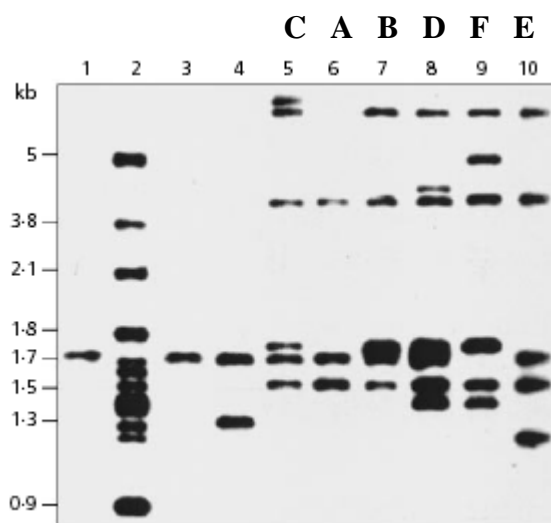
En el número acotado de aislamientos analizados por ambos métodos se determinó un índice discriminatorio de 0,92 para la combinación del Spoligotyping con los MIRUs. Debido a que no todas las cepas seleccionadas fueron tipificadas por RFLP DR/PGRS, no se calculó el ID resultante para la combinación adicional con este marcador.

4.5. Caracterización molecular de aislamientos de micobacterias provenientes de pinnípedos

Debido a que los aislamientos estudiados fueron clasificados bacteriológicamente como pertenecientes al complejo *M. tuberculosis*, con propiedades tanto de *M. bovis* (crecimiento favorecido en medios de cultivo con piruvato de sodio, negatividad a la reducción de nitratos y acumulación de niacina), como de *M. tuberculosis* (sensibilidad a la pirazinamida), sin poder clasificarlos apropiadamente, la denominación de los mismos en el resto del texto es de micobacterias aisladas de pinnípedos. El objetivo de la tipificación de estos aislamientos fue establecer si los mismos tenían patrones de *M. bovis*.

4.5.1. RFLP-IS6110

Debido a que el método de tipificación molecular de referencia para *M. tuberculosis* es el RFLP-IS6110, se evaluó el polimorfismo de este marcador entre los 10 aislamientos de micobacterias de pinnípedos, detectándose seis patrones diferentes (patrones A-F) que tuvieron entre 3 y 7 copias de IS6110 (figura 43).

Figura 43: RFLP-IS6110 de aislamientos de micobacterias de pinnípedos.

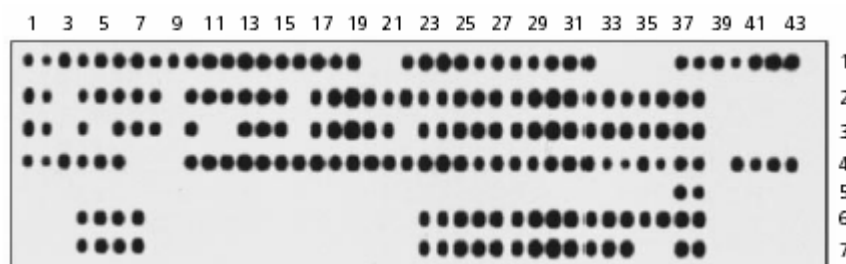
1, *M. bovis*; 2, *M. tuberculosis* H37Rv; 3, *M. bovis* AN5; 4, *M. bovis* BCG Brasil; 5, aislamiento de pinnípedo (tipo C); 6, aislamiento tipo A; 7, aislamiento tipo B; 8, aislamiento tipo D; 9, aislamiento tipo F; 10, aislamiento tipo E. Los tamaños de los fragmentos de *M. tuberculosis* H37Rv después de la digestión con *PvuII* e hibridación con IS6110 son indicados a la izquierda. Los patrones C, A y B, correspondientes a las cepas de las calles 5, 6 y 7, respectivamente, fueron descritos previamente por Romano y col., (Romano *et al.*, 1995). En cambio, los patrones D, F y E, correspondientes a las cepas de las calles 8, 9 y 10, fueron nuevos aislamientos (Zumárraga *et al.*, 1999c).

El tipo A tuvo 3 copias de este elemento y se lo encontró en dos aislamientos. Uno de ellos fue obtenido de un *Arctocephalus australis* encontrado varado en la costa Atlántica argentina en el año 1992 (tabla 22; caso 4); mientras que el segundo fue de un *Arctocephalus tropicalis* en el año 1996 (tabla 22; caso 8). El tipo B, tuvo 5 copias de IS6110 y se lo encontró en 4 aislamientos de las siguientes especies de pinnípedos: un *Otaria flavescens*, involucrado en un brote de TB en el año 1987 en un zoológico de la ciudad de Montevideo, Uruguay (tabla 22, caso 1), y tres *Arctocephalus australis* encontrados en la costa Argentina en los años 1991, 1992 y 1996 (tabla 22, casos 2, 3, y 9 respectivamente). Los restantes cuatro tipos de RFLP-IS6110, (C, D, E y F), se encontraron en los aislamientos de cuatro pinnípedos diferentes de la especie *Arctocephalus australis* (tabla 22, casos 5, 6, 7 y 10 respectivamente). Los seis patrones tuvieron en común las bandas de los fragmentos de restricción de 1,6 y 4 Kb.

4.5.2. Spoligotyping de las micobacterias aisladas de pinnípedos

Los spoligotipos obtenidos de los aislamientos de micobacterias de pinnípedos, fueron diferentes de los característicos del complejo *M. tuberculosis*, sin embargo todos ellos carecieron de los espaciadores 39-43, una de las características identificatorias de *M. bovis*. La comparación en la base de datos de *M. bovis* dio como resultado spoligotipos exclusivos de los aislamientos estudiados.

Figura 44: Comparación de los spoligotipos del complejo *M. tuberculosis* y de las micobacterias aisladas de pinnípedos.



Los números horizontales en la parte superior de la figura corresponden a los 43 oligonucleótidos espaciadores dispuestos en la membrana. Los números verticales corresponden a los spoligotipos de las siguientes micobacterias: 1- *M. tuberculosis* H37Rv, 2- *M. bovis* BCG, 3- *M. bovis* AN5, 4- *M. africanum*, 5- *M. microti*, 6- aislamiento de lobo marino con spoligotipo 1; 7- aislamiento de lobo marino con patrón 2 (caso 10).

Nueve (9/10) de los aislamientos tuvieron idéntico spoligotipo, mientras que solamente un aislamiento (1/10) se diferenció del resto por la ausencia de los espaciadores 35 y 36 (figura 44, tabla 22, caso 10), y fue el último aislamiento obtenido en septiembre de 1996, que tuvo por patrón de RFLP-IS6110, al tipo F, no descrito en ninguno de los otros aislamientos estudiados (Zumárraga *et al.*, 1999c).

Tabla 22: Tipificación por RFLP-IS6110 y Spoligotyping, indicando la especie del hospedador, el país y año del aislamiento.

Caso	Hospedador	País	Año de aislamiento	Spoligotipo	RFLP-IS6110	
					Patrón	Nº de copias
1	<i>Otaria flavescens</i>	Uruguay	1987	1	B	5
2	<i>Arctocephalus australis</i>	Argentina	1991	1	B	5
3	<i>Arctocephalus australis</i>	Argentina	1992	1	B	5
4	<i>Arctocephalus australis</i>	Argentina	1992	1	A	3
5	<i>Arctocephalus australis</i>	Argentina	1992	1	C	6
6	<i>Arctocephalus australis</i>	Argentina	1995	1	D	7
7	<i>Arctocephalus australis</i>	Argentina	1996	1	E	5
8	<i>Arctocephalus tropicalis</i>	Argentina	1996	1	A	3
9	<i>Arctocephalus australis</i>	Argentina	1996	1	B	5
10	<i>Arctocephalus australis</i>	Argentina	1996	2	F	6

La nomenclatura elegida para identificar a los distintos patrones de RFLP-IS6110 y spoligotipos fue designada arbitrariamente con letras A-F, y con números 1-2, respectivamente.

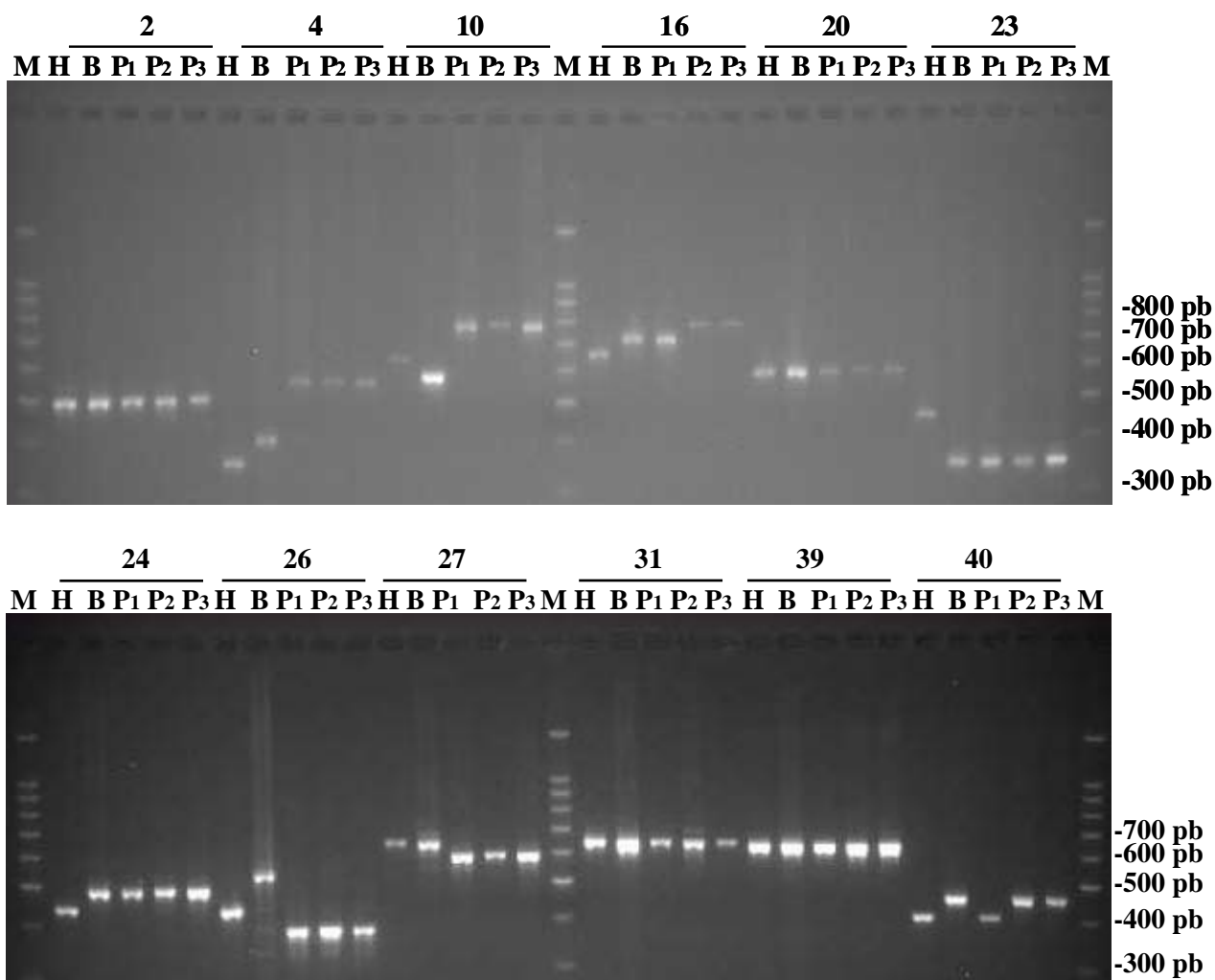
Como resultado de la combinación del Spoligotyping y RFLP-IS6110, se detectaron 2 spoligotipos y 6 patrones de RFLP, que rindieron en conjunto 6 patrones. El agrupamiento de 9

aislamientos con el spoligotipo Spo 1, fue subdividido en 5 patrones de RFLP (patrones A, B, C, D, y E con 2, 4, 1, 1 y 1, aislamientos respectivamente); mientras que el único aislamiento con spoligotipo diferente, Spo 2, también tuvo diferente patrón de RFLP (patrón F).

4.5.3. Análisis con MIRUs

Para evaluar la utilidad de los MIRUs en la diferenciación de aislamientos provenientes de pinnípedos, un aislamiento (P_1) con el spoligotipo Spo 1 y patrón de RFLP-IS6110 C, y otros dos (P_2 y P_3), también con el Spo 1 pero con patrón de RFLP-IS6110 B, fueron tipificados con los 12 MIRUs-VNTR (figura 45).

Figura 45: Corrida electrofóretica de los productos de PCR amplificados con cada uno de los 12 MIRUs-VNTR.



H: *M. tuberculosis* H37Rv; B: *M. bovis* BCG; P_1 - P_3 : aislamientos de pinnípedos; M: Marcador de peso molecular 100pb DNA Ladder (Promega). A la derecha se indican los tamaños de los fragmentos del marcador de peso molecular en pares de bases (pb). Los números sobre las calles indican los distintos MIRUs amplificados.

Los MIRUs 4, 10, 26 y 27 tuvieron alelos que permitieron diferenciar los aislamientos procedentes de pinnípedos, respecto de las cepas de referencia *M. tuberculosis* H37Rv y *M. bovis* BCG, contrariamente a lo observado con los MIRUs 2, 20, 31 y 39 en los que no se detectó polimorfismo. Los MIRUs 4, 10 y 27 a su vez tuvieron alelos diferentes a los descritos entre los 44 aislamientos de *M. bovis* tipificados por este método. Por otra parte, si bien las variantes detectadas en los MIRUs 16 y 40 también se evidenciaron en aislamientos de *M. bovis*, fueron polimórficos en los aislamientos de pinnípedos permitiendo su diferenciación. (figura 45 y tabla 23).

Tabla 23: Tamaño de los fragmentos amplificados en cada MIRU, de los aislamientos de los pinnípedos y de las cepas de referencia *M. tuberculosis* H37Rv y de *M. bovis* BCG

Cepa / aislamiento	MIRUs											
	2 (53)	4 (77)	10 (53)	16 (53)	20 (77)	23 (53)	24 (54)	26 (51)	27 (53)	31 (53)	39 (53)	40 (54)
<i>M. tuberculosis</i> H37Rv	508 (2)	353 (3')	643 (3)	671 (2)	591 (2)	465 (6)	447 (1)	438 (3)	657 (3)	651 (3)	646 (2)	408 (1)
<i>M. bovis</i> BCG	508 (2)	406 (3)	590 (2)	724 (3)	591 (2)	359 (4)	501 (2)	540 (5)	657 (3)	651 (3)	646 (2)	462 (2)
P ₁	508 (2)	560 (5)	802 (6)	724 (3)	591 (2)	359 (4)	501 (2)	387 (2)	604 (2)	651 (3)	646 (2)	408 (1)
P ₂ y P ₃	508 (2)	560 (5)	802 (6)	777 (4)	591 (2)	359 (4)	501 (2)	387 (2)	604 (2)	651 (3)	646 (2)	462 (2)

P₁: Aislamiento de pinnípedo Spo 1, RFLP-IS6110 C. P₂ y P₃: Aislamientos de pinnípedos Spo 1, RFLP-IS6110 B. Debajo de los números que identifican a cada MIRU se indica el tamaño (pb) de cada unidad repetitiva, mientras que debajo de los tamaños de los fragmentos amplificados, se indica entre paréntesis el número de unidades que definen a cada alelo MIRU. El MIRU 4 en *M. tuberculosis* H37Rv tiene una variante de menor tamaño identificada como alelo 3'. Adaptado de www.ibl.fr/mirus/mirus.html

Los dos aislamientos Spo 1/ RFLP-IS6110 B (P₂ y P₃), tuvieron el mismo patrón MIRU 256424222322, mientras que el otro aislamiento con Spo 1 que se diferenciaba en su patrón de RFLP-IS6110 C (P₁) también se diferenció en su patrón MIRU 256324222321 (tabla 24).

Tabla 24: Patrones MIRU de los aislamientos de pinnípedos tipificados

Spoligotipo	Patrón RFLP-IS6110	Patrón MIRU
1	RFLP B	256424222322
1	RFLP C	256324222321

En negrita se destacan los alelos de los MIRUs polimórficos que diferenciaron P₁ respecto de P₂ y P₃

4.5.4. Comparación con aislamientos de otros países

En Australia, Nueva Zelanda y Gran Bretaña, también detectaron aislamientos de las mismas características, los cuales fueron aislados de un hombre australiano, entrenador de lobos marinos; de un tapir brasileño *Tapirus terrestris* de Gran Bretaña, y de las siguientes especies de pinnípedos de *Arctocephalus australis*, *Arctocephalus forsteri*, *Arctocephalus pusillus doriferus*, *Neophoca cinerea* (Cousins *et al.*, 2003). La caracterización tanto fenotípica como genotípica, de varios de los aislamientos obtenidos en los tres continentes, y la posterior comparación entre sí, condujo a la descripción de un nuevo taxón miembro del complejo *Mycobacterium tuberculosis* denominado *Mycobacterium pinnipedii* sp. nov. que se describe a continuación: Los aislamientos pueden ser recuperados a partir de pulmón y linfonódulos asociados de pinnípedos con tuberculosis, y ocasionalmente de linfonódulos mesentéricos y órganos tales como hígado y bazo. Son bacilos ácido-alcohol resistentes, no formadores de espora, sin movilidad y con pérdida del factor cuerda. El crecimiento se ve favorecido por el piruvato de sodio y generalmente ocurre dentro de las 3-6 semanas de incubación en medios a base de huevo a 36-37°C. Las colonias son disgónicas, rugosas, planas y no fotocromogénicas. Los aislamientos son negativos a la reducción de nitratos y generalmente negativos para la acumulación de niacina. Son susceptibles a la pirazinamida (50ug /ml) y a la hidrazida del ácido tiofeno 2 carboxílico (TCH) (1ug/ml) (los aislamientos han demostrado ocasionalmente resistencia a 1ug TCH/ ml, pero son susceptibles a 10 ug/ml). Son patogénicos en coballos y conejos, y sumado a las infecciones fortuitas descritas en un humano, un tapir y un bovino, podrían tener una amplia variedad de hospedador. Todos los aislamientos tienen las secuencias de inserción IS6110, IS1081, *mpb70* y *mtp40*, sin producción detectable del antígeno MPB70. El gen que codifica para la pirazinamidasa, *pncA*, contiene CAC (His) en el codón 57, y el gen *oxyR* homólogo al regulador de la respuesta al estrés de peróxido en bacterias entéricas, tiene G en el nucleótido 285. Ambos genes tienen las mismas mutaciones en *M. tuberculosis*, *M. microti* y *M. africanum*, pero no en *M. bovis* (Zumárraga *et al.*, 1999c). Los patrones de Spoligotyping de los aislamientos de los pinnípedos, forman un agrupamiento diferente del resto de los integrantes del complejo *M. tuberculosis* (Cousins *et al.*, 2003; Zumárraga *et al.*, 1999c). Los aislamientos son susceptibles a la isoniazida, rifampicina, estreptomycin, etambutol y ácido p-aminosalicílico. La cepa que se registró como de referencia es la 6482^T de Australia (=ATCC BAA-688^T=NCTC 13288^T) (Cousins *et al.*, 2003).

