

UNIVERSIDAD NACIONAL DE ROSARIO

FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS

Estación Experimental Agropecuaria Rafaela

INSTITUTO NACIONAL DE TECNOLOGÍA AGROPECARIA

***Mycobacterium bovis* en fauna silvestre de la Cuenca lechera Santa Fe –
Córdoba (Argentina)**

Autor: Alejandro A. Abdala, Méd. Vet. M Sc.

Director de Tesis: Héctor D. Tarabla, Méd. Vet. M Sc., PhD

Dedicatoria

A mi familia.

Agradecimientos

A mis compañeros de trabajo Roxana Galarza, Miguel Marin, Oscar Warnke, Santiago Nava, Mario Argañaraz y Ariel Risso por su valiosa colaboración en las tareas de campo.

A los compañeros del Área de Recursos Naturales y Suelos de la EEA INTA Rafaela.

A Héctor Tarabla por su apoyo constante y espíritu crítico.

A los colegas veterinarios Adalberto Racca, Juan M. Feroglio, Elvio Ballari y Julio Rho por su estimada ayuda en la selección de los rodeos.

A los productores y su personal que accedieron a colaborar y permitieron los muestreos en sus campos.

A INTA por posibilitar el crecimiento en conocimientos de su personal.

Muy especialmente a Sergio Garbaccio y Martín Zumarraga del CICV INTA Castelar, invaluable compañeros que posibilitaron la realización de este trabajo.

1-Índice	IV
2-Resumen	1
3-Introducción	4
4-Hipótesis Objetivos	8
5-Marco teórico	9
6-Materiales y Métodos	56
7-Resultados	61
8-Discusión	67
9-Conclusiones	72
10- Imágenes, tablas y figuras	74
11- Anexo	80
12- Referencias Bibliográficas	83
13-Abreviaturas	103

2- Resumen

El *Mycobacterium bovis* (*M. bovis*), agente causal de la tuberculosis bovina (TBb), produce infecciones en animales domésticos, silvestres y en el hombre, por lo cual constituye un grave problema en salud pública. En las últimas décadas varios países ejecutaron programas de control y erradicación de TBb en sus rodeos bovinos, basándose en la detección de los animales infectados y su inmediata faena (“test and slaughter”). A pesar de haberse logrado progresos satisfactorios, en algunas áreas geográficas persistieron las reinfecciones en los rodeos saneados. Una de las principales causas para que esto ocurriera fue la presencia de fauna silvestre infectada.

En Argentina existe desde 1999 un plan oficial de control y erradicación de TBb basado en la misma premisa. Desde su puesta en marcha el número de rodeos bovinos declarados libres ha ido en constante aumento, destacándose los lecheros. Sin embargo, el nivel de infección del rodeo nacional sigue siendo elevado. El factor ambiental ha sido poco estudiado en Argentina, especialmente el que involucra a la participación de la fauna silvestre local.

Se seleccionaron 8 rodeos lecheros ubicados en la denominada Cuenca lechera Santa Fe–Córdoba. Seis de ellos presentaban prevalencias elevadas en sus vacas a la prueba de tuberculina y en los dos restantes se había detectado reinfección luego de haber finalizado un programa de saneamiento. Las labores de muestreo de fauna se realizaron durante 2007, 2008 y parte del 2009, capturándose un total de 146 mamíferos silvestres. Se aisló *M. bovis* en 12 individuos, resultando en una prevalencia de infección del 8,2 %. Diez de estos aislamientos se realizaron en comadreja overa (*Didelphys albiventris*) y los restantes se obtuvieron de un zorro gris (*Lycolapex gymnocercus*) y de una rata (*Rattus norvegicus*). La prevalencia de infección en comadrejas resultó del 12,8 %, involucrando mayoritariamente a los individuos machos, sin ser este hallazgo

estadísticamente significativo ($P=0,18$). Ninguno de los individuos en donde se aisló *M.bovis*, presentó lesiones macroscópicas de tuberculosis. Los aislamientos obtenidos en comadrejas fueron a partir de ganglios de cabeza, pulmón y pool de hígado, bazo y riñón. En el zorro se obtuvo solo a partir de ganglios mesentéricos y en la rata a partir de pulmón.

No se encontraron asociaciones significativas entre los aislamientos de *M. bovis* en fauna y la prevalencia de TBb en los rodeos bovinos ($P= 0,097$), ni en el tamaño de los mismos ($P= 0,422$). Los rodeos que sufrieron reinfección tuvieron 3,79 veces más riesgo de aislamiento de *M. bovis* en la fauna silvestre que aquellos donde la infección permaneció estable ($P= 0,0264$).

La tipificación molecular de los aislamientos correspondió en cinco ocasiones a los spoligotipos 34 y al 12. Estos aislamientos se obtuvieron sobre 9 comadrejas y una rata. En una sola oportunidad se aislaron los spoligotipos 96 y 122, el primero a partir de un zorro y el segundo de una comadreja. Solo dos aislamientos de *M. bovis* se obtuvieron de los rodeos bovinos involucrados en los muestreos de fauna, correspondiendo a los spoligotipos 21 y 98.

Debido a que la mayoría de los aislamientos se obtuvieron a partir de ganglios de la cabeza y de pool de órganos como bazo, hígado y riñón, la vía digestiva sería la principal vía por la cual las comadrejas (*Didelphis albiventris*) adquieren la infección. Estos hallazgos son coincidentes con los realizados en USA sobre otra especie del mismo género, como la comadreja de América del Norte o *Didelphis virginiana*.

Se puede considerar que *Didelphis albiventris* podría jugar el papel de hospedador circunstancial o “*spillover hosts*” del *M. bovis*. Esto se sostiene por la coincidencia de spoligotipos aislados sobre esta especie y los más frecuentemente aislados en bovinos de Argentina.

3- Introducción

3-1 Antecedentes

La tuberculosis (TB) es una enfermedad infecciosa reemergente, que durante el 2007 produjo 9,27 millones de nuevos casos humanos y 1,3 millones de personas fallecidas en todo el mundo (WHO, 2009). La enfermedad se ha visto exacerbada por el incremento global explosivo del Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA)/Virus de Inmunodeficiencia Humana (VIH) y la aparición de cepas resistentes a múltiples drogas (Neill, *et al.*, 2005).

La tuberculosis humana y de los animales es producida por micobacterias que conforman el denominado *Complejo Mycobacterium tuberculosis (CMT)*. Este es un grupo integrado por las siguientes especies de micobacterias estrechamente relacionadas: *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium africanum*, *Mycobacterium canettii*, *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium bovis- Calmet y Guérin (BCG)*, *Mycobacterium microti*, *Mycobacterium caprae* y *Mycobacterium pinnipedii*. Recientemente se ha propuesto un nuevo integrante de este grupo descrito como *Mycobacterium mungi*, por haber sido aislado de mangostas (*Mungos mungo*) en Botswana (Alexander, *et al.*, 2010).

El agente causal de la tuberculosis bovina (TBb) es el *M. bovis*, Esta bacteria produce infecciones en animales domésticos y silvestres, afectando también al hombre, por lo cual constituye un grave problema en salud pública.

En el pasado la fuente principal de la infección por *M. bovis* para los humanos era el consumo de leche cruda, la cual se asociaba con el desarrollo de lesiones extrapulmonares. La pasteurización de la leche redujo significativamente la incidencia de infección, persistiendo el riesgo en zonas de población subdesarrolladas o en aquellas que todavía tienen por costumbre el consumo de leche cruda. Actualmente la

enfermedad zoonótica la padecen personas cuyas actividades ocupacionales mantienen relación directa con bovinos como empleados de frigoríficos o mataderos, trabajadores rurales, veterinarios, transportistas de ganado o lácteos (Sequeira *et al.*, 1990). En Argentina los casos registrados de tuberculosis en humanos debido a *M. bovis*, se presentan mayormente en las provincias de Santa Fe y Córdoba donde la actividad pecuaria bovina es importante, presentando valores del orden del 1,02 y 1,24 % respectivamente, sobre el total de casos de tuberculosis diagnosticada (Kantor *et al.*, 2008).

En las últimas décadas numerosos países ejecutaron programas de control y erradicación de TBb en sus rodeos bovinos, basándose en la detección de los animales infectados y su inmediata faena (“test and slaughter”). A pesar de haber logrando progresos satisfactorios en extensas regiones, en algunas áreas persistieron las reinfecciones en los rodeos saneados. Una de las causas para que esto ocurriera fue la presencia de fauna silvestre infectada (Morris *et al.*, 1994; Clifton-Hadley *et al.*, 1995, Gallagher and Clifton-Hadley 2000; de Lisle *et al.*, 2001; Ryan *et al.*, 2006).

En Argentina existe desde 1999 un plan oficial de control y erradicación de TBb (SENASA, 1999a), reemplazado por su continuador (SENASA, 2012) basados en la misma premisa (“test and slaughter”), aunque no contemplaron la indemnización a los productores por el descarte de los animales positivos. Por ello, requiriere prioritariamente de la cooperación entre los ganaderos y sus asociaciones, el Servicio Nacional de Sanidad Animal, los servicios provinciales de salud animal, los Colegios Profesionales de Veterinarios, las Universidades y las empresas lácteas. Desde su puesta en marcha el número de rodeos bovinos declarados libres ha ido en constante aumento, especialmente los lecheros. Sin embargo el nivel de infección del rodeo bovino nacional sigue siendo elevado al ubicarse en el 1,2 % (Torres, 2004). Esta prevalencia coloca al

país en el grupo de países latinoamericanos con mayores niveles de infección (Kantor, 2006).

La distribución de la TBb en los rodeos del país reconoce áreas más afectadas que otras. Estos conglomerados geográficos coinciden con las zonas lecheras de la Argentina, siendo el más significativo por su nivel de infección el que agrupa a los departamentos centrales de la provincia de Santa Fe (Castellanos, La Capital, Las Colonias, San Jerónimo y San Justo) y parte del departamento San Justo, ubicado en la provincia de Córdoba (Pérez *et al.*, 2002). Trabajos realizados en los departamentos (Castellanos y Las Colonias), evidenciaron prevalencias en vacas y rodeos lecheros del orden del 7,7% y 30% para el primero, y del 4,1% y 15,6% para el segundo (Abdala *et al.*, 1999; Abdala *et al.*, 2002). En el vecino departamento cordobés de San Justo, la prevalencia de animales con lesiones compatibles con TB fue del 3,4% (Abdala y Tarabla, 2004).

Diversos factores de manejo y medio ambiente pueden explicar las variaciones de incidencia y prevalencia entre regiones y entre rodeos de una misma región (Morris *et al.*, 1994).

El factor ambiental ha sido poco estudiado en Argentina, especialmente el que involucra a la participación de la fauna silvestre local. El aislamiento de *M. bovis* en animales silvestres de Argentina fue comunicado en liebres (*Lepus europaeus*) (Kantor *et al.*, 1984), en jabalí (*Sus scrofa*) (Bernardelli *et al.*, 2004) y en puma en cautiverio (Quse y Falzoni, 2008). La liebre y el jabalí son especies de origen europeo y fueron introducidas entre fines del siglo XIX y principios del XX, compartiendo desde entonces el hábitat con bovinos criados en sistemas típicamente extensivos. Recientemente se ha buscado la presencia del *M. bovis* en liebres cazadas a campo y procesadas en un frigorífico de Río Cuarto (Prov. de Córdoba), inspeccionándose

181.000 individuos, de los cuales solo 20 presentaron lesiones compatibles con TB, sin embargo no se aisló *M. bovis* de estas lesiones (Raviolo *et al.*, 2005).

Hasta el momento no se han realizado estudios sistemáticos sobre la infección de fauna por *M. bovis* y su relación con las especies de interés pecuario. Más aún, dentro del actual Programa Nacional de Control y Erradicación de la TBb (SENASA, 2012), no se encuentra previsto este tipo de investigación. No obstante, cuando se alcancen estados avanzados en la aplicación de este programa, se tornará necesario conocer la totalidad de los componentes epidemiológicos y su verdadero peso en el mantenimiento del agente etiológico en el medio ambiente.

3-2 Hipótesis General

La fauna silvestre que cohabita con bovinos infectados con *M. bovis* en la cuenca lechera Santa Fe – Córdoba, es capaz de adquirir la infección y ser una fuente potencial de diseminación a otras especies

4- Objetivos

4-1 Objetivo General

Determinar si la fauna silvestre autóctona de la región centro de la Provincia de Santa Fe y este de Córdoba puede estar infectada con *M. bovis*.

4-2 Objetivos Específicos

- Estimar la prevalencia bruta de infección en fauna silvestre.
- Estimar la prevalencia específica por especie.
- Tipificar por técnicas moleculares los aislamientos de *M. bovis* obtenidos y compararlos con los de circulación conocida en bovinos de Argentina
- Estimar las asociaciones de riesgo posibles, derivadas del aislamiento de *M bovis* en fauna y las características epidemiológicas de los rodeos donde se realizaron las capturas.

5- Marco teórico

5-1 Biología de *Mycobacterium bovis*

M. bovis integra el género de las Micobacterias, este grupo de bacterias se caracteriza por ser bacilos aerobios, no esporulados, no móviles, con una pared celular rica en complejos lipídicos y ceras. Estos lípidos se unen a la fucsina, no pudiéndose ser removida por el decolorante (ácido clorhídrico-alcohol etílico) de la coloración de Ziehl Neelsen (ZN), de allí que toman la denominación de ácido alcohol resistentes. Esta coloración es utilizada para diferenciarlas de las restantes bacterias (Quinn *et al.*, 2002).

Las Micobacterias se encuentran ampliamente distribuidas en la naturaleza, pudiendo ser saprófitas, patógenas oportunistas y estrictamente patógenas. El género contiene cerca de 60 especies divididas en tres grandes grupos, los de crecimiento lento, los crecimiento rápido y las aquellas especies o aislamientos que no pueden cultivarse *in vitro* (Grange, 1996).

La diferenciación entre micobacterias patógenas y las restantes se realiza a través del desarrollo en medios de cultivos, pruebas bioquímicas, inoculación en animales de laboratorio y por métodos moleculares.

Las bacterias de marcada importancia para la salud humana y animal conforman dos grupos: el denominado Complejo *Mycobacterium tuberculosis* (CMT) que engloba las especies responsables de la tuberculosis en humanos y animales y el Complejo *Mycobacterium avium-intracellulare* (MAC), donde el *M. avium* se subdivide en cuatro subespecies (ssp): ssp. *avium*, ssp. *paratuberculosis*, ssp. *silvaticum* y ssp. *hominis-suis*. El *M. avium ssp avium* produce la tuberculosis en aves y se ha transformado en un serio problema en humanos afectados por SIDA, mientras que el *M. avium ssp paratuberculosis* es el responsable de la enfermedad de Johnes en rumiantes y

sospechado de producir la enfermedad de Crohn en humanos. Queda fuera de estos complejos *M. leprae* responsable de la lepra en humanos.

5-1-2 Composición de la pared celular

La particularidad distintiva de las micobacterias se basa en la composición de la pared celular, caracterizada por poseer cuatro capas por sobre la membrana celular. La capa más interna la forman peptidoglycanos, cubiertos por una segunda capa compuesta por arabinogalactan unido a macromoléculas constituidas por arabinosa y galactosa. Uno de los lados de la cadena de arabinogalactan se une a la tercera capa formada por ácido micólico, el cual está conformado por largas cadenas de ácidos grasos. Este es el principal componente de la pared, debiendo a ello su espesor. La cuarta capa es la superficial y contiene varios lípidos y compuestos relacionados como glycosidos, glicolípidos y peptidoglicolípidos denominados Mycosides. Otro compuesto de importancia presente en esta pared celular lipídica es el lipoarabinomanano (LAM) que se une a la membrana celular por la porción lipídica atravesando toda la pared terminando el extremo polisacárido por fuera de la superficie de la misma. Algunas especies de micobacterias pueden contener antígeno O en su pared a semejanza de las bacterias Gram-negativas (Grange, 1996)

5-1-3 Estructura intracelular y genoma

Por dentro de la pared celular las micobacterias se asemejan a las otras bacterias, conteniendo varios gránulos de inclusión, cuerpos lipídicos de almacenamiento y cuerpos nucleares. Aunque el genoma generalmente consiste en un solo cromosoma circular, algunas micobacterias pueden tener más de uno. Las secuencias del genoma

han sido elucidadas para *M. tuberculosis*, *M. bovis* y *M. bovis* BCG (Garnier, *et al*, 2003)

5-1-4 Cultivo en laboratorio

Para el aislamiento primario de las especies del Complejo *M. tuberculosis* se utilizan medios sólidos en base a huevo como el Löwestwin-Jensen y el Stonebrink. Si bien las micobacterias son aerobias, *M. bovis* se desarrolla en condiciones de microaerofilia. La temperatura de incubación es de 37°C y los cultivos se mantienen durante 8 semanas ya que el desarrollo es lento, las colonias son lisas y de color parduzco y se pueden desarrollar al cabo de 3-6 semanas. *M. bovis* desarrolla mejor y más temprano en el medio de Stonebrink que contiene piruvato de sodio como fuente de carbono y presenta un crecimiento disgónico en cultivos que contienen glicerina. La identificación de las cepas de *M. bovis* se realiza a través de pruebas bioquímicas y moleculares. Dentro de las primeras, es sensible a la hidracida del ácido 2-Tiofeno carboxílico (TCH) y a la hidracina del ácido isonicotínico (INH). También resultan negativas a la pruebas de Nitrato Reductasa, Catalasa a 68° C, nicototaminidasa y pirazinaminidasa (Jorge *et al.*,2005).

5-1-5 Supervivencia en el medio ambiente

M. bovis es un patógeno obligado que puede sobrevivir por períodos sustanciales en el medio ambiente bajo condiciones favorables (Morris *et al.*, 1994).

Los trabajos de Morris (1994) y O`Reill y Daborn (1995) detallan las investigaciones realizadas por varios autores en diferentes décadas pasadas, exponiendo la supervivencia del *M. bovis* bajo diversas condiciones. Este bacilo puesto en materia fecal de bovino puede sobrevivir según las estaciones climáticas desde 2 meses en

primavera, hasta 5 meses en invierno (Stenhouse & Hoy, 1930 citados por O'Reill y Daborn, 1995). Bajo las condiciones del clima tropical australiano, la inoculación de *M. bovis* en materia fecal, suelo seco y húmedo estériles en oscuridad o bajo 80% de sombra, permitió la supervivencia de la bacteria hasta 4 semanas. Cuando estos sustratos fueron sometidos a la luz solar no se pudo reaislar la bacteria en ninguna de estas mezclas (Dufield y Young 1985, citado por Morris *et al.*, 1994).

La mezcla de *M. avium*, *M. bovis* y *M. tuberculosis* con materia fecal, sangre y orina permite la supervivencia por 150 a 332 días a una temperatura de 12 a 14° C y al resguardado de la luz solar. Esta supervivencia disminuye a 18 a 31 días con temperaturas de 24-43 °C y expuesto a la luz solar (Genov 1965, citado por Morris *et al.*, 1994).

Una adecuada disponibilidad de nutrientes orgánicos es el factor más importante que influye en el mantenimiento de la viabilidad de las bacterias patógenas en el ambiente. Si los nutrientes son escasos aumenta su susceptibilidad a las mayores temperaturas. La exposición solar afecta la supervivencia en forma indirecta a través de la desecación, mientras la luz ultravioleta tiene un efecto limitado en las zonas templadas (Wray 1975, citado por Morris *et al.*, 1994). La supervivencia del *M. bovis* en pasturas y suelo se puede ver afectada por factores como la temperatura, la humedad, la exposición a la luz solar, al oxígeno disuelto, la presencia de antibióticos naturales disueltos en el suelo, los tipos de microflora asociados (Key and Collins 1978, citados por Morris *et al.*, 1994). La bacteria en materiales naturalmente contaminados tiende a morir más rápido que en equivalentes pero artificialmente infectados (Morris *et al.*, 1994).

El mantenimiento de *M. bovis* viable en carcasas de animales muertos fue posible mientras las lesiones granulomatosas fueron reconocibles en ellas, pero no después de la descomposición (Livigstone 1979, citado por Morris *et al.*, 1994). *M. bovis* fue aislado

del interior húmedo de carcasas que tenían por lo menos un mes después de muerto y había sufrido actividad de carroñeros (Pfeiffer and Morris 1991, citados por Morris *et al.*, 1994).

En carcasas de animales sobre pasturas el nivel de infección disminuye rápidamente después de 2 semanas, no pudiéndose recuperar *M. bovis* después de la cuarta semana (O'Reill y Daborn, 1995). La persistencia en fomites como fuentes de transmisión en la mayoría de los medios ambientes, aparece como disminuido ya que la dosis oral infectiva debe ser elevada en comparación con la vía respiratoria (Morris *et al.*, 1994).

5-1-6 Resistencia a los desinfectantes

Las micobacterias son bien conocidas por poseer resistencia a los antisépticos y desinfectantes, encontrándose ubicadas en la escala de bacterias más resistentes, solo por debajo de las esporuladas. Esta resistencia se basa en su compleja pared celular, la cual actúa de barrera para la entrada de los agentes desinfectantes (McDonnell and Russell 1999).

Los antisépticos y desinfectantes que poseen actividad anti-micobacterianas son el fenol, el ácido peroacético, el peróxido de hidrógeno, el alcohol y el glutaraldehído. El hipoclorito de sodio al 4%, el ácido cresílico al 3% o el fenol conteniendo Ortofenil-fenol al 5% son los más utilizados y seguros en la destrucción del bacilo, aunque el alcohol etílico al 70% en agua lo destruye rápidamente (SENASA 1999b).

5-2 Patogenia

5-2- 1 Vías de transmisión

La mejor evidencia de la ruta de transmisión del *M. bovis* en los bovinos es el patrón de lesiones observadas en los frigoríficos (Phillips *et al.*, 2003).

5-2-1-1 Vía aerógena

La tuberculosis es primariamente una enfermedad respiratoria y la transmisión por vía aerógena es el mecanismo de contagio primordial intra especie y entre especies (O'Reilly and Darbon, 1995). Los resultados de infecciones experimentales realizadas por vía aerógena y digestiva, junto con la distribución de lesiones halladas en los bovinos naturalmente infectados, demuestran que cerca del 80 a 90% se infecta por inhalación (Francis 1947, citado por Morris *et al.*, 1994).

La transmisión de organismos patógenos por vía aerógena depende no solo de la supervivencia de éste en el medio, sino de algunos factores como ser la tasa de eliminación, el tamaño de la gota de aerosol y la dosis mínima infectante (Cox 1987, citado por Gannon *et al.*; 2007). Para el caso de *M. bovis* la dosis infectante por vía respiratoria sería tan baja como un bacilo para producir una lesión en comparación con los millones que requiere la vía digestiva (Chaussé 1913, citado por Morris *et al.*, 1994 y Phillips *et al.*, 2003). Esta observación fue comprobada muchos años después, donde se demostró que una dosis tan pequeña como 1 unidad formadora de colonias (UFC) puede establecer la patología tuberculosa por esta vía en bovinos, con igual desarrollo de patología y respuesta inmunitaria que dosis 1.000 veces mayores (Dean *et al.*; 2005). Dosis tan bajas de bacterias pueden ser vehiculizadas en aerosoles expulsados por las vías respiratorias. En la transmisión de *M. tuberculosis* en humanos se demostró que durante el habla o en la tos se producen residuos de gotas de $<5 \mu\text{m}$. Este tamaño de partículas permite contener a las bacterias que al ser inhaladas pueden llegar a los bronquiolos terminales y alvéolos pulmonares. Las gotas $> 5 \mu\text{m}$ son removidas por el árbol respiratorio superior (Palmer and Waters 2006).

