



UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOMAS DE ZAMORA



**Detección de *Mycobacterium bovis* en leche de cabra mediante
métodos moleculares:
Amplificación Isotérmica Mediada por Bucles vs.
Reacción en Cadena de la Polimerasa**

Tesis presentada para optar el grado de licenciado en gestión de la
calidad e inocuidad de los alimentos

Rocha, Rosana Valeria

Director: Dr. Martín José Zumárraga

Co-Directora: Dra. Fabiana Bigi

Lomas de Zamora, abril de 2021

Agradecimientos

Quiero agradecer a mi director de tesis el Dr. Martín Zumárraga por acompañarme en este camino, por darme las herramientas y el apoyo que necesitaba para poder realizar este trabajo.

A la Dra. Fabiana Bigi por permitirme crecer académicamente, darme el espacio, ideas, consejos y sobre todo por las enseñanzas que me deja día a día permitiéndome ser parte de su equipo de trabajo.

Al Dr. Marcos Trangoni y Dr. Carlos Garro, por toda la ayuda recibida y por brindarnos toda la experiencia que ha desarrollado.

A la Universidad Nacional de Río IV, (Dr. Magnano Dra. Macías y equipo). Por brindarnos las muestras a campo de los animales que fueron analizados en este trabajo.

A Mercedes Ghibaudi y Horacio Martínez de la UNLZ Agrarias por brindarnos las muestras de los animales negativos utilizados en esta tesis.

A mi familia, a Martín mi compañero de Vida por acompañarme en todos los momentos, apoyándome, dándome aliento, a mis hijas LUNA y PALOMA, por destinar tiempo de juegos y esperar que mamá termine de estar en la compu para poder estar con ellas, las amo profundamente.

A mis padres por ayudarme en todo y por apoyarme, especialmente a mi madre, que es la que siempre me enseñó todos los valores que, adoptado como forma de vida, a no bajar los brazos, a progresar y a crecer, no solo a nivel académico sino como persona que es lo más importante.

A todas las personas que me acompañaron en este trabajo de tesis, a Yami, y a Jime, que no son solo Profesionales que me enseñaron a nivel académico, sino que son mis amigas y me ayudaron muchísimo, gracias infinitas.

A mi grupo de trabajo, Laura, Fede, Cristi, Marina, Eli, Luciana, por acompañarme en este camino y ayudarme cada vez que lo necesite.

A mis amigas que me acompañaron y me apoyaron, Cris, Vane, Majo, Cinti las quiero.

Al IABIMO de INTA, donde trabajo y donde todos de una manera u otra ayudaron para que este trabajo fuera posible.

Resumen

Para producir alimentos de buena calidad y sanitariamente seguros, y además responder a las exigencias de los mercados, se debe contar con rodeos sanos. *Mycobacterium bovis* (*M. bovis*), es el principal agente causal de la tuberculosis (TB) en animales, enfermedad zoonótica crónica diseminada mundialmente, que afecta tanto a bovinos como a otras especies de importancia pecuaria como búfalos, cerdos y cabras. La TB provoca serios problemas económicos en el sector pecuario, al reducir la eficiencia productiva de los animales y dificultar la comercialización de sus productos derivados. La lucha contra la TB está basada en su detección y control, para lo cual se necesitan técnicas de diagnóstico rápidas, sensibles y específicas, que permitan la identificación de los focos de infección y su posterior control.

El objetivo de este trabajo fue implementar y adecuar herramientas de biología molecular para detectar *M. bovis* en leche de ganado caprino, para brindar alternativas diagnósticas y estrategias complementarias a las utilizadas en el Plan Nacional de Control y Erradicación de la Tuberculosis bovina (PNCETBB) en Argentina.

Se realizó una comparación entre (a) la amplificación isotérmica mediada por bucle (LAMP) utilizando la secuencia IS6110, y (b) la PCR *Touch-Down* utilizando IS6110 ó (c) Rv2807, y (d) la PCR-TbD1. Se evaluaron los métodos diagnósticos en muestras de campo considerando al cultivo como prueba de oro del diagnóstico de la enfermedad. La sensibilidad fue de 100% para PCR-TbD1 y de 42,9% tanto para LAMP-IS6110 como PCR-IS6110 y PCR-Rv2807, mientras que la especificidad fue de 88,1% tanto para PCR-TbD1 como para PCR-IS6110 y PCR-Rv2807, y de 85,7 para LAMP-IS6110. El grado de concordancia respecto al cultivo fue adecuado para PCR-TbD1, mientras que resultó débil para las restantes pruebas diagnósticas. Por otra parte, la concordancia entre PCR-IS6110 y PCR-Rv2807 fue del 100% y entre LAMP-IS6110 y PCR-IS6110/Rv2807 de 94,5%.

LAMP-IS6110 podría utilizarse como herramienta de diagnóstico preliminar en laboratorios de baja complejidad mientras que PCR-TbD1 como método de laboratorios de referencia.

Finalmente, por PCR en tiempo real, se estimó que la excreción de *M. bovis* por leche de los animales analizados fue variable, requiriéndose continuar con la optimización del método para futuros estudios.

Palabras claves: caprinos, tuberculosis, leche, LAMP, PCR.

Abstract

To produce good quality and sanitary safe food, and respond to the demands of the markets, it is necessary to have healthy herds. *Mycobacterium bovis* (*M. bovis*) is the main causative agent of tuberculosis in animals, a zoonotic and chronic disease spread worldwide that affects both cattle and other important livestock species such as buffalo, pigs and goats. TB causes serious economic problems in the livestock sector, by reducing the productive efficiency of animals and making it difficult to market their derived products. The fight against TB is based on its detection and control, for which rapid, sensitive and specific diagnostic techniques are needed, which allow the identification of sources of infection and their subsequent control.

The objective of this work was to implement and adapt molecular biology tools to detect *M. bovis* in goat milk, to provide diagnostic alternatives and complementary strategies to those used in the National Plan for the Control and Eradication of Bovine Tuberculosis (PNCETBB) in Argentina.

Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) using the sequence IS6110 was compared to PCR *Touch-Down* using IS6110 and Rv2807 and PCR-TbD1. The diagnostic methods were evaluated in field samples considering the culture as the gold standard for the diagnosis of the disease. The sensitivity was 100% for PCR-TbD1 and 42.9% for LAMP-IS6110 and, PCR-IS6110 and PCR-Rv2807, while the specificity was 88.1% for PCR-TbD1 as well as PCR-IS6110 and PCR-Rv2807, and 85.7 for LAMP-IS6110. The agreement respect to the culture was substantial for PCR-TbD1, while it was weak for the other diagnostic tests. On the other hand, the agreement between PCR-IS6110 and PCR-Rv2807 was 100% and between LAMP-IS6110 and PCR-IS6110 / Rv2807 was 94.5%.