4.6. Evaluación de la virulencia de cepas de *M. bovis* en modelo murino

Para poder determinar si las cepas predominantes en los bovinos y otras especies son más virulentas, se estudió el grado de patogenicidad de diferentes cepas de *M. bovis* en modelo murino

de infección intraperitoneal. Con este objetivo se compararon 5 cepas tipificadas por Spoligotyping y MIRUs respecto de la cepa de referencia *M. bovis* AN5 (tabla 25). La selección de las cepas se llevó a cabo considerando el siguiente criterio: Tres de ellas tuvieron el spoligotipo predominante en Argentina (Spo 34), dos provinieron de bovinos (534 y V-2) y la tercera de un jabalí (04-303). Otra de las cepas elegidas, también fue aislada de un jabalí (04-302) con Spo 10, y se la incluyó para poder realizar comparaciones entre animales salvajes de la misma especie; mientras que la última cepa fue de un aislamiento de un humano (02-2B), otro hospedador no habitual, con un spoligotipo único y exclusivo de Argentina Spo 60.

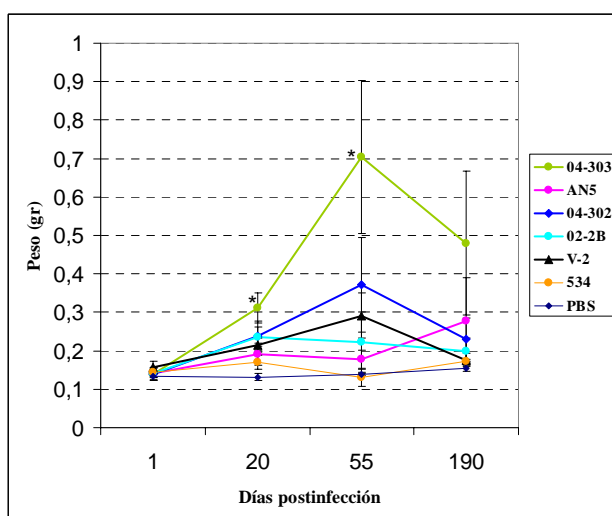
Tabla 25: Patrones de las cepas de *M. bovis* estudiadas

Cepa	Hospedador	Spoligotipo	Patrón MIRU
AN5	Cepa de referencia	Spo 55	232224 24 3322
02-2B	Humano	Spo 60	232224 25 3122
V2	Bovino	Spo 34	232224 25 3322
04-302	Jabalí	Spo 10	232224 26 3222
04-303	Jabalí	Spo 34	232224 26 3322
534	Bovino	Spo 34	232224 16 3322

Los MIRUs polimórficos se destacan en negrita.

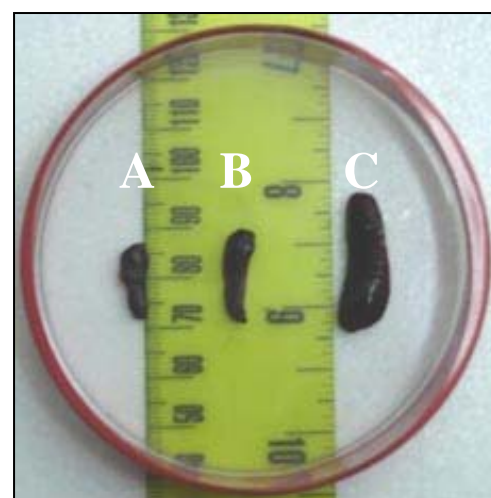
Al cabo de 1, 20, 55 y 190 días postinfección (dpi) por vía intraperitoneal, se les extirpó el bazo, se midió la esplenomegalia por pesada (figuras 46 y 47), y posteriormente se realizaron cultivos a partir de los bazos disgregados y homogeneizados para cuantificar las colonias recuperadas (figura 48).

Figura 46: Comparación de los pesos de los bazos de los distintos grupos de animales.



Diferencia significativa respecto a *M. bovis* AN5 (* $p < 0,05$; $n = 3$)

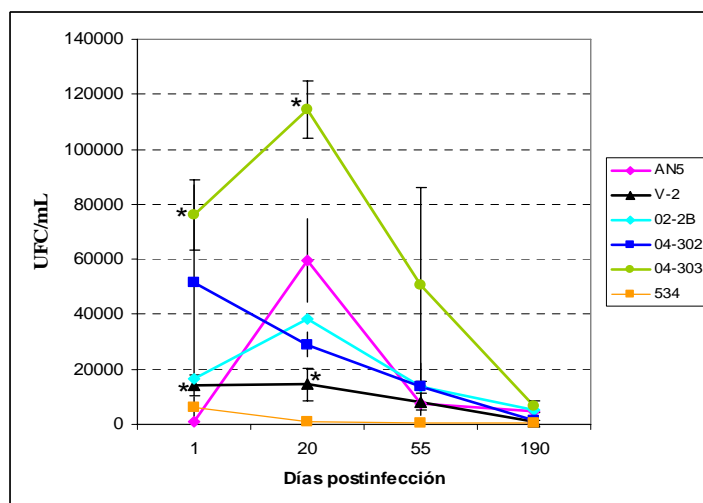
Figura 47: Fotografía de los bazos más representativos a los 55 dpi



Bazos de los ratones inoculados con: PBS (A), *M. bovis* AN5 (B) y la cepa salvaje *M. bovis* (04-303) (C).

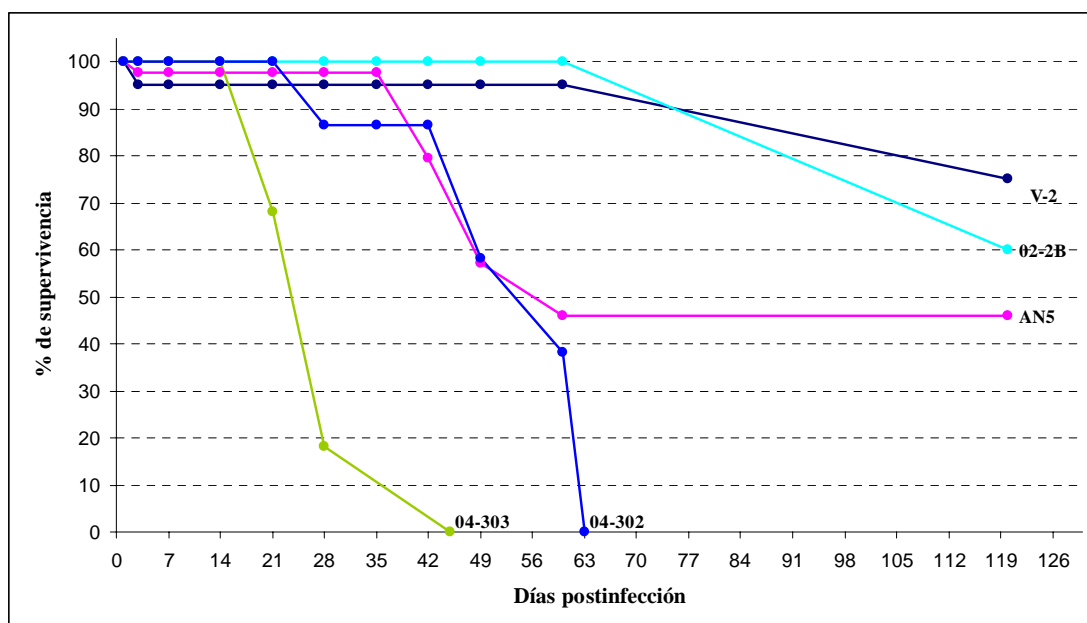
Los resultados de las mediciones de esplenomegalia mostraron que la cepa 04-303 presentó diferencias significativas respecto de la cepa *M. bovis* AN5 a partir de los 20 días postinfección, alcanzando un pico de mayor diferencia a los 55 dpi para decaer a los 190 dpi. El mismo comportamiento, aunque estadísticamente no significativo, fue observado en las cepas 04-302 y V-2. Por el contrario, los ratones inoculados con la cepa 534 tuvieron en los tres tiempos, mediciones de peso menores al de los inoculados con la cepa *M. bovis* AN5. La diferencia en tamaño de los bazo más notoria se produjo en el tiempo 55 dpi (figura 47) con un peso máximo de 0,7 gr. para la cepa 04-303. Los bazo de los ratones controles inoculados con PBS y con la cepa de referencia *M. bovis* AN5, pesaron en promedio 0,14 y 0,19 gr. respectivamente. El recuento de colonias de bacterias recuperadas de los bazo, mostró una disminución de la carga bacteriana presente en dichos órganos, en el último tiempo considerado, alcanzando niveles más bajos a los iniciales, a excepción de la cepa AN5 (figura 48). A los 20 dpi la cepa 04-303 tuvo la mayor diferencia significativa respecto de la cepa de referencia, para luego decaer a los 55 y 120 dpi (figura 48). Esta tendencia también se observó en las cepas 02-2B y V-2, pero ambas se encontraron por debajo de los recuentos de AN5. Por el contrario los grupos inoculados con las cepas 04-302 y 534 tuvieron un progresivo comportamiento decreciente de la carga bacteriana a partir del primer día de inoculación. La cepa 534 además fue la que registró los menores recuentos en los cuatro tiempos. Por otra parte, en el primer día postinfección se registraron diferencias significativas de las cepas 04-303 y V-2 respecto de la cepa de referencia AN5, indicando que la infección en ese tiempo no fue homogénea para todos los grupos. Por otra parte, al culminar la experiencia a los 190 dpi, solamente murió un ratón perteneciente al grupo 02-2B.

Al comparar los resultados de las mediciones de esplenomegalia y de la recuperación de bacterias del bazo, se constató una relación inversa entre estos parámetros. Se observó que en el tiempo 20 dpi se registraron los mayores recuentos de UFC y la esplenomegalia comenzó a manifestarse. Sin embargo cuando las UFC disminuyeron a partir de 55 dpi, se registraron los mayores pesos de los órganos de los animales. Estos resultados podrían deberse a la respuesta inmunológica desencadenada en el hospedador para controlar la infección micobacteriana.

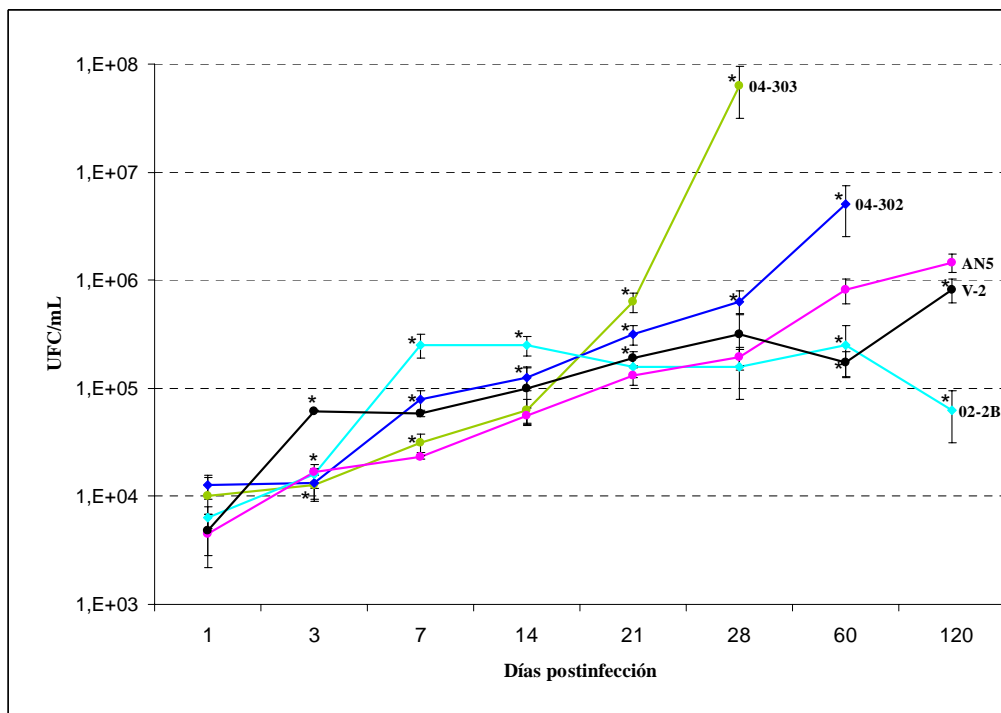
Figura 48: Recuento de unidades formadoras de colonias recuperadas del bazo.

* Diferencia significativa respecto a *M. bovis* AN5 (* $p < 0,05$; $n=2$ para el tiempo 1; y $n=3$ para los tiempos restantes).

Con el objetivo de comparar el comportamiento de las cepas en otro modelo de infección, se procedió a evaluar la patogenicidad en el modelo experimental murino de tuberculosis pulmonar descrito por Hernández-Pando y col. (López *et al.*, 2003). Con este fin se inocularon los ratones por vía intratraqueal, las cepas 04-302; 04-303; V-2; 02-2B y la cepa de referencia AN5, y se procedió a comparar la supervivencia y el número de UFC recuperadas de los pulmones. La cepa 534 no estuvo disponible para realizar el ensayo. Al evaluar la supervivencia de los ratones en el tiempo, se observó que la menor sobrevivencia correspondió al grupo inoculado con la cepa 04-303, que murieron a los 45 dpi. En orden de letalidad, le siguió la otra cepa procedente de jabalí (04-302) que mató a todos los animales a los 63 dpi. Como parámetro de comparación se calculó la mediana del tiempo de supervivencia (MTS), que indica el tiempo en el cual permanecen vivos el 50 % de los animales (Medina *et al.*, 2006). Los resultados de MTS obtenidos fueron los siguientes: 24, 53 y 57 días, para los grupos inoculados con las cepas 04-303, 04-302 y AN5 respectivamente. Las cepas 02-2B y V-2 tuvieron una letalidad mucho menor porque solamente del 20 al 40 % de los ratones murieron al culminar el experimento. Por otra parte, el comportamiento de la cepa AN5 fue atípico, porque si bien el 50% de los animales murieron rápidamente, los restantes permanecieron vivos al finalizar la experiencia (figura 49).

Figura 49: Supervivencia de los ratones postinfección

El recuento de las unidades formadoras de colonias recuperadas a partir de los cultivos de los pulmones de los ratones dieron los siguientes resultados (figura 50). Con excepción de los ratones inoculados con la cepa 02-2B, todos los restantes mostraron una progresiva acumulación de bacterias en los pulmones correspondiéndose con el avance del estado de enfermedad de los animales y una menor supervivencia. El recuento de bacterias más alto ($6,3 \cdot 10^7$ UFC/mL) fue alcanzado por la cepa 04-303 a los 28 dpi, seguida por la cepa 04-302 que provocó una acumulación de $5,0 \cdot 10^6$ UFC/mL pero a los 60 dpi (figura 50). Como se dijo en el párrafo anterior, el grupo inoculado con la cepa 02-2B no conservó la tendencia de acumulación de bacterias progresiva y por el contrario culminó con un recuento menor en el tiempo final que al cabo de la primera semana post infección. Además de las diferencias significativas obtenidas para la cepa 04-303 respecto de la cepa de referencia *M. bovis* AN5, también hubo tales diferencias para otras cepas en distintos tiempos. El mayor recuento de UFC se obtuvo para la cepa 04-303. Por otra parte, la relación entre la supervivencia y recuento de colonias de los pulmones en los grupos V-2 y 02-2B se invirtió en el tiempo final. Esto podría indicar una mayor virulencia en la cepa 02-2B respecto a la V-2 ya que a menor número de bacterias la supervivencia también fue menor.

Figura 50: Recuento de bacterias recuperadas de los pulmones de los ratones

* Diferencia significativa respecto a *M. bovis* AN5 (* $p < 0,05$; $n=6$)

Al comparar los resultados obtenidos en ambos modelos de infección, se observó que para el grupo inoculado con la cepa 04-303, el número de bacterias aisladas a partir de los pulmones a los 21 y 28 dpi, y de los bazos en todos los tiempos (1, 20, 55 y 190 dpi) fueron mayores a los obtenidos con las otras cepas. Sin embargo, contrariamente a lo observado en el modelo de inoculación intratraqueal en el que la evolución de la infección fue progresiva, en el modelo de inoculación intraperitoneal luego de alcanzar un punto máximo, se produjo una disminución del proceso infeccioso que podría relacionarse con la depuración de las bacterias del bazo.

Discusión

5. Discusión

El trabajo desarrollado posibilitó la identificación y caracterización de cepas de *M. bovis* circulantes tanto en las principales regiones pecuarias del país como así también de países limítrofes y distantes, incrementando el conocimiento de su distribución y diseminación.

La teoría básica de la epidemiología molecular consiste en que aislamientos epidemiológicamente relacionados derivan de la expansión clonal de un simple precursor, teniendo características comunes que difieren de aquellos no relacionados (Maslow *et al.*, 1993). La utilidad de un marcador en la tipificación se debe a su estabilidad dentro de una cepa y a su diversidad dentro de la especie, reflejando la divergencia genética evolutiva originada por mutaciones al azar neutras, no letales, que se acumulan en el tiempo, y que son detectadas cuando ocurren en las regiones estudiadas del genoma (Maslow *et al.*, 1993; Milian-Suazo *et al.*, 2002). A partir de estos conceptos, las cepas aisladas en una misma región geográfica deberían ser genéticamente cercanas o relacionadas, siempre y cuando el movimiento de individuos sea limitado (Milian-Suazo *et al.*, 2002). El trazado de rutas de infección está condicionado a la disponibilidad de la información epidemiológica de los aislamientos. En algunos casos, el lugar de faena del animal no necesariamente se corresponde con la procedencia del mismo, situación que acontece generalmente en los sistemas de comercialización mediante remate en feria, en los que se forman tropas con animales de distintos establecimientos. En un esfuerzo por revertir esta situación, recientemente la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentos (SAGyPA), creó el "Sistema Nacional de Identificación de Ganado Bovino", según la resolución N° 103/2006, imponiendo a partir del 1° de enero de 2007, la identificación de los bovinos como requisito previo de cualquier traslado.