El 94 % de los bacilos pueden sobrevivir en aerosoles durante los primeros 10 minutos de exposición al aire, pudiendo algunos permanecer viables hasta 12 horas en estas condiciones (Gannon *et al.*, 2007).

La detección de bovinos que eliminan *M. bovis* por vía respiratoria es más difícil que en los humanos, donde la muestra de esputo es rutinaria en los casos sospechosos de TB. En bovinos positivos a tuberculina se lograron aislamientos del orden del 9% mediante hisopados nasales (Kantor *et al.*, 1978) y del 19% sobre secreciones traqueales (McIlroy *et al.*, 1986). Los mayores datos de excreción de esta bacteria por bovinos, se realizaron a través de estudios experimentales consistentes en la inoculación nasal y el seguimiento posterior de su presencia en secreciones de vías respiratorias. Luego de la inoculación ocurre un período de latencia, el cual es más prolongado en los animales donde se aplicaron las dosis menores de infección, pudiendo variar de esta manera el aislamiento en mucus nasal entre los 11 días (10^6 UFC) y los 18 días (10^4 UFC) (Neill *et al.*, 1988). Este período de latencia estaría influenciado por factores como el tipo de cepa de *M. bovis* y la velocidad de respuesta inmunológica por parte del hospedador. Una vez comenzada la excreción, ésta permanece varias semanas, para luego decaer y hacerse intermitente. El comportamiento de los animales infectados naturalmente se asemejaría a las infecciones provocadas con una baja dosis de bacilos, donde luego de 7 a 8 semanas decae la eliminación, siendo difícil su aislamiento o estando ausente del moco nasal. Esta intermitencia permite que algunos animales eliminen por aerosoles *M. bovis* hasta las 34-38 semanas post infección (Neill *et al.*, 1988) La excreción de bacilos en las infecciones naturales comienza a partir de los 87 días pos-infección, incluso en bovinos negativos al test de tuberculina (Neill *et al.*, 1992).

Estas observaciones hacen más consistentes la hipótesis que ciertos individuos tuberculosos actúan como efectivos diseminadores y que esta acción sea probablemente

intermitente (Langmuir 1961, citado por Morris *et al.*, 1994). Los factores fisiológicos y ambientales de diverso tipo pueden actuar como factores precipitantes de los períodos de excreción de *M. bovis*.

5-2-1-2 Vía Digestiva

Esta es la segunda vía de importancia en los bovinos. Si bien los animales infectados pueden contaminar las pasturas por la eliminación de *M. bovis* en materia fecal (MF), se requerirían grandes dosis de estos bacilos para lograr establecer infección por esta vía. Ejemplo de ello consisten las inoculaciones experimentales realizadas, donde 3 de 4 terneros se lograron infectar con una dosis de $4,3 \times 10^6$ UFC y 1 solo de 4 con una dosis de 5×10^3 UFC, siendo esta última dosis casi 5.000 veces mayor que la dosis requerida para infectar un bovino por vía aerógena (Palmer *et al.*, 2004). Por eso la transmisión de la tuberculosis entre bovinos a través de pasturas contaminadas sería un evento poco común, donde la supervivencia del bacilo esta directamente condicionada en el medio ambiente por el clima.

La proporción de bovinos altamente infectados por *M. bovis*, que eliminan bacilos por MF es del 10%, pero puede llegar hasta el 80% (Reuss, 1955 citado por Phillips *et al.*, 2003). Trabajos experimentales más recientes evaluaron la eliminación de bacilos por MF en bovinos infectados, donde sobre 10 terneros infectados por vía respiratoria, se logró aislar *M. bovis* en las MF de 9 de ellos. Sin embargo esta eliminación fue de forma irregular y los aislamientos no se realizaron sobre los medios de cultivos convencionales, sino por inoculación en cobayo, animal que presenta una alta susceptibilidad a *M. bovis*. El autor concluye que ninguno de los animales presentaba lesiones en intestino y que las bacterias provendrían de la ingestión del moco de las vías respiratorias, donde estaba presente el bacilo (Neill *et al.*, 1988).

En general el rol de la contaminación del medio ambiente como fuente de infección para los bovinos es de poca significancia en relación con la transmisión directa de bovino a bovino (Morris *et al.*, 1994).

Esta vía digestiva adquiere relevancia en la infección de terneros por el consumo de leche provenientes de vacas tuberculosas. Uno al dos por ciento de las vacas tuberculosas presenta lesiones en glándula mamaria proveniente de la diseminación hematogena (Morris *et al.*, 1994; Collins & Grange, 1983, citados por, Hardie and Watson, 1992). La excreción de *M. bovis* por leche en vacas afectadas también sería muy baja y del orden del 1-2% (Flamand, *et al.*, 1994). Sin embargo suministro de leche cruda proveniente de vacas tuberculino positivas a terneros bajo sistemas de crianzas intensivos, ha producido brotes cuando estos animales llegaron a los 8-9 meses de edad. Los animales afectados presentaron lesiones en pulmón, ganglios linfáticos mesentéricos, hígado y SNC (Bernardelli *et al.*, 1994). En rodeos lecheros donde se pretende controlar la infección, el suministro de sustitutos lácteos o el tratamiento térmico de la leche son medidas apropiadas para cortar esta ruta de transmisión (Bernardelli *et al.*, 1994).

5-2-1-3 Otras vías de transmisión

La vía congénita puede ocurrir en el 12 al 50% de los terneros nacidos de vacas con metritis tuberculosa, pudiendo ser ésta la causa de la presentación de lesiones en el sistema nervioso central (Francis 1947, citado por O' Reilly and Darbon, 1995). Otros autores citan que el 1% de los terneros nacidos de vacas tuberculosas están congénitamente infectados, presentando lesiones en el hígado, en el pulmón y varios nódulos linfáticos de la carcasa (Tweddle *et al.*, 1994).

La transmisión genital puede ocurrir si los órganos reproductivos se encuentran afectados, pero es extremadamente rara (Neill *et al.*, 1994). La posibilidad de que la transmisión de TB ocurra por medio de vectores como artrópodos (garrapatas), fue revisada por Phillips y col. (2003) quienes citan publicaciones de varias décadas atrás que describen la posibilidad de esta vía. Sin embargo no parece ser esta una forma de transmisión importante.

5-3-1 Desarrollo de lesiones

Las micobacterias patógenas producen una lesión granulomatosa en los tejidos tanto de humanos, como en los de una larga lista de animales domésticos y silvestres (Thoen and Williams 1994, citado por Thoen and Barletta 2.004).

Cuando un bovino es expuesto a *M. bovis* varios factores ejercen una influencia significativa sobre los eventos subsiguientes. Algunos de estos factores son inherentes al bacilo, otros al huésped y otros al medio ambiente (Pollock and Neill 2002).

Luego de la inhalación de pequeñas gotas de aerosoles conteniendo algunos pocos bacilos, estos llegan a los bronquiolos terminales y alvéolos donde son fagocitados por los macrófagos alveolares. La mayoría de los bacilos pueden ser destruidos en el interior de estas células. Ello ocurre cuando las estructuras donde se encuentran los bacilos denominadas fagosomas, se fusionan con los lisosomas que contienen un batería de enzimas que le permiten reducir los elementos extraños a fracciones simples. Estas partes de la bacteria son moléculas que van a ser reconocidas como antígenos y van a ser presentadas a otras células del sistema inmunológico para montar la respuesta inmunitaria. No obstante al ser *M. bovis* un patógeno intracelular, puede eludir este mecanismo de defensa, dando como resultado la multiplicación de los bacilos en el interior del macrófago y liberándose cuando éste muere. Nuevos macrófagos

inactivados concurren desde el torrente sanguíneo e ingieren estos bacilos liberados, los cuales se multiplican en forma simbiótica en el macrófago no inactivado. Eventualmente, el bacilo puede lisar el macrófago y diseminarse por el tejido circundante. En individuos resistentes, las fracciones antigénicas de la bacteria estimulan fuertemente la inmunidad mediada por células (IMC) a través de la activación de linfocitos Th1. Estas células producen interleuquinas como INF- γ , IL 2 y IL12. Estos mediadores activan a los macrófagos haciéndolos más competentes en la destrucción de los bacilos. Además favorecen la atracción, inmovilización y activación de más células mononucleares provenientes del torrente sanguíneo al área donde existen restos de bacterias y detritus celulares. Esta respuesta de hipersensibilidad celular contribuye a la muerte de células y la destrucción de tejido (necrosis caseosa) (SENASA, 1993).

En individuos cuya IMC es débil, los bacilos continúan multiplicándose y hacen arribar más macrófagos a la zona para fagocitarlos, mientras que las células Th1 se acumulan también en el área. Al no estar los macrófagos adecuadamente activados los bacilos continúan parasitándolos y estimulan un mayor reclutamiento de éstos. Linfocitos T con capacidad citotóxica producen sustancias que al ser liberadas al medio producen mayores daños en los tejidos del hospedador. De esta manera el área de lesión continúa agrandándose formando un centro caseoso. Los macrófagos conteniendo bacilos pueden migrar a nódulos linfáticos que drenan la zona, estableciendo otro sitio de infección, formando lo que se denomina complejo primario. Las lesiones son localizables en los ganglios y se caracterizan por aumentar su tamaño, ser muy firmes y estar rodeados por tejido conectivo fibroso. La formación de estos granulomas es un intento de parte del huésped de localizar la infección y lograr a través de los mecanismos inflamatorios e inmunitarios la destrucción de los bacilos (Thoen y Chiodini, 1993).

La apariencia microscópica del granuloma consta de un centro necrótico caseoso, rodeado por células epitelioides, linfocitos y macrófagos. La mineralización puede estar presente en el centro necrótico a medida que la lesión avanza. La zona cercana a la necrosis suele contener células gigantes multinucleadas, con nucleolos dispuestos en herradura o en forma de anillo cercano al borde citoplasmático (Thoen y Chiodini, 1993).

La diseminación del bacilo en un mismo órgano puede ocurrir a través de la difusión intracanalicular y no por la vía linfohematógena, produciéndose lesiones caseosas sin compromiso de ganglios linfáticos que drenan la zona (Rey Moreno 2000).

5 -4 Métodos de Diagnóstico

5-4 -1 Prueba de tuberculina (PT)

Esta prueba diagnóstica es reconocida internacionalmente para el comercio de bovinos por la Oficina Internacional de Epizootias (OIE, 2004). La técnica se basa en provocar una reacción de hipersensibilidad retardada (HSR) luego de la inyección intradérmica de tuberculina o PPD (Derivado Proteico Purificado), obtenido a partir de la cepa de referencia *M. bovis* AN5. Esta sustancia es una compleja mezcla de proteínas, lípidos, azúcares, ácidos nucleicos y una gran variedad de antígenos, muchos de los cuales son comunes a varias especies de micobacterias (Monaghan *et al.*, 1994).

Cuando la PPD es inyectada en un animal, sensibilizado por la infección del *M. bovis* o por la exposición a antígenos de reacción cruzada, desencadena una respuesta de tipo HSR en el sitio de inyección, Esta se caracteriza por eritema e hinchazón cuya mayor intensidad se presenta a las 48-72 horas pos-inyección decreciendo posteriormente. La inflamación desarrollada en el punto de inoculación, se caracteriza histológicamente por ser un infiltrado de células mononucleares (macrófagos y linfocitos) (Doherty *et al.*,

1996). Los animales no sensibilizados a la tuberculina no presentan respuesta inflamatoria local (De la Rúa-Domenech *et al.*, 2006).

Esta prueba diagnóstica puede realizarse en la piel de la base de la cola (tuberculina ano-caudal) o en el tercio medio del cuello (tuberculina cervical simple y cervical comparativa). En todos los casos se requiere la medición previa con calibres del grosor de la piel en el sitio de aplicación en forma previa y posterior a la aplicación del antígeno.

5-4-1-1 Tuberculina Ano-caudal (TAC) y Tuberculina Cervical Simple (TCS)

La primera de estas consiste en la aplicación intradérmica de una dosis de 0,1 ml de PPD bovina en la parte media del pliegue ano-caudal interno, mientras que la segunda la inoculación se realiza en la piel del tercio medio del cuello del animal. La lectura se realiza palpando y midiendo el sitio de inoculación a las 72 hs. (\pm 4-6 hs.) post-inyección.

En Argentina, el Servicio Nacional de Sanidad Animal (SENASA) establece a la TAC como oficial para el control y erradicación de la TBb de los rodeos bovinos (SENASA, 2012). En rodeos sin conocimiento del estatus sanitario se establece las siguientes pautas para la lectura de la prueba:

Positivo: engrosamiento de la piel de 5 mm. o más

Sospechoso: engrosamiento de 3 o menos de 5 mm.

Negativo: engrosamiento menor a 3 mm.

En los rodeos con reaccionantes positivos en anteriores pruebas tuberculínicas o con observación de lesiones tuberculosas en necropsia, se deberá repetir la TAC en todos los animales del rodeo mayores a 3 meses. En este caso se consideran positivos las lecturas

de los engrosamientos del pliegue ano-caudal por encima de los 3 mm. Los animales considerados positivos tienen como único destino el envío a faena.

Actualmente en Argentina para que un rodeo pueda ser considerado libre de la enfermedad, la totalidad de los animales mayores de 6 meses deberán resultar negativos a dos pruebas de TAC consecutivas, con un intervalo de 60-90 días (SENASA, 2012).

5-4-1-2 Tuberculina Cervical Comparativa (TCC)

Esta prueba consiste en la inoculación simultánea de PPD bovina y PPD aviar (obtenida de *M. avium subsp*) en el cuello del bovino, separando los puntos de inoculación de cada tuberculina por 12 cm. La lectura también se realiza a las 72 hs. Al establecer la diferencia de espesor de la piel antes y después de las inoculaciones se determina la respuesta a cada PPD. Se considera positiva a *M. bovis* cuando la diferencia del grosor de la piel registrando en el sitio de inoculación de la PPD bovina es mayor a 4 mm respecto de la medida en el sitio de la PPD aviar. Las reacciones mayores de 2 mm, pero inferiores a 4 mm consideran al animal como sospecho.

Esta prueba se utiliza para discriminar animales infectados por *M. bovis*, de aquellos expuestos a organismos del complejo *Mycobacterium avium* o a micobacterias ambientales no patógenas (Monaghan *et al.*, 1994; Pollock *et al.*, 2003).

5-4-1-3 Sensibilidad y Especificidad de las PT

La sensibilidad (SE) de una técnica diagnóstica, es la habilidad de la prueba en detectar un animal enfermo en una población enferma. La especificidad (ES), es la habilidad de detectar un animal sano en una población sana (Tarabla, 2000).

El desarrollo de la HSR post-infección por *M. bovis*, conlleva un período de tiempo en el cual la técnica no detecta al animal como infectado. Un estudio realizado con

infecciones experimentales, indica a partir de la 3 semanas post-inoculación los animales comienzan a resultar positivos a la PT (Thom *et al.*, 2006). Otra experiencia estima que para la mayoría de los bovinos este período ocurre entre las 3 y 6 semanas pos-infección (Morrison *et al.*, 2000, citado por De la Rúa-Domenech, *et al.*, 2006).

Una revisión de la SE para la TAC realizada por De la Rúa-Domenech y col (2006) determinó que los valores variaron entre el 63 y 100%, con una media de 84%. En Argentina un único trabajo determinó sensibilidad para la TAC y para la TCS, siendo los valores de 79,2% y 85% respectivamente (Kantor *et al.*, 1984)

Los animales verdaderamente enfermos no detectados como positivos por la prueba, se los considera como falsos negativos. Causas inherentes al hospedador, a la PPD y factores relacionados al método de administración de la prueba, suelen ser los responsables de estos falsos negativos (Monaghan *et al.*, 1994; Thom *et al.*, 2006).

Respecto a la ES de la prueba, De la Rúa-Domenech y col.(2006) cita valores del 75% al 99% con una media del 96,8%. Si bien estos valores se acercan bastante al ideal del 100%, factores diversos hacen que algunos animales reaccionen, resultando ser falsos positivos. Las causas de que ello ocurra puede ser la exposición a bacterias del MAC, a micobacterias ambientales y atípicas, otras bacterias como *Nocardia spp*, infección por *M. tuberculosis* (bacilo humano de la TB) y por utilización de vacuna contra enfermedad de Johne's o en casos experimentales con BCG (Monaghan *et al.*, 1994; De la Rúa-Domenech, *et al.*2006).

La prueba cervical comparativa presenta valores medios de SE del 80 al 93,5% y una ES del 99.5% (De la Rúa-Domenech *et al.*2006).

5-4-2 Test de Gamma Interferón (γ -IFN)

El γ -IFN es una citoquina (mensajero inmunológico) producida por los linfocitos T luego de su estimulación antigénica. La prueba fue desarrollada y oficialmente acreditada en 1991 en Australia, para ser utilizada en paralelo con la TAC (Wood and Jones, 2001). La técnica tiene dos etapas, la primera de ellas consiste en obtener sangre heparinizada de los bovinos y llevarla al laboratorio en forma inmediata. Allí alícuotas de esta sangre es puesta en contacto con PPD bovina, PPD aviar y un control negativo durante 24 hs. La segunda etapa comienza cuando se recoge el plasma sobrenadante para evaluar la presencia de γ -IFN, a través de una técnica de ELISA. El resultado se interpreta como positivo cuando los linfocitos de un bovino infectado, producen más γ -IFN luego de la estimulación con PPD bovina que con la PPD aviar.

Esta prueba fue evaluada en varios países estableciéndose una media de 87,6% para la SE y de 96,6% para la ES (De la Rúa-Domenech *et al.*, 2006).

La prueba reconoce más tempranamente a un animal infectado que la PT, no altera la respuesta inmune del animal, requiere solo un encierro del rodeo, reduce los errores de trabajo a campo que existen con la PT y aumenta la objetividad de los resultados al ser obtenidos en laboratorio y bajo normas estandarizadas (De la Rúa-Domenech, *et al.*, 2006).

Una variante de esta prueba es el reemplazo de la PPD bovina y aviar por antígenos específicos del complejo *M. tuberculosis*, a fin de aumentar sus especificidad o poder diferenciar animales infectados con *M. bovis* de aquellos vacunados con BCG Pollock (2000), Vordermeier (2001) y Buddle (2001 y 2003), citados por Buddle *et al.*, 2009)

El uso de un pool de los péptidos compuestos por las proteínas ESAT-6 y CFP10 derivadas de *M. bovis*, disminuyó los falsos positivos del 26% al 7% en una población de 72 individuos sobre la técnica estandarte (Buddle et al, 2003).

5-4-3 Pruebas Serológicas

La infección por *M. bovis* generalmente produce respuesta de anticuerpos en los estados finales de la enfermedad, estando la primer parte del proceso dominado por la respuesta mediada por células. Cuando ésta disminuye da lugar a estados de anergia, donde solo persiste la respuesta de anticuerpos (Ritaco *et al.*, 1991; Pollock and Neill 2002). Se han realizado numerosos intentos para desarrollar pruebas serológicas a fin determinar la infección por *M. bovis* en bovinos, pero la SE de las mismas resultaron bajas (De la Rúa-Domenech *et al.*, 2006).

Pruebas serológicas basadas en detectar anticuerpos contra antígenos específicos como ESAT-6, los cuales se producen en los estados iniciales de la infección, han mejorado la sensibilidad del test serológico (Lyashchenko *et al.*, 2004). Un trabajo recientemente publicado, ha desarrollado una prueba serológica de tipo “multiplex chemiluminescent” que es capaz de reconocer anticuerpos en sueros de bovinos como respuesta a 25 antígenos de micobacterias con SE del 93,1% y una ES del 98,4%. (Whelan *et al.*, 2008).

5-4-4 Prueba de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) y Tipificación por Técnicas Moleculares

La PCR se presenta con un amplio potencial para determinar la presencia de microorganismos en un abanico de muestras como tejidos de animales, mucus nasal, leche, sangre, materia fecal y forrajes. La capacidad de poder amplificar fragmentos específicos del ADN bacteriano sobre estos materiales le otorgan ventajas desde el punto de vista de la sensibilidad, rapidez y flexibilidad, por no requerir la viabilidad de los microorganismos. Sin embargo esta técnica no supera al cultivo en medios bacteriológicos en términos de sensibilidad, especificidad y confiabilidad (De la Rúa-

Domenech *et al.*, 2006). Sus limitaciones son la frecuente baja cantidad de bacilos en las muestras, la eliminación intermitente de los mismos, la ineficiencia en la extracción del ADN o la presencia de inhibidores de PCR en la muestra. Sin embargo la PCR y sus métodos complementarios, brindan un valioso aporte en la identificación de las diferentes especies de micobacterias y entre sus cepas. Las micobacterias al igual que otras bacterias, contienen secuencias repetidas de ADN en su cromosoma. Estas secuencias de inserción son únicas de especie, otras lo son para el tipo dentro de la especie y algunas para determinadas cepas. La secuencia de inserción más utilizada en la detección de las micobacterias del Complejo *Mycobacterium tuberculosis*, en muestras biológicas o en cultivos son las fracciones IS6110 e IS1081. El número de copias de este fragmento del ADN bacteriano varía según las especies. En *M. tuberculosis* existen múltiples copias del primero, pero en el *M. bovis* solo se encuentran algunas pocas o tan solo una de ellas (Butcher *et al.*, 1996). En la mayoría de los aislamientos de *M. bovis* realizados en Argentina, IS6110 se encuentra como copia única mientras que IS1081 en múltiples copias. Sin embargo se obtiene mayor sensibilidad y reproductividad en las pruebas de PCR con la secuencia IS6110 (Jorge *et al.*, 2005; Zumarraga *et al.*, 2005).