LAMP-IS6110 could be used as a preliminary diagnostic tool in low complexity laboratories while PCR-TbD1 as a method of reference laboratories.

Finally, by real-time PCR, it was estimated that the excretion of *M. bovis* through the milk of the animals analyzed was variable requiring further optimization of the method for future studies.

Key words: goats, tuberculosis, milk, LAMP, PCR.

INDICE

Resumen	3
Abstract	4
CAPITULO I.....	11
INTRODUCCIÓN.....	11
1.1. Generalidades.....	11
1.2. Diagnóstico molecular	14
1.3. Breve descripción de la patogénesis de la enfermedad	20
1.4. Clasificación.....	22
1.5. Características del bacilo	23
1.6. Vías de transmisión	25
1.7. Impacto de la tuberculosis animal en el sector pecuario	27
1.8. Epidemiología de la tuberculosis caprina	28
1.9. Leche caprina	32
1.10. La leche de cabra en alimentación humana.....	35
1.11. El manejo de los hatos caprinos.....	37
1.12. Sistemas de producción caprina	38
CAPITULO II.....	41
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	41
2.1. Hipótesis.....	41
2.2. Objetivo general.....	41
2.3. Objetivos específicos	41
CAPITULO III.....	44
MATERIALES Y MÉTODOS.....	44
3.1. Infraestructura del IABIMO. Sectores destinados a tareas específicas.	44
3.2. Disposición de los residuos.....	45
3.3. Muestras.....	45
3.3.1. Cepas de colección.....	45
3.3.2. Muestras clínicas de leche caprina	46
3.4. Extracción de ADN.....	48
3.4.1. Extracción de ADN a partir de <i>M. bovis</i> BCG.	48
3.4.2. Extracción de ADN a partir de micobacterias no tuberculosas y <i>Nocardia</i> sp.	48
3.4.3. Extracción de ADN a partir de muestras de leche caprina	48
3.5. Cuantificación del ADN extraído	49
3.6. Detección molecular del complejo <i>M. tuberculosis</i> y <i>M. bovis</i> en muestras de leche caprina	49

3.7. Amplificación Isotérmica Mediada por Bucles (LAMP)	50
3.8. PCR de punto Final.....	54
3.8.1. Visualización de las muestras amplificadas por PCR de punto final.....	57
3.9. Análisis estadístico	57
3.10. Criterio de interpretación de resultados de PCR de punto final y LAMP	58
3.11. Estimación de la excreción de <i>M. bovis</i> por PCR en tiempo real.....	59
CAPITULO IV	62
RESULTADOS	62
4.1. Obtención del inóculo de <i>M. bovis</i> BCG para la contaminación experimental de leche fluida de cabra.....	62
4.2. Extracción de ADN a partir de la contaminación con <i>M. bovis</i> de leche fluida caprina.....	63
4.3. Amplificación Isotérmica Mediada por Bucles (LAMP)	66
4.3.1. Evaluación de la visualización de la reacción de LAMP-IS6110 con SYBR Gold en distintas condiciones de iluminación.....	68
4.3.2. Determinación de la sensibilidad analítica / límite de detección de LAMP-IS6110.....	70
4.3.3. Evaluación de la especificidad de LAMP-IS6110	71
4.3.4. Evaluación de la sensibilidad de LAMP-IS6110 en muestras de leche provenientes de animales reaccionantes a la IDR	73
4.4. Evaluación de diferentes secuencias blanco de PCR para la detección del complejo <i>M. tuberculosis</i> y <i>M. bovis</i>	74
4.4.1. PCR -IS6110 Touch-Down.....	76
4.4.2. PCR-Rv2807 Touch-Down.....	77
4.4.3. PCR-TbD1	78
4.4.4. Especificidad de la PCR.....	79
4.4.5. Evaluación de la sensibilidad y especificidad de la PCR en muestras clínicas de leche	80
4.6. Análisis estadístico	85
4.7. Estimación de excreción de <i>M. bovis</i> en leche fluida caprina.....	88
CAPITULO V	92
DISCUSION.....	92
CAPITULO VI	106
CONCLUSIONES	106
CAPITULO VII	109
ABREVIATURAS	¡Error! Marcador no definido.
CAPITULO VIII	112

BIBLIOGRAFIA.....	112
CAPITULO IX	129
ANEXOS	129
9.1. Extracción de ADN a partir de un cultivo de micobacterias.....	129
9.2. Método de extracción Fenol/Cloroformo/Alcohol Isoamílico.....	130
9.3. “Spoligotyping”.....	131
9.3.1. Amplificación de la región de repeticiones directas (DR).....	131
9.3.2. Hibridación de los productos de PCR a la membrana conteniendo los oligonucleótidos espaciadores y detección.....	132
9.3.3. Deshibridación de la membrana.....	133
9.3.4. Interpretación del “Spoligotyping”.....	134
9.4. PCR de los genes <i>esxA</i> y <i>esxB</i>	134
9.5. Preparación de las soluciones.....	135

INDICE DE TABLAS

Tabla 1: Parámetros de calidad higiénica en leche de cabra	34
Tabla 2: Secuencias de los <i>primers</i> usados en LAMP-IS6110	50
Tabla 3: Mezcla 1 de reactivos de LAMP (<i>primers</i> Mix).....	52
Tabla 4: Mezcla 2 de reactivos de LAMP (2x mix)	52
Tabla 5: <i>Primers</i> utilizados para la detección del CMT, de <i>M. bovis</i> y β actina ..	54
Tabla 6: Programa de ciclado <i>Touch-Down</i> para amplificar IS6110 y Rv2807 ...	55
Tabla 7: Programa de ciclado para amplificar TbD1	56
Tabla 8: Programa de ciclado de β actina	56
Tabla 9: Interpretación de los resultados de PCR de tiempo final	59
Tabla 10: Cuantificación del ADN de las muestras de leche de animales IDR negativos	64
Tabla 11: Cuantificación del ADN de las muestras de leche de animales IDR positivos	64
Tabla 12: Límite de detección de LAMP-IS6110	71
Tabla 13: Límite de detección de PCR.....	75
Tabla 14: Límite de detección por tubo de reacción PCR	76
Tabla 15: Resultados de los distintos métodos aplicados en las muestras de los animales naturalmente infectados	83
Tabla 16: Evaluación y concordancia de las pruebas diagnósticas respecto al cultivo (prueba de oro)	86
Tabla 17: Evaluación de LAMP-IS6110	86