La técnica de referencia para la tipificación de aislamientos de *M. tuberculosis* es el RFLP utilizando como sonda la secuencia de inserción IS6110, por proporcionar el mejor poder discriminatorio entre aislamientos distintos. Sin embargo, como los aislamientos de *M. bovis* obtenidos de bovinos, generalmente cuentan con una sola copia de dicha secuencia, se requiere el empleo de otras sondas, como DR y PGRS, y de otras técnicas como se realizó en el presente trabajo. El RFLP tiene limitaciones tanto metodológicas como de análisis e interpretación y por este motivo los métodos basados en la PCR, como el Spoligotyping y los MIRUs-VNTR, son cada

vez más utilizados (Gibson *et al.*, 2004; Roring *et al.*, 2002). No obstante todavía no ha sido definido el método de referencia para la genotipificación de *M. bovis*. El Spoligotyping se distingue porque además de ser una técnica basada en PCR, es rápido, simple de llevar a cabo, interpretar y analizar; siendo recomendado para simplificar los relevamientos a gran escala, posibilitando también la identificación precisa de las especies del complejo *M. tuberculosis* (Roring *et al.*, 2002). Además, para *M. bovis* se obtiene mayor grado de diferenciación respecto del RFLP-IS6110. Por analizar una región única y conservada del genoma no posee un gran poder discriminatorio para diferenciar entre aislamientos de poblaciones dispersas, pudiendo conformar agrupamientos que constituyen familias de cepas relacionadas (Durr *et al.*, 2000a). Sin embargo, con los resultados obtenidos en este trabajo se observó que el Spoligotyping cobra fuerza por el principio de exclusión, donde aislamientos con spoligotipos diferentes podrían considerarse de distinto origen clonal. La estabilidad de la región DR es evidente ya que las seis cepas de *M. bovis* BCG (Pasteur, Danesa, Rusa, Moreau, Glaxo y Brasil) evaluadas, tuvieron el mismo spoligotipo, mientras que toda la familia de cepas BCG, obtenidas entre los años 1924 y 1961, como repiques sucesivos de la cepa original para su distribución a nivel mundial, se diferencian por las distintas deleciones (RD) que sufrieron en sus respectivos genomas (Behr *et al.*, 1999). A partir de esta característica de la región DR sería posible la determinación de relaciones más distantes entre aislamientos y la realización de inferencias evolutivas en el tiempo. Al considerar la teoría sobre la evolución del complejo *M. tuberculosis* propuesta por Brosch y col., en la que indican que los distintos linajes de las micobacterias del complejo se originaron principalmente por la pérdida progresiva y unidireccional de material genético (Brosch *et al.*, 2002), ésta también explica una de las maneras en que la región DR habría evolucionado. De este modo los spoligotipos con mayor número de espaciadores serían los más primitivos, y consecuentemente el spoligotipo correspondiente al de la cepa *M. bovis* BCG (Spo 12) con 35 espaciadores sería el más conservado. A partir de éste, mediante la pérdida progresiva de espaciadores, habrían derivado sucesivamente los spoligotipos restantes hasta alcanzar al Spo 3, con 17 espaciadores y relacionado a humanos.

La detección de genotipos de *M. tuberculosis* de aislamientos de humanos, predominantes y exclusivos de áreas con alta incidencia de tuberculosis, sugiere la ventaja selectiva que podrían tener esas cepas en comunidades y regiones geográficas particulares (Kremer *et al.*, 2004; Smith *et al.*, 2003). Los resultados de la distribución y conformación de los patrones detectados en Argentina, muestran la presencia de grandes agrupamientos en la región centro, que serían un indicativo de la activa transmisión de la enfermedad, en la principal cuenca lechera país. Estos resultados se correlacionan con un estudio realizado en 2002 por Pérez y col., en el que mediante los registros de decomiso del período marzo 1995 – febrero 1997, implementaron un modelo

estadístico, con el cual concluyeron que la tuberculosis bovina en Argentina se da bajo la forma de agrupamientos, estando confinada a regiones geográficamente delimitadas y asociadas a la producción lechera (Pérez *et al.*, 2002b). Aunque el número de aislamientos estudiados de Brasil y México no fue elevado, se observó que a diferencia de Argentina, donde el principal spoligotipo agrupó al 46,9% de los aislamientos, en esos países no superaron el 26,4 y el 37,8% respectivamente. Por otra parte, en Argentina el 66,6% de los spoligotipos fueron exclusivos de provincias, de los cuales el 32% a su vez formaron agrupamientos de hasta cuatro aislamientos.

Considerando que *M. bovis* carece de 9 de los 43 espaciadores presentes en la membrana de Spoligotyping, con los 34 espaciadores restantes podrían generarse 2^{34} combinaciones de potenciales patrones. Sin embargo, los spoligotipos incluidos en las bases de datos internacionales se encuentran lejos del número calculado (Dale *et al.*, 2001), como también se observó en el presente estudio en el que se detectaron 85 patrones entre los 780 aislamientos procedentes de los distintos países considerados. Esto se debe a que la variabilidad de cada uno de los espaciadores no es la misma para todos, siendo el polimorfismo mayor entre los espaciadores 1 y 25, respecto a lo observado entre los espaciadores 26 y 43 que representarían una región más conservada del locus DR en el genoma de *M. bovis* (Caimi *et al.*, 2001). También podría depender de la estructura poblacional de las cepas circulantes en regiones específicas, como el caso de las cepas estudiadas de Brasil en las que la variabilidad de los distintos espaciadores fue homogénea en comparación a las de Argentina y México, con la salvedad que el número de aislamientos tipificados de Brasil y México fue bajo. En este contexto se observó que el 78,6 % de los aislamientos de Brasil se agrupó en la familia de spoligotipos con más espaciadores, frente al 39,2 y 21,4 % de los de Argentina y México respectivamente.

El 46,9% de los aislamientos de las provincias estudiadas de Argentina, tuvieron el spoligotipo Spo 34, siguiéndole en orden de frecuencia el Spo 21 con el 20,1%. Ambos spoligotipos fueron encontrados en el Reino Unido, donde el Spo 34 es también predominante y mayoritario en las Islas Británicas, Nueva Zelanda y Australia, todos países que fueron colonias de Inglaterra y que siguieron manteniendo estrechas relaciones con la metrópolis, mientras que el Spo 21 es el segundo spoligotipo en frecuencia, hallado en Irlanda y Reino Unido. Además, el Spo 34 también es predominante entre los aislamientos de origen humano del Reino Unido (Gibson *et al.*, 2004). Por otra parte, en Inglaterra existe otro spoligotipo, el Spo 17, estrechamente relacionado al Spo 34, y que juntos dan cuenta del 67% de los aislamientos de ese país (Cataldi *et al.*, 2002). En cambio, el Spo 34 no ha sido encontrado en España, Camerún, Italia, Bélgica, ni Suecia, mientras que en Holanda y Francia tienen muy baja incidencia. También es significativo que no haya sido hallado en Camerún, país que fuera colonia francesa. El ganado vacuno fue introducido por los

españoles durante la colonización del territorio argentino en el siglo XVI y a fines del siglo XVIII ya existía una gran cantidad de ganado cimarrón que era cazado durante las “vaquerías”. Durante fines del siglo XIX y comienzos del siglo XX, Argentina introdujo extensivamente reproductores británicos que incrementaron su representación en coincidencia con el gran aumento en el número total de animales. En el año 1875 el país contaba con 13 millones de bovinos de origen criollo, y a partir de entonces se comenzó a introducir las razas británicas, de los cuales el toro Tarquino introducido por el inglés John Miller es prototípico. En la actualidad las razas británicas constituyen el 75%, de la población bovina del país, mientras que el ganado criollo solo representa entre el 5 y el 10% (Cataldi *et al.*, 2002). En una publicación del año 1906, se relata un viaje a París emprendido por hacendados, veterinarios y políticos argentinos, para asistir a un ciclo de conferencias sobre tuberculosis bovina, organizadas a pedido del grupo mencionado (Anónimo, 1906). Del documento pueden citarse los siguientes párrafos: “La tuberculosis cerrada no excluye la tuberculosis abierta, constituye por el contrario, un recipiente lleno para el mal, que estalla en cualquier circunstancia propicia e inesperada, sembrando la contaminación y la ruina”.....“Estas conclusiones deben tenerse siempre presentes en la Argentina y oponer una resistencia irreductible a la pretensión de los criadores ingleses que se permita introducir al país reproductores bovinos, atacados de tuberculosis cerrada. Ceder a semejante instancias, sería incurrir en las responsabilidades más grandes, renovando y extendiendo en el país los focos de la terrible enfermedad”.....“Los animales importados se instalan en el lazareto, galpón sin establos aislados, donde los reproductores coexisten en común, mezclados unos con otros. Es sabido que el sistema de estabulación es la fuente más rápida y segura de propagación de la tuberculosis” (Cataldi *et al.*, 2002).

La variedad de especies y de localizaciones geográficas analizadas permitirían avalar que el Spo 34 sea el predominante de Argentina, aunque no representaría un clon único, ya que fue subdividido en 28 patrones de RFLP DR/PGRS.

En la década del 70 existieron algunos debates acerca del origen de la tuberculosis bovina en la Argentina y la opinión preponderante consideraba que el ganado traído de España ya se encontraba infectado. Es difícil establecer si efectivamente fue así, ya que no existían controles veterinarios en la época colonial y por otro lado, recién a mediados del siglo XIX, la ciencia veterinaria identificó a la tuberculosis como una patología independiente y relacionada con la tuberculosis humana. La distribución de los spoligotipos en el Reino Unido y en Argentina, conduce a cuestionarse sobre la “importación de la tuberculosis bovina” con el ingreso al país de ganado británico infectado a principios de siglo y durante el que se habrían introducido el Spo 34, un antecesor de éste, el Spo 21 ó ambos.

La tipificación de aislamientos del año 1960, arrojó la presencia de un spoligotipo, que formó un agrupamiento de cuatro aislamientos, sin detectarse nuevamente en Argentina ni en otras partes del mundo. La capacidad de un genotipo de sobrevivir y reproducirse, incluye a una serie de factores, uno de los cuales es la virulencia. Recientemente se descubrieron los llamados genes anti-virulencia, cuya disrupción resulta en fenotipos hipervirulentos. Para algunos patógenos, los organismos menos virulentos podrían favorecer la supervivencia del hospedador y consecuentemente su transmisión a otro hospedador susceptible (Foreman-Wykert y Miller, 2003).

Tanto la desaparición de un genotipo como la presencia de patrones únicos en los aislamientos de bovinos, podrían vincularse a la erradicación de un brote o foco aislado en particular, o a nuevos hallazgos que no alcanzaron a diseminarse en la población. Otros autores indican que también puede tratarse de un evento temporal que no necesariamente significa la interrupción de la cadena de la infección sobre todo si se considera una cobertura parcial del total de casos de tuberculosis (Milian-Suazo *et al.*, 2002). Entre los spoligotipos considerados exclusivos de Argentina, 8 (5 únicos y 3 agrupados) hallados en aislamientos de Corrientes, Formosa, Chaco y Buenos Aires, fueron detectados en las bases de datos internacionales en aislamientos procedentes de Brasil, desconociéndose si podría haber existido una fortuita conexión epidemiológica. La transmisión zoonótica y epizootica de *M. bovis* es favorecida por la alta densidad del ganado en zonas con alta prevalencia de tuberculosis bovina. En Argentina, todos los aislamientos obtenidos de cerdos y animales silvestres tuvieron los dos spoligotipos predominantes en bovinos, mientras que el 76% de los procedentes de humanos, animales salvajes y mascotas, tuvieron en conjunto los cuatro spoligotipos más frecuentes, indicando claramente el origen de la infección. No obstante hubo un 14 % de los aislamientos humanos, gatos y ciervos (5, 5 y 1 aislamientos respectivamente), todos de la provincia de Buenos Aires, que tuvieron spoligotipos únicos que su vez fueron exclusivos por no encontrarse entre los bovinos estudiados. Este hallazgo podría ser debido a diversas causas. Por una lado, el desarrollo de la enfermedad en humanos como consecuencia de la reactivación de una infección pasada, con cepas que circularon entre los bovinos en otros tiempos, y por el otro, el efecto de la presión selectiva de los hospedadores secundarios sobre la cepa infectante, que podría haber provocado mutaciones en la región DR con la consecuente pérdida de material genético. Además, esos spoligotipos se diferenciaron en uno o pocos espaciadores respecto de los predominantes en el país, pudiendo en algunos casos tratarse de variantes isogénicas.

La tipificación de los dos aislamientos de animales silvestres, un mono y un armadillo del noreste argentino, que tuvieron los spoligotipos Spo 34 y 21, el primero y el segundo en frecuencia entre los aislamientos de Argentina, abren una serie de interrogantes respecto a la

cadena epidemiológica de la enfermedad y al sistema productivo, ya que en el país existe escaso conocimiento sobre la implicancia de la fauna local y su comportamiento en zonas lecheras, las cuales presentan elevados niveles de infección en algunos de sus rodeos. Recientemente se obtuvieron tres aislamientos de *M. bovis* de fauna silvestre de la zona centro de la provincia de Santa Fe, a partir de un pulmón de una rata (*Rattus norvegicus*), ganglio mesentérico de un zorro (*Lycolapex gimnocercus*) y de ganglios de cabeza de una comadreja overa (*Didephys albiventris*) (Abdala *et al.*, 2006). En otros países la existencia de tuberculosis bovina en determinadas regiones está directamente relacionada a la presencia de fauna silvestre infectada. Tanto el tejón (*Meles meles*) en el Reino Unido e Irlanda, como la zarigüeya (*Trichosurus vulpecula*) en Nueva Zelanda, constituyen reservorios silvestres de la enfermedad que comprometieron los sistemas de erradicación de la tuberculosis bovina (Aranaz *et al.*, 2004; Garnier *et al.*, 2003). Asimismo, el estudio de la magnitud que estos reservorios pueden representar en el mantenimiento de la infección en el ganado de nuestro país, podría contribuir a la explicación de la presencia de patrones iguales entre aislamientos aparentemente no relacionados.

Aunque la principal vía de transmisión de *M. bovis* entre los bovinos es la aerógena, en un grupo de 7 vaquillonas de un establecimiento de la ciudad de Río Cuarto, provincia de Córdoba (Meikle *et al.*, 2007), y en otras 4 de un tambo de la provincia de Buenos Aires (Martínez Vivot *et al.*, 2003), todas reactivas positivas a la PPD tuberculina bovina, se encontró una alta proporción de lesiones tuberculosas en linfonódulos mesentéricos y/o hepáticos, indicadoras de que la vía de contagio habría sido la digestiva, a través de la ingesta de leche o calostro infectado. El primer grupo fue de un rodeo con alta prevalencia de tuberculosis, y cuyos aislamientos tuvieron un spoligotipo particular, que posteriormente fue detectado en un solo aislamiento procedente de un humano de Buenos Aires, desconociéndose su posible vinculación epidemiológica. En cambio, el segundo fue de un tambo declarado oficialmente libre de tuberculosis, en el que era frecuente el envío de animales a exposiciones rurales de la zona y su reincorporación directa al rodeo. En todos los aislamientos de este caso se detectó el spoligotipo más frecuente detectado en Argentina y en la provincia de Buenos Aires, posiblemente favorecido por el movimiento de animales registrado.

A partir de la implementación de la pasteurización de la leche, la transmisión de *M. bovis* al hombre ocurre principalmente a través de la inhalación de los aerosoles emitidos por los bovinos enfermos, que conducen a la manifestación pulmonar de la enfermedad, quedando relegados los casos de tuberculosis digestiva. Entre los 56 aislamientos de humanos se detectaron 13 spoligotipos, de los cuales el Spo 34 agrupó al 37,5% de los mismos, mientras que el 8,9% de los aislamientos tuvieron spoligotipos únicos. Un resultado con la misma particularidad fue obtenido en el Reino Unido a partir de 50 aislamientos de *M. bovis* de humanos. En éste

encontraron que el 30 % de los mismos también tuvieron el Spo 34, el spoligotipo mayoritario entre los aislamientos del Reino Unido, sugiriendo la posible transmisión del bovino al humano.

Curiosamente otro 30% tuvieron spoligotipos no descritos entre los 15.000 aislamientos de bovinos de todo el Reino Unido, que tras la comparación con las bases de datos internacionales, solamente dos fueron reconocidos en las mismas, uno correspondiente a un aislamiento único de un bovino de Argentina (Spo 45) y el otro de Australia (Gibson *et al.*, 2004). Los autores atribuyen los episodios de enfermedad a la reactivación de infecciones adquiridas en el pasado más que a infecciones primarias, debido a que el 72,3% de los pacientes tenían una edad que rondaba los 50 años. Es decir que esos spoligotipos no encontrados en los bovinos podrían corresponder a cepas de *M. bovis* que circularon en el Reino Unido hace 50 años (Gibson *et al.*, 2004). En Italia también fueron detectados spoligotipos en humanos no descritos previamente en bovinos (Lari *et al.*, 2006), mientras que en otra investigación en España, tampoco pudieron detectar el origen animal que causara un brote de tuberculosis en humanos (Romero *et al.*, 2006). Además, entre los aislamientos de humanos de Argentina se identificó un spoligotipo que podría estar asociado a la especie, ya que el 61% de los aislamientos con el Spo 3, que agrupa al 3,3% del total de los aislamientos del país, fueron de individuos no relacionados. Por otra parte, a partir de la dificultad de la identificación de *M. bovis* por las técnicas bacteriológicas clásicas y de su resistencia natural a la pirazinamida, droga de primera línea en el tratamiento de la tuberculosis, es fundamental la tipificación molecular de los aislamientos de humanos para detectar precozmente la transmisión zoonótica y evitar el contagio a otras personas, principalmente en zonas con prevalencia de TBB y donde por el tipo de actividad laboral existe alto riesgo de contraer una infección primaria. La detección del genotipo también es importante en pacientes que reciben inmunoterapia con *M. bovis* BCG, ya que se requiere diferenciar esta cepa de otra que cause una nueva infección, y en pacientes inmunodeprimidos que pueden desarrollar tuberculosis como consecuencia de la reactivación de la cepa vacunal. En ninguno de los aislamientos de humanos estudiados en este trabajo se detectó el spoligotipo compatible con el de la cepa *M. bovis* BCG.

Uno de los estudios clínicos incluidos en el desarrollo de la tesis fue el caso de “Monoartritis séptica glenohumeral debido a *M. bovis*” (Colmegna *et al.*, 2004). La artritis tuberculosa es la segunda manifestación, seguida del compromiso espinal, de afectación osteoarticular por este patógeno. El 30% de los casos no presentan síntomas sistémicos y solo el 50% tienen evidencias de patología pulmonar en radiografía de tórax. La monoartritis glenohumeral séptica crónica, es poco frecuente y menos aún asociada a infección por *M. bovis*. El enigma del caso era dilucidar la fuente de infección por *M. bovis*, ya que la paciente era residente de la ciudad de Buenos Aires, sin haber tenido relación alguna con la actividad pecuaria. El

resultado de la anamnesis reveló la convivencia en su domicilio con aproximadamente 20 gatos, alimentados diariamente con pulmón bovino sin cocción previa, y de los cuales dos habrían muerto por “problemas respiratorios”. Cabe mencionar, que la ruta más frecuente de infección en los gatos es el tracto gastrointestinal, seguida a la ingestión de alimentos contaminados. Luego de la notificación del caso a las autoridades sanitarias, agentes del Instituto Pasteur de Buenos Aires, practicaron biopsias de pulmón y lavajes bronqueoalveolares a los gatos, estudio que se prolongó por dos años hasta obtener un aislamiento de *M. bovis*. El mismo tuvo un spoligotipo que se diferenció del obtenido del aislamiento de la mujer en dos espaciadores, indicando que eran cepas diferentes. Debido a que los dos gatos que murieron durante el período de enfermedad de la mujer, no fueron estudiados, no pudo demostrarse que la infección de la misma se produjo a partir del contagio de uno ellos. Otra posibilidad es que tanto los gatos como la mujer, se hubiesen infectado a partir de una fuente común, el “bofe”, en eventos independientes o no. De este modo, la mujer podría haberse infectado durante la manipulación diaria del alimento en paupérrimas condiciones de higiene, mientras que los gatos mediante su ingesta. Este caso denota las fugas y fallas existentes en el control y erradicación de la enfermedad en el ganado, que sumado a la faena clandestina, favorecen la transmisión zoonótica y epizoótica de la tuberculosis bovina. Por otra parte, se tipificaron 18 aislamientos más de gatos de la ciudad de Buenos Aires, que contribuyeron a confirmar la problemática de la enfermedad y el riesgo que representan para los seres humanos debido a su estrecha convivencia.