Entre las distintas técnicas de tipificación molecular basadas en PCR se encuentra el Spoligotyping (Tipo con Oligonucleótidos Espaciadores). Se caracteriza por permitir la diferenciación intra e inter especie de las micobacterias que integran el Complejo *M. tuberculosis* (Kamerbeek, *et al.*, 1997). Esta técnica de hibridación reversa permite detectar el polimorfismo de la región de Repeticiones Directas (DR) del complejo *M. tuberculosis* (Kamerbeek, *et al.*, 1997). Esta se constituye de múltiples secuencias repetitivas directas de 36 pares de bases (pb), intercaladas por secuencias polimórficas denominadas “espaciadores” cuya longitud varía entre 35 y 41 pb. Por lo general los

espaciadores se encuentran una sola vez en el genoma de la micobacteria, aunque si se repiten pueden estar en forma consecutiva (Caimi *et al.*, 2001), o separados por uno o varios DR y espaciadores (Kamerbeek, *et al.*, 1997). Si bien fueron detectados 94 espaciadores diferentes, los oligonucleótidos espaciadores utilizados ordinariamente en la técnica son 43 (Kamerbeek, *et al.*, 1997). El elemento de inserción IS6110 se localiza entre los espaciadores 25 y 26 (Kamerbeek *et al.*, 1997). 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 representan a una región más conservada del genoma. El polimorfismo de la región DR, se debe principalmente a deleciones por recombinaciones homólogas entre DR adyacentes o distantes, duplicaciones de unidades DR durante la replicación del ADN y transposiciones de la secuencia de inserción IS6110 (Groenen *et al.*, 1993 ; van der Zanden *et al.*, 2002; Warren *et al.*, 2002).

El Spoligotyping permite la adecuada identificación y diferenciación de las micobacterias que integran el CMT (Erler, *et al.*, 2004). *M. bovis*, se caracteriza por la ausencia de los espaciadores 3, 9, 16 y 39-43 (Caimi, *et al.*, 2001; Zumárraga, *et al.*, 1999). En Argentina la aplicación de esta técnica sobre aislamientos de *M. bovis* obtenidos principalmente en bovinos, permitió relacionar la transmisión activa de la enfermedad en grandes agrupamientos (Zumárraga, *et al.*, 1999).

Para la detección de transmisión reciente y detección de clones deben utilizarse complementariamente otros marcadores moleculares más discriminativos como las Repeticiones en Tándem en Número Variable (VNTRs) (Supply *et al.*, 2000).

Por otra parte, los métodos tradicionales de tipificación molecular como el Polimorfismo en Tamaño de los Fragmentos de Restricción (RFLP) fueron siendo desplazados por aquellos basados en PCR, debido a las ventajas que éstos presentan.

5-4-5 Otros Métodos de diagnóstico

La técnica de luz polarizada (FPA) fue utilizada para reconocer la presencia de anticuerpos derivados de la infección tuberculosa en sueros bovinos. Estos anticuerpos están dirigidos contra el antígeno MPB70, que se encuentra expresado tanto en *M. bovis* BCG como cepas virulentas de *M. bovis* (Harboe and Nagai, 1984). Una evaluación de este método realizada en Canadá arrojó valores de 92.9% de sensibilidad y de 98,3% de especificidad (Surujballi *et al.*; 2002). Sin embargo cuando esta técnica se utilizó en un trabajo de campo su comportamiento no fue superior a la técnica de tuberculina (Ngandolo *et al.*;2009)

Otro método que ha mostrado resultados promisorios para el diagnóstico, es el uso de la denominado “nariz electrónica”, basado en el reconocimiento de compuestos orgánicos volátiles (Fend *et al.*, 2005; Fend *et al.*, 2006). Sin embargo deberán realizarse numerosos estudios para validar esta nueva técnica.

5-5-Implicancia de la fauna silvestre como fuente de infección del *M. bovis*

La infección por *M. bovis* fue detectada en animales silvestres en un amplio rango de animales silvestres (Morris *et al.*, 1994; O`Reilly and Darbon, 1995, de Lisle *et al.*, 2002) de regiones como América del Norte, Europa, África y Nueva Zelanda, afectando distintas especies y con manifestaciones diferentes (Corner, 2006). La enfermedad produce no solo un impacto sobre la fauna, sino que es un grave perjuicio económico por lo que significa la presencia de un reservorio para los animales domésticos que pueden entrar en contacto.

Las especies silvestres afectadas por *M. bovis*, pueden clasificarse de acuerdo a la dinámica de la infección en hospedadores de mantenimiento o reservorios (“*maintenance hosts*”) y en hospedadores finales (“*spillover hosts*”) (Morris *et al.*, 1994; de Lisle *et al.*, 2002).

El primer tipo mantiene por si solo la infección dentro de la especie y es fuente de infección para otras. En el segundo la infección no persiste dentro de la especie, necesitando del contagio por parte de otra especie para reinfectarse. Sin embargo este hospedador puede transmitir la infección a otras especies de animales. Para determinar si el control de una especie es necesario y predecir la probabilidad de la infección en otras especies, es importante reconocer el tipo de hospedador. Debe considerarse que los patrones epidemiológicos cambian, siendo dinámica la relación entre hospedador de mantenimiento y hospedador diseminador (Delahay *et al.*, 2002).

5-5-1 Factores que afectan la transmisión

Los factores inherentes al animal y a la población influyen la transmisión dentro y entre poblaciones de animales

Factores relevantes al animal: vías de ingreso, localización de lesiones, vías y niveles de excreción, vía de ingreso más importante para las especies domésticas en riesgo y dosis mínima infectante de acuerdo a la vía de ingreso.

Factores relevantes a la población: el riesgo de transmisión depende del número de animales infectados y del número de animales susceptibles en la población. Cuánto son capaces de infectar los individuos de una especie y si cumplen con las condiciones necesarias para esto (Caley and Hone, citado por Corner 2006).

Para cada vía de ingreso las situaciones pueden diferir, tornándose importante la distancia entre tiempo y espacio, entre la fuente de infección y el animal susceptible. Relacionados con el tiempo y espacio, esta la duración de la interacción entre infectado y huésped susceptible, el efecto del tiempo sobre la viabilidad del bacilo excretado y la supervivencia de este en el medio ambiente. Para una efectiva transmisión el *M. bovis* debe sobrevivir en el medio y en una cantidad suficiente de manera de poder infectar al

huésped, esta supervivencia de los bacilos fuera del animal es importante en la duración del riesgo.

La alteración del medio ambiente y el manejo poblacional de la fauna, pueden producir alteraciones que lleven a introducir la enfermedad o exacerbar su presencia en los animales silvestres. Estos cambios tienden a incrementar la interacción entre los animales silvestres y los animales domésticos, facilitando la transmisión (Corner, 2006).

5-5-2 Especies de animales silvestres infectados por *M. bovis* e involucrados en la transmisión a los bovinos.

5-5-2-1 Tejón – “European badger” (*Meles meles*).

Este mamífero de la familia Mustelidae se halla distribuido en gran parte de Europa. Tienen una cabeza pequeña, ojos pequeños, cuello corto y grueso, cuerpo en forma de cuña que termina en una cola corta. Su talla media en los adultos de cabeza a cola es de unos 75 cm y una cola de unos 15 cm. Su pelaje consta de pelos blancos y negros dando una apariencia de gris a la distancia. En el pecho y garras delanteras su pelaje es negro y su cabeza tiene prominentes rayas de pelo blanco y negro. El peso promedio varía de acuerdo a la época del año entre los 8 y 12 kg, lo cual hace del tejón un animal fornido para su tamaño, dotado además de poderosas garras adaptadas a escarbar la tierra. Se considera que poseen una expectativa de vida máxima de 14 años, aunque muy pocos ejemplares la alcanzan. Su fuente de alimento son las lombrices de tierra, pero puede consumir una vasta variedad de alimentos como insectos, pequeños mamíferos, frutos, pájaros y cereales. Se reproduce en verano y la gestación dura entre 7-8 semanas, naciendo las crías de enero a marzo en camadas de 2-5 crías. Los cachorros no son totalmente independientes hasta cerca de las 15 semanas de vida. Sus hábitos son nocturnos y conforma grupos sociales que cohabitan en cuevas realizadas en el suelo.

Estas cuevas poseen una red de túneles que le sirven de refugio, lugar de cría y reproducción. El tamaño de los grupos o colonias de tejones, varía entre los de dos a 23 individuos adultos, pero el número usual es seis. Estos grupos de tejones son territoriales, variando la superficie de su área de dominio entre 30 y 150 ha. Estos territorios lo delimitan realizando sus deposiciones en sitios puntuales considerados como “letrinas” que sirven de demarcación para otros grupos de tejones (The Mammals Society, 2011, Badger at Animal Corner 2011 y Badger Trust 2011).

El primer aislamiento de *M. bovis* en tejones fue realizado en Suiza (Bouvier, 1963 citado por Gallagher and Clifton-Hadley 2000). Posteriormente aislamientos se realizaron en Inglaterra e Irlanda (Muirhed *et al.*, 1974 y Noonan *et al.*, 1975, citados por Gallagher and Clifton-Hadley, 2000). La realización de estudios con necropsias de tejones donde se observaban lesiones y en algunos casos manifestaciones de enfermedad (Barrow and Gallagher, 1981; Clifton-Hadley, *et al.* 1993) dio lugar a que este animal fuera considerado como fuente de infección para los bovinos en Irlanda y el Reino Unido. Esto produjo que durante la mitad de la década del 70 y mediados del los 90, se ejecuten matanzas para disminuir la presencia de tejones en áreas rurales. La disminución de la población de tejones fue efectiva para el control de la TB en los bovinos (Ó Mártín *et al.*, 1998; Griffin *et al.*, 2005). Sin embargo a pesar de estas intervenciones la incidencia de TB en algunos rodeos bovinos continuó elevada. Esto originó la necesidad de revisar las acciones llevadas a cabo para controlar la enfermedad. A fin de revisar los antecedentes de la TB en tejones, el gobierno del Reino Unido solicitó un informe a un comité de expertos independientes (Krebs Report 1997). Algunas de las conclusiones más importantes obtenidas por este grupo fue que si bien el tejón es una fuente importante de infección para los bovinos, se debían rever las acciones de exterminio, aconsejando la realización de estudios más complejos para

cuantificar el verdadero peso de la infección en los tejones y como fuente de infección para los bovinos en ese país (Krebs Report 1997). A consecuencia de ello se conformó un grupo de trabajo (Independent Scientific Group on Cattle TB) cuyas conclusiones más importantes fueron: que los tejones eran una clara fuente de infección para los bovinos y que la matanza selectiva de estos animales silvestres facilitaba el control de la TB. No obstante en los lugares donde se llevaron a cabo estas acciones se observó que algunos individuos migraban del área de exterminio hacia áreas periféricas produciendo la diseminación de la enfermedad a nuevas poblaciones de tejones (Defra 2007). Otra de las conclusiones fue que los bovinos, aún bajo regímenes de control, son una fuente importante de infección, persistencia y diseminación de la enfermedad (Defra 2007).

La TB en el tejón es primariamente una enfermedad respiratoria ya que entre el 50 y el 60 % de los animales con lesiones visibles (LV) muestran lesiones en pulmones y nódulos linfáticos torácicos y un 15 % presenta lesiones en la cabeza solamente (Jenkins *et al.*, 2008, Gallagher and Clifton-Hadley, 2000). La principal vía de contagio es la inhalación de aerosoles que contienen el *M. bovis* (Corner *et al.*, 2011). Una vez establecida la bacteria en el pulmón se extiende a los nódulos linfáticos bronquiales y mediastínicos y luego por sangre puede diseminarse a otros nódulos linfáticos y órganos internos (Gallagher and Clifton-Hadley, 2000).

Otras vías de ingreso son las heridas provocadas por mordidas entre tejones donde la infección ingresa por la saliva contaminada, el tracto digestivo a través de la ingestión de alimentos contaminados por heces, orina, esputo o exudados de mordidas que contengan el bacilo y finalmente las vías aéreas superiores a través de aerosoles de gran tamaño (Corner *et al.*, 2011). Además de la cavidad torácica los sitios más frecuentes de localización de lesiones son el hígado, el bazo y especialmente los riñones, los cuales aparentemente son afectados en forma secundaria por vía hematogena proveniente de

las lesiones ubicadas en pulmones o de las heridas ocasionadas por mordidas (Clifton-Hadley, *et al.* 1993).

Las características de las lesiones pulmonares varían en un rango de uno o más tubérculos de 1-2 mm de diámetro a patologías más severas como la diseminación miliar que afecta a los lóbulos con caseificación y consolidación (Corner *et al.*, 2011). Los nódulos linfáticos del aparato respiratorio afectados se encuentran agrandados y edematosos, pudiendo presentar lesiones tuberculosas de distinto tamaño y de color amarillo pálido, áreas blancas de caseificación, siendo infrecuente la mineralización (Nolan and Wilesmith, 1994). Iguales características presentan las lesiones de cabeza y los demás nódulos del cuerpo. Las lesiones en hígado y bazo presentan la apariencia de aserrín y las lesiones en el riñón adquieren una disposición radial y alargada (Gallagher and Clifton-Hadley, 2000).

Las lesiones por mordidas pueden comprender granulomas subcutáneos cerrados, abscesos que drenan a través de una pequeña herida, o amplias úlceras abiertas sin pelo de varios cm de diámetro, que producen descargas de exudados (Corner, *et al.* 2011). Los sitios anatómicos con mayor presencia de estas lesiones son la grupa, cabeza y en menor proporción el torso. La presencia de lesiones en otros tejidos de la cabeza y periferia puede ocurrir por la diseminación a partir de las lesiones de piel a estos sitios y por los nódulos linfáticos que drenan la zona (Jenkins, *et al.* 2008).

La lesión histopatológica en el tejón se caracteriza por presentar en su inicio una pequeña trama de células epiteliodes rodeadas por fibroblastos. A medida que aumenta su tamaño aparece un centro necrótico, donde pueden observarse los bacilos en el citoplasma de los macrófagos, ubicados estos muy cerca del centro necrótico. Al aumentar la severidad de la lesión, se incrementa el tamaño del granuloma, en cuyo centro se reúnen más células epiteliodes, rodeadas por linfocitos con una infiltración

variable de neutrófilos y macrófagos, todo esto rodeado por una fina capa de fibroblastos. La mineralización de las zonas de necrosis es infrecuente. Estas lesiones se diferencian de las que presentan otras especies de animales, donde grandes áreas de caseificación son observadas, hay presencia de encapsulamiento, cavitación, organización en capas del granuloma y presencia de células Langhans (Corner, *et al.* 2011).

La distribución de lesiones indica que el *M. bovis* puede ser excretado a través del aparato respiratorio, digestivo, urinario y por exudados de lesiones localizadas en piel (Gavier-Widen *et al.*, 2001). Los niveles de excreción del bacilo dependen del sitio de localización de las lesiones y la severidad de las mismas. Solo se ha reportado la eliminación de *M. bovis* en estados avanzados de la enfermedad en estos animales, Gallaher (1998) citado por Corner *et al.*, 2011, reportó 10^5 - 10^6 UFC/ml en exudados bronquiales, 10^2 - 10^5 UFC/ml de orina y 10^2 - 10^5 UFC/g de materia fecal (MF). El mismo autor encontró excreción fecal en el 65% de los tejonos que presentaban lesiones visibles en pulmón y estos animales no presentaron lesiones en el tracto digestivo, de manera que los bacilos encontrados en MF debían provenir del tracto respiratorio.

Los estudios sobre la ocurrencia de la enfermedad en tejonos fueron realizados en el Reino Unido e Irlanda, evidenciaron índices de prevalencia fluctuantes entre el 2% al 15% de acuerdo a las series de años en que se realizaron (Morris *et al.*, 1994). Fue recién en los últimos años donde a consecuencia de las recomendaciones del comité de expertos (Krebs Report, 1997) se realizaron en el Reino Unido trabajos que abarcaron extensas zonas con alta prevalencia de infección, con muestreos seriales anuales y con la misma metodología de trabajo respecto a captura, necropsia, acondicionamiento y procesado de muestras. En un estudio desarrollado entre los años 1998 y 2005, se procesaron 6.432 tejonos adultos, de los cuales 1.020 (15,9 %) mostraron infección por

M. bovis a través del aislamiento bacteriológico o por la observación de lesiones histopatológicas. De este total de animales infectados se observó LV de tuberculosis en 393 (38%), representando este porcentaje solo el 6,1% del total de tejonos adultos muestreados. La cantidad de tejonos juveniles que resultaron infectados fue de 146 (9%) sobre 1.620 analizados, pero la proporción de cachorros con LV fue del 55,5%, notoriamente superior a la de los adultos, involucrando mayoritariamente el tracto respiratorio y en menor proporción los órganos abdominales y heridas por mordidas (Jenkins *et al.*, 2008). Generalmente los machos presentan mayor prevalencia de infección que las hembras (Corner *et al.*, 2008), pudiéndose atribuir a la diferente conducta que hay entre los sexos, donde los machos están más comprometidos en la defensa del territorio y por ello presentan conductas más agresivas (Gallagher and Clifton-Hadley, 2000).

El riesgo de transmisión de la infección en los tejonos, depende del grado de desarrollo de la enfermedad, la ruta de excreción, la vía de exposición, la cantidad de bacilos excretados y la dosis mínima infectante necesaria de acuerdo a la ruta de ingreso. Luego de establecida la infección en el animal, el riesgo de transmisión aumenta por la excreción de aerosoles. El riesgo de eliminación por otras vías aumenta a medida que la infección progresa en aquellos individuos con estados muy avanzados de enfermedad. Esta eliminación aumenta el riesgo de infectar a través de la vía digestiva. Las heridas producidas por mordidas e infectadas con *M. bovis*, contaminan la saliva en el acto de lamido y son una fuente de infección para otros individuos y para si mismo por la vía digestiva (Corner *et al.*, 2011).

Dadas las características del comportamiento de esta especie y del medio ambiente que habitan, lo expuesto anteriormente explicaría el mantenimiento de la infección, pero deja el interrogante si solo una pequeña parte de la población de tejonos que presenta

importante desarrollo de lesiones, puede transmitir la enfermedad a los bovinos. Al respecto Jenkins y col. (2008) sugiere que esta pequeña proporción de tejones severamente afectados, serían la base de la fuente de transmisión a los bovinos, pero deberían ser partícipes también una gran parte de tejones que presentan grados menores de infección para que la enfermedad se difunda a estos animales (Jenkins *et al.*, 2008).

La vía de transmisión más probable de bovinos a tejones es la vía aerógena a través de aerosoles, dado que las otras vías de excreción son muy infrecuentes en los bovinos. La transmisión de tejones a bovinos probablemente ocurra más frecuentemente a través de aerosoles, aunque también puede ocurrir por la ingestión de alimentos contaminados. Los tejones en estado terminal excretan altas cantidades de aerosoles infectantes, de manera que esta interacción posee un alto riesgo de transmisión para los bovinos (Corner, 2006).

Los animales vivos son los únicos que pueden producir estos aerosoles infectantes y para que ello ocurra tanto los tejones como los bovinos tienen que estar en estrecho contacto al momento que los aerosoles son expedidos (Corner *et al.*, 2011). La actividad de pastoreo por parte de bovinos en áreas rurales, permite la interacción entre estas especies. También se conoce que los tejones suelen invadir instalaciones destinadas al ganado bovino en busca de alimento, brindando la oportunidad de entrar en estrecho contacto con este. Esto se puede potenciar si ese contacto se produce por prolongados períodos de tiempo (Corner, 2006). Los bovinos generalmente rechazan pastorear áreas contaminadas con MF y orina de tejones hasta varios días después de su deposición. Sin embargo esta selectividad se puede perder cuando la oferta de forraje decrece (Benham and Broom 1991, citados por Gallagher and Clifton-Hadley, 2000). Los tejones con estados avanzados de la enfermedad suelen cambiar su comportamiento, comenzando a ser activos en horarios diurnos y perdiendo su miedo a los bovinos y humanos (Muirhead, 1974 citado por Corner, 2006).

Como consecuencia de la magnitud de la infección en los tejones fueron investigadas otras especies de la fauna en el Reino Unido, para conocer su estado respecto a la infección por *M. bovis*, (Delahay *et al.*, 2002; Delahay *et al.*, 2007). En estos trabajos se reconocen los aislamientos del bacilo en ciervos dama (*Dama dama*), sika (*Cervus nippon*), corzuela (*Capreolus capreolus*), muntjac (*Muntiacus reevesi*), rojo (*Cervus elaphus*), zorros (*Vulpes vulpes*), hurón (*Mustela furo*), rata (*Rattus norvegicus*), topo (*Talpa europea*), gatos domésticos (*Felis domesticus*), visón (*Mustela vison*), pequeños ratones como *Clethrionomys spp.*, *Microtus spp.*, *Apodemus spp.*, *Mus.* y musaraña (*Sorex araneus*). Excepto los ciervos, gatos y en muy baja proporción los zorros y mustelidos, no se observaron LV en el resto de las especies. El aislamiento de *M. bovis* con iguales spoligotipos en diferentes especies, demostró la transmisión entre estas pero sin poder especular en que dirección. La frecuencia de los aislamientos de estos spoligotipos se corresponde con los aislados previamente en bovinos y tejones en las zonas investigadas (Delahay *et al.*, 2007). Los ciervos del Reino Unido pueden transformarse en un riesgo de transmisión de *M. bovis* para los bovinos, dependiendo de la densidad poblacional en áreas puntuales. Si bien aún no es claro el rol de zorros y mustelidos en la transmisión, el desarrollo infrecuente de patología sugeriría que estas especies son poco probables de presentar un riesgo importante para los bovinos (Delahay, *et al.*2002).

Los tejones son los hospedadores ideales para *M. bovis*, la infección es endémica en su población, la enfermedad mata muy pocos individuos, no siendo significativa para densidad poblacional, ni para la estructura social de las comunidades. Los tejones con franca enfermedad pueden sobrevivir largos períodos de tiempo y la mayoría de los infectados permanecen clínicamente saludables mientras que una alta proporción de los infectados tiene infecciones latentes. Asimismo las hembras tuberculosas pueden

producir cachorros (Corner *et al.*, 2011). Se estima que existe aproximadamente una población de 300.000 tejones en el Reino Unido y unos 250.000 en Irlanda, pereciendo anualmente en accidentes de tránsito casi la sexta parte de ellos (Badger at Animal Corner, 2011).

5-5-2-2 Comadreja cola de cepillo – “Brush-tailed possum” - (*Trichosurus vulpecula*)

Este marsupial originario de Australia se encuentra principalmente en áreas forestadas o boscosas, plantaciones de pinos o eucaliptos, áreas semiáridas e incluso parques y jardines urbanos. Tiene un cuerpo de unos 32 a 58 cm de longitud y una cola de 24 a 35 cm de largo. La piel esta cubierta densamente de pelos cortos cuyo color varía de acuerdo al habitat. Existiendo varias subespecies predomina el color de pelo gris en casi todas, pero una *T.v. fuliginosus* tiene una coloración negra. Se destaca su larga cola que es prensil en su punta y le permite sostenerse de ramas. Esta cola se encuentra cubierta de pelo tupido que la da el nombre vulgar de comadreja cola de cepillo. Este animal posee ojos grandes y orejas largas terminadas en puntas y un hocico con pelos oscuros. Sus miembros anteriores poseen una garra de cinco dedos finos y en sus miembros posteriores poseen un primer dedo que le permite un buen sostenimiento de la vegetación. Los machos son de mayor tamaño que las hembras que tienen en la parte ventral de su abdomen una bolsa donde se alojan la cría luego de una gestación de unos 16-18 días. La época de procreación es en primavera y otoño y en algunas ocasiones las hembras pueden criar en ambas estaciones, naciendo una sola cría que permanece en la bolsa sin emerger hasta los 4 meses de vida. El destete se produce a los 6 meses y los individuos juveniles permanecen en la colonia hasta que se dispersan entre los 8 a 18 meses. Las hembras pueden gestar a partir de los 12 meses de edad y los machos

adquieren la madurez recién a los 2 años. Son fundamentalmente solitarios y delimitan su territorio a través de la secreción de las glándulas anales y por el uso de unas glándulas que tienen en la piel de la porción ventral del pecho. Se pasan el día escondidos en huecos de árboles, cuevas entre arbustos y malezas u hoyos en el suelo cubiertos por vegetación. Existe una dominancia de las hembras adultas sobre las hembras jóvenes que permanecen en cercanía de los refugios de las mayores. Se alimentan de hojas, brotes y flores de árboles, aunque pueden consumir insectos, huevos y pichones de pájaros. Su vida media puede alcanzar los 7 años en la naturaleza y los rangos de mortalidad son del 75% en los menores de un año y del 20% en la edad madura (Animaldiversity, 2011; Arkive, 2011).