Tabla 18: Evaluación de PCR- IS6110/Rv2807	87
Tabla 19: Evaluación de PCR-TbD1	87
Tabla 20: Concordancia entre LAMP-IS6110 y PCR-IS6110/Rv2807	88

INDICE FIGURAS

Figura 1: Intradermorreacción en caprinos.....	13
Figura 2: Principio de la reacción de LAMP	18
Figura 3: Esquema de la reacción de LAMP con la incorporación de los <i>primers</i> de los bucles	19
Figura 4: Lesiones tuberculosas en cabras.....	22
Figura 5: Cultivo de <i>M. bovis</i> y tinción Ziehl-Neelsen.....	24
Figura 6: Esquema de las vías de transmisión de la tuberculosis bovina.....	27
Figura 7: Distribución y existencias caprinas en la República Argentina.....	31
Figura 8: Esquema del proceso de diluciones seriadas 1/10	47
Figura 9: Esquema de la región IS6110 con las regiones blanco de los <i>primers</i> de LAMP-IS6110	51
Figura 10: Espoligotipo de la cepa <i>M. bovis</i> BCG	62
Figura 11: PCR de los genes <i>esxA</i> y <i>esxB</i>	62
Figura 12: Cultivos de <i>M. bovis</i> BCG	63
Figura 13: Curvas obtenidas de la cuantificación del ADN por espectrofotometría	65
Figura 14: Visualización de LAMP con HNB	67
Figura 15: Visualización de LAMP con SYBR Gold.....	67
Figura 16: Visualización de LAMP-IS6110 en distintas condiciones de iluminación.	68
Figura 17: Límite de detección de LAMP-IS6110 en agua.	70
Figura 18: Límite de detección de LAMP-IS6110 en leche fluida caprina.....	70
Figura 19: Evaluación de la especificidad de LAMP-IS6110, visualización de la reacción en distintas condiciones de iluminación.	72
Figura 20: Evaluación de la sensibilidad de LAMP-IS6110 en muestras de leche, visualización de la reacción en distintas condiciones de iluminación	74
Figura 21: Límite de detección de PCR-IS6110 TD en agua.....	76
Figura 22: Límite de detección de PCR-IS6110 TD en leche	77
Figura 23: Límite de detección de PCR-Rv2807 TD en agua.....	77
Figura 24: Límite de detección de PCR-Rv2807 TD en leche	78
Figura 25: Límite de detección de PCR-TbD1 en agua.....	78
Figura 26: Límite de detección de PCR-TbD1 en leche	78

Figura 27: Especificidad de la PCR de punto final	79
Figura 28: PCR-Rv2807 <i>Touch-Down</i> en muestras de leche	80
Figura 29: PCR-IS6110 <i>Touch-Down</i> en muestras de leche	81
Figura 30: PCR-TdD1 en muestras de leche	82
Figura 31: PCR- β actina	82
Figura 32: PCR β actina de muestras inhibidas y diluidas en agua	83
Figura 33: Espoligotipo detectado en los aislamientos de <i>M. bovis</i>	85
Figura 34: Gráficos de la PCR-TbD1 en tiempo real	89

Introducción

CAPITULO I

INTRODUCCIÓN

1.1. Generalidades

Mycobacterium bovis (*M. bovis*) es el principal agente causal de la tuberculosis en animales (TB), enfermedad zoonótica crónica mundialmente diseminada. La TB representa un serio problema económico en el sector pecuario al reducir la eficiencia productiva de los animales y dificultar la comercialización de sus productos derivados.

Si bien el bovino constituye el hospedador principal, otros animales de importancia pecuaria como búfalos, cerdos y cabras también son susceptibles. Asimismo, el ganado caprino puede desarrollar la enfermedad por infección con *Mycobacterium caprae* (Aranaz et al., 1999) e incluso por *M. tuberculosis* (Cadmus et al., 2009). Sin embargo, en nuestro país los casos detectados han sido atribuidos a *M. bovis* (Zumárraga et al., 2013; Magnano, 2015). Tanto la coexistencia de caprinos pastando con bovinos infectados, como la ingestión de leche bovina/caprina contaminada con *M. bovis* en la crianza artificial de los cabritos, constituyen las principales causas de infección en cabras de explotación tambera.

La producción caprina en la Argentina, se encuentra regionalizada en las áreas marginales, está principalmente representada por sistemas extensivos, y su destino es la producción principalmente de carne. Sin embargo, en los últimos años, la producción se ha orientado a un sistema lechero intensivo, con vías de expandirse, siendo su producto final la

elaboración de quesos para consumo interno y exportación. En el marco del Plan Nacional de Control y Erradicación de la Tuberculosis (Res. 128/2012 SENASA), se incorporó la especie caprina con el fin de detectar la presencia de animales infectados que podrían transformarse en reservorios y/o diseminadores de la infección hacia el ganado vacuno y el hombre (SENASA, 2012).

La técnica de diagnóstico oficial para la detección de tuberculosis en bovinos y caprinos es la intradermorreacción (IDR) o prueba de la tuberculina cuya sensibilidad y especificidad en bovinos es de 75 % y 90 % respectivamente, mientras que en caprinos es de 83,7 % y 100 % respectivamente (Gutiérrez et al., 1998). Ésta se realiza *in vivo* y evalúa la respuesta inmune celular generada a partir de la aplicación del antígeno, el derivado proteico purificado (PPD), que es un conjunto de proteínas obtenidas por precipitación ácida a partir del cultivo de la cepa de referencia *M. bovis* AN5 (SENASA, Resolución 128/12). Se aplica en el pliegue anocaudal o en la tabla del cuello. Su aplicación, lectura e interpretación es similar a la de los bovinos (SENASA,¹ Resolución 128/12).

¹ Resolución-128-2012-senasa - servicio nacional de sanidad y calidad agroalimentaria

Figura 1: Intradermorreacción en caprinos



https://inta.gob.ar/sites/default/files/folleto_tuberculosis_en_caprinos.

El caprino desarrolla patologías más severas que el bovino indicando diferencias en la respuesta inmune frente a la tuberculosis y probablemente también frente a la IDR (Underwood et al., 2003).

Otra alternativa del diagnóstico, que también evalúa la respuesta inmune celular, pero *in vitro*, es la detección de interferón gamma (IFN- γ) previa estimulación de los linfocitos con PPD. Esta técnica puede ser utilizada tanto para el diagnóstico de tuberculosis bovina como caprina (Liébana et al., 1998). Dicha prueba se realiza a fin de aumentar la sensibilidad en el diagnóstico (Rothel et al., 1992; Pollock et al., 2001). En nuestro país está siendo evaluada en bovinos, aunque todavía no se encuentra aprobada como prueba oficial (Paolicchi et al., 2018).