El otro caso clínico estudiado fue la transmisión de *M. bovis* MDR entre padre e hija, que podría tratarse del primer reporte de transmisión de *M. bovis* MDR entre personas en Argentina, demostrado por la detección del mismo spoligotipo y patrón MIRU en ambos aislamientos. Como antecedente relevante, en España entre 1993 y 1995 se describió la transmisión de *M. bovis* MDR entre pacientes con VIH / SIDA, procedentes de dos hospitales diferentes (Blazquez *et al.*, 1997; Samper *et al.*, 1997).

En Brasil, la mayoría de los aislamientos provinieron de los estados San Pablo y Minas Gerais, ubicados al sudeste del país, y de Río Grande del Sur limítrofe con las provincias de Misiones y Corrientes (Zanini *et al.*, 2005; Rodríguez *et al.*, 2004; Zanini *et al.*, 2001). Los otros estados brasileños que limitan con la provincia de Misiones, son los de Paraná y Santa Catalina, de los que solamente se obtuvo un aislamiento respectivamente. Aunque la presencia de estados limítrofes haría presumir la presencia de múltiples genotipos compartidos, en total se detectaron 6 spoligotipos comunes a ambos países, de los cuales dos fueron compartidos entre el estado de Río Grande del Sur y la provincia de Corrientes. Por otra parte, los dos spoligotipos más frecuentes en los aislamientos de Brasil no fueron detectados en Argentina, en cambio el primero y tercero de

Argentina sí fueron detectados en el sur y sudeste de Brasil. Además, todos los aislamientos de humanos (1), cerdos (2) y búfalos (7), tuvieron spoligotipos de bovinos.

Los resultados obtenidos con los aislamientos de México, de los cuales el 69,5% fueron del estado de Chihuahua, indicaron que el 95,12% de los mismos formaron distintos agrupamientos y que los tres spoligotipos principales en frecuencia agruparon el 37,8%, 15,8% y 14,6% de los aislamientos respectivamente (Cobos-Marín *et al.*, 2005). En contraste a estos resultados, el estudio realizado por Milián-Suazo y col., no describe la presencia de spoligotipos predominantes ni por estado ni en su conjunto, detectando un 21,4% (9/42) de spoligotipos que agruparon en pequeños conjuntos de 2 a 4 aislamientos al 33,8% del total (Milián-Suazo *et al.*, 2002). Una de las razones de ello podría ser el área geográfica de la que fueron obtenidos los aislamientos, ya que todos ellos fueron de cuatro estados del centro del país. El spoligotipo mayoritario fue el Spo 14, con el 37,8% de los aislamientos, que también es predominante en España, país que introdujo el ganado bovino durante la conquista. Además, este spoligotipo representa al segundo en frecuencia detectado entre los aislamientos de Brasil, existiendo como antecedente que algunas razas bovinas como el Cebú (*Bos indicus*) fueron transportadas desde Sudamérica a México antes de 1946 (Cobos-Marín *et al.*, 2005). Si bien los spoligotipos predominantes en Argentina también fueron detectados en Brasil y en México, en estos países no alcanzaron la misma dimensión. A diferencia de Argentina, una buena proporción del ganado mexicano está compuesto por las razas cebuinas, con lo cual además de los factores estrictamente epidemiológicos, como el manejo de los rodeos, habría que considerar el rol de las razas bovinas en la adaptación de cepas particulares a esos hospedadores. Armeni y col., encontraron que la respuesta inmune celular contra antígenos de *M. bovis*, medida *in vitro* mediante la liberación de INF- γ , es mayor en la raza Holstein (*B. taurus*) que en el cebú, pudiendo estar relacionada a la presencia de diferentes alelos BoLA en las diferentes razas (Armeni *et al.*, 2006). Por otra parte, si bien la relación entre la genética de los bovinos y la resistencia a la tuberculosis aún no fue establecida, mediante un ensayo preliminar de selección genética de ciervos colorados (*Cervus elaphus*), han sido obtenidas progenies con el fenotipo resistente a la enfermedad, resultantes de la inseminación artificial de hembras elegidas al azar, con semen de venados clasificados de alta y baja susceptibilidad a la enfermedad según las observaciones de infecciones experimentales (Morris *et al.*, 2006).

La evolución de la región DR condujo a la formación de spoligotipos únicos y específicos de las especies del complejo *M. tuberculosis*, que a su vez pueden conformar familias características que pueden subdividirse con marcadores moleculares más discriminativos. De este modo se detectaron dos spoligotipos específicos de los aislamientos de pinnípedos, distinguibles claramente de los patrones típicos del resto de las especies que integran el complejo *M.*

tuberculosis. Uno de los spoligotipos conformó una familia de 5 patrones de RFLP-IS6110, mientras que el aislamiento que se diferenció por Spoligotyping también pudo diferenciarse por RFLP-IS6110 ya que tuvo un patrón distinto a los descritos entre los otros aislamientos. Los patrones de RFLP-IS6110, se caracterizaron por poseer entre 3 a 7 copias de la secuencia de inserción IS6110, describiéndose en total 6 patrones diferentes (Zumárraga *et al.*, 1999c). Por otra parte, también se detectaron patrones MIRUs no detectados entre los aislamientos de *M. bovis*. Además, otros autores realizaron un estudio comparativo entre aislamientos de Australia y Argentina, mediante el Polimorfismo en Longitud de los Fragmentos Fluorescentes Amplificados (FAFLP, sigla en inglés), en el que detectaron un genotipo único en todos los aislamientos (Cousins *et al.*, 2003). Los resultados de la tipificación con los distintos marcadores moleculares utilizados en el presente trabajo, fueron la base para que, a partir de la comparación de las características fenotípicas y genéticas de varios de los aislamientos obtenidos en los tres continentes, se describiera un nuevo taxón miembro del complejo *M. tuberculosis* designado *Mycobacterium pinnipedii* sp. nov. (Cousins *et al.*, 2003; Zumárraga *et al.*, 1999c). Esta micobacteria no es específica de hospedador *per se*, porque ocasionalmente también fue aislada de humanos y de un tapir, sin embargo es un organismo que infecta pinnípedos a lo largo de una inmensa extensión geográfica en un nicho ecológico particular (Mostowy *et al.*, 2005). Cabe mencionar que los cuatro miembros que tradicionalmente formaban el complejo *M. tuberculosis* (*M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. microti* y *M. africanum*), fueron aceptados como especies separadas, a partir de sus características fenotípicas y de sus aparentes especificidades de hospedador (Cousins *et al.*, 2003).

Entre los aislamientos analizados con RFLP con las sondas DR/PGRS, se detectaron 79 patrones combinados diferentes que a su vez estuvieron agrupados en 31 spoligotipos, de los cuales el Spo 34 representó el 50 %. Entre éstos el 36% de los aislamientos con el Spo34 estuvieron agrupados con un mismo patrón combinado DR/PGRS A/A que es el mayoritario entre los aislamientos estudiados de Argentina, y además el 98% de los aislamientos con el patrón de RFLP A/A se agruparon en el Spo 34. Estos resultados sugieren que el Spoligotyping, menos discriminativo que el RFLP, rinde patrones que representan relaciones epidemiológicas más vastas y extendidas en el tiempo. Por otra parte, los dos spoligotipos más frecuentes (Spo 34 y 21) tuvieron patrones de RFLP-DR/PGRS relacionados en más del 65%, mientras que el 77% de los aislamientos foráneos tuvieron patrones de RFLP y spoligotipos exclusivos de esos países. También se encontraron patrones combinados en aislamientos de distintas regiones de Argentina y en dos de Paraguay, denotando la diseminación de clones particulares debido a la activa transmisión de la enfermedad. Entre los 79 patrones DR/PGRS combinados, el 27,8% formaron

agrupamientos que reunieron al 63% de los aislamientos, mientras que los restantes fueron patrones únicos. El número de patrones obtenido con la sonda DR fue de 42 mientras que con la sonda PGRS fue de 40, aunque este elemento repetitivo se encuentra en muchas localizaciones del genoma de *M. bovis*. Esto puede deberse a que los patrones obtenidos con esta sonda son dificultosos de analizar y solamente se consideraron las bandas mejor definidas, correspondientes a fragmentos más grandes a 2Kb. En consecuencia, la comparación de patrones entre laboratorios es compleja, ya que los perfiles obtenidos tienen múltiples bandas de interpretación subjetiva, debiéndose realizar RFLPs simultáneos para poder dilucidar la relación entre cepas sin ambigüedades. El número de patrones se elevó a 88 cuando se combinaron los patrones de RFLP DR/PGRS con los spoligotipos. Esto se debió a que existió un 5,8 % de los aislamientos con patrones DR/PGRS combinados que pudieron ser subdivididos por Spoligotyping en 9 spoligotipos.

La incorporación de los MIRUs-VNTR como nuevo método de tipificación molecular de *M. bovis* fue alentador. Mediante los MIRUs-VNTR es posible analizar distintas regiones del genoma de las micobacterias mediante la PCR, determinando el polimorfismo por el número de copias de cada unidad repetitiva existente en cada locus amplificado. La evolución de los MIRUs-VNTR es lenta, ya que en la tipificación de cepas de *M. bovis* BCG genealógicamente distantes (Pasteur, Glaxo y Japón), solamente se obtuvieron diferencias con uno de los 12 loci MIRUs-VNTR polimórficos, indicando que son estables y adecuados en investigaciones epidemiológicas (Supply *et al.*, 2000; Mazars *et al.*, 2001). Entre los 44 aislamientos tipificados, el 38,4% de los aislamientos que conformaron distintos agrupamientos por spoligotyping pudieron subdividirse con los MIRUs-VNTR, y a su vez el 20% de los que tuvieron el mismo spoligotipo y patrón de RFLP-DR/PGRS, pudieron diferenciarse además con los MIRUs-VNTR. Por el contrario, el patrón MIRU que agrupó al 41 % de los aislamientos pudieron diferenciarse por en 7 spoligotipos. Si bien teóricamente con los 12 MIRUs polimórficos podrían obtenerse 16 millones de combinaciones MIRUs-VNTR, debido a la diferente diversidad alélica de cada MIRU el número de patrones sería sensiblemente menor (Supply *et al.*, 2003; Mazars *et al.*, 2001). El polimorfismo observado en cada uno de los 12 MIRUs-VNTR fue heterogéneo, encontrándose desde 6 variantes alélicas para el MIRU 26, a ninguna para los MIRUs 2, 10 y 39. Además, en el caso de los aislamientos de *M. pinnipedii* sp. nov. se pudo observar que los MIRUs 4, 10 y 27 tuvieron variantes no detectadas en las cepas de referencia de *M. tuberculosis* H37Rv y *M. bovis* BCG, ni en los aislamientos de *M. bovis* analizados. Otros autores describieron nuevos VNTRs (MPTRs, ETRs) más polimórficos en aislamientos de *M. tuberculosis* que algunos de los MIRUs-VNTR utilizados y cuya combinación apropiada debería ser evaluada para incrementar el grado de

diferenciación de *M. bovis* (Oelemann *et al.*, 2006; Roring *et al.*, 2002; Skuce *et al.*, 2002; Frothingham *et al.*, 1998). A medida que se incrementa el número de MIRUs-VNTR el análisis se hace complejo, sobre todo cuando se tipifican simultáneamente varios aislamientos y cuando la identificación de los fragmentos amplificados se realiza en geles de agarosa, como se realizó en este trabajo. Para salvar este inconveniente una alternativa es la amplificación de cada MIRU con oligonucleótidos iniciadores marcados con distintos fluorocromos y la posterior determinación del tamaño de los fragmentos amplificados con la lectura en un secuenciador automático, simplificando significativamente la técnica y reduciendo además los errores de interpretación de los geles (Supply *et al.*, 2001). Tanto los patrones de Spoligotyping como los de MIRUs-VNTR, pueden expresarse en forma numérica facilitando la comparación de datos entre laboratorios, punto crítico para el RFLP. La sensibilidad y especificidad del Spoligotyping y los MIRUs-VNTR fueron determinadas apropiadamente para *M. tuberculosis*, refiriéndolas a la técnica de referencia, el RFLP-IS6110. Como criterio para el cálculo de dichos parámetros estimaron la sensibilidad como el porcentaje de aislamientos con el mismo patrón de RFLP-IS6110 que tuvieron el mismo spoligotipo y patrón MIRU, mientras que la especificidad como el porcentaje de aislamientos con un único patrón de RFLP-IS6110 que tuvieron spoligotipos y patrones MIRUs-VNTR únicos (Scott *et al.*, 2005). De este modo, la sensibilidad calculada para el Spoligotyping fue del 83% y para los MIRUs del 52% mientras que las especificidades fueron del 40 y 56 % respectivamente (Scott *et al.*, 2005). Sin embargo, para el caso de *M. tuberculosis* con bajo número de copias de IS6110 y de *M. bovis*, el grado de resolución de los MIRUs, es mayor al del Spoligotyping y al del RFLP-IS6110 (Allix *et al.*, 2006; Cowan *et al.*, 2002), aunque las falencias de cada uno de los métodos se minimizan cuando se los combina apropiadamente para incrementar la especificidad de la tipificación. Ante la ausencia de un marcador molecular de referencia para la tipificación de *M. bovis*, en este trabajo no se determinó la sensibilidad y especificidad relativa de los tres métodos del modo discutido. Sin embargo, aunque no todos los aislamientos fueron tipificados por todos los métodos, se calculó el índice discriminatorio de Simpson (Hunter y Gaston, 1998) con el cual fue posible establecer un parámetro para determinar el marcador más discriminatorio. Así para el Spoligotyping fue de 0,73; para el RFLP DR/PGRS 0,95; y para el Spoligotyping junto con el RFLP DR/PGRS de 0,96. Por otra parte para los MIRUs-VNTR el índice fue de 0,81 mientras que combinado con Spoligotyping se elevó a 0,92. Estos índices demuestran que a medida que se combinan las distintas técnicas de tipificación, se incrementa el poder discriminatorio de las mismas, fortaleciendo los resultados obtenidos con cada uno de los métodos por separado. Asimismo, si además del poder discriminatorio de las técnicas utilizadas, se considera su robustez, su reproducibilidad y su sencillez, la combinación de los métodos basados en PCR, Spoligotyping

(que a su vez permite la identificación de los aislamientos del complejo *M. tuberculosis*) y MIRUs-VNTRs, sería beneficioso para lograr una rápida y eficiente diferenciación de los aislamientos de *M. bovis*.

Por otra parte, si bien se han descripto nuevos espaciadores que incrementarían el polimorfismo del Spoligotyping (van Embden *et al.*, 2002; van der Zanden *et al.*, 2002; Caimi *et al.*, 2001; Beggs *et al.*, 1996), las bases de datos internacionales solamente cuentan con los patrones generados con la membrana tradicional de 43 espaciadores y además no existe un consenso para estandarizar su utilización. Por esta razón, se propone continuar utilizando la membrana tradicional, complementando la tipificación con otro marcador molecular como los MIRUs-VNTR.

Además de los factores estrictamente epidemiológicos que pueden explicar la persistencia de cepas particulares en el ganado bovino, también debe considerarse el efecto de la virulencia de las mismas. Por esta razón se procedió a la evaluación de la virulencia de distintas cepas en los modelos murinos de infección por inoculación intraperitoneal e intratraqueal. De este modo se demostró por ambos modelos, que una cepa aislada de un jabalí de La Pampa (# 04-303), fue la más virulenta respecto de la cepa de referencia *M. bovis* AN5 y de otras aisladas de bovinos, jabalíes y humanos, a partir de la menor supervivencia de los ratones, la mayor esplenomegalia y el mayor número de colonias recuperadas del bazo y de los pulmones. Si bien por ambos modelos se arribó a la misma conclusión, se diferenciaron en el curso de la infección. La evolución de la infección en el modelo intratraqueal fue en aumento progresivo, mientras que en el intraperitoneal a partir de registrarse un máximo disminuyó notablemente. Además la relación entre la esplenomegalia y las bacterias recuperadas del bazo fue inversa, probablemente a causa de la depuración de los esplenocitos para contener la infección. Por otra parte, mientras que en el curso de la infección intraperitoneal (190 días) solamente murió un ratón, que no fue del grupo 04-303, en el otro modelo a los 45 días post infección murieron todos los ratones del grupo. Otros autores también observaron diferencias en la cinética de infección en distintos órganos cuando la inoculación es endovenosa (Medina *et al.*, 2006). El pulmón es más afectado que el hígado y bazo, que tienden a controlar la infección. Además, la menor sobrevida fue relacionada al resultado del rápido desarrollo de patología pulmonar, como ocurre cuando la vía de infección es aerógena o endovenosa (Medina *et al.*, 2006). Por otra parte, al mismo tiempo que se llevaba a cabo el trabajo presentado, en el laboratorio estaba en curso la evaluación de nuevos antígenos de *M. bovis*, para lo cual una de las cepas que posteriormente fue considerada de baja virulencia en modelo murino (# 534 aislada de un bovino de Santa Fe), fue utilizada para infectar por vía intranasal bovinos raza Holando Argentino, sin lograr un estado de enfermedad con presencia lesiones. Estos

resultados indican que la evolución de un brote de tuberculosis puede estar supeditada al genotipo de la cepa infectiva. Por otra parte, el comportamiento diferente de las cepas evaluadas en modelo murino respecto de la cepa de referencia *M. bovis* AN5, conduce al planteo de la posibilidad de elaborar una nueva PPD tuberculina bovina, compuesta por una mezcla de distintas cepas autóctonas, a fin de incrementar la respuesta de los bovinos a la intradermorreacción. En otro estudio comparativo de virulencia de cepas de *M. tuberculosis* en el modelo murino de tuberculosis pulmonar, demostraron que aquellos ratones inoculados con una cepa de *M. tuberculosis* de la familia W-Beijing desarrollan una severa enfermedad pulmonar y tienen una sobrevida significativamente menor (López *et al.*, 2003; van Soolingen *et al.*, 2003). Esta hiperletalidad fue atribuída a glicolípidos fenólicos (PGL, sigla en inglés) producidos por los aislamientos de *M. tuberculosis* de la familia W-Beijing, por acción de poliketido sintetasas (PKS, sigla en inglés) con elevada actividad biológica (Reed *et al.*, 2004). La disrupción de la síntesis de PGL resulta en la pérdida de este fenotipo virulento sin comprometer de modo significativo la carga bacteriana durante el curso de la enfermedad. Por otra parte, la pérdida de PGL se correlaciona *in vitro*, con un incremento en la liberación de citoquinas proinflamatorias TNF α , e interleucinas 6 y 12 (Reed *et al.*, 2004). Tales diferencias pueden manifestarse en la capacidad que tienen algunos aislamientos de modificar la respuesta inmune celular del hospedador, contribuyendo a la diversidad de manifestaciones y consecuencias clínicas (Reed *et al.*, 2004). Sin embargo, aún establecida la asociación entre genotipo y virulencia en modelo animal, hay que considerar el tropismo y la respuesta del hospedador natural a la infección (Reed *et al.*, 2004), como observaron otros autores en pacientes infantiles con meningitis tuberculosa, en los que aún en infecciones con cepas de la familia W-Beijing no se manifestaron diferencias en la patogenicidad de la enfermedad (Maree *et al.*, 2007). Por otra parte, en estudios recientes también realizados en modelo murino, observaron que *M. bovis* es más virulento que *M. tuberculosis* al registrarse una menor sobrevida de los ratones infectados (Medina *et al.*, 2006).