Desde principio de 1940 se conoce en Nueva Zelandia que la comadreja es susceptible a TB, pero no fue hasta 1950-1960 que la infección se estableció en la población de esta especie, siendo descrita por primera vez en 1967. No obstante fue recién a partir de 1970 que comenzó a reconocerse como hospedador de mantenimiento en este país, a pesar de encontrarse libre de la infección en su país de origen, Australia (Morris *et al.*, 1994).

La ausencia de predadores naturales y la oferta de abundante alimento hicieron que su número aumentase a tal punto que la población de comadreas ocupase más del 90% de la superficie de Nueva Zelandia, con una población estimada en 60-70 millones de individuos. La densidad estimada en algunas áreas de este país ronda actualmente los 1,5 a 25 individuos por hectárea, lo cual es 20 veces superior a observada en Australia (O' Neill and Pharo 1995, citado por Palmer 2007).

El primer caso reportado de infección por *M. bovis* en comadreas salvajes fue en 1967 (Ekdahhl., 1970, citado por Palmer 2007). La evidencia epidemiológica que unía estos animales tuberculosos con los bovinos fue comunicado por Collins y col (1988) citado

por Palmer, (2007). Trabajos posteriores relevaron prevalencias de infección tuberculosa en possum del 53 % en algunas áreas de Nueva Zelandia (Coleman *et al.*, 1994). Otro estudio demostraba prevalencias por observación de lesiones con medias del orden del 5%, con variaciones estacionales del 2 al 10% (Morris *et al.*, 1994).

Las lesiones tuberculosas se ubican en el tracto respiratorio en el 55 al 70% de los animales afectados. Otro sitio de localización frecuente son los nódulos linfáticos superficiales, que producen descargas en forma intermitente o continua a través de senos en la piel (Morris *et al.*, 1994). Las lesiones pulmonares suelen ser extensas, variando desde formas miliare hasta grandes nódulos, proveyendo una amplia oportunidad de excreción por esta vía en muchos de estos animales infectados (O'Really and Darbon, 1995). En la comadreja esta infección no produce el desarrollo de cápsula fibrosa que rodea la lesión, su centro necrótico está compuesto por un exudado semilíquido de color verdoso que pueden descargar al exterior. Estas lesiones son consistentes con una pobre respuesta del huésped al proceso de la enfermedad (Morris *et al.*, 1994). Esto es semejante a lo observado en los tejones donde la fibrosis es escasa o nula y la mineralización es raramente observada, dando una apariencia de absceso piógeno producido por bacterias tipo *Corynebacterium* (de Lisle *et al.*, 2002). La lesión histopatológica se caracteriza por una zona central necrótica con una limitada reacción de macrófagos mezclados con linfocitos y neutrófilos, la presencia de numerosos bacilos puede observarse en el centro necrótico y en el interior de los macrófagos y células gigantes que bordean esta área (Buddle *et al.*, 1994).

En inoculaciones experimentales de comadrejas, se comprobó la excreción urinaria y en materia fecal (Corner and Presidente, 1981) pero ambas vías no parecen ser de importancia bajo las condiciones de campo (Morris *et al.*, 1994).

Las dos mayores vías de contagio entre possum son la pseudo-vertical (Pfeiffer *et al.*, 1995, citado por Coleman y Cooke, 2001) y la horizontal (Morris *et al.*, 1994). La primera ocurre por el estrecho contacto madre-cría que se produce al completar gran parte de su desarrollo en la bolsa de este marsupial. El contagio puede ocurrir a través del tracto respiratorio, la leche o las descargas de nódulos linfáticos abscedados. La transmisión horizontal ocurre en las actividades de reproducción, las peleas entre machos, la cohabitación en cuevas o escondites y el acicalamiento entre individuos. La dispersión de la enfermedad a otros grupos podría deberse a la dispersión de los machos jóvenes o a la relocalización de machos adultos.

La transmisión entre comadreas puede ser compleja y envuelve el estatus social del individuo dentro de la colonia. Las comadreas naturalmente infectados suelen ser individuos prominentes o centrales en la jerarquía social (Palmer, 2007). El momento en que la infección se transforma en enfermedad clínica en estos animales suele ser muy variable y está fuertemente influenciado por la severidad del medio ambiente, clima y otras situaciones estresantes (Morris *et al.*, 1994).

Las comadreas en los estadios finales de la enfermedad alteran su comportamiento presentado actividad diurna y mostrándose torpes en sus desplazamientos. Esto llama la atención a bovinos y ciervos que exhiben interés por este comportamiento anormal, llegando a entrar en estrecho contacto con ellos, pudiendo olfatearlos, lamerlos, tocarlos, mordisquearlos, hacerlos rodar y hasta agredirlos con patadas. Este comportamiento de bovinos y ciervos es característico de los individuos dominantes en sus rodeos (Paterson and Morris, 1995; Sauter and Morris 1995). Los cadáveres de comadreas muertas por TB pueden servir de fuente de infección para otras especies silvestres que tienen como hábito consumir carroña como los hurones, los cerdos salvajes y los armiños (Morris *et al.*, 1994).

La manera que los bovinos pueden transmitir esta enfermedad a las comadrejas y a otros animales silvestres en Nueva Zelandia es desconocida aunque se ha documentado a través del uso de video cámaras que las comadrejas pueden alimentarse de desechos de ciervos que son dejados por cazadores Nungent 2000 citado por Coleman and Cooke, 2001).

Otras especies silvestres, la mayoría de estas introducidas en Nueva Zelandia, fueron también investigadas sobre su estado referente a la infección por *M. bovis*. Estos trabajos fueron revisados por Morris y col. 1994, Coleman y Cooke, 2001 y Corner, 2006, registrándose como potenciales hospedadores por haberse aislado *M. bovis* en erizo, conejo, liebre, armiño, hurón, ciervo colorado, ciervo sika, ciervo dama, además de bovinos, cabras, ovejas, cerdos y gatos en estado silvestre. De este listado se consideran verdaderos hospedadores de mantenimiento además del possum al ciervo y bajo ciertas circunstancias al hurón. En esta última especie la infección parece estar relacionada a la alta infección de los possums, de los cuales son predadores debido a la elevada población de estos últimos en el medio que comparten. La mayoría de las lesiones en hurones se encuentran en nódulos linfáticos de mesenterio, consistente con la vía digestiva como ingreso (Lugton *et al.*, 1997a). Un número bajo de hurones puede excretar *M. bovis* por vía oral, lo cual limitaría la transmisión horizontal entre hurones solamente a través de las mordeduras (Lugton *et al.*, 1997b). El riesgo de transmisión de los hurones a los bovinos parece ser poca, debido a la baja excreción de bacilos por parte de estos y al infrecuente contacto entre estas especies en el medio ambiente para que ocurra por la vía aerógena (Corner, 2006).

Las diferentes especies de ciervos en estado silvestre adquieren la infección a través del contacto directo con possum (Sauter and Morris 1995) y cuando el número de marsupiales afectados disminuye artificialmente, decrece en forma constante los niveles

de infección en la población de ciervos (Coleman and Cooke, 2001). La transmisión de ciervos a bovinos es un raro evento, aunque se ha sugerido que la introducción de ciervos silvestres capturados en diferentes partes de Nueva Zelandia e introducidos a granjas con fines de cría, fueron los responsables de la aparición de la enfermedad en rodeos que antes estaban libres de la misma (Morris *et al.*, 1994). La costumbre de cazadores de ciervos de eviscerar los animales cazados y abandonar estos despojos en el campo favorece la transmisión entre los ciervos y posum en Nueva Zelandia (O'Reilly and Daborn, 1995). Los ciervos silvestres en Nueva Zelandia pueden actuar como reservorios de mantenimiento únicamente en áreas de alta densidad de población. En estado silvestre su responsabilidad es como amplificador de la infección, es decir que es capaz de incrementar la prevalencia en el ganado o en otros animales silvestres (Coleman and Cooke, 2001).

Las comadrejas son consideradas plaga en Nueva Zelandia. Se estima que estos animales consumen 21.000 toneladas de vegetación verde y frutos por noche. Al ser omnívoros pueden consumir pichones y huevos de pájaros e insectos. Su remoción del ecosistema no tiene la resistencia por parte de la sociedad, como ocurre en otras partes del mundo con la fauna silvestre infectada por *M. bovis*. El control a través de cebos en base a monofluoracetato de sodio, hizo decrecer la población de comadrejas y disminuyó la prevalencia de TB en los bovinos. El exterminio total de esta especie es un hecho impracticable, sugiriéndose que lo mas promisorio a largo plazo sería el desarrollo de una vacuna para estos animales junto con su control biológico (Palmer, 2007).

5-5-2-3 Ciervo de cola blanca-“white-tailed deer” (*Odocoileus virginianus*) en Michigan (EEUU).

El ciervo de cola blanca habita en el sur de Canadá, en casi todos los estados de EEUU excepto los del sur oeste, México, América Central y América del Sur hasta Bolivia. Existiendo treinta y ocho subespecies de acuerdo a las zonas que ocupa en su extendido habitat. La talla de estos ciervos en EEUU es mediana, pudiendo pesar los machos adultos entre los 70 y 140 kg y las hembras 40 a 90 kg. Su color es marrón tostado en verano, tendiendo al grisáceo en el invierno. Posee partes blancas alrededor de los ojos y el hocico, en la parte ventral del cuerpo y en la cola. Los machos poseen cornamenta, que crece todo el año perdiéndola en el invierno. Viven en grupos familiares compuestos por hembras y sus crías. Los machos forman grupos de pocos individuos transformándose en solitarios hasta la época de monta. Su alimento son los pastos naturales, los frutos, los brotes y el follaje de los bosques, pudiendo invadir cultivos de maíz, sorgo y pasturas para bovinos. Se alimentan durante las primeras horas de luz del día y el crepúsculo. Las hembras desarrollan una gestación de aproximadamente 6 meses, pudiendo parir de una a tres crías. La madurez sexual ocurre al año de vida en las hembras y a los 18 meses en los machos. Sus predadores naturales son los lobos, los osos, los coyotes y gatos de monte (Dewey and Animal Diversity Web Staff 2003).

M. bovis ha sido aislado de una amplia gama de especies de ciervos en estado salvaje como el axis (*Axis axis*), el dama (*Dama dama*), el sika (*Cervus nippon*), el mula (*Odocoileus hemionus*), ciervo de cola blanca (*Odocoileus virginianus*), la corzuela (*Capreolus capreolus*), el colorado (*Cervus elephus*) y una subespecie de este último el elk o ciervo canadiense (*Cervus elephus/canadensis*) en una gran cantidad de países (EEUU, Australia, Irlanda, Nueva Zelandia, Suiza, Japón, Canadá, Inglaterra, Hungría y Dinamarca) (Griffin and Mackintosh 2000). En Nueva Zelandia la infección en ciervos silvestres ocurre por compartir áreas donde las comadrejas se encuentran infectadas y

luego de adquirir la infección a través de sus movimientos pueden llevarla a otros sitios donde las comadreas no presentan la infección.

La presencia de la enfermedad en granjas dedicadas a la explotación de ciervos fue resumida por O'Reilly and Daborn, 1995, quienes citan numerosos trabajos que reportan la ocurrencia de brotes de TB en varias partes del mundo.

Los ciervos se transforman en hospedadores de mantenimiento de *M. bovis* cuando la densidad de la población afectada se incrementa a niveles semejantes a las granjas de cría, situación que difícilmente se alcance en la naturaleza (Coleman and Cooke2001). El ciervo de cola blanca (*Odocoileus virginianus*) en el estado de Michigan (EEUU) es un buen ejemplo. En 1995 se reconoció una epidemia de TB en su población autóctona (Schmitt *et al.*, 1997), una año después que el estado adquiriera el estatus libre de TB en el ganado bovino (Corner, 2006). Las teorías propuestas para explicar esta ocurrencia son la alta densidad poblacional de ciervos que se alcanzaron en este estado, producto de prácticas como el cebado y la alimentación de los ciervos, debido al enorme interés que tiene en la población el desarrollo de las actividades de caza (Schmitt *et al.*, 2002). La importancia de la actividad de la caza deportiva de este ciervo en la economía del estado de Michigan fue cuantificada por el Departamento del Interior de EEUU en el año 2001. Esta actividad generó en ese año más de 506 millones de dólares (O'Brien *et al.*, 2006). Este aumento de la población de ciervos hizo que la receptividad del medio ambiente fuera superada, haciéndose necesario la suplementación de los animales durante el invierno (O'Brien *et al.*, 2002). Como consecuencia se produjo el agrupamiento de ciervos en torno a los sitios de alimentación, favoreciendo de este modo la transmisión por aerosoles (Schmitt *et al.*, 1997). Estos cambios en el manejo de los ciervos silvestres produjo que su población se duplicara en unos 40 años (O'Brien *et al.*, 2002). La

transmisión oral también puede ocurrir al verse facilitada la contaminación del alimento que se ofrece en este tipo actividad (Comer, 2006).

Se considera que los ciervos fueron responsables de la ocurrencia de brotes de la enfermedad en 13 rodeos bovinos de carne y en dos de leche, actualmente se considera que cinco condados del estado de Michigan presentan infección en sus ciervos (Schmitt, *et al.*, 2002).

El origen de la infección de *M. bovis* en los ciervos de Michigan se ha asociado al ganado bovino que en décadas anteriores presentaban niveles de infección muy elevados en ese país (Schmitt *et al.*, 1997). Los sitios de localización de las lesiones tuberculosas en estos ciervos son principalmente las vía respiratorias superiores como inferiores y los nódulos linfáticos de la cabeza, especialmente los retrofaríngeos (O'Brien *et al.*, 2001). Los ganglios afectados están aumentados de tamaño con un contenido purulento de color amarillo-verdoso, siendo poco frecuente la presencia de granulomas caseosos con pus y textura arenosa. La observación microscópica de las lesiones presenta un centro con necrosis coagulativa rodeada de macrófagos, linfocitos y un número variable de células de Langhans y células gigantes multinucleadas. La zona necrótica puede presentar algunas áreas parciales de mineralización y la presencia de bacilos suele ser en bajo número, estando frecuentemente localizados en el interior de los macrófagos o en la zona de necrosis. La lesión se ve rodeada de una pared de tejido conectivo fibroso (Schmitt *et al.*, 1997, de Lisle *et al.*, 2002).

La presencia de la enfermedad en este ciervo nativo, hizo investigar si el *M. bovis* podía estar en otras especies con las cuales comparte su hábitad en el estado de Michigan, lográndose aislar *M. bovis* en el coyote (*Canis latrans*), lince (*Felis rufus*), el zorro común (*Vulpes vulpes*), el zorro gris (*Urocyon cinereoargenteus*), el oso negro (*Ursus americanus*), la comadreja (*Didelphis virginiana*) y el mapache (*Procyon lotor*)

(Bruning-Fann *et al.*, 2001 y 1998) y (Witmer *et al.*, 2010). Estos animales son considerados como hospedadores diseminadores y no reservorios. Sin embargo se considera que estas especies silvestres deberían ser eliminadas en los casos de establecimientos bovinos afectados por tuberculosis y en proceso de despoblamiento y desinfección, dada la larga expectativa de vida de algunos, sus hábitos de frecuentar establos y las posibilidades de excretar la bacteria (Witmer *et al.*, 2010).

La disminución de la población de ciervos fue puesta en práctica por el gobierno del estado de Michigan con medidas como el incremento del número de ejemplares que se podían abatir anualmente por parte de los cazadores deportivos y con la prohibición de las prácticas de alimentación y cebado de ciervos. Esto produjo el descenso de la prevalencia aparente en la población de ciervos desde los 4.9% del año 1995 al 1,7 en el 2004 (O'Brien *et al.*, 2006).

5-5-2-4 Búfalo africano (*Syncerus caffer caffer*)

Existen dos tipos de búfalo africano, el grande y de pelaje oscuro de las savanas o búfalo del Cabo (*Syncerus caffer caffer*) y el más pequeño de pelaje rojizo de la selva (*Syncerus caffer nanus*), ambos son encontrados al sur de Sahara. En Sudáfrica el búfalo africano (*Syncerus caffer caffer*) es considerado como hospedador de mantenimiento de *M. bovis*. La infección fue detectada en los años noventa dentro del Parque Nacional Kruger (PNK) donde esta especie nativa habita. (De Vos *et al.*, 2001, Michel *et al.*, 2006). El origen de la misma se remonta al ingreso de bovinos a Sudáfrica, por parte de colonizadores europeos en el siglo XIX (Renwick *et al.*, 2006).

Estos rumiantes tienen un cuerpo en forma de tonel con un pecho ancho, patas cortas y fuertes, una gran cabeza con un cuello corto y también grueso. Su pelaje es marrón muy oscuro o negro, siendo los machos más oscuros que las hembras, pudiendo alcanzar

estos hasta un peso de 700-900 kg. Ambos sexos poseen astas que tienen forma de gancho, son muy prominentes en los machos teniendo una base muy ancha a modo de escudo, en las hembras los cuernos son más finos y cortos y no tienen desarrollado la base. Estos animales habitan sabanas con bosques en mosaico, se alimentan de pastos, hierbas y vegetación que crece en las cercanías de los pantanos. Conforman rodeos que contienen de 50 a 500 individuos, dentro de estos se conforman pequeños grupos sociales como los compuestos por varias hembras adultas, sus hijas y los terneros. La unión entre las hembras es muy fuerte y esta cohesión brinda protección al grupo y a los recién nacidos. Algunos machos adultos pueden estar asociados a estos grupos de hembras o bien formar pequeños grupos de machos de igual edad, como lo hacen los machos juveniles. La conformación de rodeos de 2.000 o más individuos generalmente es temporaria y se debe al aporte de numerosos pequeños rodeos y bajo condiciones de pastoreo muy favorable. Estos grupos tienden a no ser migratorios, variando su área de pastoreo entre los 126 y 1.057 km² con densidades variables de menos de un individuo a algo más de tres por km². Esta densidad se ve aumentada hasta 18 animales por km² en zona de buenas lluvias y con áreas de pastoreo de 10 km². El búfalo puede reproducirse todo el año pero los nacimientos tienden a ser estacionales cuando la lluvia es limitada. La gestación dura 340 días aproximadamente, naciendo un solo ternero y el intervalo entre partos normalmente suele ser de dos años. El búfalo africano mantiene una relación simbiótica con algunas especies de pájaros que se alimentan de los ectoparásitos que atacan su piel. El hombre, el león y los cocodrilos son los predadores más importantes, pero estos últimos solo atacan terneros y animales viejos (Ultimateungulate, 2011).

La prevalencia de infección en búfalos en la reserva del PNK fue estimada en el 18,6 % de los búfalos y el 63,3% de los rodeos de esta especie (Rodwell *et al.*, 2001).

La enfermedad en el búfalo es crónica y subclínica, pudiendo llevar años el desarrollo de signos clínicos, caracterizándose el estadio terminal por la emaciación. El tiempo entre el inicio de la infección y la muerte es variable, debido que la respuesta inmunitaria de cada animal, puede verse debilitada por el estrés, la edad avanzada y la sequía (De Vos *et al.*, 2001). Existe una fuerte correlación entre el incremento de la prevalencia de infección y la condición corporal del rodeo de búfalos. Esta asociación es más fuerte durante la estación seca donde los rodeos afectados pierden condición corporal rápidamente. Estos animales debilitados son presa fácil de los depredadores (Caron, 2003 citado por Michel *et al.*, 2006).

El patrón de lesiones observadas en esta especie sugiere que la vía aerógena a través de aerosoles es la vía principal de transmisión, la cual se ve facilitada por el carácter gregario de los búfalos, haciéndolos un hospedador de mantenimiento ideal dentro del ecosistema sudafricano (Renwick *et al.*, 2006).

Entre los 3-6 meses luego de la infección, los búfalos desarrollan lesiones en nódulos linfáticos de la cabeza, tonsilas, pulmón y ganglios linfáticos torácicos. La infección puede difundirse de estos sitios iniciales a órganos distales por vía hemática o linfática (Renwick *et al.*, 2006). Histológicamente la lesión presenta se pequeños signos de encapsulamiento, lo cual sugiere que es un animal muy susceptible (De Vos *et al.*, 2001). Esta débil respuesta inmunitaria indicaría que el búfalo es un hospedador reciente y en evolución (Renwick *et al.*, 2006).

La infección por *M. bovis* en esta especie dio lugar a que predadores naturales como el león (*Panthera leo*), el chita o guepardo (*Acinonyx jubatus*) y el babuino (*Papio ursinus*) adquieran también la infección en forma directa o indirecta (Keet *et al.*, 1996), La enfermedad fue reportada en otros animales como el leopardo (*Panthera pardus*), la hiena (*Crocuta crocuta*), el facocero (*Phacocoerus aethiopicus*) y el gran kudú

(*Tragelaphus strepsiceros*) (Renwick *et al.*, 2006). Este último animal herbívoro, tiene la particularidad que al desarrollarse la infección se afectan los nódulos de cabeza y del cuello presentándose agrandados y con fístulas que drenan exudado, contaminando pastos y vegetación. De este modo el kudú es uno de los pocos animales en los cuales se pueda diagnosticar la TB a distancia (Renwick *et al.*, 2006).

Cepas de *M. bovis* que afectan búfalos fueron aisladas en algunos kudús, pero diferentes genotipos de cepas se encontraron en un grupo de kudús en el PNK, lo que indicaría que a pesar de ser susceptible al a las cepas dominantes de la infección, pueden mantener un ciclo de infección separado, lo cual puede tener implicancias diferentes en su potencial rol como huésped de mantenimiento (Keet *et al.*, 2001).