La infección sub-clínica, la co-infección con otros microorganismos (patógenos o no) que pueden presentar reactividad cruzada antigénica con

la tuberculina empleada en la IDR, y la necesidad de detección temprana de la infección, requieren implementar técnicas diagnósticas suficientemente sensibles y altamente específicas, características que reúnen los métodos moleculares.

1.2. Diagnóstico molecular

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) reproduce *in vitro* el proceso fisiológico de la replicación del ADN en las células. La PCR multiplica “amplifica” exponencialmente una secuencia específica de ADN, sintetizando grandes cantidades en un proceso de ciclos térmicos que se suceden en tres etapas: desnaturalización, hibridación y extensión. Inicialmente se desnaturaliza el ADN a 90°C a 96 °C) quedando las hebras de la doble cadena separadas, luego la temperatura disminuye de modo que los *primers* se hibriden en los extremos 3' de las hebras del ADN. Finalmente, una polimerasa termoestable, como la Taq ADN polimerasa (obtenida de la bacteria termófila *Thermus aquaticus*) extiende los extremos 3' de ambos *primers* incorporando los nucleótidos complementarios a las hebras de ADN. Una última desnaturalización pone fin a un ciclo y da comienzo al siguiente, repitiéndose entre 20 y 40 veces. Al cabo del primer ciclo se obtienen dos moléculas bicatenarias del fragmento de ADN inicial, sirviendo cada una de ellas como molde o templado para ser nuevamente copiadas. De esta manera se produce un aumento exponencial del número de copias de la secuencia específica (Aoyaki 2001). Dicha reacción se realiza en un termociclador, luego los fragmentos amplificados se separan por electroforesis horizontal en gel de agarosa teñido con un colorante

intercalante del ADN como el bromuro de etidio, y la detección se realiza a partir de la exposición del gel a una fuente de luz ultravioleta.

En nuestro grupo de trabajo, se ha puesto a punto una PCR a partir de muestras de leche bovina cruda para detectar a los miembros del complejo *M. tuberculosis*, mediante la secuencia de inserción IS6110 (Zumárraga et al., 2012; Zumárraga et al., 2005). Estudios realizados en la provincia de Santa Fe demostraron la importancia de utilizarla en forma complementaria a las pruebas de diagnóstico oficial. Este método y estrategia de uso fue incorporada al plan regional de Control y Erradicación de la TB de dicha provincia para la vigilancia epidemiológica de tambos libres de TB (Ministerio de la producción, Resolución 949/12). Asimismo, dicho método se adaptó recientemente para la detección de *M. bovis* en leche de cabra (Rocha y col., 2018a), habiéndose identificado al 48% de los animales con TB confirmada por cultivo (Rocha y col., 2018b).

La PCR en tiempo real / cuantitativa (qPCR) es una variante de la PCR que permite visualizar el curso de la reacción a medida que se van formando los productos de amplificación. Como la formación de estos es proporcional a la concentración del templado en la muestra, es posible su cuantificación, siendo esta una de las principales características que la diferencian de la PCR convencional de tiempo final. Por otra parte, como los productos de amplificación se detectan a partir de la fluorescencia emitida, que es captada y registrada en el equipo, no se requiere la separación de los productos de PCR mediante electroforesis en agarosa, obteniendo una ventaja adicional ya que se evita la apertura de los tubos,

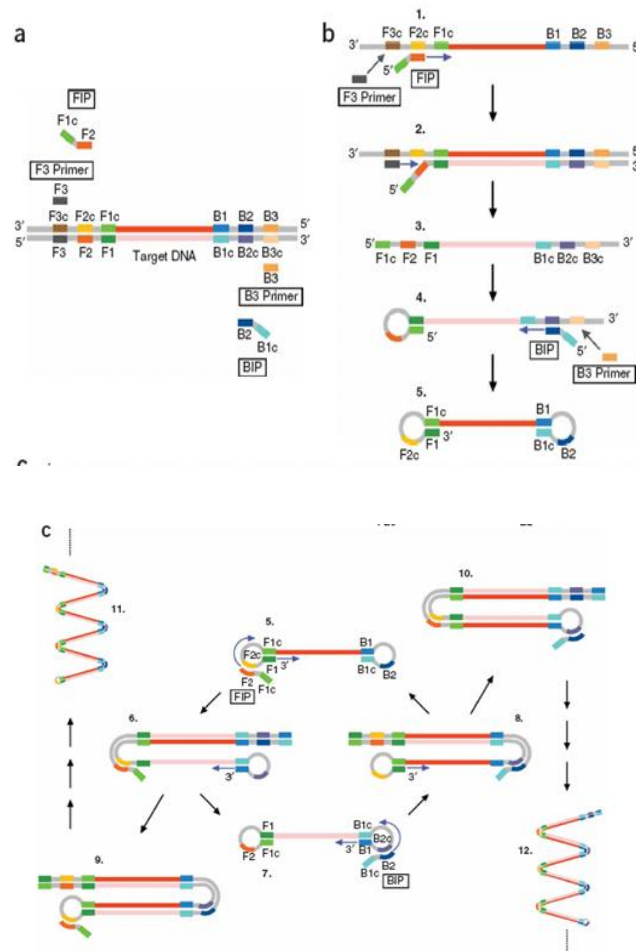
constituyendo así un sistema cerrado en el que se reduce el riesgo de contaminación (Kralik y Ricchi; 2017; Espy et al., 2006).

Otro de los métodos moleculares de interés para la detección sensible y específica de microorganismos patógenos es la amplificación isotérmica mediada por bucles (LAMP, del inglés *Loop-mediated isothermal amplification*) (Nagamine et al., 2002; Notomi et al., 2000). El proceso de amplificación y detección se realiza en un paso único en el que se someten los componentes de reacción a condiciones isotérmicas, requiriéndose de un equipamiento simple (como un baño termostático de agua) a diferencia de las tecnologías basadas en PCR.