En algunos casos la determinación del genotipo puede estar condicionada a la presencia de aislamientos heterogéneos, compuestos por mezclas de cepas a causa de coinfecciones, o por subpoblaciones con el mismo origen clonal, variantes isogénicas, como fue observado en aislamientos de humanos mediante el análisis comparativo individual de los genotipos de las colonias de bacterias aisladas en el mismo cultivo (Shamputa *et al.*, 2004; van Soolingen *et al.*, 2003; Milián-Suazo *et al.*, 2002; van Embden *et al.*, 2000). Esta situación debería considerarse para la interpretación de futuros estudios en regiones con alta prevalencia de tuberculosis bovina y movimiento regular de hacienda, para evaluar si en los bovinos también ocurre, ya que cuando se realiza la tipificación molecular, se parte de la hipótesis que el aislamiento está compuesto por una

población bacteriana homogénea derivada de un clon particular, identificable por un perfil característico.

A partir de los resultados obtenidos en el presente trabajo y según las perspectivas de la actividad pecuaria en nuestro país, las técnicas evaluadas podrían ser implementadas como nuevas estrategias en la campaña de control y erradicación de la tuberculosis bovina. En este escenario, la tipificación molecular de los aislamientos obtenidos en las distintas etapas de la campaña, permitirían conocer ante la aparición de un eventual brote, la localización exacta o al menos bastante aproximada del origen del mismo; situación relevante cuando se establece un área libre de la enfermedad. Además, podría determinarse si el episodio es a causa de la diseminación clonal de una cepa en particular o por mal saneamiento de la zona afectada. Si bien lejos de esta situación se encuentra la Argentina, se espera que en un futuro pueda alcanzar la calificación de país libre de tuberculosis bovina, siendo a partir de entonces fundamental el conocimiento previo de la situación de la enfermedad. Con respecto a este último aspecto y gracias al trabajo aquí desarrollado, en la actualidad se conocen los patrones de las cepas de *M. bovis* tipificadas hasta el momento, algunos de ellos destacados por su predominancia.

En principio, los métodos utilizados y los estudios realizados hasta el momento, estarían disponibles para ser aplicados en el plan piloto de control y erradicación de la tuberculosis bovina implementado en la provincia de Entre Ríos, con la perspectiva de su extensión a nivel nacional. En consecuencia, como estrategia de tipificación de aislamientos de *M. bovis* en el marco de un sistema de vigilancia epidemiológica aplicable en Argentina, se propone: a) identificación adecuada en playa de faena de los animales con lesiones compatibles con tuberculosis, teniendo un registro adecuado de los traslados y establecimientos de origen; b) remisión de las muestras al laboratorio de referencia regional, para la realización de cultivo y posterior caracterización fenotípica; c) remisión de los cultivos al laboratorio de referencia en biología molecular para la tipificación por Spoligotyping y MIRUs-VNTR; d) comunicación de los resultados obtenidos a la oficina sanitaria para adoptar las medidas sanitarias pertinentes.

La información generada en este trabajo, sobre la identificación y distribución de los patrones genéticos de cepas de *M. bovis*, aisladas tanto de Argentina como de países limítrofes y distantes, sumada a la variada virulencia observada en cepas autóctonas, abren un nuevo horizonte para afrontar la problemática de la tuberculosis bovina en nuestro país.

Conclusiones



6. Conclusiones

- Los spoligotipos más frecuentes detectados en los aislamientos de *M. bovis* de Argentina, no fueron predominantes en los procedentes de los otros países estudiados, indicando una distribución independiente de genotipos. Además se identificaron perfiles genéticos exclusivos de los respectivos países.

- Los patrones predominantes y familias de patrones altamente relacionados, reflejarían la activa transmisión de la enfermedad en las principales regiones pecuarias del país.

- La demostración de la transmisión de *M. bovis* entre humanos, pone en evidencia la importancia de la detección de este patógeno en Salud Pública.

- La presencia de *M. bovis* en otros animales de producción, fauna silvestre y salvaje, y animales domésticos, con genotipos comunes a los hallados en aislamientos de bovinos, denotan el riesgo de transmisión epizootica de la infección y los escapes al sistema de vigilancia.

- La detección de spoligotipos únicos en aislamientos de hospedadores no bovinos, diferenciados en uno o pocos espaciadores a los hallados en los procedentes de éstos, indicarían que tales variaciones podrían haber ocurrido por la presión selectiva ocasionada por el cambio de hospedador.

- La combinación de las distintas técnicas de tipificación, permite incrementar el poder discriminatorio de las mismas, fortaleciendo los resultados obtenidos con cada uno de los métodos por separado. La utilización conjunta de los métodos basados en PCR, Spoligotyping y MIRUs-VNTR, constituirían una herramienta beneficiosa para lograr una tipificación simple, rápida, reproducible y suficientemente discriminatoria, de los aislamientos de *M. bovis*.

- Se demostró la variada virulencia de distintas cepas de *M. bovis* en dos modelos murinos de infección diferentes, identificándose una aislada de jabalí como significativamente más

virulenta respecto de la cepa de referencia *M. bovis* AN5 y de otras aisladas tanto de humanos como de bovinos. Estos resultados demuestran la importancia que tiene la fauna salvaje, no solo como reservorio de *M. bovis* sino también como sistema selectivo que podría direccionar la generación de genotipos de mayor virulencia para otros hospedadores.

- La detección de patrones específicos en los aislamientos de micobacterias de pinnípedos, condujeron a la caracterización de un nuevo taxón dentro del complejo *M. tuberculosis* denominado *Mycobacterium pinnipedii* sp. nov.

- Los resultados de esta tesis, crearon una nueva perspectiva para encarar la problemática de la enfermedad en Argentina, sustentando además a las técnicas de tipificación molecular de *M. bovis*, para ser utilizadas como herramientas de apoyo al “Plan Nacional de Control y Erradicación de la tuberculosis bovina”.

Bioq. Martín José Zumárraga

Tesista

Dr. Angel Adrián Cataldi

Director

Dr. Horacio Esteban Hopp

Director

Bibliografía

6. Bibliografía

6.1. Referencias bibliográficas

1. Abdala A., Tarabla H., Garbaccio S., Jorge M.C., Traversa M.C, Zumárraga M., y Cataldi A. 2006. Aislamiento de *Mycobacterium bovis* en fauna silvestre. XVI Reunión científico técnica de la AAVLD, Mar del Plata, 5-7 de diciembre.
2. Alito A., Morcillo N., Scipioni S., Dolmann A., Romano M.I., Cataldi A. and van Soolingen D., 1999a. The IS6110 restriction fragment polymorphism in particular multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains may evolve too fast for reliable use in outbreak investigation. J. Clin. Microbiol. 37, 788–791.
3. Alito A., Romano M.I., Bigi F., Zumárraga M. and Cataldi A., 1999b. Antigenic characterization of mycobacteria from South American wild seals. Vet. Microbiol., 68; 293-299.
4. Allix C., Walravens K., Saegerman C., Godfroid J., Supply P. and Fauville-Dufaux M., 2006. Evaluation of the epidemiological relevance of variable-number tandem-repeat genotyping of *Mycobacterium bovis* and comparison of the method with IS6110 restriction fragment length polymorphism analysis and spoligotyping. J. Clin Microbiol.; 44(6):1951-62. Erratum in: J Clin Microbiol. 2006 Sep; 44(9):3471.
5. Ameni G., Aseffa A., Engers H., Young D., Hewinson G. and Vordermeier M., 2006. Cattle husbandry in Ethiopia is a predominant factor affecting the pathology of bovine tuberculosis and gamma interferon responses to mycobacterial antigens. Clin. Vaccine. Immunol.; 13 (9):1030-6.
6. Anónimo, 1906. La tuberculosis bovina. Librería de la Viuda, de Ch. Bouret, París.
7. Antognoli M.C., Salman M.D., Triantis J., Hernandez J. and Keefe T., 2001. A one-tube nested polymerase chain reaction for the detection of *Mycobacterium bovis* in spiked milk samples: an evaluation of concentration and lytic techniques. J. Vet. Diagn. Invest. 13:111-116.
8. Aranaz A., de Juan L., Montero N., Sanchez C., Galka M., Delso C., Alvarez J., Romero B., Bezos J., Vela A.I., Briones V., Mateos A. and Domínguez L., 2004. Bovine Tuberculosis (*Mycobacterium bovis*) in Wildlife in Spain. J. Clin. Microbiol. 2004, p. 2602–2608 Vol. 42, No. 6.

9. Aranaz A., Cousins D., Mateos A. and Dominguez L., 2003. Elevation of *Mycobacterium tuberculosis* subsp. *caprae* Aranaz et al. 1999 to species rank as *Mycobacterium caprae* comb. nov., sp. nov. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2003 Nov; 53(Pt 6):1785-9.
10. Aranaz A., Liebana E., Gomez-Mampaso E., Galan J.C., Cousins D., Ortega A., Blazquez J., Baquero F., Mateos A., Suarez G. and Dominguez L., 1999. *Mycobacterium tuberculosis* subsp. *caprae* subsp. nov.: a taxonomic study of a new member of the *Mycobacterium tuberculosis* complex isolated from goats in Spain. Int. J. Syst. Bacteriol.; 49 Pt 3:1263-73.
11. Aranaz A., Liébana E., Mateos A., Dominguez L., Vidal D., Domingo M., González O., Rodríguez-Ferrari E.F., Bunschoten A.E., van Embden J.D.A. and Cousins D., 1996. Spacer Oligonucleotide Typing of *Mycobacterium bovis* Strains from Cattle and Other Animals: a Tool for Studying Epidemiology of Tuberculosis. J. Clin. Microbiol. Vol 34, p.2734-2740.
12. Ausubel F.M., Brent R., Kingston R.E., Moore D.D., Seidman J.G., Smith J.A. and Struhl K., 1994. Current Protocols in Molecular Biology. Vol. 1 John Wiley and Sons, Inc. 6.4.6.
13. Banu S., Gordon S. V., Palmer S., Islam R., Ahmed S., Alam K.M., Cole S.T. and Brosch R., 2004. Genotypic Analysis of *Mycobacterium tuberculosis* in Bangladesh and Prevalence of the Beijing Strain. J. Clin. Microbiol. p. 674–682 Vol. 42, No. 2.
14. Beggs M.L., Cave M.D., Marlowe C., Cloney L., Duck P. and Eisenach K.D., 1996. Characterization of *Mycobacterium tuberculosis* complex direct repeat sequence for use in cycling probe reaction. J. Clin. Microbiol. 34:2985–2989.
15. Behr M.A., Wilson M.A., Gill W.P., Salamn H., Schoolnick G.K., Rane S., Small P.M., 1999. Comparative genomics of BCG vaccines by whole-genome DNA microarray. Science. Vol. 284. P. 1520-1523.
16. Bernardelli A., Bastida R., Loureiro J., Michelis H., Romano M.I., Cataldi A. y Costa E., 1996. Tuberculosis in sea lions and fur seals from the south-western Atlantic coast. Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz., 15(3), 985-1005.
17. Bifani P.J., Mathema B., Kurepina N.E. and Kreiswirth B.N., 2002. Global dissemination of the *Mycobacterium tuberculosis* W-Beijing family strains. Trends in Microbiology, 10 (1), 45-52.
18. Bigi F., Romano., M.I., Alito A. and Cataldi A., 1995. Cloning of a novel polymorphic GC rich repetitive DNA from *Mycobacterium bovis*. Res. Microbiol., 146: 341-348.
19. Blázquez J., Espinosa de Los Monteros L.E., Samper S., Martín C., Guerrero A., Cobo J., van Embden J., Baquero F. and Gomez Mampaso E., 1997. Genetic Characterization of Multidrug-Resistant *Mycobacterium bovis* Strain from a Hospital Outbreak Involving Human Immunodeficiency Virus-Positive Patients. J. Clin. Microbiol. 35(6):1390-3. Erratum in: J. Clin. Microbiol. 1998 Aug; 36 (8):2398.
20. Bouvet E., Casalino E., Mendoza-Sassi G., Lariven S., Vallée E., Pernet M., Gottot S. and Vachon F., 1993. A nosocomial outbreak of multidrug-resistant *Mycobacterium bovis* among HIV-infected patients. A case-control study. AIDS 7:1453–1460.

21. Brosch R., Gordon S.V., Garnier T., Eiglmeier K., Frigui W., Valenti P., Dos Santos S., Duthoy S., Lacroix C., Garcia-Pelayo C., Inwald J.K., Golby P., Garcia J.N., Hewinson R.G., Behr M.A., Quail M.A., Churcher C., Barrell B.G., Parkhill J. and Cole S.T., 2007. Genome plasticity of BCG and impact on vaccine efficacy. *Proc. Natl. Acad. Sci.; USA.* 27; 104 (13):5596-601.
22. Brosch R., Gordon S.V., Marmiesse M., Brodin P., Buchrieser C., Eiglmeier K., Garnier T., Gutierrez C., Hewinson G., Kremer K., Parsons L.M., Pym A.S., Samper S., van Soolingen D., and Cole S.T., 2002. A new evolutionary scenario for the *Mycobacterium tuberculosis* complex. 3684–3689, *PNAS*, vol. 99, no. 6.
23. Brosch R., Pym A. S., Gordon S. V. and Cole S.T., 2001. The evolution of mycobacterial pathogenicity: clues from comparative genomics. *TRENDS in Microbiology* Vol.9 No.9 Review.
24. Bulla T.J., Sidi-Boumedinea K., McMinna E.J., Stevensonb K., Pickupc R. and Hermon-Taylor J., 2003. Mycobacterial interspersed repetitive units (MIRU) differentiate *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* from other species of the *Mycobacterium avium* complex. *Molecular and Cellular Probes* 17, 157–164.
25. Caimi, K., Romano M. I., Alito A., Zumárraga M., Bigi F. and Cataldi A., 2001. Sequence analysis of the direct repeat region in *Mycobacterium bovis*. *J. Clin. Microbiol.* 39:1067–1072.
26. Canal A., 2001. Programa de control y erradicación de tuberculosis bovina, Asociación Unión Tamberos Cooperativa Ltda. Simposio Internacional de Tuberculosis Animal, Sociedad Rural Argentina, Buenos Aires, 16 de Noviembre.
27. Castro Ramos M., Ayala M., Errico F. y Silvera F.V., 1998. Primeros aislamientos de *Mycobacterium bovis* en Pinnípedos Otaria byronia (lobo marino común) en Uruguay. *Rev. Med. Vet.* 79, 197-200.
28. Cataldi A.A., Gioffré A., Santángelo M.P., Alito A., Caimi K., Bigi F., Romano M.I. and Zumárraga M., 2002. El genotipo de *Mycobacterium bovis* mayoritario en la Argentina lo es también en las Islas Británicas: ¿la tuberculosis bovina provino de Gran Bretaña?. *Rev Argent. Microbiol.* 34:1-6.
29. Cave M.D., Murray M. and Nardell E., 2005. Molecular epidemiology of *Mycobacterium tuberculosis*. En: *Tuberculosis and the Tubercle Bacillus*. Cole S.T., Eisenach K.D., McMurray D.N., Jacobs W.R. ASM Press, Washington, D.C.
30. Cobos-Marín L., Montes-Vargas J., Zumárraga M., Cataldi A., Romano M.I., Estrada-García I. and Gonzalez-y-Merchand J.A., 2005. Spoligotype analysis of *Mycobacterium bovis* isolates from Northern México. *Can. J. Microbiol.* 51: 996–1000.
31. Collins D.M. and De Lisle G.W., 1985. DNA restriction endonuclease analysis of *Mycobacterium bovis* and other members of the tuberculosis complex. *J. Clin. Microbiol.*; 21 (4):562-4.

32. Collins D.M., Radford A.J., de Lisle G.W. and Billman-Jacobe H., 1994. Diagnosis and epidemiology of bovine tuberculosis using molecular biological approaches. *Vet. Microbiol.* 40(1-2):83-94.
33. Colmegna I., Ricci, B. G., Zumárraga M., Cataldi A.A., Di Lonardo M. M., Citera G. and Maldonado-Cocco J.A., 2004. *Mycobacterium bovis* and septic glenohumeral arthritis. *Clin. Rheumatol.*, 23: 379–380.
34. Cornejo B.J., Sahagun-Ruiz A., Suarez-Guemes F., Thornton C.G., Ficht T.A. and Adams L.G., 1998. Comparison of C18-carboxypropylbetaine and glass bead DNA extraction methods for detection of *Mycobacterium bovis* in bovine milk samples and analysis by PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* 64 (8) :3099-101.
35. Cosivi O., Grange J.M., Daborn C.J., Raviglione M.C., Fujikura T., Cousins D., Robinson R.A., Huchzermeyer H.F., de Kantor I. and Meslin F.X., 1998. Zoonotic tuberculosis due to *Mycobacterium bovis* in developing countries. *Emerg. Infect. Dis.*; 4(1):59-70. Review.
36. Cotter T.P., Sheehan S., Cryan B., O’Shaughnessy E., Cummins H. and Bredin C.P., 1996. Tuberculosis due to *Mycobacterium bovis* in humans in the south-west region of Ireland: is there a relationship with infection prevalence in cattle?. *Tuber.Lung.Dis. Dec*; 77 (6):545-8.
37. Cousins D.V., Bastida R., Cataldi A., Quse V., Redrobe S., Dow S., Duignan P., Murray A., Dupont C., Ahmed N., Collins D.M., Butler W.R., Dawson D., Rodriguez D., Loureiro J., Romano M.I., Alito A., Zumárraga M. and Bernardelli A., 2003. Tuberculosis in seals caused by a novel member of the *Mycobacterium tuberculosis* complex: *Mycobacterium pinnipedii* sp. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol. Sep*; 53(Pt 5):1305-14.
38. Cowan L.S., Mosher L., Diem L., Massey J.P. and Crawford J.T., 2002. Variable-number tandem repeat typing of *Mycobacterium tuberculosis* isolates with low copy numbers of IS6110 by using mycobacterial interspersed repetitive units. *J. Clin. Microbiol.* ; 40 (5):1592-602.
39. Crubezy E., Ludes B., Poveda J.D., Clayton J., Crouau-Roy B. and Montagnon D., 1998 C.R. Acad. Sci. III Nov.321 (11):941-51. Identification of *Mycobacterium bovis* DNA in an Egyptian Pott’s disease of 5400 years old.
40. Daffé M., Mc Neil M. and Brennan P.J. Novel type-specific lipooligosaccharidos from *Mycobacterium tuberculosis*. *Biochemistry.* 1991; 30: 378-88.
41. Dale J.W., Brittain D., Cataldi A.A., Cousins D, Crawford J.T., Driscoll J., Heersma H., Lillebaek T., Quitugua T., Rastogi N., Skuce R.A., Sola C., Van Soolingen D. and Vincent V., 2001. Spacer oligonucleotide typing of bacteria of the *Mycobacterium tuberculosis* complex: recommendations for standardised nomenclature. *Int. J. Tuberc. Lung. Dis. Mar*; 5(3):216-9.
42. Daniel T.M., 2000. The origins and precolonial epidemiology of tuberculosis in the Americas: can we figure them out? *Int. J. Tuberc. Lung. Dis.* 4(5):395-400.
43. da Silva Rocha A., da Costa Leite C., Torres H.M., de Miranda A.B., Pires Lopes M.Q., Degraeve W.M. and Suffys P.N., 1999. Use of PCR-restriction fragment length polymorphism