Estas observaciones se corroboraron con un estudio posterior donde las cepas aisladas de las especies afectadas en el PNK presentaba un mismo spoligotipo para el 73% de ellas, siendo las restantes cepas (27%) variantes que corresponden a la cepa dominante. La única variante en el patrón de cepas fue aislada en un grupo de kudús, la cual no fue hallada ni en búfalo ni otras especies, demostrando un comportamiento específico de especie, bastante avanzado en la interacción entre patógeno y huésped (Michel *et al.*, 2009). Ambas especies son grandes herbívoros que viven en manadas de alta densidad de individuos en la cual *M. bovis* puede persistir y mantenerse en estas especies sin necesidad de otra fuente externa de infección (Renwick *et al.*, 2006)

Consecuentemente la transmisión entre búfalos y kudús ocurre y de ellos a los grandes carnívoros por predación, o bien en forma indirecta a través de otras especies que pueden actuar como hospedadores intermediarios. Estos son a su vez presa de los carnívoros mayores, lo cual impacta en forma exacerbada sobre estas últimas especies. Esta situación permitiría describir un modelo de transmisión de múltiples especies (Renwick *et al.*, 2006).

5-5-2-5 Jabalí europeo (*Sus scrofa*)

La distribución histórica de la especie abarca Europa, Asia y el norte de África, pero actualmente se encuentra también en el continente americano, Australia, Nueva Zelanda además de otras partes del mundo. Su presencia en lugares alejados de su distribución original, se debe a las introducciones que se han realizado en la mayor parte de los casos de manera voluntaria. La especie muestra un marcado dimorfismo sexual, presentando los machos mayores dimensiones que las hembras. Otros caracteres secundarios son diferenciales como la presencia de caninos de mayores dimensiones, piel más gruesa y dura alrededor de la espalda, crin dorsal más desarrollada y presencia de un pincel de pelos que señala el emplazamiento del pene. El jabalí adulto muestra una característica morfología corporal alcanzando la máxima altura en la región de las extremidades anteriores. El cuello es poco aparente, las orejas son pequeñas y se mantienen erguidas a diferencia de las del cerdo doméstico que son mayores y tienden a caer hacia adelante

Los machos superan los 100 kg de peso, mientras que las hembras son más pequeñas alcanzando el 80% del peso corporal de éstos. Posee un olfato muy desarrollado teniendo una gran importancia en la exploración del medio y en la comunicación entre individuos, así como en la función defensiva, ya que en gran medida los peligros los detectan con este sentido. La especie es prolífica basándose en la precocidad a la que alcanza la madurez sexual, su gestación relativamente corta, y a la elevada cantidad de crías por camada. La gestación dura unos 120 días, naciendo las crías completamente cubiertas de pelo y con las capacidades locomotoras y de exploración del medio plenamente desarrolladas. La pubertad la alcanzan los machos a los 10 meses, aunque hasta los 2 años de vida no se encuentran en condiciones de competir por las hembras adultas. Estas sí pueden incorporarse a la etapa reproductiva entre los 8 y los 10 meses.

La época de apareamiento es en el otoño y los nacimientos ocurren en primavera, aunque los partos pueden producirse prácticamente durante todo el año.

La estructura social del jabalí tiene como unidad básica el grupo matriarcal, que se compone de una o diversas hembras acompañadas de sus jóvenes. Estos núcleos son liderados por una hembra que establece una red de interrelaciones que facilitan el desarrollo del proceso de aprendizaje de las camadas. Además de estos núcleos básicos se constituyen también agregaciones de jóvenes machos que abandonan sus grupos matriarcales por la presión de machos adultos. Estos son solitarios durante la mayor parte del año, pero que se acercan a los grupos de hembras y crías durante el período de celo. De hábitos oportunistas y generalistas, el jabalí tiene tendencia a alimentarse de pocos elementos abundantes, digeribles y nutritivos. Esto unido a su gran plasticidad ecológica, permite que utilice fuentes de alimento de lo más diversas en función de su disponibilidad. Se advierte también una elevada frecuencia de ingestión de materia animal que, si bien es cuantitativamente poco significativa, parece constituir un complemento nutricional indispensable. La especie ocasiona daños a las zonas agrícolas, con especial preferencia por los cultivos de cereales, grano grueso y frutales. El lobo (*Canis lupus*) es uno de los pocos predadores que tiene en su habitat europeo, su longevidad en condiciones naturales alcanza como máximo los 13 años: La actividad cinegética es la responsable de la alta tasa de renovación de las poblaciones y es actualmente el factor de mortalidad más relevante. La especie ocasiona daños a las zonas agrícolas, con especial preferencia por los cultivos de maíz, cereales y frutales.

Parecería que el jabalí no requiere actualmente de medidas de conservación, sino que más bien corre el riesgo de acabar siendo considerado una especie plaga en muchas de las zonas de su área de distribución en la península Ibérica y también en el Norte de África. No obstante, existen aspectos que requieren atención. Se aprecia una evidente

contradicción entre las dinámicas expansivas de la especie y la proliferación de granjas destinadas a la cría de jabalíes que luego son empleados para ser liberados en lugares destinados a la actividad cinegética en algunas regiones de España. También es de destacar el aumento de los denominados cercones (superficies que no suelen sobrepasar las 500 ha) creadas con fines cinegéticos y donde los jabalíes se mantienen de forma artificial en densidades muy superiores a la que puede alcanzar en su estado natural (Rosell *et al.*, 2001).

En el norte de Italia se ha aislado *M. bovis* de jabalíes (*Sus scrofa*), cuyos patrones y spoligotipos coinciden con los de bovinos de la misma región, considerando que la transmisión entre ambas especies podría haberse debido al compartir áreas de pastoreo, pero sin establecer cual o cuales pudieron ser las vías de transmisión (Serraino *et al.*, 1999). Los mismos autores consideraron que debido a la localización predominante de las lesiones de TB en ganglios de cabeza, esta especie no parecería jugar un rol importante en la difusión de *M. bovis*, aunque aclararon que más estudios deberían llevarse a cabo.

En España se ha reportado aislamientos de *M. bovis* con iguales spoligotipos en bovinos y animales silvestres como el jabalí, el ciervo rojo, el ciervo dama y el lince ibérico (*Lynx pardina*) (Aranaz *et al.*, 2004). La prevalencia de la infección ha ido en aumento entre 1997 y 2002 en el jabalí y en el ciervo rojo que comparten su habitat, alcanzando niveles de infección del 2,3% y 1,74% respectivamente en la región de Extremadura (Parra *et al.*, 2006). Otro trabajo que muestreó jabalíes y ciervos en diferentes regiones de España, encontró que las áreas más afectadas correspondían a la provincia de Ciudad Real y sus adyacencias (centrosur del país), donde de acuerdo a los sitios relevados se encontró una prevalencia media de 42% en jabalíes y del 13% de los ciervos (Vicente *et al.*, 2006). Los mismos autores describieron que en áreas solo habitadas por jabalíes,

estos igualmente presentaban lesiones de TB. La observación de estas lesiones, su clasificación por tamaño y localización en estos jabalíes fue ampliada en otro trabajo donde se describió que el 82,% (105/127) de los animales muestreados presentaba lesiones compatibles con TB, correspondiendo el 42,2% de las lesiones a una única localización y el 57,8% restante a lesiones localizadas en más de una región anatómica (Martín-Hernando *et al.*, 2006). Esta mayor proporción de TB generalizada que afecta a pulmones, estaría relacionada a la alta densidad de jabalíes que se producen en estos lugares a consecuencia del cercado y suministro de alimentación, para su explotación como cotos de caza (Martín-Hernando *et al.*, 2006). Estas observaciones fueron también realizadas por otro trabajo donde se manifestó que con el aumento de la densidad de los jabalíes, aumentó la prevalencia de infección y los casos de TB generalizada (Naranjo *et al.*, 2008). La apreciación de que el jabalí bajo el ecosistema Mediterráneo Español tiene el potencial de actuar como reservorio de la enfermedad es formulada en varios trabajos (Gortazar *et al.*, 2005; Parra, *et al.*, 2006; Vicente, *et al.*, 2006; Naranjo *et al.*, 2008).

En Francia país declarado libre de TB por la Comisión Europea en el 2000, se reportó un brote de *M. bovis* en fauna silvestre que involucró a ciervos rojos, jabalíes y corzuelas en la zona de Normandía. El patrón genético de los aislamientos demostró que eran todos del mismo genotipo, correspondiendo al circulante en los rodeos bovinos de la zona. La infección habría ingresado a los ciervos por contagio con los bovinos ya que comparten áreas de pastoreo y luego a los jabalíes por consumo de despojos de ciervos abandonados en el campo por cazadores (Zanella, *et al.*, 2008).

En otros países como Australia y Nueva Zelandia la infección TB fue descrita en cerdos domésticos asilvestrados o cimarrones, donde se los considera hospedadores circunstanciales, sin jugar un rol importante en la epidemiología de la TB de los

bovinos, debido a que no presentan una significativa excreción de *M. bovis* (Corner 2006).

5-5-2-6 Otras especies hospedadoras de mantenimiento

Además de las especies silvestres nombradas anteriormente existen otras que también son catalogadas como de mantenimiento de la infección por *M. bovis*, pero su peso epidemiológico se encuentra muy limitado a una ecorregión en particular. Es el caso del bisonte (*Bison bison athabascae*) y el alce o elk (*Cervus elaphus manitobensis*) en Canadá. Ambas especies se encuentran separadas geográficamente ocupando la primera el Wood Buffalo National Park (WBNP) en la provincia de Alberta y la segunda el Riding Mountain National Park en la provincia de Manitoba (RMNP) (Nishi *et al.*, 2006). En el caso de los bisontes del WBNP también presentan infección por brucelosis, pero la capacidad de dispersar estas enfermedades a otros rodeos de la especie y a rodeos bovinos es baja, debido a la larga distancia geográfica que los separan de los rodeos susceptibles. No así para el elk del RMNP en cuyo entorno han ocurrido casos de TBb en rodeos bovinos (Nishi *et al.*, 2006). A pesar de la existencia de TB en estos ungulados, no se han reportado evidencia de enfermedad en otras especies silvestres (Tesaro, 1988, citado por Wobeser, 2009).

Otros ungulados podrían ser considerados también huéspedes de mantenimiento en el continente Africano, como el kudu menor (*Tragelaphus imberbes*), el ñu azul (*Connochaetes taurinus*) en Tanzania (Cleaveland, *et al.*, 2005). El antílope Lechewe (*Kobus leche*) en Sudáfrica (de Lisle *et al.*, 2001) y en Tanzania (Munyeme *et al.*, 2010) y antílope jeroglífico (*Taegelaphus scriptus*) en Zambia (Cleaveland *et al.*, 2005).

La cabra salvaje (*Capra hircicus*) en nueva Zelandia (Coleman and Cooke, 2001) y el búfalo de agua o asiático (*Bubalus arnee*) en Australia (Corner, 2006).

6- Materiales y Métodos

6-1 Localización de Rodeos Lecheros

Se seleccionaron 8 rodeos lecheros ubicados en la denominada Cuenca lechera Santa Fe-Córdoba, que permitieron la captura de animales silvestres en sus predios (Imagen 1). Seis de estos rodeos presentaron al inicio del trabajo prevalencias elevadas de vacas lecheras a la prueba de tuberculina ano-caudal, variando del 7 al 81% de animales positivos. Los dos restantes tuvieron nuevamente reaccionantes positivos a tuberculina (2 al 4% sobre el total del rodeo) luego de haber finalizado ambos un programa de saneamiento de esta enfermedad. En uno de estos dos últimos rodeos previo al inicio de los muestreos de fauna, se aisló una cepa de *M. bovis* a partir de lesiones visibles en frigorífico de uno de sus bovinos.

Las labores de muestreo de fauna se realizaron durante los años 2007, 2008 y primer semestre del 2009. Durante este tiempo uno de los establecimientos abandonó la producción lechera, otro descartó el total de animales del rodeo reemplazándolos por animales negativos a tuberculina, un tercero ejecutó un plan de erradicación que le permitió disminuir drásticamente el número de infectados y otro redujo en un tercio la existencia total de bovinos independientemente de su estado sanitario.

6-2 Captura de animales

Se procuró la captura de todas las especies de mamíferos silvestres existentes en los predios lecheros seleccionados. Para tal fin se utilizaron trampas tipo Tomahawk para los roedores pequeños y otra de diseño semejante pero de dimensiones superiores para las especies de mayor tamaño. Las trampas se colocaron en línea, separadas por 2 o 3 metros entre sí, en las áreas donde naturalmente se refugian los animales silvestres. Estas incluyeron las zonas perimetrales a las pasturas cultivadas utilizadas por los

bovinos, donde existía cobertura de árboles y pajonales naturales, en proximidad de instalaciones de ordeño y en los sitios donde se depositan los bovinos muertos de estos establecimientos.

Los roedores capturados fueron manipulados y sacrificados siguiendo normas estándares para roedores (Mills *et al.*, 1995). En el caso de animales del orden Xenarthra (peludos) y Didelphimorphia (comadreas) y Galactis (hurón) se le suministró xilazina (Rompun[®], Bayer Argentina) IM en dosis de 5 mg/kg de peso como tranquilizante, previo a la aplicación intracardíaca del eutanásico (T61[®], Intervet Argentina S.A). Dada las características de algunos mamíferos (zorros y liebres), se recurrió al empleo de armas de fuego para su captura. Las carcasas de los animales se mantuvieron refrigeradas desde su captura-sacrificio hasta su procesamiento, no superando las 8 horas post-mortem. Las labores de capturas se realizaron en períodos de cinco días por cada establecimiento, repitiéndose varios de estos períodos por establecimiento entre los meses de mayo a septiembre, contando con autorización expresa para el manejo de fauna del Gobierno de la provincia de Santa Fe (Res. 0040/08 Exp. N° 02101-00009273-3)

6-3 Toma de muestras en bovinos

Se procuró el aislamiento de *M. bovis* en los bovinos de todos los rodeos donde se hicieron las capturas de animales silvestres, a fin de determinar la cepa/s presentes y spoligotipos. Se tuvo oportunidad de realizar necropsias en cuatro de los establecimientos y de solo un bovino en cada uno de ellos. Las muestras se obtuvieron de las lesiones macroscópicas compatibles con tuberculosis cuando se observaron y de ganglios retrofaríngeos y mediastínicos cuando los bovinos no presentaban lesiones. Las muestras se acondicionaron en recipientes estériles, se refrigeraron inmediatamente

después de su obtención y se mantuvieron a -18°C hasta su procesamiento. En los tres establecimientos donde no se pudo realizar necropsias, se procuró el aislamiento de *M. bovis* a través de hisopados nasales realizados a varios animales positivos a tuberculina y cuyo número varió por establecimiento entre 10 y 15. En los establecimientos que permanecieron en actividad y no reemplazaron los animales durante el tiempo que duró la experiencia, estos muestreos se realizaron en dos ocasiones. La toma de muestras se realizó con hisopos estériles contruidos artesanalmente e introducidos unos 8-10 cm. en los ollares de los bovinos y colocados posteriormente en tubos de 50 mL. de capacidad conteniendo 15 mL. de PBS estéril. Estas muestras fueron mantenidas congeladas a -18°C hasta su procesamiento en el laboratorio de bacteriología.

6-4 Toma de muestras en animales silvestres

Independientemente de la especie animal se aplicó una rutina de necropsia que consistía en la apertura de cavidades por línea media, observación macroscópica de presencia de lesiones compatibles con TB en órganos. Rutinariamente se tomaron muestras individuales de pulmón y alícuotas de bazo, hígado y riñón, colocándose las todas estas muestras en contenedores estériles. En los mamíferos de mayor tamaño se tomaron nódulos linfáticos de cabeza (retrofaríngeos, submandibulares y tonsilas), incluyéndose también los preescapulares conformando un pool de nódulos linfáticos. Todas las muestras con destino a bacteriología se conservaron a -18°C hasta su procesamiento. Todo órgano de animal con apariencia de lesión o con cambios macroscópicos se destinaría a examen histopatológico, acondicionando estos tejidos en formol *bufferado* al 10% y procesados por los métodos histopatológicos estándares y coloreándose con la técnica de Hematoxilina-Eosina.

6-5 Cultivos bacteriológicos

Las muestras de tejido fueron trituradas utilizando un homogenizador mecánico (Stomacher Basic 470, Sedward) y decontaminadas por la técnica de Petroff, ambos procesos se realizaron siguiendo la metodología recomendada por el Manual de Micobacterias de la AAVLD (Jorge *et al.* 2005). Posteriormente se sembraron por duplicado en medios de Löwestein–Jensen y Stonebrink. Los desarrollos obtenidos fueron sometidos primeramente a la tinción de Ziehl Neelsen (ZN).

6-5-1 Técnicas moleculares

La identificación del CMT en los aislamientos con tinción de ZN positiva, se realizó por la técnica de PCR-IS6110, utilizando los cebadores:- INS1 CGTGAGGGCATCGAGGTGGC y - INS2 CGTAGGGCGTCGGTGACAAA de acuerdo a lo descrito por Hermans y col., 1991).

La tipificación molecular de los aislamientos identificados como pertenecientes al CMT se efectuó utilizando la técnica de Spoligotyping de acuerdo a lo descrito por Kamerbeek y col., 1997 (Kamerbeek *et al.*, 1997).

En el Anexo 1 se detallan las técnicas moleculares utilizadas

6-6 Análisis estadístico

Para determinar la asociación entre aislamiento de *M. bovis* y sexo en la especie *Didelphys albiventris*, prevalencia de infección de los rodeos lecheros (rodeos con < de 10% y > 10% de infección por *M bovis* en sus vacas), tamaño del rodeo (< de 100 vacas y > de 100 vacas) y rodeos que sufrieron reinfección vs. rodeos que no sanearon, con el aislamiento de *M. bovis* en animales silvestres. Se aplicó el Test Exacto de Fischer. La intensidad de la asociación se calculó mediante el Odds Ratio (OR) e intervalo de confianza del 95%, utilizándose el software SatWin Ep. Scope V. 2.0.

Comentado [W1]: Agregado

7- Resultados

Se capturaron un total de 146 mamíferos obteniéndose el aislamiento de *M. bovis* en 12 individuos, resultando en una prevalencia de infección del 8,2%. Estos aislamientos se realizaron sobre tres especies diferentes (Tabla 1), diez de ellos se realizaron sobre individuos de comadreja overa (*Didelphys albiventris*) y los restantes se obtuvieron de un zorro gris (*Lycolapex gymnocercus*) y de una rata (*Rattus norvegicus*). La prevalencia de infección en comadrejas resultó del 12,8%, involucrando mayoritariamente a los individuos machos (Tabla 1).

Ninguno de los individuos en donde se aisló *M. bovis*, presentó lesiones macroscópicas de tuberculosis, ni indicio de alguna patología semejante. En varios individuos de la especie comadreja se observó la presencia de parásitos gastrointestinales.

Los aislamientos obtenidos en comadrejas fueron a partir del conjunto de ganglios de cabeza (n= 6), pulmón (n=3) y pool de hígado, bazo y riñón (n=1). En el zorro se obtuvo solo a partir de ganglios mesentéricos y en la rata a partir de pulmón (Tabla 1).

Siete de los aislamientos realizados en las comadrejas se realizaron sobre individuos machos, los tres restantes sobre hembras (Tabla 1), sin embargo no se encontró asociación significativa entre aislamientos y sexo (P= 0,1785) (Tabla 3). Tampoco se encontró asociación significativa cuando se relacionó la prevalencia de infección del rodeo (rodeos con < de 10% y > 10% de infección por *M bovis* en sus vacas lecheras), el tamaño del rodeo (< de 100 vacas y > de 100vacas), con el aislamiento de esta bacteria en animales silvestres, resultando un valor de P=0,097 para el primero y de P= 0,422, para el segundo (Tabla 3).

Donde se observó asociación significativa fue cuando se analizó la relación de rodeos que sufrieron reinfección vs. rodeos que no habían efectuado saneamiento con el aislamiento de *M bovis* en fauna (P=0,022), presentando los rodeos con reinfección 3,79

veces mas riesgo de aislamiento de *M. bovis* en la fauna silvestre capturada dentro de sus predios (Tabla 3).

La tipificación molecular por Spoligotyping de los aislamientos obtenidos de fauna silvestre e identificados como pertenecientes al complejo CMT por tener PCR-IS6110 positiva, permitió la caracterización de los mismos como pertenecientes a la especie *M. bovis*. Así también, se identificaron 4 patrones de hibridación o spoligotipos diferentes. Los más frecuentes fueron los spoligotipos 34 y 12 con cinco aislamientos cada uno. Estos aislamientos se obtuvieron sobre 9 comadrejas y una rata. Se detectaron en una sola oportunidad el spoligotipo 96 obtenido en el zorro y el 122 proveniente de una comadreja (Figura 1 y Tabla 1).

Los animales que presentaron aislamientos fueron capturados en seis de los ocho establecimientos seleccionados para llevar adelante el muestreo (Tabla 2).

Para poder identificar la fuente de infección en todos los rodeos lecheros se intentó obtener aislamiento de *M. bovis* a partir de los bovinos, pudiéndose realizar necropsias en 4 de los 7 establecimientos. Se observaron lesiones macroscópicas de TB en dos de ellos, obteniéndose aislamiento de un bovino proveniente de un solo establecimiento (Tabla 2). Los intentos realizados en obtener más aislamientos, utilizando la técnica de hisopados nasales sobre bovinos positivos a tuberculina, no produjeron resultados positivos. Los *M. bovis* aislados de estos establecimientos correspondieron al spoligotipo 21 para el establecimiento 5 y spoligotipo 98 para el establecimiento 8 (Tabla 2).

8- Discusión

La prevalencia de infección por *M. bovis* del 8,2% detectada sobre el total de animales silvestres capturados es elevada, debiendo estar relacionada a los altos niveles de infección que presentaban los rodeos bovinos que cohabitaban con estos animales silvestres. Infecciones elevadas (> 4 %) también fueron observadas en carnívoros y omnívoros en un área donde existe un huésped silvestre de mantenimiento como es el ciervo de cola blanca en el estado de Michigan, USA (Bruning-Fan *et al.*, 2001). La infección en especies de carnívoros y omnívoros parece ocurrir como consecuencia de la presencia de la infección en bovinos u otros rumiantes (Schmitt *et al.*, 1997, Serraino *et al.*, 1999, Bruning-Fann *et al.*, 2001, Defra 2007, Delahay *et al.*, 2007, Renwick *et al.*, 2006, Witmer *et al.*, 2010). En el presente trabajo no se encontraron diferencias significativas en relación al riesgo de producir mayores aislamientos en la fauna de los establecimientos con prevalencias de TBb mayores al 10 %, respecto a los que tenían índices menores. Posiblemente este resultado se deba a que valores del 2%, 4% y 7,3 % tampoco son cifras menores de infección tuberculosa en rodeos bovinos (Tabla 2).

Si bien el tamaño del rodeo acrecienta el riesgo de sufrir TBb en los bovinos (Griffin *et al.*, 1996). Esta variable (rodeos < de 100 vacas vs. rodeos > de 100 vacas), tampoco parece traducirse en una mayor probabilidad de lograr aislamientos de *M. bovis* en la fauna silvestre que comparte el hábitat con estos. Posiblemente ello se deba a los altos niveles de infección TBb que presentaban los rodeos seleccionados para este trabajo.

La prevalencia de infección (12,8%) por *M. bovis* obtenida en comadrejas overas (*Didelphis albiventris*) fue notoriamente superior a la descrita en las comadrejas de Norteamérica (*Didelphis virginiana*). Estas adquieren la infección por consumo de despojos de ciervos de cola blanca, único hospedador reservorio (Witmer *et al.*, 2010).