La reacción de LAMP se caracteriza por su rapidez, alta especificidad y sencillez. Se utilizan cuatro *primers* diferentes y una ADN polimerasa (*Bst*) con actividad de desplazamiento de cadena. La amplificación del ADN se realiza a través de reacciones de elongación repetitivas que ocurren en las regiones de asa o bucle que se forman en la estructura original durante la amplificación por LAMP. El principio de la reacción de LAMP se resume en la figura 2 (adaptada de Tomita et al., 2008). Las regiones blanco de los *primers* son seis F3, F2, F1, B1c, B2c y B3 de los extremos 5' del ADN. Las secuencias complementarias son designadas con la letra "c", de esta manera la secuencia F1c es complementaria a la F1. En la reacción se usan dos *primers* internos (FIP y BIP) y dos externos (F3 y B3). FIP y BIP son *primers* híbridos que tienen las secuencias F1c-F2 y B1c-B2 respectivamente. La reacción de LAMP comienza cuando la secuencia F2 del primer FIP se alinea y se hibrida a F2c de la cadena de ADN. Como la secuencia F1c del primer no es una

secuencia complementaria queda suelta y entonces se inicia la elongación por acción de la ADN polimerasa *Bst* que sintetiza una primera cadena. De la misma manera ocurre la síntesis de ADN con BIP. El primer F3 hibrida a la región F3c de la cadena blanco de ADN y ocurre la síntesis y desplazamiento de la cadena de ADN. La cadena de ADN extendida a partir de FIP es reemplazada y liberada. De esta manera la simple cadena liberada forma un bucle en su extremo 3' (estructura 3) porque contiene secuencias antisentido. La síntesis de ADN continúa con la simple cadena de ADN como templado con los *primers* BIP y B3, de la misma manera que se describió antes, generando así la estructura con bucles en ambos extremos conocida como estructura de mancuerna (estructura 5). A partir de esta estructura continua la amplificación cíclica que se inicia a partir del extremo 3' de la región F1 y la elongación se inicia con la hibridación de FIP a la simple cadena de la región F2c en la estructura de bucle. Luego de varios pasos se genera la estructura 7 la cual es complementaria a la estructura 5 y además esta estructura es producida a partir de la estructura 8. Las estructuras 9 y 10 son producidas a partir de las estructuras 6 y 8 respectivamente y también se producen más estructuras de elongación (estructuras 11 y 12). De esta forma, los *primers* continúan alineándose con las regiones complementarias en la fase de amplificación y las reacciones de elongación se repiten secuencialmente por la actividad de desplazamiento de cadena a una temperatura constante, formando diferentes estructuras de manera azarosa (Tomita et al., 2008; Li et al., 2017).

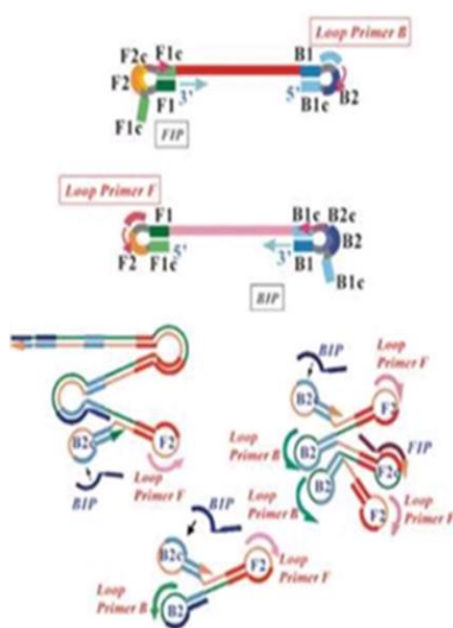
Figura 2. Principio de la reacción de LAMP



A: Regiones blanco y *primers*. B: Formación de bucles y estructura tipo mancuerna. C: Amplificación cíclica

El método de LAMP fue mejorado mediante la incorporación de dos *primers* más, los *primers* de los bucles (*loop primer F* y *loop primer B*) que están dirigidos a las simples cadenas de la región de los bucles. De esta manera se generan nuevos sitios para iniciar la síntesis de ADN aumentando considerablemente la rapidez y rendimiento de la reacción (Negamine et al., 2002).

Figura 3. Esquema de la reacción de LAMP con la incorporación de los *primers* de los bucles



Se representa la amplificación a partir de la estructura de mancuerna con la incorporación de los *primers* de bucle (*loop primer F* y *loop primer B*) que están dirigidos a las simples cadenas de la región de los bucles.

La detección del producto amplificado puede realizarse visualmente por métodos colorimétricos. Existen distintos estudios en los que se han referido a LAMP como una alternativa promisoría para la identificación rápida y específica de patógenos que afectan a humanos y animales (Barkway et al., 2011; Dukes et al., 2006; Savan et al., 2004; Sirichaisinthop et al., 2011; Wang et al., 2012; Meng et al., 2013; Zhang 2013). Por lo tanto, LAMP puede constituir una opción ventajosa y accesible para laboratorios de baja complejidad. En el grupo de trabajo se ha puesto a punto esta técnica para la detección de *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*, *Brucella* spp. (Trangoni et al., 2015) y *M. bovis* (Zumárraga y Cataldi, 2010).

1.3. Breve descripción de la patogénesis de la enfermedad

La infección es un proceso complejo que ocurre en distintas etapas y es el resultado de la interacción entre la micobacteria y el hospedador. La principal defensa del pulmón es el macrófago alveolar, ya que cuando son activados por los linfocitos T (LT) y otros efectores pueden matar al bacilo.

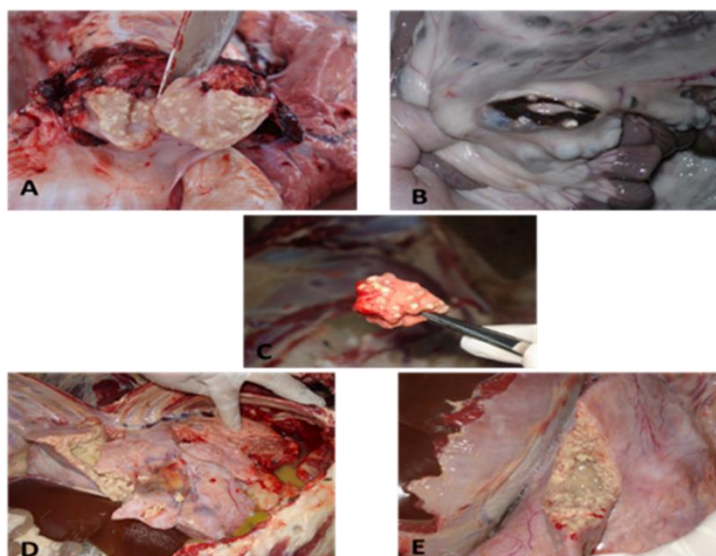
La interacción inicial entre la micobacteria y el macrófago provoca una respuesta inmune mediada por LT colaboradores CD4+ y citotóxicos CD8+ (Salyers y Whitt, 1994). La subpoblación de los LT CD4+ (Th1), al liberar INF- γ estimulan la activación de los macrófagos y la unión de las células endoteliales con los LT, que migran desde el torrente sanguíneo hacia el área afectada. Los LT CD8+, destruyen a los fagocitos infectados que no pudieron detener el crecimiento de los bacilos, para luego ser ingeridos y matados por los macrófagos activados. En esta etapa de la infección, fase de latencia, el bacilo persiste dentro del hospedador relativamente inactivo, y puede llegar a reactivarse.