- analysis of the *hsp65* gene for rapid identification of mycobacteria in Brazil. J. Microbiol. Methods. Sep; 37(3):223-9.
44. da Silva Rocha A., Werneck Barreto A.M., Dias Campos C.E., Villas-Boas da Silva M., Fonseca L., Saad M.H., Degraive W.M. and Suffys P.N., 2002. Novel allelic variants of Mycobacteria isolated in Brazil as determined by PCR-restriction enzyme analysis of *hsp65*. J. Clin. Microbiol.; 40(11):4191-6.
45. Davis B. D., Dulbecco R., Eisen H.N., Ginsberg H.S. and Wood W.B., 1978. Tratado de Microbiología, Salvat Editores S.A., Segunda edición, Cap35, pag. 868-892.
46. de Boer A.S., Blommerde B., de Haas P.E.W., Sebek M.M.G.G., Lambregts-van Weezenbeek K.S.B., Dessens M. and van Soolingen D., 2002. False positive *Mycobacterium tuberculosis* cultures in 44 laboratories in The Netherlands (1993-2000): incidence, risk factors, and consequences. J. Clin. Microbiol. 40:4004-9.
47. de Boer A.S., Borgdorff M.W. and van Soolingen D., 2003a. The impact of defaulting from treatment on the transmission of *Mycobacterium tuberculosis* in The Netherlands. DNA Fingerprinting of *Mycobacterium tuberculosis*: bands and link, Annette de Boer. Colofon Bilthoven, The Netherlands. Chapter 7:103-117
48. de Boer A.S., Borgdorff M.W., Vynnyk E., Sebek M.M.G.G. and van Soolingen D., 2003b. Exogenous re-infection as a cause of recurrent tuberculosis in a low incidence area. Int. J. Tuberc. Lung. Dis. (7):145-52.
49. de C. Ramos M., Soini H., Roscanni G.C., Jaques M., Villares M.C. and Musser J.M., 1999. Extensive cross-contamination of specimens with *Mycobacterium tuberculosis* in a reference laboratory. J. Clin. Microbiol. 37(4):916-9.
50. Deforges L., Boulouis H.J., Thibaud J.L., Boulouha L., Sougakoff W., Blot S., Hewinson G., Truffot-Pernot C. and Haddad N., 2004. First isolation of *Mycobacterium microti* (Llama-type) from a dog. Vet. Microbiol. 103; 249–253.
51. DEFRA (*Department for Environment Food and Rural Affairs*), 2003. <http://www.defra.gov.uk/animalh/tb/human/p1act.htm>
<http://www.defra.gov.uk/animalh/tb/publications/pdf/factsheet2.pdf>
52. de Kantor I.N., 1988. Bacteriología de la tuberculosis N°11. Centro Panamericano de Zoonosis, Organización Panamericana de la Salud, Oficina Sanitaria Panamericana, Oficina Regional de la Organización Mundial de la Salud, pág. 40.
53. de Kantor I.N. y Ritacco, V., 1994. Bovine tuberculosis in Latin America and Caribbean, current status, control and eradication programs. Vet. Microbiol. 40:5-14.
54. Desjardin L.E., Chen Y., Perkins M.D., Teixeira L., Cave M.D. and Eisenach K.D., 2004. Comparison of the ABI 7700 system (TaqMan) and competitive PCR for quantification of IS6110 DNA in sputum during treatment of tuberculosis. J. Clin. Microbiol. 36 (7), 1964-1968.

55. Devallois A., Goh K.S. and Rastogi N., 1997. Rapid identification of mycobacteria to species level by PCR-restriction fragment length polymorphism analysis of the *hsp65* gene and proposition of an algorithm to differentiate 34 mycobacterial species. *J. Clin. Microbiol.* 35(11):2969-73.
56. Durr P.A., Clifton-Hadley R.S. and Hewinson R.G., 2000. Molecular epidemiology of bovine tuberculosis II. Applications of genotyping. *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.*, 19 (3), 689-701.
57. Doherty, M.L., Monaghan, M.L., Bassett, H.F. and Quinn, P.J., 1995. Effect of a recent injection of purified protein derivative on diagnostic test for tuberculosis in cattle infected with *Mycobacterium bovis*. *Res. Vet. Sci.* 58:217-221.
58. Erler W., Martin G., Sachse K., Naumann L., Kahlau D., Beer J., Bartos M., Nagy G., Cvetnic Z., Zolnir-Dovc M. and Pavlik I. 2004. Molecular Fingerprinting of *Mycobacterium bovis* subsp. *caprae* Isolates from Central Europe. *J. Clin. Microbiol.*, p. 2234–2238 Vol. 42, No. 5.
59. Fang Z. and Forbes K. J., 1997. A *Mycobacterium tuberculosis* IS6110 preferential locus (*ipl*) for insertion into the genome. *J. Clin. Microbiol.* 35, (2), p. 479–481.
60. Fernández F. y Morici E., 1999. Tuberculosis felina por *Mycobacterium bovis*: comunicación de dos casos. *Revista Argentina de Microbiología* 31 (Supl. 1): 19-20.
61. Filliol I., Sola C. and Rastogi N., 2000. Detection of a previously unamplified spacer within the DR locus of *Mycobacterium tuberculosis*: epidemiological implications. *J. Clin. Microbiol.* 38(3):1231-4.
62. Fisanotti J.C., Alito A., Bigi F., Latini O., Roxo E., Cicuta E., Zumárraga M.J., Cataldi A. and Romano M.I. 1998. Molecular Epidemiology of *Mycobacterium bovis* isolates from South America. *Vet. Microbiol.*, 60 251-257.
63. Flynn J.L. and Chan J., 2001. Tuberculosis: latency and reactivation. *Infec. Immun.* 69, (7); 4195-4201.
64. Foreman-Wykert A.K. and Miller J.F., 2003. *Trends in Microbiol.* Vol11. N°3 105-108.
65. Frothingham R. and Meeker-O'Connell W.A., 1998. Genetic diversity in the *Mycobacterium tuberculosis* complex based on variable numbers of tandem DNA repeats. *Microbiology.* 144:1189-96.
66. Gangadharam P.R.J. 1998. Drug resistance in tubercle bacilli. En: *Mycobacteria I Basic Aspects*, Gangadharam P.R.J. y Jenkins P.A.; Chapman&Hall., 72-101.
67. Garnier T., Eiglmeier K., Camus J.C., Medina N., Mansoor H., Pryor M., Duthoy S., Grondin S., Lacroix C., Monsempe C., Simon S., Harris B., Atkin R., Doggett J., Mayes R., Keating L., Wheeler P.R., Parkhill J., Barrell B.G., Cole S.T., Gordon S.V. and Hewinson R.G., 2003. The complete genome sequence of *Mycobacterium bovis*. *PNAS*, 100, (13), 7877–7882.
68. Gibson A. L., Hewinson G., Goodchild T., Watt B., Story A., Inwald J. and Drobniewski F.A., 2004. Molecular epidemiology of disease due to *Mycobacterium bovis* in humans in the United Kingdom. *J. Clin. Microbiol.* p. 431–434 Vol. 42, No. 1.

69. Glickman M.S. and Jacobs W.R., 2001. Microbial pathogenesis of *Mycobacterium tuberculosis*: dawn of a discipline. *Cell*, 104; 477-485.
70. Glynn J.R., Bauer J., de Boer A.S., Borgdoff M.W., Fine P.E.M., Godfrey-Faussett P., and Vynnycky E., 1999. Interpreting DNA fingerprint clusters of *Mycobacterium tuberculosis*. *Int.J. Tuberc. Lung. Dis* 3 (12):1055-1060.
71. Gouget de la Samoniere Y.O., Li H.M., Torrea G., Bunschoten A., van Embden J. and Gicquel B., 1997. Evaluation of spoligotyping in a study of the transmission of *Mycobacterium tuberculosis*. *J.Clin. Microbiol* Vol.35 No9. p2210-2214.
72. Goyal M., Saunders N.A., van Embden J.D.A., Young D.B. and Shaw R.J., 1997. Differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* Isolates by Spoligotyping and IS6110 Restriction Fragment Length Polymorphism. *J. Clin. Microbiol* 35:647-651.
73. Groenen P., Bunschoten A., van Soolingen D. and van Embden J. 1993. Nature of DNA polymorphism in the direct repeat cluster of *Mycobacterium tuberculosis*; application for strain differentiation by a novel typing method. *Mol. Microbiol.* 10(5), 1057-1065.
74. Gutiérrez, M. C., Galán J. C., Blázquez J., Bouvet E. and Vincent V., 1999. Molecular markers demonstrate that the first described multidrug-resistant *Mycobacterium bovis* outbreak was due to *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Clin. Microbiol.* 37:971-975.
75. Gutiérrez M.C., Vincent V., Aubert D., Bizet J., Gaillot O., Lebrun L., Le Pendeven C., Le Pennec M.P., Mathieu D., Offredo C., Pangon B. and Pierre-Audigier C., 1998. Molecular fingerprinting of *Mycobacterium tuberculosis* and risk factors for tuberculosis transmission in Paris, France, and surrounding area. *J. Clin. Microbiol.*; 36: 486-92.
76. Haddad N., Masselot M. and Durand B., 2004. Molecular differentiation of *Mycobacterium bovis* isolates. Review of main techniques and applications. *Research in Veterinary Science* 76 1-18.
77. Hanna J., Neill S.D. and O'Brien J.J., 1992. ELISA tests for antibodies in experimental bovine tuberculosis. *Vet. Microbiol.* 1992 Jun 1; 31(2-3):243-249.
78. Hunter P.R. and Gaston M.A, 1988. Numerical index of the discriminatory ability of typing systems: an application of Simson's index of diversity. *J. Clin. Microbiol.* 26 (11): 2465-2466.
79. Harris N.B., Payeur J., Bravo D., Osorio R., Stuber T., Farrell D., Paulson D., Treviso S., Mikolon A., Rodriguez-Lainz A., Cernek-Hoskins S., Rast R., Ginsberg M., Kinde H., 2007. Recovery of *Mycobacterium bovis* from Soft Fresh Cheese Originating in Mexico. *Appl. Environ. Microbiol.*; 73(3):1025-8.
80. Hatfull G.F. and Jacobs W.R., 2000. *Molecular Genetics of Mycobacteria*, ASM Press, pag.1-16.
81. Hecker K.H. and Roux K.H., 1996. High and low annealing temperatures increase both specificity and yield in touchdown and stepdown PCR Biotechniques. *Mar*; 20(3):478-85.

82. Hermans P.W.M., van Soolingen D., Bik E.M., De Hass P.E.W., Dale J.W. and van Embden J.D.A., 1991. Insertion element IS987 from *Mycobacterium bovis* BCG is located in a hot-spot integration region for insertion elements in *Mycobacterium tuberculosis* complex strain. *Infect. Immun.* 59:2695-2705.
83. Hermans P.W., van Soolingen D., Dale J.W., Schuitema A.R., McAdam R.A., Catty D. and van Embden J.D.A., 1990. Insertion element IS986 from *Mycobacterium tuberculosis*: Useful tool for diagnosis and epidemiology of tuberculosis. *J. Clin. Microbiol* 28 (9): 2051-2058.
84. Hernández, C.R. La tuberculosis en la época del romanticismo europeo: un recorrido literario. *Rev. Inst. Nal. Enf. Resp. Mex.* Volumen 13-numero 1, enero-marzo 2000, pag 63-64.
85. Hopewell P. C., 1994. Overview of clinical tuberculosis. *Tuberculosis: pathogenesis, protection and control.* Bloom B. R. (Ed.), AMS Press, Washington, DC. Cap. 3, 25-46.
86. Horstkotte M.A., Sobottka I., Schewe C.K., Schafer P., Laufs R., Rusch-Gerdes S., Niemann S., 2001. *Mycobacterium microti* llama-type infection presenting as pulmonary tuberculosis in a human immunodeficiency virus-positive patient. *J. Clin. Microbiol.*; 39(1):406-7.
87. Ijaz K., Yang Z., Matthews S., Bates J.H., Cave D., 2002. *Mycobacterium tuberculosis* transmission between cluster members with similar fingerprint patterns. *Emerg. Infect. Dis.* 8, 1257-1259.
88. INER, 2001. Situación de la tuberculosis. (<http://www.anlis.gov.ar/INER/TBCArgentina/TBC.htm>).
89. INPPAZ, 1997, Tuberculosis, Guía para proyectos de tuberculosis bovina, Nota técnica N°15/Rev.2 pag.1.
90. Iseman M.D., 2000b. Drug resistant tuberculosis. A clinician's guide to tuberculosis. Iseman M.D. (Ed.), Lippincott Williams & Wilkins, USA. Capítulo 11, 323-353.
91. Iseman M.D., 2000a. Tuberculosis down through the centuries. A clinician's guide to tuberculosis. Iseman M.D. (Ed.), Lippincott Williams & Wilkins, USA. Capítulo 1, 1-19.
92. Jansen R., van Embden J.D.A., Gaastra W., and Schouls L.M., 2002. Identification of genes that are associated with DNA repeats in prokaryotes. *Mol. Microbiol.* 43(6), 1565-1575.
93. Joklik W.K., Willet H. P., Bernard Amos D., 1989. *Zinsser Microbiología*, 18ª edición, Editorial Médica Panamericana S.A., Cap.33 pag. 635-675.
94. Jorge M.C., Mendivil M y Fresneda K. 2004. Perros y gatos como huéspedes susceptibles y reservóros epidemiológicos de la tuberculosis. *AAVLD, XV Reunión Científico Técnica* 167-168.
95. Kamerbeek, J., Schouls L., Kolk A., van Agterveld M., van Soolingen D., Kuijper S., Bunschoten A., Molhuizen H., Shaw R., Goyal M., and van Embden J., 1997. Simultaneous detection and strain differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* for diagnosis and epidemiology. *J. Clin. Microbiol.* 35:907-914.

96. Kapur V., Whittam TS, Musser JM. Is *Mycobacterium tuberculosis* 15000 years old? *J. Infect Dis.* 1994; 170:1348-1349.
97. Kremer K., Glynn J.R., Lillebaek T., Niemann S., Kurepina N.E., Kreiswirth B.N., Bifani P.J., van Soolingen D., 2004. Definition of the Beijing/W lineage of *Mycobacterium tuberculosis* on the basis of genetic markers. *J. Clin. Microbiol.* 42(9):4040-9.
98. Kremer K., van Soolingen D., van Embden J., Hughes S., Inwald J., Hewinson G., 1998. *Mycobacterium microti*: more widespread than previously thought. *J. Clin. Microbiol.* 36(9):2793-4.
99. Kubica T., Rusch-Gerdes S., Niemann S., 2003. *Mycobacterium bovis* subsp. *caprae* caused one-third of human *M. bovis*-associated tuberculosis cases reported in Germany between 1999 and 2001. *J. Clin. Microbiol.* ; 41(7):3070-7.
100. Lari N., Rindi L., Bonanni D., Tortoli E., Garzelli C., 2006. Molecular analysis of clinical isolates of *Mycobacterium bovis* recovered from humans in Italy. *J. Clin. Microbiol.*; 44 (11): 4218-21.
101. Lasco T.M., Turner O.C., Cassone L., Sugawara I., Yamada H., Mc. Murray D.N., Orme I.M., 2004. Rapid accumulation of eosinophils in lung lesions in guinea pigs infected with *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect. Immun.*; 72(2):1147-9.
102. Larsen H.H., Masur H., Kovacs J.A., Gill V.J., Silcott V.A., Kogulan P., Maenza J., Smith M., Lucey D.R., Fischer S.H., 2002. Development and evaluation of a quantitative, Touch-Down, real-time PCR assay for diagnosing *Pneumocystis carinii* pneumonia. *J. Clin. Microbiol.*; 40 (2): 490-4.
103. Latini O., Canal A. M., Ferrara M. E, Sequeira M. D., Sequeira G., Bagnaroli R., Torres P., 1997. Confiabilidad en la determinación de prevalencia de infección por *Mycobacterium bovis* en ganado bovino por decomisos en frigoríficos. *Arch. Med. Vet.* XXIX, N°2.
104. Latini, M.S., Latini, O.A., Lopez, M.L. y Cecconi, J.O., 1990. Tuberculosis bovina en seres humanos. *Rev. Arg. Torax*, 51:13-16.
105. Legrand E., Filliol I., Sola C., and Rastogi N., 2001. Use of spoligotyping to study the evolution of the direct repeat locus by IS6110 transposicion in *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Clin. Microbiol.* Vol.39, No.4, p1595-1599.
106. López B., Aguilar D., Orozco H., Burger M., Espitia C., Ritacco V., Barrera L., Kremer K., Hernandez-Pando R., Huygen K., van Soolingen D., 2003. A marked difference in pathogenesis and immune response induced by different *Mycobacterium tuberculosis* genotypes. *Clin. Exp. Immunol.*, 133(1):30-7.
107. Magdalena J., Supply P. and Loch C., 1998a. Specific differentiation between *Mycobacterium bovis* BCG and virulent strains of the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *J. Clin. Microbiol.* ; 36(9):2471-6.

108. Magdalena J., Vachée A., Supply P. and Locht C., 1998. J. Clin. Microbiol. 36(4):937-43. Identification of a new DNA region specific for members of *Mycobacterium tuberculosis* complex.
109. Mahairas G.G., Sabo P. J., Hickey M. J., Singh D. C., and Kendall Stover C., 1996. Molecular analysis of genetic differences between *Mycobacterium bovis* BCG and virulent *M. bovis*. Journal of Bacteriology, vol 178. No5 p.1274-1282.
110. Malone F.E., Wilson E.C., Pollock J.M., Skuce R.A., 2003. Investigations into an outbreak of tuberculosis in a flock of sheep in contact with tuberculous cattle. J. Vet. Med. 50 (10):500-4.
111. Maree F., Hesselning A.C., Schaaf H.S., Marais B.J., Beyers N., van Helden P., Warren R.M., y Schoeman J.F., 2007. Absence of an association between *Mycobacterium tuberculosis* genotype and clinical features in children with tuberculous meningitis. Pediatr. Infect. Dis. J.; 26(1):13-8.
112. Martínez Vivot M., Saez G., Ritacco V., Reniero A., Pellegrino F., Poggio G., Torres P. 1996. Inter-species transmission of *Mycobacterium bovis* in Argentina: molecular analysis. Tubercle Lung Dis. 77 (Suppl. 2):121.
113. Martínez Vivot M., Romano M.I. y Torres P., 1999. Aplicación del spoligotyping al análisis de la transmisión de *Mycobacterium bovis* de rodeos bovina a caprinos. Rev. Argent. Microbiol. 31 (Supl.1): 10-12.
114. Martínez Vivot M., Zumárraga M., Romano M., Cataldi A., Diz L., Guida N., Borboni A., Moras E. V., 2003. Aplicación del spoligotyping para identificar el origen de reinfección de tuberculosis bovina en un tambo de la provincia de Buenos Aires. Vet. Argent., Vol XXN°191, 27-31.
115. Maslow J., and Mulligan M.E., 1996. Epidemiologic typing systems. Infect. Control. Hosp. Epidemiol., 17:595-604.
116. Maslow J.N., Mulligan M.E., and Arbeit R.D., 1993. Molecular epidemiology: Application of contemporary techniques to the typing of microorganisms. Clin. Infect. Dis. 17:153-164.
117. Mazars E., Lesjean S., Banuls A.L., Gilbert M., Vincent V., Gicquel B., Tibayrenc M., Locht C., and Supply P., 2001. High-resolution minisatellite-based typing as a portable approach to global analysis of *Mycobacterium tuberculosis* molecular epidemiology. PNAS, vol. 98, no. 4, 1901–1906.
118. Medina E., Ryan L., La Course R., North R.J., 2006. Superior virulence of *Mycobacterium bovis* over *Mycobacterium tuberculosis* for Mtb-resistant and Mtb-susceptible mice is manifest as an ability to cause extrapulmonary disease. Tuberculosis, 86; 20-27.
119. Meikle V., Schneider M., Azenzo G., Zumárraga M., Magnano G., Cataldi A., 2007. Individual animals of a cattle herd infected with the same *Mycobacterium bovis* genotype shows important variations in bacteriological, histopathological and immune response parameters. Zoonoses Public Health.; 54(2):86-93.