Tanto en este último trabajo como en el citado anteriormente, no fue posible observar lesiones visibles (LV) o sospechosas de TB en esta especie.

El aislamiento de *M. bovis* en animales silvestre sin lesiones visibles (SLV) ha sido reportado tanto en especies consideradas como reservorios (Clifton-Haddley *et al.* 1993), como de hospedadores finales (Lugton *et al.*, 1997a; Brunig-Fannn *et al.*, 1998, 2001, Delahay *et al.*, 2007). Esta falta de observación de lesiones en animales silvestres infectados puede deberse a varios factores como ser la metodología utilizada en las necropsias y muestreos y los relacionados con la virulencia de la cepa de *M. bovis*, la resistencia natural del huésped, la especie y la edad del animal (Gavier-Widen *et al.*, 2009). Las probabilidades de la observación macroscópica de alguna lesión o alteración en los sitios anatómicos de donde se aisló *M. bovis*, podrían haberse mejorado si se hubieran efectuados mayor cantidad de cortes seriados conjuntamente con la palpación de los órganos. Sin embargo esta metodología tiene poca practicidad en especies de animales pequeños como los capturados en el presente trabajo, donde tonsilas y ganglios de ratas y comadrejas no superan los 5 a 6 mm de diámetro.

El aislamiento de *M. bovis* en una rata (*Rattus norvegicus*) (1/17) fue previamente comunicado en el Reino Unido. Sin embargo la prevalencia establecida en dos trabajos fue menor (2/90) (Little *et al.*, 1982) y (5/412) (Delahay *et al.*, 2002). En el primero de los trabajos el aislamiento se realizó a partir de linfonódulos, mientras que en el segundo no se determinó el sitio anatómico. En el presente trabajo el aislamiento se obtuvo de pulmón. Otro muestreo realizado años más tarde también en el Reino Unido y sobre una zona de alto riesgo de brote de TB bovina, no lograron aislamiento de *M. bovis* sobre 317 ejemplares muestreados (Delahay *et al.*, 2007). Se considera a esta especie como muy resistente a la enfermedad ya que la inoculación experimental con dosis altas de *M. bovis* no produce desarrollo de lesiones (Francis1958 citado por Little

et al., 1982 y Delahay *et al.*, 2002) El carácter no progresivo de la enfermedad en esta especie, hace de la misma un hospedador poco probable de transmitir la infección a otras ratas o especies de animales, siendo poco probable que ocurra la excreción de *M. bovis* (Little *et al.*, 1982). La prevalencia obtenida en ratas en el presente trabajo parecería elevada comparada a los trabajos expuestos, pero se debe considerar que el número de individuos atrapados fue bajo, posiblemente por cuestiones de competencia en los sitios de captura con otra especie muy abundante como la comadreja.

El hallazgo de la infección en uno de los dos zorros capturados es coincidente con otros trabajos del Reino Unido, en los que también se obtuvo *M. bovis* de zorros colorados (*Vulpes vulpes*). En estos casos los aislamientos de *M. bovis* se obtuvieron siempre a partir de linfonódulos como los faríngeos, mediastínicos, bronquiales y mesentéricos, los cuales en su gran mayoría eran SLV (Little *et al.*, 1982; Delahay *et al.*, 2002; Delahay *et al.*, 2007). El aislamiento de *M. bovis* en zorros colorados (*Vulpes vulpes*) junto con otros carnívoros como coyotes (*Canis latrans*), mapaches (*Procyon lotor*) y osos negros (*Ursus americanus*) fue reportados en USA (Bruning-Fann *et al.*, 2001 y 1998). Las lesiones compatibles con tuberculosis solo fueron observadas en nódulos linfáticos mesentéricos y en pulmón de unos pocos ejemplares, SLV en la gran mayoría de los animales investigados (Bruning-Fann *et al.*, 2001). El único caso de lesiones diseminadas en esta especie se reporta en un ejemplar de zorro colorado (*Vulpes vulpes*) en el sur de España (Millán *et al.*, 2008). La actividad de consumir carroña de todos estos animales, hace que la vía principal por la que ingresa la infección sea la vía digestiva, al consumir despojos de los animales reservorios de TB que se hallan presente en su medio ambiente (Little *et al.*, 1982; Delahay *et al.*, 2007; Bruning-Fann *et al.*, 2001; O'Brien *et al.*, 2006; Witmer *et al.*, 2010). Al ser esta la vía de entrada y a pesar no encontrarse lesiones macroscópicas en la mucosa intestinal, la vía digestiva puede

ser un vía de excreción de *M. bovis* en estos animales. Sin embargo y a pesar de la incertidumbre en el desarrollo de patologías esta especie de carnívoro junto con otras como hurones y armiños, no parecerían ser un riesgo para otras especies (Delahay *et al.*, 2007).

La baja cantidad de zorros obtenidos en el presente trabajo se debió a las dificultades que la captura de esta especie presenta en Argentina, donde el comercio de su cuero está prohibido (Sillero-Zubrin *et al.*, 2004). De esta manera no existe una actividad de caza legalizada de la especie, impidiendo de esta manera contar con la colaboración de cazadores, lo cual hubiera permitido realizar mayores observaciones y muestreos sobre piezas abatidas, logrando así determinar con mayor justeza el peso de la infección en la especie. Los datos poblacionales disponibles del zorro pampeano son pocos, estimándose entre 1,04 a 0,64 zorros por km² (Sillero-Zubrin *et al.*, 2004). Esta baja densidad poblacional, la baja susceptibilidad al desarrollo de lesiones al infectarse con *M. bovis* y los antecedentes de la especie enumerados en otros países, hacen que el zorro pampeano debería ser considerado como hospedador final de la infección, siendo muy limitada su capacidad de transmitir *M. bovis*.

Los aislamientos obtenidos en comadrejas (*Didelphis albiventris*) a partir de ganglios de la cabeza (6/10) y de pool de órganos como bazo, hígado y riñón (1/10), indicaría que la vía digestiva sería la principal vía por la cual las comadrejas adquieren la infección, estando en consonancia con su capacidad de alimentarse de carroña. Este hecho fue constado durante nuestro trabajo, cuando se colocaron trampas en proximidad de bovinos muertos y al analizar el contenido estomacal de los ejemplares capturados, se observó que algunos contenían abundantes restos de larvas de moscas (Dípteros) provenientes de esos cadáveres.

La localización en pulmón de *M. bovis* (3/10) indicaría que la vía aerógena también es una vía probable de entrada de la bacteria en esta especie, debiendo requerirse un estrecho contacto entre comadreja y el animal infectado excretor. La comadreja es un animal nocturno que merodea las instalaciones rurales de todo tipo en su búsqueda de alimento, la interacción con bovinos puede darse en estos espacios o bien en la proximidad de su hábitat. Para el caso de los rodeos lecheros seleccionados, estos lugares podrían ser las estrechas arboledas y pajonales que se ubican contiguos a los alambrados perimetrales de las pasturas, que los bovinos utilizan como sombra durante el día y reparo en la noche. Otra explicación posible para el aislamiento de *M. bovis* en pulmón de esta especie, puede deducirse de su comportamiento. Estos animales son principalmente solitarios y de carácter agresivo entre congéneres, siendo esta conducta bien pronunciada entre machos. Durante la época de celo las hembras suelen ser agresivas con los machos pero estos no responden la agresión (Gordon, 2004). Es probable que durante estos contactos ocurra la eliminación de aerosoles por parte de individuos afectados, trasladando de esta manera la infección a otro. En el presente trabajo las infecciones se detectaron mayoritariamente sobre los machos (7/10) y a estos correspondieron también la totalidad de los aislamientos en pulmón, aunque no se obtuvo una asociación significativa entre sexo y la ocurrencia de infección, probablemente debido al bajo número de aislamientos obtenidos. Un ejemplo de especie donde los machos presentan mayor prevalencia de infección que las hembras son los tejones (Corner *et al.*, 2008), estando relacionado a los enfrentamientos entre los individuos machos por la dominancia y defensa del territorio (Gallagher and Clifton-Hadley, 2000). Situación semejante ocurre con los machos de la especie possum (Morris *et al.*, 1994).

Esta ruta de los aerosoles se mostró muy eficaz para establecer la infección cuando se realizaron infecciones experimentales en comadrejas *Didelphis virginiana*, lográndose el desarrollo de lesiones, particularmente en pulmones (Fitzgerald *et al.*, 2003).

Esta susceptibilidad al *M. bovis* en comadrejas de Norteamérica fue comprobada también por otras vías como la digestiva e intramuscular (Diegel *et al.*, 2002). La eliminación de *M. bovis* fue evaluada en materia fecal, resultando que muy pocos animales eliminaban *M. bovis* por esta vía, independientemente de la ruta y dosis utilizada para establecer la infección (Diegel *et al.*, 2002; Fitzgerald *et al.*, 2003).

La no observación de LV a pesar de los aislamientos en varios individuos de comadrejas, haría suponer de una lenta evolución de la enfermedad cuando la infección ocurre naturalmente en la especie. La condición corporal de los individuos capturados y que resultaron con aislamiento de *M. bovis* fue buena, incluso en aquellos que presentaron parasitosis gastrointestinal. En forma similar la condición corporal como el comportamiento parecieron no estar afectados en las comadrejas *Didelphis virginiana* que desarrollaron lesiones en las inoculaciones experimentales, aunque estos animales no sobrepasaron los 90 días post-inoculación ya que fueron sacrificados (Fitzgerald *et al.* 2003). Debido a la semejanza entre ambas comadrejas *Didelphis virginiana* y *Didelphis albiventris*, ya que pertenecen al mismo género junto con varias especies más dentro del continente americano (Wilson and Reeder, 2005), es de esperar una susceptibilidad similar de la comadreja sudamericana *Didelphis albiventris* al *M. bovis*. Se considera a *Didelphis virginian* como un probable hospedador circunstancial o “spillover hosts” de *M. bovis* y que si bien puede ser un potencial reservorio, no jugaría un rol mayor en la transmisión del organismo a los ciervos y bovinos (Diegel *et al.*, 2002, Fitzgerald *et al.* 2003). Respecto a este posible rol de las comadrejas americanas del Género *Didelphis* , en el presente trabajo seis individuos de comadreja con aislamiento de *M. bovis*

correspondieron a los dos establecimientos que registraron reinfección, revelando 3,79 veces más riesgo de aislamiento de *M. bovis* en la fauna silvestre capturada dentro de estos predios, que de aquellos que no habían efectuado saneamiento. Estos resultados se deben analizar a la luz de que ambos rodeos realizaron tareas de saneamiento aplicando las normativas vigentes del SENASA (SENASA 1999). Sin embargo no se puede asegurar que estos rodeos hayan procedido correctamente en el saneamiento, ya que no estuvieron supervisados oficialmente. Por ejemplo las reinfecciones se podrían deber a la demora en el descarte de los reaccionantes positivos, no haber utilizado sustituto lácteo en la crianza de terneros y por no realizar un control estricto de ingresos de bovinos (vaquillonas de reposición).

Los spoligotipos obtenidos en los dos aislamientos realizados de bovinos (Spo 21 y 98), no se correspondieron con los aislados en los animales silvestres. Esto es explicable debido a las pocas oportunidades que se tuvo de realizar necropsias en los bovinos y obtener de esta manera material para cultivo. El uso de hisopados nasales como método para obtener aislamientos de bovinos vivos reconocidos como positivos a la PT, no se mostró competente para tal fin por lo menos en este trabajo. De existir en Argentina un sistema nacional de vigilancia epidemiológica para TBb en frigorífico, nos hubiera permitido obtener mayores datos sobre la enfermedad presente en los rodeos seleccionados y contar con buena cantidad de aislamientos de *M. bovis* por rodeo y poder así relacionarlos con los obtenidos en los animales silvestres de cada uno de ellos. Ambos spoligotipos han sido previamente detectados en aislamientos de bovinos en Argentina, siendo el spoligotipo 21 el segundo en frecuencia a nivel nacional (Zumárraga, *et al.* 1999).

Los patrones de spoligotipos 34 (5/12) y 12 (5/12) de *M. bovis* obtenidos de nueve ejemplares de comadreas y en la rata, también registran numerosas notificaciones de

aislamiento en los bovinos de Argentina, encabezando este ranking el spo 34 que agrupa al 45% de los mismos (Zumárraga *et al.*, 1999, Cataldi *et al.*, 2002). En la provincia de Santa Fe, estos ocupan el primer y tercer lugar en frecuencia de aislamientos sobre bovinos (Zumárraga, comunicación personal). El spoligotipo 96 obtenido del zorro es el segundo aislamiento registrado en el país ya que el primero fue realizado sobre un puma (*Puma concolor puma*) en cautiverio (Traversa comunicación personal). Por otra parte éste se diferencia del spoligotipo 12 por la ausencia de un sólo espaciador (el n° 35) estando ambos patrones relacionados en un 98,6% (Figura 1). Esto sería un posible indicador que a través de un reordenamiento de la región DR el spoligotipo 12 habría sido el precursor del spoligotipo 96, que se habría originado mediante la pérdida del espaciador 35. Cabe destacar que según la teoría evolutiva de las micobacterias del Complejo *M. tuberculosis* propuesta por Brosh y col., (2002) la misma habría sido unidireccional en el sentido de pérdida de material genético en forma progresiva. En el mismo marco evolutivo, el spoligotipo 98 habría derivado del spo 34 por la pérdida del espaciador 23. Tanto el spo 21 como el 34 predominan en los países, como Argentina, que fueron importadores de razas británicas desde fines del siglo XIX (Cataldi *et al.*, 2002; Smith *et al.*, 2011). El spoligotipo 122 obtenido de una comadreja es un patrón único y exclusivo tanto de hospedador como de país (Argentina), porque hasta el momento no hay registro de habérselo detectado en otra especie o país, no estando registrado en la base de datos internacional <http://http://www.mbovis.org> (diseñado y conducido por Noel Smith y Rainer Hilscher, ubicado en el servidor de University of Sussex). Este spoligotipo se diferencia del spo 21 por la ausencia de los espaciadores 22, 28 y 29.

Esta correlación entre los spoligotipos circulantes en los bovinos de Argentina y los obtenidos en los animales silvestres objeto de captura, indica claramente el pasaje de la

infección de estos a las especies silvestres en una de las zonas lecheras más importante de la Argentina.

9- Conclusiones

9-1 Las especies *Didelphis alvibentris*, *Pseudalopex gymnocercus* y *Ratus norvegicus* son susceptibles a adquirir la infección de *M. bovis*, en la región geográfica relevada y en presencia de rodeos bovinos con alto nivel de infección.

9-2 La presencia de spoligotipos en fauna silvestre detectados previamente en bovinos, demuestra la transmisión de *M. bovis* desde este hacia los otros hospedadores

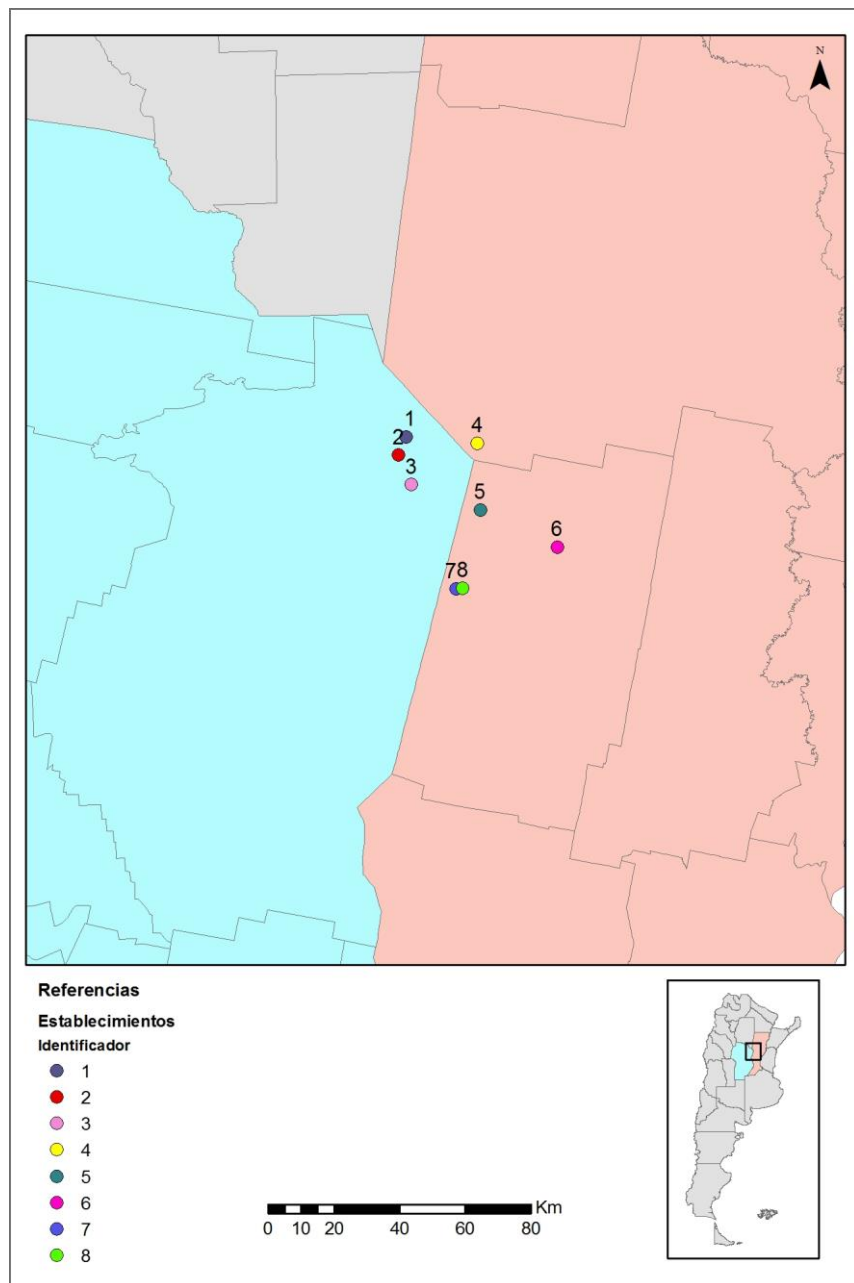
9-3 La detección de un spoligotipo único y exclusivo obtenido de un aislamiento de *M. bovis* de una comadreja podría ser un patrón de baja circulación entre los animales susceptibles de Argentina o bien correspondería a una cepa de *M. bovis* exclusiva en esta especie.

9-4 Dada la elevada prevalencia de infección por *M. bovis* hallada en *Didelphis alvibentris*, se deberían realizar estudios complementarios referidos a como la enfermedad afecta a la especie, es decir al desarrollo de lesiones y su localización, vías de eliminación de *M. bovis*, sexo, edad, conducta y que influencia podría tener la infección sobre las poblaciones de la especie.

9-5 En los estadios finales de la erradicación de la TB en rodeos infectados, se debería considerar la posibilidad de realizar tareas de despoblamiento de especies como *Didelphis alvibentris*, de esta manera se lograría una mayor seguridad en la erradicación del *M. bovis* del medio ambiente.

10- Imágenes, tablas y figuras

Imagen 1: Ubicación de los rodeos lecheros donde se realizaron las capturas de animales silvestres



10- Imágenes, tablas y figuras

Total de Capturas	Machos	Hembras	Presencia de lesión macroscópica	Aislamiento de <i>M. bovis</i>	Cantidad de individuos afectados/sexo	Sitio anatómico del aislamiento	Spoligotipo de <i>M. bovis</i> / frecuencia de aislamiento
13	7	6	no	-	-	-	-
8	4	4	no	-	-	-	-
2	1	1	no	-	-	-	-
17	7	10	no	si	1 ♀	pulmón	12 (1)
2	2		no	-	-	-	-
10	7	3	no	-	-	-	-
78	37	41	no	si	7 ♂ 3 ♀	nódulos linfáticos de cabeza y carcasa; pulmón, pool de hígado, bazo y riñón	12 (4), 34 (5) y 122 (1)
9	6	3	no	-	-	-	-
2	1	1	no	si	1 ♂	nódulo mesentérico	96 (1)
1	-	1	no	-	-	-	-
4	3	1	no	-	-	-	-
146	75	71	-	-	12	-	-

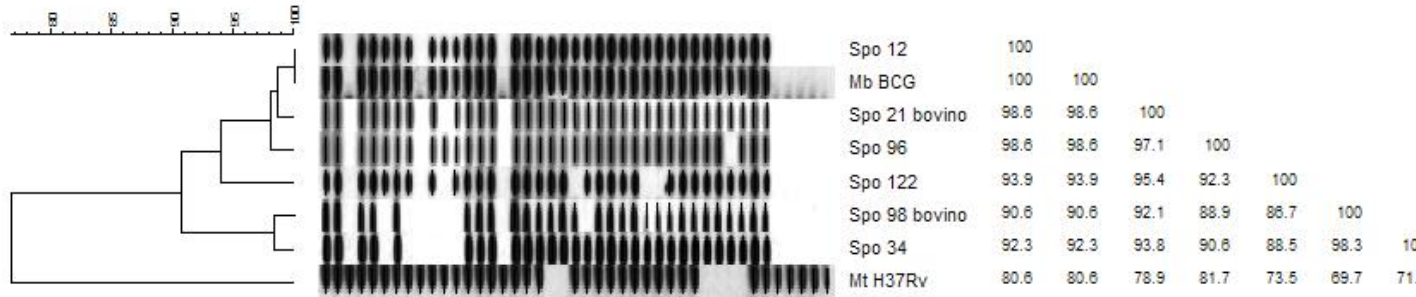
Tabla 1: detalle de las especies silvestres capturadas, sexo, aislamiento de *M. bovis*/ spoligotipos, sitio anatómico de los aislamientos obtenidos.

Rodeo	Existencia de bovinos/ % de bovinos positivos a TAC	Aislamiento en fauna silvestre/cantidad/especie	Necropsia de bovinos/ inspección frigorífico	Lesiones macroscópicas compatibles con TB en bovinos	Hisopados nasales	Aislamiento en bovinos	Spoligotipos aislados en bovinos
1	115 vacas en lactancia/ 21,8 %	no	no	-	si	no	-
2	85 vacas en lactancia 60,6 %	Si (3/ <i>Didelphys albiventris</i>)	Si - necropsia	si	si	no	-
3	74 vacas en lactancia 81 %	no	no	no	-	-	-
4	96 vacas en lactancia 29 %	Si (1/ <i>Pseudalopex gymnocercus</i>)	Si - necropsia	no	si	no	-
5	220 vacas en lactancia 4 % Reinfección	Si (3/ <i>Didelphys albiventris</i>)	Si - frigorífico	si	no	si	21
6	116 vacas en lactancia 13 %	Si (1/ <i>Ratus norvegicus</i>)	Si - necropsia	no	si	no	-
7	130 vacas en lactancia 2 % Reinfección	Si (3/ <i>Didelphys albiventris</i>)	no	no	si	no	-
8	68 vacas en lactancia 7,3 %	Si (1/ <i>Didelphys albiventris</i>)	Si - necropsia	si	no	si	98

Tabla 2: detalle de los rodeos bovinos donde se realizaron las capturas de animales silvestres, respecto existencia de vacas en lactancia la prevalencia de infección, aislamientos de *M. bovis* en animales silvestres, realización de necropsias/observación de lesiones, hisopados nasales para obtención y aislamiento/spoligotipo de cepas obtenidas en bovinos.