Cuando la infección no puede ser resuelta, nuevas células T, polimorfonucleares y macrófagos, se acumulan en torno de los sitios donde se desarrolla el bacilo. Los macrófagos se unen y forman células gigantes multinucleadas, rodeadas de una capa de macrófagos y LT, formando el granuloma. El crecimiento de la lesión es limitado con una cubierta de fibrina que puede calcificarse. Cuando los fagocitos no pueden matar a los bacilos, se provoca más daño tisular, y en las áreas donde los bacilos continúan en crecimiento ocurre la necrosis caseosa que puede licuificarse.

En la lesión caseosa los bacilos se hallan contenidos, pero en la licuificada pueden alcanzar otras partes del cuerpo, constituyendo así la forma diseminada de la enfermedad. Esta es la etapa más contagiosa por la facilidad de eliminar bacilos a través de la expectoración. Aunque el sistema inmune pudiera contener la infección, como en el granuloma puede haber bacilos en estado de latencia, ante una situación de inmunosupresión pueden desarrollarse nuevamente y ocasionar un nuevo episodio de enfermedad, con los mismos síntomas y tan contagiosa como la tuberculosis primaria (Salyers y Whitt, 1994).

Por otra parte, hay que considerar que distintas cepas de *M. bovis* tienen diferente grado de patogenicidad, por la evaluación de la patología y la respuesta inmune en modelo murino (Aguilar León et al., 2009). La sobrevivencia de los ratones infectados con una cepa de *M. bovis* aislada de un jabalí de la provincia de La Pampa, fue notoriamente menor respecto a otras cepas de campo y de la cepa de referencia *M. bovis* AN5.

Figura 4: Lesiones tuberculosas en cabras



A y B: ganglios mediastínicos **C:** ganglio mesentérico **D y E:** tejido Pulmonar (Pulmón). Fotos cedidas gentilmente por la Dra. Analía Macías y el Dr. Gabriel Magnano de la Universidad Nacional de Río Cuarto, Córdoba.

1.4. Clasificación

El género *Mycobacterium* está conformado por 188 especies que incluyen tanto a los principales patógenos animales y humanos como otras numerosas especies saprófitas (Gupta et al., 2018).

La taxonomía de las micobacterias recientemente ha sido revisada y cambiada. Se describen 5 grupos monofiléticos diferentes: *Mycobacterium* “Tuberculosis-Simiae”, el cual incluye a todos los patógenos de importancia clínica, *Mycolicibacterium* gen. nov., “Fortuitum-Vaccae,” *Mycolicibacter* gen. nov., “Terrae,” *Mycolicibacillus* gen. nov. “Triviale” y *Mycobacteroides* gen. nov. “Abscessus-Chelonae” (Gupta et al., 2018).

Sin embargo, debido a que todavía no existe un consenso generalizado y coexisten las dos clasificaciones, por simplicidad, en este trabajo se adoptó la taxonomía tradicional.

M. bovis es miembro del complejo *Mycobacterium tuberculosis* (CMT), el cual incluye a las especies de micobacterias que causan tuberculosis en mamíferos *M. tuberculosis*, *M. africanum*, *M. microti*, *M. caprae*, *M. mungi*, *M. orygis*, *M. pinnipedii* y también *M. bovis* BCG (van Ingen et al., 2012). Las micobacterias no incluidas en el CMT se denominan no tuberculosas (MNT).

M. bovis es el principal agente causal de la tuberculosis en bovinos. Se encuentra diseminado a nivel mundial con un amplio rango de hospedadores incluyendo a otras especies de importancia pecuaria como caprinos, ovinos, suinos, bubalinos, camélidos y además animales silvestres y de compañía. El hombre no es la excepción, dado que también puede infectarse con *M. bovis* constituyendo una zoonosis de impacto a nivel de Salud Pública.

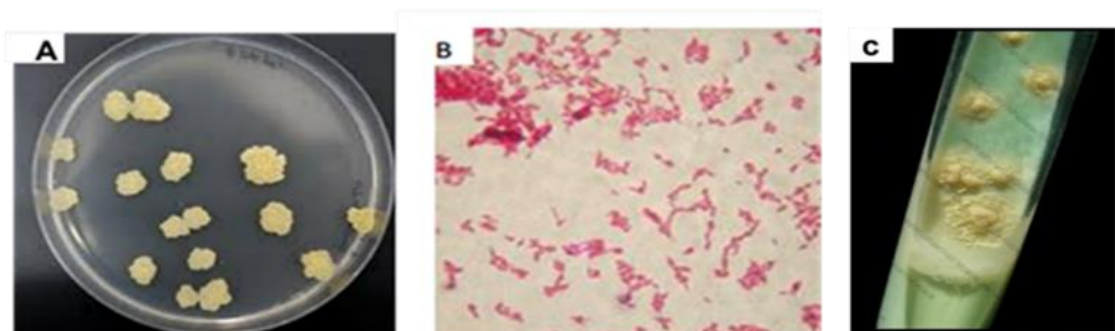
1.5. Características del bacilo

El género *Mycobacterium* está compuesto por bacilos que carecen de flagelos, cápsula y no producen esporas. Incluye especies saprófitas, patógenas oportunistas y primarias, que causan enfermedades descritas desde la antigüedad como la tuberculosis y la lepra. En medios de cultivos, algunas crecen en menos de siete días (crecimiento rápido), otras requieren de tres a cinco semanas (crecimiento lento) como *M. bovis* y *M. tuberculosis*, mientras que otras no son cultivables *in vitro* como *M. leprae*.

En general, las micobacterias son aeróbicas, excepto *M. bovis* que es microaerófila. La temperatura de crecimiento óptimo es de 37°C en especies patógenas. Por otra parte, los medios de cultivos tienen una composición particular y requiriéndose de suplementos para lograr su aislamiento y favorecer su desarrollo.

El genoma micobacteriano tiene una composición de guanina y citosina que oscila entre 62 y 70% (Garnier et al., 2003). Las micobacterias tienen una pared celular gruesa, hidrofóbica, que le brinda rigidez y forma a la bacteria, constituida mayoritariamente por arabinogalactanos y ácidos micólicos que le confieren resistencia a desinfectantes y a múltiples antimicrobianos. La capa externa contiene trehalosa 6,6-dimicolato (“factor cuerda”) y mucósidos. Su característica de resistencia a la decoloración con alcohol-ácido permite su visualización microscópica con la tinción de Ziehl-Neelsen (Figura 5 B), denominándolos bacilos ácido alcohol resistentes (BAAR).