120. Mc. Adam R.A., Quan S., and Guilhot C., 2000. Mycobacterial transposons and their applications. Molecular genetics of micobacteria, Hatfull G.H., y Jacobs W.R. (Eds.) AMS Press, Washington. Cap. (4) 69-84.
121. Mc. Adam R.A., Guilhot C., and Gicquel B., 1994. Transposición in Mycobacteria. Tuberculosis: pathogenesis, protection and control. Bloom B. R. (Ed.), AMS Press, Washington, DC., Cap. 14, 199-216.
122. Mc. Murray, 1994. Guinea pig model of tuberculosis. En, Tuberculosis: pathogenesis, protection and control. Bloom B. R. (Ed.), AMS Press, Washington, DC., Cap. 9, 135-147.
123. Milian-Suazo F., Banda-Ruiz V., Ramirez-Casillas C., y Arriaga-Diaz C., 2002. Genotyping of *Mycobacterium bovis* by geographic location within Mexico. Prev. Vet. Med. 55 (2002) 255-264.
124. Monaghan M.L., Doherty M.L., Collins J.D., Kazda J.F., Quinn P.J., 1994. The tuberculin test. Vet. Microbiol.; 40(1-2):111-24.
125. Montali R.J., Mikota S.K., Cheng L.I., 2001. *Mycobacterium tuberculosis* in Zoo and Wildlife species. Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz., 20(1), 291-303.
126. Morcillo N., Di Giulio B., Chirico C., Kuriger A., Dolmann A., Alito A., Zumárraga M., van Soolingen D., Kremer K., Cataldi A., 2005. First description of *Mycobacterium tuberculosis* Beijing genotype in Argentina. Rev. Argent. Microbiol. 37: 92-95.
127. Morris C.A. 2006. A review of genetic resistance to disease in *Bos taurus* cattle. Vet J. Nov 7; en prensa.
128. Mostowy S., Cousins D., Brinkman J., Aranaz A. and Behr M.A., 2002. Genomic deletions suggest a phylogeny for the *Mycobacterium tuberculosis* complex. J. Infect. Dis. Jul 1; 186 (1): 74-80.
129. Mostowy S., Inwald J., Gordon S., Martin C., Warren R., Kremer K., Cousins D. and Behr M.A., 2005. Revisiting the evolution of *Mycobacterium bovis*. J. Bacteriol.; 187(18):6386-95.
130. Niemann S., Rüsç-Gerdes S., Joloba M. L., Whalen C. C., Guwatudde D., Ellner J. J., Eisenach K., Fumokong N., Johnson J. L., Aisu T., Mugerwa R. D., Okwera A., and Schwander S. K., 2002. *Mycobacterium africanum* Subtype II is associated with two distinct genotypes and is a major cause of human tuberculosis in Kampala, Uganda. J. Clin. Microbiol., Vol. 40, No. 9, p. 3398–3405.
131. Niemann, S., E., Richter, and S. Rusch-Gerdes; 2000a. Differentiation among members of the *Mycobacterium tuberculosis* complex by molecular and biochemical features: evidence for two pyrazinamide-susceptible subtypes of *M. bovis*. J. Clin. Microbiol. 1:152-157.
132. Niemann S., Richter E., Dalugge-Tamm H., Schlesinger H., Graupner D., Königstein B., Gurath G., Greinert U., Rusch-Gerdes S., 2000b. Two cases of *Mycobacterium microti* derived tuberculosis in HIV-negative immunocompetent patients. Emerg. Infect. Dis.; 6(5):539-42.

133. Niemann S., Richter E. and Rusch-Gerdes S., 1999. Stability of IS6110 restriction fragment length polymorphism patterns of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains. J. Clin. Microbiol. 1999 Sep;37(9):3078; author reply 3078-9.
134. Noordhoek G.T., Mulder S., Wallace P. and van Loon A.M., 2004. Multicentre quality control study for detection of *Mycobacterium tuberculosis* in clinical samples by nucleic amplification methods. Clin. Microbiol. Infect.; 10(4):295-301.
135. Norazmi M.N. and Mustaffa M., 2004. Approaches towards the development of a vaccine against tuberculosis: recombinant BCG and DNA vaccine. Tuberculosis 84, 102-109.
136. Nuermberger E.L., Yoshimatsu T., Tyagi S., Bishai W.R. and Grosset J.H., 2004. Paucibacillary tuberculosis in mice after prior aerosol immunization with *Mycobacterium bovis* BCG. Infect. Immun. 72(2):1065-71.
137. Ocepek M., Pate M., Zolnir-Dovc M., Poljak M., 2005. Transmission of *Mycobacterium tuberculosis* from human to cattle. J. Clin. Microbiol. 2005; 43(7):3555-7.
138. Oelemann M.C., Diel R., Vatin V., Haas W., Rusch-Gerdes S., Loch C., Niemann S. and Supply P., 2006. Assessment of an optimized Mycobacterial Interspersed Repetitive Unit-Variable Number of Tandem Repeat typing system combined with spoligotyping for population-based molecular epidemiology studies of tuberculosis. J. Clin. Microbiol.; 45 (3):691-7.
139. Oettinger T., Jorgensen M., Ladefoged A., Haslov K. and Andersen P., 1999. Development of the *Mycobacterium bovis* BCG vaccine: review of the historical and biochemical evidence for a genealogical tree. Tubercle and Lung Disease 79 (4), 243-250.
140. Oh P., Granich R., Scott J., Sun B., Joseph M., Stringfield C., Thisdell S., Staley J., Workman-Malcom D., Borestein L., Lehnkering E., Ryan P., Soukup J., Nitta A. and Flood J., 2002. Human exposure following *Mycobacterium tuberculosis* infection of multiple animal species in a metropolitan zoo. Emerging Infect. Dis. vol.8, No.11, nov 2002. 1290-1293.
141. Ottavianoni L.A., Bernardelli A., y Dubarry R.J., 1986. Aspectos sobre tuberculosis porcina en la provincia de La Pampa. Vet. Arg., Vol. III, N°25. 456-462.
142. Palmero D.J., Ritacco V. y Waisman J.L., 2001. Tuberculosis multirresistente (TBMR): Epidemias intrahospitalarias. SIDA y Enfermedades Asociadas. 2da edicion, Benetucci J.A., Ed. FUNDAI. Bs. As., (14); 261-279.
143. Palomino J.C., Martin A. and Portaels F., 2002. New methods for the diagnosis and drug resistance detection in mycobacteria. Recent Res. Devel. Microbiology, 6:297-318.
144. Parashar D., Chauhan D.S., Sharma V.D., Katoch V.M., 2006. Applications of real-time PCR technology to mycobacterial research. Indian J. Med. Res.; 124(4):385-98. Review.
145. Paterson A. B., 1948. The production of bovine tuberculoprotein. J. Comp. Pathol. 58:302-313.

146. Perez A, Reniero A, Forteis A, Meregalli S, Lopez B. and Ritacco V., 2002a. Study of *Mycobacterium bovis* in milk using bacteriological methods and the polymerase chain reaction. Rev. Argent. Microbiol. 34(1):45-51.
147. Perez A., Ward M., Torres P. and Ritacco V., 2002b. Use of spatial statistics and monitoring data to identify clustering of bovine tuberculosis in Argentina. Prev. Vet. Med. 56; 36-74.
148. Perfecto B., Dorronsoro I. y Lopez-Goni I., 2000. Confirmación mediante tipificación molecular de contaminaciones cruzadas en el laboratorio de micobacterias. Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.; 18:12-15.
149. Pfyffer, 2003. Laboratory Diagnosis of tuberculosis. Mycobacteria and TB. Issues Infect. Dis. Kaufmann S.H.E. y Hahn H.; Basel, Karger, Vol.2, 67-83.
150. Pfyffer G.E., Auckenthaler R., van Embden J.D.A. and van Soolingen D., 1998. *Mycobacterium canettii*, the smooth variant of *M. tuberculosis*, isolated from a swiss patient exposed in Africa. Emerging Infectious Diseases Vol.4, No4, October-December.
151. Phillips C.J.C., Foster C.R.W., Morris P.A., Teverson R., 2003. The transmission of *Mycobacterium bovis* infection to cattle. Research in Veterinary Science 74 (1), 1-15.
152. Qian L., van Embden J.D., van Der Zanden A.G., Weltevreden E.F., Duanmu H. and Douglas J.T., 1999. Retrospective analysis of the Beijing family of *Mycobacterium tuberculosis* in preserved lung tissues. J. Clin. Microbiol. 37(2):471-4.
153. Rad M.E., Bifani P., Martin C., Kremer K., Samper S., Rauzier J., Kreiswirth B., Blazquez J., Jouan M., van Soolingen D. and Gicquel B., 2003. Mutations in putative mutator genes of *Mycobacterium tuberculosis* strains of the W-Beijing family. Emerg Infect Dis. 9 (7):838-45.
154. Radunz, B.L. y Lepper, A.W.D. 1985. Suppression of skin reactivity to bovine tuberculin in repeat tests. Aus. Vet J. 62:191.194.
155. Rastogi N, Goh K.S. and Berchel M., 1999. Species-specific identification of *Mycobacterium leprae* by PCR-restriction fragment length polymorphism analysis of the *hsp65* gene. J. Clin. Microbiol. 37(6):2016-9.
156. Rastogi N., Legrand E., and Sola C., 2001. Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz., 20(1),21-54.
157. Rauzier J., Gormley E., Gutierrez M.C., Kassa-Kelembho E., Sandall L.J., Dupont C., Gicquel B., Murray A., 1999. A novel polymorphic genetic locus in members of the *Mycobacterium tuberculosis* complex. Microbiol. 145 (Pt 7):1695-701.
158. Reed M.B., Domenech P., Manca C., Su H., Barczak A.K., Kreiswirth B.N., Kaplan G. and Barry C.E. 3 rd., 2004. A glycolipid of hypervirulent tuberculosis strains that inhibits the innate immune response. Nature Vol. 431 (7004): 84-7.
159. Remacha Esteras M.A., Parra Parra I., and Blanco Mercade M., 2003. Disseminated tuberculosis due to *Mycobacterium africanum*. Arch. Bronconeumol. Aug; 39(8):376.

160. Ritacco V. y de Kantor I. N., 2006. Una actualización sobre la situación de la tuberculosis bovina en América Latini y Caribe y su importancia zoonótica. En: Temas de Zoonosis II, Cap. 27, 232-237. AAZ, Bs.As.
161. Ritacco V., Sequeira de Latini M.D., Torres P., Perez A.M., Latinti O., y de Kantor I.N., 2005. Tendencia de la infección por *Mycobacterium bovis* en ganado doméstico y el hombre en la Argentina. Revista Argentina de Zoonosis. Vol.II-Nº2.
162. Rodrigues C., Almeida D., Shenai S., Goyal N. and Mehta A., 2007. Dedicated decontamination: A necessity to prevent cross contamination in high throughput mycobacteriology laboratories. Indian J. Med. Microbiol.; 25 (1): 4-6.
163. Rodriguez C.A.R., Zumárraga M.J., de D. Oliveira E.M., Cataldi A.A., Romano M.I., Otto H.H., Bonafé V.L. y Ferreira Neto J.S., 2004. Caracterização molecular de isolados de *Mycobacterium bovis* do Estado São Paulo, Brasil, utilizando a técnica de Spoligotyping. Arq. Inst. Biol., São Paulo, v.71, n.3, p.277-282.
164. Romano M.I., Amadio A., Bigi F., Klepp L., Etchehoury I., Llana M.N., Morsella C., Paolicchi F., Pavlik I., Bartos M., Lea o S.C. y Cataldi A., 2005. Further analysis of VNTR and MIRU in the genome of *Mycobacterium avium* complex, and application to molecular epidemiology of isolates from South America. Vet. Microbiol. 110 (3-4):221-37.
165. Romano M.I., Alito A., Bigi F., Fisanotti J.C. y Cataldi A., 1995. Genetic characterization of mycobacteria from South American wild seals. Vet. Microbiol., 47; 89-98.
166. Romano, M.; Alito, A.; Zumárraga, M., Bigi, F. y Cataldi, A. 1999. Uso de sondas moleculares para la epidemiología de la tuberculosis bovina. Rev.Arg. de Microbiol. 31 (Supl.1):1-3.
167. Romero B., Aranaz A., de Juan L., Alvarez J., Bezos J., Mateos A., Gomez-Mampaso E. y Dominguez L., 2006. Molecular epidemiology of multidrug-resistant *Mycobacterium bovis* isolates with the same spoligotyping profile as isolates from animals. J. Clin. Microbiol.; 44 (9): 3405-8.
168. Roring S., Scott A., Brittain D., Walker I., Hewinson G., Neill S. y 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, p. 2126–2133 Vol. 40, No. 6.
169. Roux K.H., 1994. Using mismatched primer-template pairs in touchdown PCR. Biotechniques; 16(5):812-4.
170. Sales M.P.U., Taylor G.M., Hughes S., Yates M., Hewinston G., Young D. B. and Shaw R. J., 2001. Genetic Diversity among *Mycobacterium bovis* Isolates: a Preliminary Study of Strains from Animal and Human Sources. J. Clin. Microbiol. Vol. 39, No. 12, p. 4558–4562.
171. Salo W., Aufderheide A.C., Buikstra J. and Holcomb T.A., 1994. Identification of *Mycobacterium bovis* DNA in a pre-Columbian Peruvian mummy. Proc. Natl. Acad. Sci.;USA,; 91: 2091-2094.

172. Salyers A.A. and Whitt D.D., 1994. Tuberculosis. En: Bacterial pathogenesis: a molecular approach. Salyers A.A. y Whitt D.D. (Eds.). ASM Press, Washington, D.C., Cap. 26, 307-320.
173. Samper S., Martín C., Pinedo A., Rivero A., Blázquez J., Baquero F., van Soolingen D., and van Embden J., 1997. Transmission between HIV-infected patients of multidrug-resistant tuberculosis caused by *Mycobacterium bovis*. AIDS 11:1237-1242.
174. Samper S., Iglesias M.J., Rabanaque M.J., Lezcano M.A., Vitoria L.A., Rubio M.C., Gomez-Lus R., Gómez L.I., Otal I., Martín C., 1998. The molecular epidemiology of tuberculosis in Zaragoza, Spain: a retrospective epidemiology study in 1993. Int. J. Tuberc. Lung. Dis.; 2: 281-7.
175. Sampson S.L., Warren R.M., Richardson M., van der Spuy G.D. and van Helden P.D., 1999. Disruption of coding regions by IS6110 insertion in *Mycobacterium tuberculosis*. Tubercle and Lung Disease. 79(6), 349–359.
176. Sampson S., Warren R., Richardson M., van der Spuy G. and van Helden P., 2001. IS6110 insertions in *Mycobacterium tuberculosis*: predominantly into coding regions. J.Clin. Microbiol. 39 (9):3423-4.
177. Scott A.N., Menzies D., Tannenbaum T.N., Thibert L., Kozak R., Joseph L., Schwartzman K. and Behr M.A., 2005. Sensitivities and specificities of spoligotyping and mycobacterial interspersed repetitive unit-variable-number tandem repeat typing methods for studying molecular epidemiology of tuberculosis. J. Clin. Microbiol.; 43(1): 89-94.
178. SENASA, 2004. Secretaría de Agricultura, Ganadería y Pesca. (Servicio Nacional de Sanidad Animal). “Plan Nacional de Control y Erradicación de la Tuberculosis Bovina”. 1994.
179. SENASA, 2006. Programa Nacional de Lucha contra la Tuberculosis Bovina (<http://www.senasa.gov.ar/sanidad/tuberculosis/tuberculosis.php>).
180. Shamputa I.C., Rigouts L., Eyongeta L.A., El Aila N.A., van Deun A., Salim A.H., Willery E., Loch C., Supply P. and Portaels F., 2004. Genotypic and phenotypic heterogeneity among *Mycobacterium tuberculosis* isolates from pulmonary tuberculosis patients. J. Clin. Microbiol. 42 (12):5528-36.
181. Shinnick T.M. and Jonas V., 1994. Molecular approaches to the diagnosis of tuberculosis. En, Tuberculosis: Pathogenesis, Protection, and Control. Bloom B. R. (Ed.), AMS Press, Washington, DC. Cap. 30, 517-530.
182. Skuce R.A., Mc Corry T.P., Mc Carroll J.F., Roring S.M., Scott A.N., Brittain D., Hughes S.L., Hewinson R.G. and Neill S.D., 2002. Discrimination of *Mycobacterium tuberculosis* complex bacteria using novel VNTR-PCR targets. Microbiology.148:519-28.
183. Small P.M. and van Embden J.D.A., 1994. Molecular epidemiology of tuberculosis. En: Tuberculosis: pathogenesis, protection and control. Edited by Bloom B. R., AMS Press, Washington, DC. Cap. 3, 25-46.

184. Smith N.H., Dale J., Inwald J., Palmer S., Gordon S.V., Hewinson R. G. and Smith J.M., 2003. The population structure of *Mycobacterium bovis* in Great Britain: Clonal expansion. PNAS, vol. 100, no. 25, 15271-15275.
185. Smith N.H., Kremer K., Inwald J., Dale J., Driscoll J.R., Gordon S.V., van Soolingen D., Glyn Hewinson R. and Maynard Smith J., 2006. Ecotypes of the *Mycobacterium tuberculosis* complex. J. Theor. Biol. 239 (2):220-225.
186. Soini H., Pan X., Teeter L., Musser J. M. and Graviss E. A., 2001. Transmission dynamics and molecular characterization of *Mycobacterium tuberculosis* isolates with low copy numbers of IS6110. J.Clin.Microbiol. 39 (1):217-221.
187. Sommers H.M., 1993. Enfermedades micobacterianas. En: Diagnóstico y tratamiento clínico por el laboratorio. Henry J.B. (Ed.). Ediciones científicas y técnicas, S.A., Masson-Salvat Medicina, 9ª edición. Cap.43; 1103-1121.
188. Sreevatsan S., Pan X., Stockbauer K., Connell N., Kreiswirth B., Whittam T. and Musser J., 1997. Restricted structural gene polymorphism in the *Mycobacterium tuberculosis* complex indicates evolutionarily recent global dissemination. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97:9869-9874.
189. Supply P., Magdalena J., Himpens S. and Locht C., 1997. Identification of novel intergenic repetitive units in a mycobacterial two-component system operon. Mol. Microbiol, 26, 991-1003.
190. Supply P., Mazars E., Lasjean S., Vincent V., Gicquel B. and Locht C. 2000. Variable human minisatellite-like regions in the *Mycobacterium tuberculosis* genome. Mol. Microbiol, 26, 762-771.
191. Supply P., Lesjean S., Savine E., Kremer K., van Soolingen D. and Locht C., 2001. Automated High-Throughput genotyping for study of global epidemiology of *Mycobacterium tuberculosis* based on Mycobacterial Interspersed Repetitive Units. J.Clin. Microbiol.Vol. 39, No. 10, p. 3563-3571.
192. Supply P., Warren R.M., Banuls A.L., Lesjean S., van Der Spuy G.D., Lewis L.A., Tibayrenc M., van Helden P.D. and Locht C., 2003. Linkage disequilibrium between minisatellite loci supports clonal evolution of *Mycobacterium tuberculosis* in a high tuberculosis incidence area. Mol. Microbiol. 47(2):529-38.
193. Taylor G. M., Goyal M., Legge A. J., Shaw R. J. and Young D., 1999. Genotypic analysis of *Mycobacterium tuberculosis* from medieval human remains. Microbiology 145, 899-904.
194. Telenti A., Marchesi F., Balz M., Bally F., Bottger E.C. and Bodmer T., 1993. Rapid identification of mycobacteria to the species level by polymerase chain reaction and restriction enzyme analysis. J Clin Microbiol. 31(2):175-8.