Figura 1: Dendrograma y matriz de similitud que muestran la relación entre los spoligotipos de *M. bovis* aislados de los animales silvestres y de los bovinos y las cepas de referencia *M. bovis* BCG y *M. tuberculosis* H37Rv.

Dice (Opt:1.00%) (Tol:1.1%-1.1%) (H>0.0% S>0.0%) [0.0%-100.0%]
 Spoligotyping_43



Variable	Aislamientos en animales silvestres		OR	P
	M. bovis +	M. bovis -		
Sexo de comadreja				
Macho	7	30	2,96 (0,70-12,41)	0,18
Hembra	3	38		
Prevalencia de infección en el rodeo de vacas				
<10%	7	46	0,373 (0,112-1,242)	0,097
>10%	5	88		
Tamaño del rodeo de vacas				
<100 vacas	5	72	1,626 (0,491-5,381)	0,422
>100 vacas	7	62		
Rodeos con reinfección vs. Infección estable				
R. con reinfección	6	28	0,264 (0,079-0,882)	0,0264
R. con infección estable	6	106		

Tabla 3: detalle de asociaciones de factores de riesgo realizadas a partir de los aislamientos en fauna y datos de rodeos.

Comentado [W2]: tabla nueva

11- Anexo

Técnicas Moleculares

Spoligotyping

Esta técnica se lleva a cabo en tres pasos básicos que consisten en:

- 1) La región DR es amplificada por PCR, utilizando uno de los oligonucleótidos iniciadores biotinilado. Como los iniciadores pueden hibridarse en DR contiguos o distantes, los productos de la amplificación son de tamaño diferente.
- 2) Los productos amplificados son hibridados a los oligonucleótidos espaciadores, que se encuentran fijados covalentemente en la membrana de nylon y dispuestos en forma paralela entre sí. Como el sentido de siembra del producto de PCR es perpendicular al que se encuentran dispuestos estos oligonucleótidos, en caso de haber hibridación, ésta se caracteriza por ser puntiforme.
- 3) Detección de la hibridación por quimioluminiscencia y revelado por autorradiografía.

Amplificación por PCR de la región DR

Secuencia de los oligonucleótidos iniciadores utilizados en la amplificación de la región DR

Nombre	Secuencia 5' - 3'	Blanco	Producto tamaño (pb)	Fuente
DRa	GGTTTTGGGTCTGACGAC, biotinilado en el extremo 5'	DR	Variable	Kamerbeek <i>et al.</i> , 1997
DRb	CCGAGAGGGGACGGAAAC			

Mezcla de reacción

La mezcla para la amplificación de la región DR consiste en : buffer (Tris-HCl 10 mM, pH 9,0; KCl 50 mM, y Tritón X-100 al 0,1%), 2 mM de MgCl₂, 0,2 mM de cada dNTP, 20 pmoles de cada iniciador (DRa- DRb), 10ng de templado y 1,25U de Taq Polimerasa, en un volumen final de 50µl.

Programa de amplificación de la región DR

Desnaturalización inicial	Ciclos			Extensión final	Conservación
	Desnaturalización	Hibridación	Extensión		
96°C 3 min.	96°C 1 min.	55°C 1 min.	72°C 30 seg.	72°C 8 min.	4° C ∞
	30 ciclos				

Hibridación de los productos de PCR y detección

- a) Lavar la membrana filtro a 60 °C durante 5 min. en 250 mL de SSPE 2x/SDS 0,1%.
- b) Ubicar la membrana en el miniblottter, de tal manera que los espaciadores queden perpendiculares a la siembra de los productos amplificados.
- c) Agregar 20 µL de los productos de PCR a 150 µL de SSPE 2x /SDS 0,1%
- d) Desnaturalizar por calentamiento a 100°C durante 10min. y enfriar rápidamente en hielo.
- e) Quitar por aspiración el buffer residual contenido en el miniblottter.
- f) Llenar las ranuras con los productos de PCR diluídos y desnaturalizados (evitando la formación de burbujas) e hibridar a 60 °C en horno durante 1 hora.
- g) Aspirar las muestras y quitar la membrana.
- h) Lavar la membrana dos veces en 250 mL de SSPE2x /SDS 0,5% durante 10 min. a 60 °C.
- i) Dejar enfriar la membrana, ubicarla en una botella, e incubar con estreptavidina peroxidasa (1:4000) en SSPE2x /SDS 0,5% durante 40-60 min. a 42°C con rotación constante en horno de hibridación
- j) Lavar la membrana dos veces en 250 mL de SSPE 2x / SDS 0,5% durante 10 min. a 42°C.

k) Lavar la membrana dos veces en 250 mL de SSPE 2x durante 5 min. a temperatura ambiente.

l) Incubar la membrana durante 1 min. con el reactivo de quimioluminiscencia (20 mL de ECL Amersham Biosciences).

m) Cubrir la membrana con un nylon transparente y exponerla a un film (X-Ray) sensible en un cassette durante 5min.

n) Revelar el film en cuarto oscuro.

Deshibridación de la membrana

Para poder utilizar la membrana nuevamente es necesario remover los productos de PCR que se hibridaron a la misma. Este paso es fundamental para lograr un máximo rendimiento de la membrana (puede utilizarse hasta 20 veces aproximadamente).

a) Lavar la membrana dos veces por incubación en 1 litro de SDS 1% a 80 °C durante 30 min.

b) Lavar la membrana en 250 mL de EDTA 20 mM pH 8, durante 15 min. a temperatura ambiente.

c) Conservar la membrana a 4 °C (sellada con nylon para evitar que se deshidrate) hasta que se utilice nuevamente.

El análisis de los patrones de hibridación se realizó con ayuda del programa BioNumerics (Applied Maths, Bélgica).

Los insumos utilizados para llevar a cabo la técnica fueron provistos por la firma Ocimum Biosolutions, India.

11- Referencias Bibliográficas

Abdala, A.A.; Tarabla, H.D.; Bertero, S.; Torres, P. Vigilancia Epidemiológica de la Tuberculosis Bovina en el Depto. Castellanos, Santa Fe 1999. Revista de Medicina Veterinaria 80, 357-360.

Abdala, A. A.; Tarabla, H. D.; Bertero, S 2002. Estimación de la prevalencia de tuberculosis bovina en rodeos lecheros del departamento Las Colonias, Santa Fe. Revista FAVE - Ciencias Veterinarias 1, 13 –20.

Abdala, A.A.; Tarabla, H.D. 2004. Prevalencia de tuberculosis bovina en el Depto. San Justo (Provincia de Córdoba, Argentina) según información obtenida en frigoríficos. Veterinaria Argentina 21, 21-29.

Alexander, A. K., Laver, P., Michel, A. L., Williams, M., van Helden, P. D., Warren, R. and Gey van Pittius, N. C. 2010. Novel *Mycobacterium tuberculosis* complex pathogen, *M. mungi*. Emerging Infectious Diseases 16, 1296-1299.

Animaldiversity,2011.

http://animaldiversity.ummz.edu/site/acounts/information/Trichosurus_vulpec

Accedido marzo de 2011.

Aranaz, A. de Juan, L., Montero, N., Sánchez, C., Galka, M., Delso, C., Álvarez, J., Romero, B., Bezos, J., Vela, A. I., Briones, V., Mateos, A., Domínguez, L. 2004. Bovine tuberculosis (*Mycobacterium bovis*) in wildlife in Spain. Journal Clinical Microbiology 42, 2602-2608.

Arkive, 2011.

<http://www.arkive.org/common-brushtail-possum/trichosurus-vulpecula>.

Accedido enero de 2011.

Badger at Animal Corner 2011, Badger

<http://animalcorner.co.uk/britishwildlife/badger.html> Accedido enero de 2011.

Badger Trust 2011, The Eurasian Badger (*Meles meles*),
<http://www.badger.org.uk> Accedido enero de 2011.

Barrow, P. A. and Gallagher, J. 1981. Aspects of epidemiology of bovine tuberculosis in badger and cattle. I. The prevalence of infection in two wild animal populations in south-west England. *The Journal of Hygiene* 86, 237-245.

Bernardelli, A., Franceschi, G. Costa, E.; Sanguinetti, R., Torres, P. Pianovi, C., Idiart, J. 1994. Enzootia tuberculosa en terneros de crianza artificial. Descripción de un foco. *Revista de Medicina Veterinaria* 75, 251-254.

Bernardelli, A.; Zumárraga, M.; Alonso, B.; Cataldi, A. Y Sanguinetti, R. 2004. Tuberculosis en fauna salvaje. XIX Congreso Panamericano de Ciencias Veterinarias. Octubre 24-28, 2004 Buenos Aires, Argentina.

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.

Bruning-Fann, C. S, Schmitt, S. M, Fitzgerald, S. D., Payeur, J. B., Whipple, D.L., Cooley, T.M., Carlson, T., Friedrich, P. 1998. *Mycobacterium bovis* in coyotes from Michigan. *Journal of Wildlife Diseases* 34, 632-636.

Bruning-Fann C.S., Schmitt, S. M., Fitzgerald, S. D, Fierke, J. S., Friedrich, P. D., Kaneene, J. B., Clarke, K. A., Butler, K. L., Payeur, J. B., Whipple, D. L., Cooley, T. M., Miller, J. M., Muzo, D. P. 2001. Bovine tuberculosis in free-ranging carnivores from Michigan. *Journal of Wildlife Diseases* 37, 58-64.

Buddle, B. M., Aldwell, F. E., Pfeffer A., de Lisle, G. W. 1994. Experimental *Mycobacterium bovis* infection in the brushtail possum (*Trichosurus vulpecula*): pathology, haematology and lymphocyte stimulation responses. *Veterinary Microbiology*, 38, 241-254.

Buddle, B. M., McCarthy, A. R., Ryan, T. J., Pollock, J. M., Vordermeier, H. M., Hewinson, R. G., Andersen, P., de Lisle, G. W. 2003. Use of mycobacterial peptides and recombinant proteins for the diagnosis of bovine tuberculosis in skin test-positive cattle. *Veterinary Record* 153, 615-20.

Buddle, B. M., Livingstone, P. G., Lisle, G. W. 2009. Advances in ante-mortem diagnosis of tuberculosis in cattle. *New Zealand Veterinary Journal* 57 4, 173-180.

Butcher, P. D.; Hutchinson, N. A.; Doran, T. J. And Dale, J.W. 1996. The application of molecular techniques to the diagnosis and epidemiology of mycobacterial diseases. *Journal of Applied Bacteriology* 81, 53S-71S.

Caimi, K. Romano, M. L., Alito, A., Zumárraga, M. Bigi, F. and Cataldi, A. 2001. Sequence analysis of the direct repeat region in *Mycobacterium bovis*. *Journal Clinical Microbiology* 39, 1067-1072.

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??. *Revista Argentina de Microbiología*. 34, 1-6.

Cleaveland, C., Mlengeya, T., Kazwala, R. R., Michel, A., Kaare, M. T., Jones, S. L., Eblate, E., Shirima, G. M., and Parcker, C. 2005. Tuberculosis in Tanzanian Wildlife. *Journal of Wildlife Diseases* 41, 446-453.

Clifton-Hadley, R. S., Wilesmith, J. W., Stuar, F. A. 1993. *Mycobacterium bovis* in the European badger (*Meles meles*): epidemiological findings in tuberculous badger from a naturally infected populations. *Epidemiology Infection* 111, 9-19.

Clifton-Hadley R. S.; Wilesmith, J. W.; Richards, M. S.; Upon, P. & Johnston, S. (1995) The occurrence of *Mycobacterium bovis* infection in cattle in and around an area subset to extensive badger (*Meles meles*) control. *Epidemiology Infection* 114, 179-193.

Coleman, J. D., Cooke, M. M. 2001. *Mycobacterium bovis* infection in wildlife in New Zealand. Tuberculosis 81, 191-202.

Coleman, J. D., Jackson, R., Cooke, M. M. Grueber L. 1994. Prevalence and spatial distribution of bovine tuberculosis in brushtail possums on a forest-scrub margins. New Zealand Veterinary Journal.42, 128-132.

Corner, L. A. L. 2006. The role of wild animal populations in the epidemiology of tuberculosis in domestic animals: How to assess the risk. Veterinary Microbiology 112, 303-312.

Corner, L. A. L., Clegg, T. A., More, S. J., Williams, D. H., O'Boyle I., Costello, E., Sleeman, D. P., Griffin, J. M. 2008. The effect of varying levels of population control on the prevalence of tuberculosis in badgers in Ireland. Research in Veterinary Science 85, 238-249.

Corner, L. A. L., Murphy, D. and Gormley, E. 2011. *Mycobacterium bovis* Infection in the Eurasian Badger (*Meles meles*): the Disease, Pathogenesis, Epidemiology and Control. Journal of Comparative Pathology 144, 1-24.

Corner, L.A. and Presidente, P. J. A. 1981. *Mycobacterium bovis* infection in the brush-tailed possum (*Trichurus vulpecula*): II comparison of experimental infections with an Australian cattle strain and New Zealand possum strain. Veterinary Microbiology 6, 351-366.

Dean, G. S., Rhodes, S. G., Coad M., Whelan, A. O., Cockle, P. J., Clifford, D. J. Hewinson, R. G. and Vordermeier H. M. 2005. Minimum Infective Dose of *Mycobacterium bovis* in Cattle. Infection And Immunity 73, 6467-6471.

Defra. Bovine TB: The Scientific Evidence. Final Report of the Independent Scientific Group on Cattle TB 2007.

http://www.defra.gov.uk/foodfarm/farmanimal/disease/atoz/tb/isgreport/final_report.pdf

Accedido enero de 2011.

Delahay, R. J.; De Leeuw, A. N. S.; Barlow, A. M.; Clifton-Hadley, R. S. and Cheeseman, C. L. 2002. The status of *Mycobacterium bovis* infection in UK Wild mammals: A review. *The Veterinary Journal* 164, 90-105.

Delahay, R. J., Smith, G. C., Barlow, A. M., Walker, N., Harris, A., Clifton-Hadley R. S., Cheeseman, C. L. 2007. Bovine tuberculosis infection in wild mammals in the South-West region of England: A survey prevalence and semi-quantitative assessment of the relative risks to cattle. *The Veterinary Journal* 173, 287-301.

De la Rúa-Domenech, R., Godchild, A.T., Vordemeier, H. M., Hewinson, R. G., Christiansen, K. H., Clifton-Hadley R. S. 2006. Ante mortem diagnosis of tuberculosis in cattle: A review of the tuberculin tests, γ -interferon assay and other ancillary diagnostic techniques. *Research in Veterinary Science* 81, 190-210.

de Lisle, G.W.; Mackintosh, C.G.; and Bengis, R.G. 2001. *Mycobacterium bovis* in free-living and captive wildlife, including farmed deer. *Revue Scientifique et Technique (International Office of Epizootics)* 20, 86-111.

de Lisle, G.W.; Bengis, R.G.; Schmitt, S.M. and O'Brien D.J. 2002. Tuberculosis in free-ranging wildlife: detection, diagnosis and management. *Scientifique et Technique (International Office of Epizootics)* 21, 371-334.

De Vos, V., Bengis, R. G., Kriek, N. P., Michel, A., Keet, D. F., Raath, J. P., Huchzermeyer, H. F. 2001. The epidemiology of tuberculosis in free-ranging African buffalo (*Syncerus caffer*) in the Kruger National Park, South Africa. *The Onderstepoort Journal of Veterinary Research* 68, 119-130.

Dewey, T. and Animal Diversity Web Staff 2003. "*Odontocampus virginianus*" Animal Diversity Web
[Http://animaldiversity.ummz.umich.edu/site/accounts/information/odontocampus_virginianus.sh](http://animaldiversity.ummz.umich.edu/site/accounts/information/odontocampus_virginianus.sh) Accessed 23/3/2011.

Diegel, K. L., Fitzgerald, S. D., Berry, D. E., Church, S. V., Reed, W. M. Sikarskie, J. G. and Kaneene, J. B. 2002. Experimental inoculation of north American opossums (*Didelphis virginiana*) with *Mycobacterium bovis*. Journal of Wildlife Disease 38, 275-281.

Doherty, M.L., Bassett, H.F., Quinn, J. P., Davis, W.C., Kelly, A.P. & Monaghan M. L. 1996. A sequential study of bovine tuberculin reaction. Immunology 87, 9-14.

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. Journal of Clinical Microbiology 42, 5 2234–2238.

Fend, R.; Geddes, R.; Lesellier, S.; Vordermeier, M. H.; Corner, L. A. L.; Gormley, E.; Costello, E.; Hewinson, R. G.; Marlin, D. J.; Woodman, A. C. and M. A. Chambers 2005. Use of an Electronic Nose To Diagnose *Mycobacterium bovis* Infection in Badgers and Cattle. Journal of Microbiology 43, 1745-1751.

Fend, R.; Kolk, A. H. J.; Bessant, C.; Buijtels, P.; Klatser, P. R. and Woodman, A. C. 2006. Prospects for Clinical Application of Electronic-Nose Technology to Early Detection of *Mycobacterium tuberculosis* in Culture and Sputum. Journal of Microbiology 44, 2039-2045.

Fitzgerald, S. D., Zwick, L. S., Diegel, K. L., Berry, D. E., Church, S. V., Sikarskie, J. G. Kaneene, J. B. and Reed, W. M. 2003. Experimental Aerosol Inoculation of *Mycobacterium bovis* in North American Opossums (*Didelphis virginiana*). Journal of Wildlife Disease, 39 418-423.

Flamand, J. R. B. ; Greth, A. Haagsma, J. Griffin, F. 1994. An outbreak of tuberculosis in captive herd of Arabian oryx (*Oryx leucoryx*) diagnosis and monitoting. Veterinary Record 134, 115-118.

Gallagher J.; Clifton-Hadley, R.S. 2000. Tuberculosis in badger; a review of the disease and its significiance for other animals. Research in Veterinary Science 69, 203-217.

Gannon B W., Hayes, C. M. Roe, J. M. 2007. Survival rate of airborne *Mycobacterium bovis*. Research in Veterinary Science 82, 169-172.

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. J., Cole, S. T., Gordon S. V. and Hewinson, R. G. 2003. The complete genome sequence of *Mycobacterium bovis*. The national Academy of Sciences USA 100, 7877-7882.

Gavier-Widen, D., Chambers M. A., Palmer, N. Newell, D. G., Hewinson R. G. 2001. Pathology of natural *Mycobacterium bovis* infection in European badgers (*Meles meles*) and its relationship with bacterial excretion. Veterinary Record 148, 299-304.

Gavier-Widen, D. Cooke, M. M., Gallagher, J. Chambers, M. A. and Gortázar, C. 2009. A review of infection of wildlife host with *Mycobacterium bovis* and the diagnostic difficulties of the “no visible lesion” presentation. New Zealand Veterinary Journal 57, 122-131.

Gordon, C. (2004). *Didelphis albiventris* (On line), Animal DiversityWeb. http://animaldiversity.ummz.umich.edu/site/accounts/information/didelphis_albiventris.html. Accedido 22/10/11.

Gortazar, C., Vicente, J., Samper, S., Garido, J. M. Fernández-de-Mera, I. G., Gavin, P., Juste, R. A., Martín, C., Acevedo, P., De La Puente, M., Höfle, U. 2005. Molecular characterization of *Mycobacterium tuberculosis* complex isolates from wild ungulates in south-central Spain. Veterinary Research 36, 43-52.

Grange, J. 1996. M. The biology of the genus *Mycobacterium*. Journal of Applied Bacteriology Symposium Supplement 81, 1S-9S.

Griffin, J. E. T. and Mackintosh, C. G. 2000. Tuberculosis in deer: Perceptions, Problems and Progress. The Veterinary Journal 160, 202-219.

Griffin, J. M., Williams, D. H., Kelly, G. E., Clegg, T. A., O'Boyle, I., Collins, J. D., More, S. J. 2005. The impact of badger removal on the control of tuberculosis in cattle herds in Ireland. *Preventive Veterinary Medicine* 67, 237-266.

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. *Molecular Microbiology* 10, 1057-1065.

Harboe, M. and Nagai, S. 1984. MPB70 a unique antigen of *Mycobacterium bovis* BCG. *The American Review of Respiratory Disease* 129, 444-452.

Hardie, R. M. and Watson J. M. 1992. *Mycobacterium bovis* in England and Wales: past, present and future. *Epidemiology and Infection* 109, 23-33.

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. *Infection and Immunity* 59, 2695-2705.

Jenkins, H. E., Morrison, W. I., Cox, D. R., Donnelly, C. A., Jhonston, W. T., Bourner F. J., Clifton-Hadley, R.S., Gettinby, G., McInerney, J. P., Watkins, G. H. and Woodroffe, R. 2008. The prevalence, distribution and severity of detectable pathological lesions in badger naturally infected with *Mycobacterium bovis*. *Epidemiology Infection* 136, 1350-1361.

Jorge, M.C. , Alito, A., Bernardelli, A. Canal, A. Cataldi, A, Cicuta, M. Gentile, F., Kistermann, J., Magnano, G. Martinez Vivot, M., Orinai, S. Paolicchi, F. , Pérez, A. Rictacco, V., Romano, M. Scheneider, M. y Torres, P. 2005. Asociación Argentina de Veterinarios de Diagnóstico (AAVLD) Manual de Diagnóstico de Micobacterias de Importancia en Medicina Veterinaria. Argentina, 132 pp.

Kamerbeek, J., Schouls, L., Koll, A., Van Agterveld, M., Van Soolingen, D., Kuijper, S., Bunschoten, A., Molhuizen, H., Shaw, R., Goyal, M., and Van Embdem, J. 1997. Simultaneous detection and strain differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* for diagnosis and epidemiology. *Journal of Clinical Microbiology*. 35, 907-914.

Kantor I. N., Bioch D, and Roswurm J. D., 1978. Mycobacterium isolated from nasal secretions of tuberculin test reactor cattle. *American Journal of Veterinary Research* 39, 1233-1238.

Kantor, I., Odeón, A. C., Stefan, P. E., Auza, M. J., Madrid, C. R. and Marchevky N. 1984. Sensitivity of cervical and cudal fold tuberculin test with *Mycobacterium bovis* in infected cattle of Argentina. *Revue Scientifique et Technique (International Office of Epizootics)* 3, 137-150.

Kantor, I. N.; de la Vega E.; Bernardelli A. 1984. Infección por *Mycobacterium bovis* en liebres en la Provincia de Buenos Aires. *Revista Argentina de Medicina Veterinaria*, 65, 268-270.

Kantor, I. N.; Ritacco, V. 2006. An update on bovine tuberculosis programmes in Latin American and Caribbean countries. *Veterinary Microbiology* 112, 111-118.