Figura 5: Cultivo de *M. bovis* y tinción Ziehl-Neelsen



A: Cultivo *in vitro* en medio sólido en el que se observan las colonias aisladas de aspecto grumoso con bordes irregulares B: Tinción de Ziehl-Neelsen realizada a partir de un cultivo de *M. bovis* en medio sólido donde se observan los bacilos (gentileza de la Dra. Soledad Barandarian de la Universidad de Buenos Aires) C: Cultivo en medio Löwenstein-Jensen (LJ) en el que se observa el desarrollo de colonias de aspecto grumoso con bordes irregulares.

Para el aislamiento y desarrollo *in vitro* de *M. bovis*, los medios de cultivo utilizados habitualmente en el laboratorio son los medios sólidos Stonebrink (a base de huevo) y Middlebrook 7H10 (sintético) (Difco 262710) y el medio líquido Middlebrook 7H9 (sintético) (Difco 271310), ambos suplementados con piruvato de sodio como fuente de carbono. Asimismo, se favorece el desarrollo con la incorporación de ácido oleico, albúmina, dextrosa y catalasa (OADC). El crecimiento se evidencia por su morfología característica, con colonias de color crema y de fácil desprendimiento en el medio sólido, además de su crecimiento radial característico (Figuras 5 A y C). Dado el extenso tiempo requerido para el desarrollo de colonias, es necesario hacer un tratamiento previo de descontaminación para el aislamiento primario a partir de material clínico con el fin de eliminar la flora saprófita concomitante a excepción de los fluidos estériles como el líquido cefalorraquídeo. Uno de los más empleados es el método de Petroff, que consiste en un tratamiento alcalino con hidróxido de sodio (4%) y posterior neutralización con ácido sulfúrico. Este procedimiento tiene la desventaja de afectar la viabilidad de las micobacterias presentes en las muestras clínicas, siendo crítico en las muestras pausibacilares.

1.6. Vías de transmisión

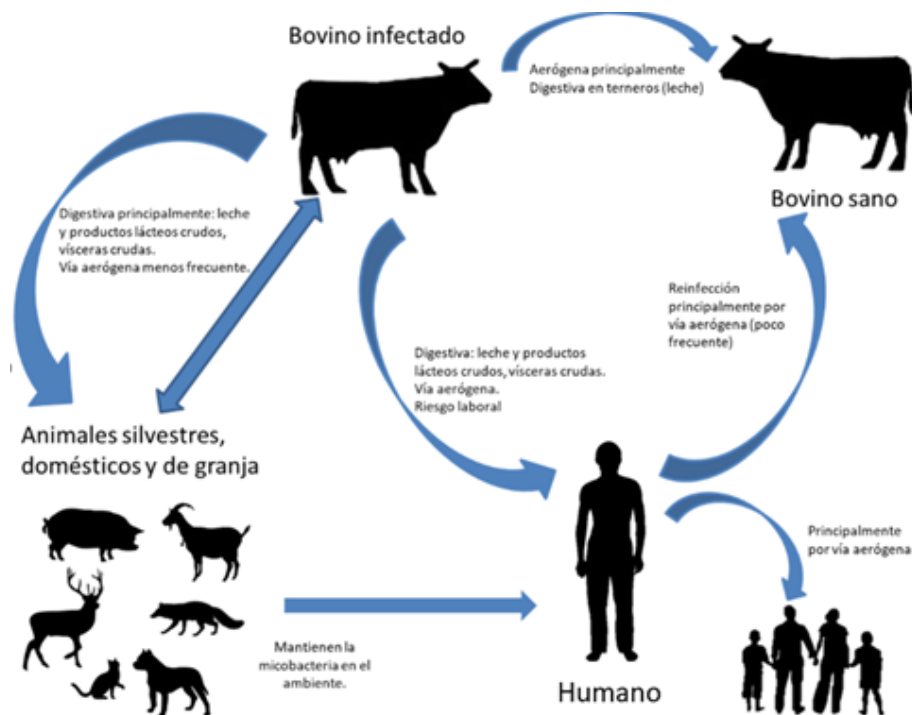
La principal vía de transmisión de *M. bovis* es la aerógena. Esta ocurre a partir de la expectoración o espiración de un animal enfermo. Los bacilos permanecen en suspensión, y al ser inhalados por otro hospedador susceptible alcanzan los pulmones. Es allí donde luego de lograr la infección de los macrófagos alveolares pueden dar comienzo a una nueva infección. El contagio mediante esta vía se ve favorecido por el estrecho

contacto diario durante períodos de tiempo prolongados, situación que sucede principalmente en sistemas de producción intensiva, como los bovinos en los *feedlots*, los tambos, durante el encierro en las salas de ordeño; en los comederos o incluso en corrales tanto de bovinos como de caprinos. En los sistemas de cría extensiva caprina, que son los que abundan en nuestro país, el encierro de los animales durante la noche en corrales para prevenir el acecho de predadores, también facilita la transmisión por vía aerógena (Menzies y Neill, 2000). Asimismo, los animales silvestres no solo pueden adquirir la infección por esta vía, sino que también pueden diseminarla, aunque es menos frecuente (Palmer 2013; Abdala et al., 2015; Renwick et al., 2007). La importancia de la fauna silvestre en la transmisión de la tuberculosis depende de cada situación epidemiológica particular de la enfermedad (Abdala et al., 2015).

Otra vía de infección menos frecuente es la digestiva, como ocurre en animales de corta edad por el suministro de leche, calostro o suero proveniente de madres infectadas que eliminan el bacilo por leche. Esta vía también requiere su consideración en el caso de los animales de compañía como los perros y los gatos, a partir de la ingesta de vísceras crudas contaminadas (principalmente pulmón bovino “bofe”, hígado, etc.) (Marfil et al., 2018) o de leche cruda sin pasteurizar; (Zumárraga et al., 2009); Barandiaran et al., 2017). A su vez, estos podrían transmitirlo al hombre por vía aerógena. Este escenario representa un factor de riesgo para el ser humano en el que la transmisión zoonótica afecta principalmente a los trabajadores relacionados con la actividad pecuaria en distintos ámbitos (mataderos, frigoríficos y tambos (Thoen et al., 2009). Asimismo, se

demostró que la infección por *M. bovis* puede transmitirse entre humanos por vía respiratoria (Etchechoury et al., 2010; Blázquez et al., 1997).

Figura 6: Esquema de las vías de transmisión de la tuberculosis bovina



1.7. Impacto de la tuberculosis animal en el sector pecuario

A nivel productivo, la TB animal representa un problema económico serio en el sector pecuario tanto por la disminución de la eficiencia productiva de los animales infectados, como por las restricciones al comercio nacional e internacional de los productos cárnicos, lecheros y derivados. Además, por tratarse de una zoonosis, hay que considerar los costos asociados a Salud Pública.