195. Thierry D., Bfisson-Noel, A., Vincent-Levy-Frebault V., Nguyen, S., Guesdon J.L. and Gicquel B. 1990a. Characterization of a *Mycobacterium tuberculosis* insertion sequence, IS6110, and its application in diagnosis. J. Clin. Microbiol. 28:2668-2673.
196. Thierry D., Cave M.D., Eisenach KD, Crawford J.T., Bates J.H., Gicquel B. and Guesdon J.L., 1990b. IS6110, an IS-like element of *Mycobacterium tuberculosis* complex. Nucleic Acids Research 18:188.
197. Thoen C., Lobue P., de Kantor I., 2006. The importance of *Mycobacterium bovis* as a zoonosis. Vet. Microbiol.; 112(2-4):339-45.
198. Thornton C.G., MacLellan K.M., Brink T.L. and Passen S., 1998. In vitro comparison of NALC-NaOH, Tween 80, and C18 Carboxypropylbetaine for processing of specimens for recovery of mycobacteria. J.Clin.Microbiol, Vol. 36, No.12 p 3558-3566.
199. Torres P., 2006. Situación de la tuberculosis bovina en la República Argentina. www.senasa.gov.ar/oldweb/sanidad/tuberculosis/situacion_actual.pdf
200. Troesch A., Nguyen H., Miyada C.G., Desvarenne S., Gingeras T.R., Kaplan P.M., Cros P. and Mabilat C., 1999. Mycobacterium species identification and rifampin resistance testing with high-density DNA probe arrays. J. Clin. Microbiol. 37(1):49-55.
201. Underwood S., Pinto M.C., Rey Moreno J.C. and Carfagnini S.C., 1999. Tuberculosis felina: casos diagnosticados y consideraciones sobre su posible fuente de infección. Rev. Argent. Microbiol. 31 (Supl. 1): 17-18.
202. Underwood, S.C., Decaminada, E.C., Grimoldi, F., Moras, E.V. y Carfagnini, J.C., 2001. Prevalencia de brucelosis y tuberculosis en cabras lecheras pertenecientes a minifundistas de Forres, Santiago del Estero. Revista Argentina de Producción Animal, Vol.21 – Supl.1.
203. van der Spuy G.D., Warren R.M., Richardson M., Beyers N., Behr M.A. and van Helden P.D., 2003. Use of genetic distance as a measure of ongoing transmission of *Mycobacterium tuberculosis*. J.Clin.Microbiol., 41 (12): 5640–5644.
204. van der Zanden A.G., Hoentjen A.H., Heilmann F.G., Weltevreden E.F., Schouls L.M. and van Embden J.D., 1998. Simultaneous detection and strain differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* complex in paraffin wax embedded tissues and in stained microscopic preparations. Mol Pathol. Aug; 51(4):209-14.
205. van der Zanden A.G.M., Kremer K., Schouls L.M., Caimi K., Cataldi A., Hulleman A., Nagelkerke N.J.D. and van Soolingen D. 2002. Improvement of Differentiation and Interpretability of Spoligotyping for *Mycobacterium tuberculosis* Complex Isolates by Introduction of New Spacer Oligonucleotides. J. Clin. Microbiol., Vol. 40, No. 12, p. 4628-4639.
206. van der Zanden A.G., Te Koppele-Vije E.M., Vijaya Bhanu N., Van Soolingen D. and Schouls L.M., 2003. Use of DNA extracts from Ziehl-Neelsen-stained slides for molecular detection of rifampin resistance and spoligotyping of *Mycobacterium tuberculosis*. J. Clin. Microbiol.; 41(3):1101-8.

207. van Embden J. D., Donald Cave M., Crawford J.T., Dale J.W., Eisenach K.D., Gicquel B., Hermans P., Martín C., Mc Adam R., Shinnick T.M. and Small P.M., 1993. Strain identification of *Mycobacterium tuberculosis* by DNA fingerprinting: recommendations for a standardized methodology. *J. Clin. Microbiol.* 31(2):406-409.
208. van Embden J. D., van Gorkom T., Kremer K., Jansen R., Der Zeijst B. A., and Schouls L. M., 2000. Genetic variation and evolutionary origin of the direct repeat locus of *Mycobacterium tuberculosis* complex bacteria. *J. Bacteriol.* 182:2393–2401.
209. van Embden J.D., van Soolingen D., Small P.M. and Hermans P.W., 1992. Genetic markers for the epidemiology of tuberculosis. *Res. Microbiol.* 143(4):385-91.
210. van Soolingen D., Hermans P.W., de Haas P.E., Soll D.R., and van Embden J.D., 1991. Occurrence and stability of insertion sequences in *Mycobacterium tuberculosis* complex strains: evaluation of an insertion sequence-dependent DNA polymorphism as a tool in the epidemiology of tuberculosis. *J. Clin. Microbiol.*; 29(11):2578-86.
211. van Soolingen D., Hermans P.W., de Haas P.E., van Embden J.D., 1992. Insertion element IS1081-associated restriction fragment length polymorphisms in *Mycobacterium tuberculosis* complex species: a reliable tool for recognizing *Mycobacterium bovis* BCG. *J. Clin. Microbiol.*; 30 (7): 1772-7.
212. van Soolingen D., Hoogenboezem T., de Haas P.E., Hermans P.W., Koedam M.A., Teppema K.S., Brennan P.J., Besra G.S., Portaels F., Top J., Schouls L.M. and van Embden J.D. A novel pathogenic taxon of the *Mycobacterium tuberculosis* complex, Canettii: characterization of an exceptional isolate from Africa. *Int. J. Syst. Bacteriol* 1997; 47: 1236-45.
213. van Soolingen D, Kremer K. and Vinycky E., 2003. New Perspectives in the Molecular Epidemiology of Tuberculosis. En: *Mycobacteria and TB*. Kaufmann S.H.E., Hahn H. (eds). *Issues Infect. Dis. Basel*, Karger, vol 2, pp 17-45.
214. van Soolingen D., van der Zanden A.G., de Haas P.E., Noordhoek G.T., Kiers A., Foudraine N.A., Portaels F., Kolk A.H., Kremer K. and van Embden J.D., 1998. Diagnosis of *Mycobacterium microti* infections among humans by using novel genetic markers. *J. Clin. Microbiol.* 36(7):1840-5.
215. Viana-Niero C., Gutierrez C., Sola C., Filliol I., Boulahbal F., Vincent V. and Rastogi N., 2001. Genetic Diversity of *Mycobacterium africanum* Clinical Isolates Based on IS6110-Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis, Spoligotyping, and Variable Number of Tandem DNA Repeats. *J. Clin. Microbiol.*, Vol. 39, No. 1, p. 57–65.
216. Vitale F., Capra G., Maxia L., Reale S., Vesco G. and Caracappa S., 1998. Detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex in cattle by PCR using milk, lymph node aspirates, and nasal swabs. *J. Clin. Microbiol.* 36(4):1050-5.
217. Warren R. M., Streicher E. M., Sampson S. L., van der Spuy G. D., Richardson M., Nguyen D., Behr M. A., Victor T. C. and van Helden P. D., 2002a. Microevolution of the

- Direct Repeat region of *Mycobacterium tuberculosis*: implications for interpretation of spoligotyping data. *J. Clin. Microbiol.*, Vol. 40, No. 12.p. 4457–4465.
218. Warren R. M., Streicher E. M., Charalambous S., Churchyard G., van der Spuy G. D., Grant A. D., van Helden P. D., y Victor T. C., 2002b. Use of spoligotyping for accurate classification of recurrent tuberculosis. *J. Clin. Microbiol.*, 40 (10). p. 3851–3853.
219. Warren R. M., van der Spuy G. D., Richardson M., Beyers N., Borgdorff M. W., Behr M. A. and van Helden P. D., 2002c. Calculation of the stability of the IS6110 banding pattern in patients with persistent *Mycobacterium tuberculosis* disease. *J. Clin. Microbiol.*p. 1705–1708 Vol. 40, No. 5
220. Wedlock D.N., Skinner M.A., de Lisle G. W. and Buddle B.M., 2002. Control of *Mycobacterium bovis* infections and the risk to human populations. *Microbes and Infection* (4) 471–480. Review.
221. WHO, 2007a. Fact sheet N°104. Tuberculosis. (<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs104/en/>).
222. WHO, 2007b. Global Tuberculosis Control, Surveillance, Planning, Financing. (http://www.who.int/tb/publications/global_report/en/.html).
223. WHO, 2003. Report. Global Tuberculosis Control, Surveillance, Planning, Financing. (<http://www.who.int/docstore/gtb/publications/globrep03/summary-sp.html>).
224. WHO, 2004. Las tasas de tuberculosis farmacorresistente son diez veces mayores en Europa Oriental y Asia Central que en el resto del mundo. (<http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2004/pr17/es/>).
225. Wood P.R, Corner L.A, Rothel J.S., Ripper J.L., Fifis T., Mc Cormick B.S. and Francis B., 1992. A field evaluation of serological and cellular diagnostic tests for bovine tuberculosis. *Vet. Microbiol.*; 31(1): 71-79.
226. Yang Z., Chaves F., Barnes P.F., Burman W.J., Koehler J., Eisenach, K.D., Bates J.H. and Cave M.D., 1996. Evaluation of Method for Secondary DNA Typing of *Mycobacterium tuberculosis* with pTBN12 in Epidemiologic Study of Tuberculosis. *J. Clin. Microbiol.*, 3044-3048. Vol. 34, No. 12.
227. Yang Z.H., de Haas P.E.W., Wachmann C.H., van Soolingen D., van Embden J.D.A. and Andersen A.B., 1995. Molecular epidemiology of tuberculosis in Denmark in 1992. *J. Clin Microbiol.*; 33: 2077-81.
228. Young D.B and Robertson B.D., 1999. TB Vaccines: Global Solutions for Global Problems. *Science*, Vol. 284 1479-1480.
229. Zhang Y. and Telenti A., 2000. Genetics of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis* Molecular Genetics of Mycobacteria. Hatfull G.F., Jacobs W.R., (Eds.); ASM Press, Washington D.C.

230. Zanini M.S., Moreira E.C., Lopez M.T., Mota P. and Salas C.E., 1998. Detection of *Mycobacterium bovis* in milk by polymerase chain reaction. Zentralbl Veterinarmed. 45(8):473-9.
231. Zanini M.S., Moreira E.C., Salas C.E., Lopes M.T., Barouni A.S., Roxo E., Telles M.A., Zumárraga M.J., 2005. Molecular typing of *Mycobacterium bovis* isolates from South-east Brazil by Spoligotyping and RFLP J. Vet. Med. B. Infect. Dis. Vet. Public. Health. 2005 Apr; 52(3):129-33.
232. Zanini M.S., Moreira E.C., Lopes M.T., Oliveira R.S., Leao S.C., Fioravanti R.L., Roxo E., Zumarraga M., Romano M.I., Cataldi A. and Salas C.E., 2001. *Mycobacterium bovis*: polymerase chain reaction identification in bovine lymphonode biopsies and genotyping in isolates from Southeast Brazil by spoligotyping and restriction fragment length polymorphism. Mem. Inst. Oswaldo Cruz.; 96 (6):809-13.
233. Zink A. R., Sola C., Reischl U., Grabner W., Rastogi N., Wolf H., and Nerlich A.G., 2003. Characterization of *Mycobacterium tuberculosis* complex DNAs from egyptian mummies by spoligotyping. J. Clin. Microbiol. p. 359–367 Vol. 41, No. 1.
234. Zumárraga M.J., Bernardelli A., Cataldi A., Quse V., Loureiro J., Bastida R., Bigi F., Alito A., Castro Ramos M., Martin C. and Romano M.I., 1999c. Molecular characterization of mycobacteria isolated from seals. Microbiology, 145; 2519-26.
235. Zumárraga M., Bigi F., Alito A., Romano M. I. and Cataldi A., 1999d. A 12.7 kb fragment of the *Mycobacterium tuberculosis* genome is not present in *Mycobacterium bovis*. Microbiology 145, 893–897.
236. Zumárraga M.J., Cataldi A., Bigi F.y Alito A., Romano M.I., 1999a. Aplicación de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en la detección de micobacterias en leche. Rev. Argent. Microbiol., 31 (Supl.1):4-5.
237. Zumárraga M.J., Martín C., Samper S., Alito A., Latini O., Bigi F., Roxo E., Cicuta M.E., Errico F., Castro Ramos M., Cataldi A., van Soolingen D. and Romano M.I., 1999b. Usefulness of spoligotyping in the molecular epidemiology of *Mycobacterium bovis* - related infections in South American countries. J. Clin. Microbiol., 37(2):296-303.
238. Zumárraga M.J., Resoagli E.H., Cicuta M.E., Martinez A.R., Oritiz de Rott M.I., de Millan S.G., Caimi K., Gioffré A., Alito A., Bigi F., Cataldi A.A. and Romano M.I., 2001. PCR-restriction fragment length polymorphism analysis (PRA) of *Mycobacterium leprae* from human lepromas and from a natural case of an armadillo of Corrientes, Argentina. Int. J. Lepr. Other. Mycobact. Dis. 69(1):21-5.
239. Zumárraga M.J., Meikle V., Bernardelli A., Abdala A., Tarabla H., Romano M.I., and Cataldi A., 2005. Use of touch-down PCR to enhance the sensitivity of *Mycobacterium bovis* detection . J. Vet. Diagn. Invest. 17 (3): 232-8.

6.1. Publicaciones derivadas del trabajo de tesis

1. Cataldi A.A., Gioffré A., Santángelo M.P., Alito A., Caimi K., Bigi F., Romano M.I., Zumárraga M., 2002. El genotipo de *Mycobacterium bovis* mayoritario en la Argentina lo es

- también en las Islas Británicas: ¿la tuberculosis bovina provino de Gran Bretaña? *Rev Argent. Microbiol.* 34:1-6.
2. Cobos-Marín L., Montes-Vargas J., Zumárraga M., Cataldi A., Romano M.I., Estrada-García I. and Gonzalez-y-Merchand J.A., 2005. Spoligotype analysis of *Mycobacterium bovis* isolates from Northern México. *Can. J. Microbiol.* 51: 996–1000.
 3. Colmegna I., Ricci, B. G., Zumárraga M., Cataldi A.A., Di Lonardo M. M., Citera G., Maldonado-Cocco J.A., 2004. *Mycobacterium bovis* and septic glenohumeral arthritis. *Clin. Rheumatol.*, 23: 379-380.
 4. Cousins D.V., Bastida R., Cataldi A., Quse V., Redrobe S., Dow S., Duignan P., Murray A., Dupont C., Ahmed N., Collins D.M., Butler W.R., Dawson D., Rodriguez D., Loureiro J., Romano M.I., Alito A., Zumárraga M. and Bernardelli A., 2003. Tuberculosis in seals caused by a novel member of the *Mycobacterium tuberculosis* complex: *Mycobacterium pinnipedii* sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol. Sep*; 53 (Pt 5):1305-14.
 5. Fisanotti J.C., Alito A., Bigi F., Latini O., Roxo E., Cicuta E., Zumárraga M.J., Cataldi A., and Romano M.I., 1998. Molecular Epidemiology of *Mycobacterium bovis* isolates from South America. *Vet. Microbiol.*, 60 251-257.
 6. Martínez Vivot M., Marticorena D., Zumárraga M., Cataldi A., Belgrano D., Barboni A.y Moras E., 2005. Tuberculosis Porcina. Caracterización bacteriológica y molecular de micobacterias aisladas de cerdos faenados en La Pampa Húmeda”. *Investigación Veterinaria.* 2005., Octubre; Vol.7, Nº 1: 246-247.
 7. Martínez Vivot M., Zumárraga M., Romano M., Cataldi A., Diz L., Guida N., Borboni A. y Moras E. V., 2003. Aplicación del spoligotyping para identificar el origen de reinfección de tuberculosis bovina en un tambo de la provincia de Buenos Aires. *Vet. Argent.*, Vol XXNº191, 27-31.
 8. Meikle V., Schneider M., Azenzo G., Zumárraga M., Magnano G., Cataldi A., 2007. Individual animals of a cattle herd infected with the same *Mycobacterium bovis* genotype shows important variations in bacteriological, histopathological and immune response parameters. *Zoonoses Public Health.*; 54(2):86-93.
 9. Rodriguez C.A.R., Zumárraga M.J., de D. Oliveira E.M., Cataldi A.A., Romano M.I., Otto H.H., Bonafé V.L. and Ferreira Neto J.S., 2004. Caracterização molecular de isolados de *Mycobacterium bovis* do Estado São Paulo, Brasil, utilizando a técnica de Spoligotyping. *Arq. Inst. Biol.*, São Paulo, v.71, n.3, p.277-282.
 10. Romano, M.; Alito, A.; Zumárraga, M., Bigi, F.; Cataldi, A. 1999. Uso de sondas moleculares para la epidemiología de la tuberculosis bovina. *Rev.Argent. Microbiol.* 31 (Supl.1):1-3.
 11. Zanini M.S., Moreira E.C., Salas C.E., Lopes M.T., Barouni A.S., Roxo E., Telles M.A. and Zumárraga M.J., 2005. Molecular typing of *Mycobacterium bovis* isolates from South-east Brazil by Spoligotyping and RFLP *J. Vet. Med. B. Infect. Dis. Vet. Public. Health.* 2005 Apr; 52(3):129-33.

12. Zanini M.S., Moreira E.C., Lopes M.T., Oliveira R.S., Leao S.C., Fioravanti R.L., Roxo E., Zumarraga M., Romano M.I., Cataldi A. and Salas C.E., 2001. *Mycobacterium bovis*: polymerase chain reaction identification in bovine lymphonode biopsies and genotyping in isolates from Southeast Brazil by spoligotyping and restriction fragment length polymorphism. Mem. Inst. Oswaldo Cruz.; 96 (6):809-13.
13. Zumárraga M.J., Bernardelli A., Cataldi A., Quse V., Loureiro J., Bastida R., Bigi F., Alito A., Castro Ramos M., Martín C., y Romano M.I., 1999. Molecular characterization of mycobacteria isolated from seals. Microbiology, 145; 2519-26.
14. Zumárraga M.J., Martín C., Samper S., Alito A., Latini O., Bigi F., Roxo E., Cicuta M.E., Errico F., Castro Ramos M., Cataldi A., van Soolingen D. and Romano M.I., 1999. Usefulness of spoligotyping in the molecular epidemiology of *Mycobacterium bovis* - related infections in South American countries. J. Clin. Microbiol., 37(2):296-303.