Kantor, I. N.; Ambroggi M; Poggi, S.; Morcillo, N.; Da Silva Trilles, M. A.; Osorio Ribeiro, M.; Garzón Torres, M. C.; Llerena Polo, C.; Ribón, W.; García, V.; Kuffo, D.; Asencios, L.; Vasquez Campos, L. M.; Rivas, C.; de Wasrd, J. H. 2008. Tuberculosis 88, 358-365.

Keet, D. F., Kriek, N. P., Penrith, M. L., Michel, A., Huchzermeyer H. 1996. Tuberculosis in buffaloes (*Syncerus caffer*) in the Kruger National Park: spread of the disease to other species. *Onderstepoort Journal Veterinary Research* 63, 239-244.

Keet, D. F., Kriek, N. P., Bengis, R. G. Michel A. L. 2001. Tuberculosis in kudus (*Tragelaphus strepsiceros*) in the Kruger National Park. *Onderstepoort Journal Veterinary Research* 68, 225-230.

Krebs J R, 1997. Report by de Independent Scientific Review group on TB in Cattle and Badger. Executive summary.

[Http://www.defra.gov.uk/foodfarm/farmanimal/disease/atoz/tb/publications/krebs.htm](http://www.defra.gov.uk/foodfarm/farmanimal/disease/atoz/tb/publications/krebs.htm).

Accedido 21/01/2011.

Little, T. W. A., Swan, C., Thompson, H. V. and Wilesmith, J. W. 1982. *Journal of Hygiene, Cambridge* 89, 225-234.

Lugton, I W., Wobese, G., Morris, R. S., Caley P. 1997a. Epidemiology of *Mycobacterium bovis* infection in feral ferrets (*Mustela furo*) in new Zealand: I. Pathology and diagnosis. *New Zealand Veterinary Journal* 45, 140-150.

Lugton, I W., Wobese, G., Morris, R. S., Caley P. 1997b. Epidemiology of *Mycobacterium bovis* infection in feral ferrets (*Mustela furo*) in new Zealand: II. Routes of infection and excretion. *New Zealand Veterinary Journal* 45, 151-157.

Lyashchenko, K., Whelan, A. O., Greenwald, R. Pollock, J. M., Andersen, P. Hewinson, R. G., Vondermeier, H. M. 2004. Association of tuberculin-boosted antibody responses with pathology and cell-mediated immunity in cattle vaccinated with *Mycobacterium bovis* BCG and infected with *M. bovis*. *Infection and Immunity* 72, 2462-2467.

Martín-Hernando, M. P., Höfle, U., Vicente, J., Ruiz-Fons, F., Vidal, D., Barral, M. Garrido, J. M., de la Fuente, J., Gortazar, C., 2006. Lesions associated with *Mycobacterium bovis* complex infection in the European wild boar. *Tuberculosis* 87, 360-367.

McDonnell G. and Russell D. 1999 Antiseptics and desinfectants: Activity, Action, and Resistance. *Clinical Microbiology Reviews* 12, 147-179.

McIlory S.G.; Neill S. D.; McCracken R. M. 1986. Pulmonary lesions and *Mycobacterium bovis* excretion from respiratory tract of tuberculin reacting cattle. *Veterinary Record* 118, 718-721.

Michel, A. L., Bengis, R. G., Keet, D. F., Hofmeyr, M., de Klerk, L. M., Cross, P. C., Jolles, A. E., Cooper, D., Whyte, I. J., Buss, P., Godfroid, J. 2006. Wildlife tuberculosis in South African Conservation areas: Implications and challenges. *Veterinary Microbiology* 112, 91-100.

Michel, A. L., Coetzee, M. L. Keet, D. F., Maré, L., Warren, R. , Cooper, D.; Bengis, R. G., Kremer, K., van Helden, P. 2009. Molecular epidemiology of *Mycobacterium bovis* isolates from free-rangin wildlife in South African game reserves. *Veterinary Microbiology* 133, 335-343.

Millán, J., Jiménez, M. A., Viota, M., Candela, M. G., Peña, L and Vizcaíno, L. L. 2008. Disseminated Bovine Tuberculosis in a Wild Red Fox (*Vulpes vulpes*) in Southern Spain. *Journal of Wildlife Diseases* 44, 701-706.

Mills, J. N.; Chils, J.E.; Zsiazek, T.G.; Peters, C.J. 1995. Methods for trapping and sampling small mammals for virologic testing. CDC, Atlanta, pp.7-32.

Monaghan, M. L., Doherty, M. L., Collins, J. D., Kazda, J. F., Quinn, P. J. 1994. The tuberculin test. *Veterinary Microbiology* 40, 111-124.

Morris, R.S.; Pfeiffer, D.U.; Jackson, R. 1994. The epideiology of *Mycobacterium bovis* infections. *Veterinary Microbiology*. 40, 153-177.

Munyeme, M., Muma, J. B., Siamudaala, V. M., Skjerve, E., Munag`andu, H. M., Tryland, M. 2010. Tuberculosis in Kafue lechwe (*Kobus leche Kafuensis*) of the Kafue Basin in Zambia. *Preventive Veterinary Medicine* 95, 305-308.

Naranjo, V., Gortazar, C., Vicente, J., de la Fuente, J. 2008. Evidence of the role of European wild boar as a reservoir of *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Veterinary Microbiology* 127, 1-9.

Neill, S. D., Hanna, J. ; O' Brien, J. J. McCracken, R. M. 1988. Excretion of *Mycobacterium bovis* by experimentally infected cattle. *Veterinary Record* 123, 340-343.

Neill, S. D., Hanna, J., Mackie, D. P. and Bryson , T. D. G. 1992. Isolation of *Mycobacterium bovis* from the respiratory tracts of skin test-negative cattle. *Veterinary Record* 131, 45- 7.

Neill, S. D., Pollock J. M., Bryson , T. D. G. & Hanna, J. 1994. Pathogenesis of *Mycobacterium bovis* infection in cattle. *Veterinary Microbiology* 40, 41-52.

Neill, S. D., Skuce, R. A. & Pollock J. M. 2005. Tuberculosis – new light from an old window. *Journal of Applied Microbiology*. 98, 1261-1269.

Ngandolo BN, Müller B, Diguimbaye-Djaïbe C, Schiller I, Marg-Haufe B, Cagiola M, Jolley M, Surujballi O, Akakpo AJ, Oesch B, Zinsstag J. 2009. Comparative assessment of fluorescence polarization and tuberculin skin testing for the diagnosis of bovine tuberculosis in Chadian cattle. *Preventy Veterinary Medicine* 89, 81-9.

Nishi, J. S, Shury, T., Elkin, B. T. 2006. Wlidlfe reservoirirs for bovine tuberculosis (*Mycobacterium bovis*) in Canada: Strategies for management and research. *Veterinary Microbiology* 112, 325-338.

Nolan, A. and Wilesmith, J.W.1994. Tuberculosis in badgers (*Meles meles*). *Veterinary Microbiology* 40, 179-91.

O'Brien, D. J., Fitzgerald, S. D., Lyon, T. J., Butler, K. L., Fierke, J. S., Clarke, K. R., Schmitt, S. M., Cooley, T. M., Berry, D. E., 2001. Tuberculosis lesions in free-rangin white-tailed deer in Michigan. *Journal of Wildlife Diseases* 37, 608-613.

O'Brien, D. J., Schmitt, S. M., *et al.*, Fierke, J. S., Hogle, S. A., Winterstein S. R., Cooley, T. M., Moritz, W. E., Diegel, K.L., Fitzgerald, S. D., Berry, D. E., Kaneene, J.

B. 2002. Epidemiology of *Mycobacterium bovis* in free-ranging white-tailed deer, Michigan, USA, 1995-2000. Preventive Veterinary Medicine. 54, 47-63.

O'Brien, D. J., Schmitt, S. M., Fitzgerald, S. D., Berry, D. E., Hickling G. J. 2006. Managing the wildlife reservoir of *Mycobacterium bovis*: The Michigan, USA, experience. Veterinary Microbiology 112, 313-323.

OIE - World Organisation for Animal Health, 2004 Manual of Diagnostic Test and Vaccines for Terrestrial Animals, 5th edition Chapter 2.3.3. http://www.oie.int/eng/normes/mmanual/A_00054.htm. Accedido abril de 2007.

Ó Mártín, D., Williams, D. H., Griffin, J. M., Dolan, Eves, J.A. 1998. The effect of badger removal programme on the incidence of tuberculosis in Irish cattle population. Preventive Veterinary Medicine 34, 47-56.

O'Reilly, L.M.; Daborn, C.J. 1995. The epidemiology of *Mycobacterium bovis* infections in animals and man: a review. Tubercle Lung Dis. 76, 1-46.

Palmer, M. V.; Waters, W. R.; Whipple D. L. 2004. Investigation of the transmission of *Mycobacterium bovis* deer to cattle through indirect contact. American Veterinary Medical Association 11, 1483-1489.

Palmer, M V. 2007. Tuberculosis: a reemerging disease at the interface of domestic animals and wildlife. Current Topics in Microbiology and Immunology 315, 195-215.

Palmer, M.V. and Waters W. R. 2006. Advances in bovine tuberculosis diagnosis and pathogenesis: What policy makers need to know. Veterinary Microbiology 112, 18-190.

Parra, A., García, A., Inglis, N. F., Tato, A., Alonso, J. M., Hermoso de Mendoza, M., Hermoso de Mendoza J., Larrasa, J. 2006. An epidemiological evaluation of *Mycobacterium bovis* infections in wild game of the Spanish Mediterranean ecosystem. Research in Veterinary Science 80, 140-146.

Paterson B. M. and Morris R. S. 1995. Interactions between beef cattle and simulated tuberculous possums on pasture. *New Zealand Veterinary Journal* 43, 289-93.

Perez, A.M.; Ward, M. P.; Torres, P.; Ritacco, V., 2002. Use of spatial statistic and monitoring data to identify clustering of bovine tuberculosis in Argentina. *Preventy. Veterinary Medicine* 56, 63-74.

Phillips, C. J. C., Foster, C. R. W., Morris, P. A., Teverson, R. 2003. The transmission of *Mycobacterium bovis* infection to cattle. *Resarch in Vetrinary Science* 74, 1-15.

Pollock J. M. and Neill S. D. 2002 *Mycobacterium bovis* infection and tuberculosis in cattle. *The Veterinary Journal* 163, 115-127.

Pollock, J. M., McNair, J. Basset, H., Cassidy, J. P., Costello, E., Aggerbeck, H., Rosenkrands, I. and Andersen, P. 2003. Specific Delayed-Type Hypersensitivity Responses to ESAT-6 Identify Tuberculosis-Infected Cattle. *Journal of Clinical Microbiology* 41, 1856-1860.

Quinn, P. J.; Markey , B. K.; Carter, M. E.; Donnelly, W. J. C.; Leonard, F. C. and Maghire, D. 2002. *Veterinary Microbiology and Microbial Disease*. Ed. Blackwell Science Ltd, UK. 356 pp.

Quse, V., Falzoni, E. y Fundación Teimaikén. 2008. *Patología en fauna silvestre - Manual y atlas*. Ed. Vazquez Mazzini. 192pp.

Raviolo, J.; Speciale, W.; Giraudo, J.; Di Cola, G. 2005. Principales causas de decomisos en liebres de frigorífico. 12° Simposio Internacional de la Asociación Mundial de Laboratorios de Diagnóstico Veterinario (WAVLD) Nov. 2005 Montevideo Uruguay.

Rey Moreno, C. 2002. Tuberculosis bovina: Anatomía Patológica. En. Torres P. *Actualización en Tuberculosis bovina*. SENASA, Buenos Aires pp.26-38.

Ritaco, V., López, B., de Kantor, I. N., Barrera, L. Errico, F., Nader A.1991. Reciprocal cellular and humoral immune responses in bovine tuberculosis. *Research in Veterinary Science* 50, 365-367.

Rodwell, T. C., Kriek, N. P., Bengis, R.G., Whyte, I. J., Viljoen, P. C., de Vos, V., Boyce, W. M. 2001. Prevalence of bovine tuberculosis in African buffalo at Kruger National Parck. *Journal of Wildlife Diseases* 37, 258-264.

Renwick, A. R., White, P. C. L. and Bengis, R. G. 2006. Bovine tuberculosis in southern African wildlife: a multi-species host-pathogen system. *Epidemiology Infection* 135, 529-540.

Rosell, C., Fernández-Llario, P. y Herrero, J. 2001. El Jabalí (*Sus Scrofa* LINNAEUS, 1758) *Galemys* 2, 2001. <http://www.secem.es/galemys/pdf>. Accedido 16/11/11.

Ryan, T. J.; Livingstone, D. S. L.; Ramsey, De Lisle, G.W.; Nugent, G.; Collins, D. M. Buddle, B. M. 2006. Advances in understandin disease epidemiology and implications dor control and eradication of tuberculosis in livestock: The experience from New Zealand. *Veterinary Microbiology* 112, 211-219.

Sauter, C. M. and Morris R. S. 1995. Dominance hierarchies in cattle and red deer (*Cervus elaphus*): their possible relationship to the transmission of bovine tuberculosis. *New Zealand Veterinary Journal* 43, 301-5.

Schmitt, S. M., Fitgerad, S. D., Cooley , T. M., Bruning-Fann, C. S., Sullivan L., Berry, D., Carlson, T., Minnis, R. B., Payeur, J. B., Sikarkie, J. 1997. Bovine tuberculosis in free-ranging white-tailed deer from Michigan. *Journal of Wildlife Disease* 34, 749-758.

Schmitt, S. M, O'Brien, D. J., Bruning-Fann C. S., Fitgerad, S. D. 2002. Bovine tuberculosis in Michigan wildlife and livestock. *Ann N Y Acad Sci.* 969, 262-268.

SENASA, Secretaría de Agricultura, Dirección Nacional de Sanidad Animal, Argentina 1993. Manual de Normas y Procedimientos Anexo I (Resol. N° 1287/93 II Parte, 77 pp.

SENASA, Secretaría de Agricultura, Dirección Nacional de Sanidad Animal, Argentina. 1999a. Plan Nacional de Control y erradicación de la Tuberculosis Bovina. Resolución N° 115/99.

SENASA, Secretaría de Agricultura, Dirección Nacional de Sanidad Animal, Argentina. 1999b. Actualización en Tuberculosis pp. 74.

SENASA, Secretaría de Agricultura, Dirección Nacional de Sanidad Animal, Argentina. 2012. Plan Nacional de Control y Erradicación de la Tuberculosis Bovina en la República Argentina. Resolución N° 128/2012.

www.senasa.gov.ar/contenido.php?to=n&in=1526&io=20050 Accedido 12/2012.

Serraino, A., Marchetti, G., Sanguinetti, V., Rossi, M.V., Zanoni, R. G., Catozzi, L., Bandera, A., Dini, W., Mignone, W., Franzetti, F and Gori, A. 1999. Monitoring of transmission of tuberculosis between wild boars and cattle: genotypical analysis of strains by molecular epidemiology techniques. *Journal of Clinical Microbiology* 37, 2766-2771.

Sequeira, M.D.; Latini, O. A.; López, M.L. y Cecconi, J.O. Tuberculosis Bovina en Seres Humanos II Parte: Período 1977-1989. Instituto nacional de Epidemiología "Dr. Emilio Coni" Santa Fe. Documento divulgación, febrero de 1990. 7 pp.

Sillero-Zubrin, C., Hoffmann, M., and McDonald, D. W. 2004. Canids: Foxes, Wolves, Jackals and Dogs. Status Survey and Conservation Action Plan. IUCN/SSC Canid Specialist Group. Gland, Switzerland and Cambridge, UK. 430 pp. <http://www.canids.org/cap/canid2.pdf>. Accedido 7/10/11.

Smith N. H., Berg S., Dale J., Allen A., Rodriguez S., Romero B., Matos F., Ghebremichael S., Karoui C., Donati C., da Conceicao Machado A., Mucavele C., Kazwala R. R., Hilty M., Cadmus S., Ngandolo B. N. R., Habtamu M., Oloya J., Muller A., Milian-Suazo F., Andrievskaia O., Projahn M., Barandiarán S., Macías A., Müller B., Zanini M. S., Ikuta K.Y., Rosales Rodriguez C.A., Pinheiro S. R., Figueroa A., Cho S.N., Mosavari N., Chuang P. C., Jou R., Zinsstag J., van Sooling D., Costello E., Aseffa A., Proaño-Perez F., Portaels F., Rigouts L., Cataldi A. A., Collins D. M.,

Boschiroli M. L., Hewinson R. G., Ferreira Neto J. S., Surujballi O., Tadyon K., Botelho A., Zárraga A. M., Buller N., Skuce R., Michel A., Aranaz A., Gordon S. V., Jeon B. Y., Källenius G., Niemann S., Boniotti M. B., van Helden P. D., Harris B., Zumárraga M. J. and Kremer K. 2011. European 1: a globally important clonal complex of *Mycobacterium bovis*. *Infection, Genetics and Evolution* 11, 1340-1351.

Supply P., Mazars E., Lasjean S., Vincent V., Gicquel B. and Locht C. 2000. Variable human minisatellite-like regions in the *Mycobacterium tuberculosis* genome. *Molecular Microbiology* 26, 762-771.

Surujballi, O. P., Romanowska, A., Sugden, E. A., Turcotte, C., Jolley, M. E. 2002. A fluorescence polarization assay for the detection of antibody to *Mycobacterium bovis* in cattle sera. *Veterinary Microbiology* 87, 149-157.

Tarabla, H. D. 2000. *Epidemiología Diagnóstica*. Centro de Publicaciones, Secretaría de Extensión, Universidad Nacional del Litoral, Santa Fe, Argentina. 120pp.

The Mammals Society, *About British Mammals, The Badger*.

<http://www.mammal.org.uk>. Accedido enero de 2011.

Tweddle, N. E., Livingstone P. 1994. Bovine tuberculosis control and eradication programs in Australian and New Zealand. *Veterinary Microbiology* 40, 23-39.

Tohen, C. O. y Chiodini R. *Pathogenesis of Bacterial Infections in Animals* (pp.44-56)
Gyles, C. L. y Tohen, C. O. with twenty-eight contributors. IOWA State University Press/AMES.

Tohen, C. O. and Barletta, R. G. 2004. *Mycobacterium. Pathogenesis of Bacterial Infection in Animals*. 3rd Edition . C.L. Gyles, J.F.Prescott, J. G. Songer and C. O. Tohen. Blackwell Publishing Ltd, pp 69-76.

Thom, M. L., M. L., Hope, J.C., McAulay, M. Villareal-Ramos, B., Coffey, T. J., Stephens, S., Vordermeier, H. M., Howard, C.J. 2006. The effect of tuberculin testing

on the development of cell-mediated immune responses during *Mycobacterium bovis* infection. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 114, 25-36.

Torres. P. 2004. Situación de la tuberculosis bovina en la República Argentina. In: Programa Nacional de Control y Erradicación de la Tuberculosis, SENASA (Servicio Nacional de Sanidad Animal). Secretaría de Agricultura, Buenos Aires, Argentina.

Ultimateungulate, 2011.

http://www.Ultimateungulate.com7Artiodactyla/Syncerus_cafferFull.html

Accedido 14/11/11.

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. *Journal of Clinical Microbiology* 40, 4628-4639.

Vicente, J. Höfle, U., Garrido, J. M. Fernández De Mera, I. G., Juste, R., Barral, M. Gortazar, C. 2006. Wild boar and red deer display high prevalences of tuberculosis-like lesions in Spain. *Veterinary Research* 37, 107-119.

Warren, R. M., Streicher, E. M., Charalambous, S., Churchyard, G., van der Spuy, G. D., Grant, A. D., van Helden, P. D., Victor T. C., 2002. Use of spoligotyping for accurate classification of recurrent tuberculosis. *Journal of Clinical Microbiology* 40, 3851-3853.

Whelan, C. Shuralev, E, O'Keeffe, G., Hyland, P., Kwok, H. F., Snoddy, P. 2008. Multiplex immunoassay for the serological diagnosis of *Mycobacterium bovis* infection in cattle. *Clinical and Vaccine Immunology* 15, 1834-8.

WHO. Global Tuberculosis Control, Epidemiology, Strategy, Financing 2009. http://www.who.int/tb/publications/global_report/2009. Accedido octubre de 2009.

Wilson D. E. & Reeder D. M. 2005. Mammal Species of the World. A Taxonomic and Geographic Reference (3rd ed), Johns Hopkins University Press.

<http://www.press.jhu.edu>. Accedido septiembre de 2011.

Witmer, G., Fine, A. E., Gionfriddo, J., Pipas, M., Shively, K., Piccolo, K. and Burke, P. 2010. Epizootiologic survey of *Mycobacterium bovis* in wildlife and farm environments in northern Michigan. *Journal of Wildlife Disease* 37, 58-64.

Wobeser, G. 2009. Bovine tuberculosis in Canadian wildlife: An updated history. *Canadian Veterinary Journal* 50, 1169-1176.

Wood, P.R., Jones, S. L. 2001. BOVIGAN™ : an in vitro cellular diagnostic test for bovine tuberculosis. *Tuberculosis*, 81, (1/2), 147-155.

Zanella, G., Durant, B., Hars, J., Moutou, F., Garin-Bastuji, B., Duvauchelle, A., Fermé, M., Karoui, C. and Boschiroli, M. L. 2008. *Mycobacterium bovis* in wildlife in France. *Journal of Wildlife Disease* 44, 99-108.

Zumárraga, M., Martin, C., Samper, S., Alito, A., Latini, O., Bigi, F., Roxo, E., Cicuta, M. E., Errico, F., Castro Ramos, M., Cataldi, A., van Soelingen, D., and Romano, M. I. 1999. Usefulness of Spoligotyping in Molecular Epidemiology of *Mycobacterium bovis*-Related Infections in South América. *Journal of Clinical Microbiology*, 37 296-303.

Zumarraga, M.J., Meikle, V., Bernardelli, A., Abdala, A., Tarabla, H., Romano, M.I., Cataldi, A. 2005. Use of touch-down polymerase chain reaction to enhance the sensitivity of *Mycobacterium bovis* detection. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 17, 232-238.

11- Abreviaturas

ADN: ácido desoxirribonucleico

CMT: *Complejo Mycobacterium Tuberculosis*

MAC: *Complejo Mycobacterium avium-intracellulare*

DR: repeticiones directas

ES: especificidad

HSR: hipersensibilidad retardada

γ -IFN: Gamma interferón

LV: lesiones visibles

MAC: *Complejo Mycobacterium avium-intracellulare*

PCR: reacción en cadena de la polimerasa

PPD: derivado protéico purificado

PT: prueba de tuberculina

RFLP: polimorfismo en tamaño de los fragmentos de restricción

SE: sensibilidad

SLV: sin lesiones visibles

Spo: Spligotipo

TAC: tuberculina ano-caudal

TB: Tuberculosis

TBb: Tuberculosis bovina

TCC: tuberculina cervical comparativa

TCS: tuberculina cervical simple

UFC: unidad formadora de colonias

VNTRs: repeticiones en tándem en número variable

ZN: Ziehl Neelsen