Un estudio reciente, reveló una reducción en la producción de leche de vacas reaccionantes a la tuberculina de aproximadamente 6% (Magnano et al., 2016). Por otra parte, según la última información

proporcionada por SENASA, en el año 2016 se decomisaron, por presencia de lesiones compatibles con tuberculosis en playa de faena, el 0,3% de los bovinos enviados a frigorífico, representando un total de 35.000 bovinos (SENASA 2016).

La resolución SENASA 128/2012 destaca la obligatoriedad del ingreso al Plan Nacional de Control y Erradicación de la Tuberculosis Bovina para todos los establecimientos lecheros bovinos y caprinos, las cabañas de bovinos y caprinos (carne y leche), y los establecimientos y cabañas de ovinos de leche. En el caso de los cerdos, considerados reservorios intermedios de la infección, también fue aprobada la certificación de Predios Libres de Tuberculosis Porcina según la resolución 145/09.

1.8. Epidemiología de la tuberculosis caprina

El origen de la raza caprina en el mundo data de tiempos remotos, habiendo subsistido hasta la actualidad debido a la gran versatilidad que presenta ya que se adapta a condiciones ambientales adversas. Puede ser utilizada como alimento, proveedora de leche o bien utilizar su piel o pelo dando origen a lanas de alta calidad. Si bien el ganado caprino puede infectarse con *M. bovis*, *M. caprae* (Aranaz et al., 1999) o incluso *M. tuberculosis* (Cadmus et al., 2009), y desarrollar la enfermedad, los casos de tuberculosis detectados en nuestro país han sido por *M. bovis*.

La coexistencia de caprinos pastando con bovinos infectados, o bien la ingestión de leche bovina contaminada con *M. bovis* en la crianza artificial

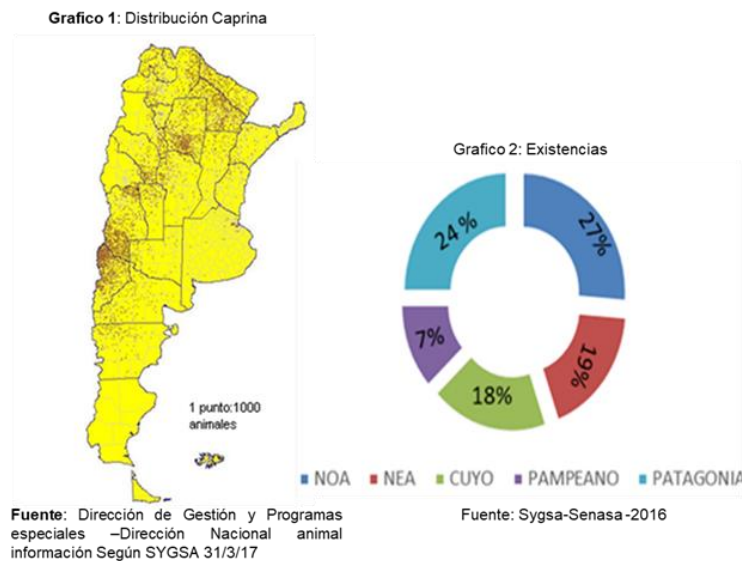
de los cabritos constituyen las principales causas de infección en cabras de explotación tambera.

En un contexto global, se ha reportado tuberculosis en cabras en diferentes regiones, las cuales coinciden con la distribución mundial de *M. bovis*. Está presente en los cinco continentes, en zonas con una alta endemia como ocurre en la península Ibérica y diferentes países de América, Asia, África y Oceanía (Javed et al., 2007; Rodríguez et al., 2011; Alvarez et al., 2008). En Etiopía se detectaron 18 casos de cabras con *M. bovis* luego de analizar 1.500 animales (Hiko y Agga 2011). En una granja del norte de Italia, donde convivían bovinos y cabras también se detectaron casos de tuberculosis por *M. bovis* (Crawshaw et al., 2008). Otro país también con antecedentes de *M. bovis* en el continente africano es Nigeria (Cadmus et al., 2009). En Australia y Nueva Zelanda se han confirmado casos de tuberculosis tanto en cabras domésticas como en salvajes (Cousins et al., 1993). En nuestro continente, en Brasil, en el estado de Paraíba, se identificó *M. bovis* a partir de caprinos faenados en frigorífico (Higino et al., 2011). Asimismo, se tipificaron por “Spoligotyping” y compararon siete aislamientos de *M. bovis* obtenidos de cabras del sudeste de Brasil (Zumárraga et al., 2008). Los espiligotipos detectados fueron comunes a los de los bovinos de ese país, pero diferentes a los de Argentina. Cuatro aislamientos de Minas Gerais mostraron el mismo espiligotipo, dos de cabras y uno de una vaca de la misma granja donde ocurrió un brote de tuberculosis en cabras alimentadas con leche de vacas tuberculosas, mientras que el cuarto se aisló de otra cabra de un brote en un establecimiento vecino a la propiedad relacionada

epidemiológicamente. Los otros cuatro aislamientos estudiados eran provenientes de cabras con síntomas respiratorios, tos y caquexia, de una misma región de San Pablo en cuya necropsia se encontraron lesiones sugerentes de tuberculosis que se confirmaron por cultivo. En este trabajo se visualiza la importancia de la tuberculosis caprina en la salud pública veterinaria y de los bovinos como fuente de infección de las cabras (Zumárraga et al., 2008). Además de Brasil, en Argentina, Chile y Venezuela también se obtuvieron espigotipos de aislamientos de *M. bovis* de cabras que fueron comunes a los detectados en bovinos (Zumárraga et al., 2013).

En Argentina, la especie caprina data desde la época de la colonización, siendo los españoles los que la introdujeron durante la conquista, principalmente para la producción de carne y leche siendo su producto final la elaboración de quesos (semiduros, cremosos, feta y quesillos) para consumo interno y exportación; además de dulce de leche y leche en polvo. Así, la producción lechera se centra en las provincias de Jujuy, Salta, La Rioja, Córdoba, Santiago del Estero, Tucumán

Figura 7: Distribución y existencias caprinas en la República Argentina



Si bien la infección por *M. bovis* en bovinos es más frecuente que en el ganado caprino, existen estudios que demuestran que la misma está presente en determinadas regiones del país. En Argentina, en un estudio realizado por Tribulo y col. (2002) en el norte de la provincia de Córdoba se detectaron 2,6 % de animales con IDR reaccionante de un total de 9.541. Sin embargo, los caprinos con IDR reaccionante estuvieron distribuidos en 41 de los 107 campos examinados. Así, Garbaccio y col., (2008) reportaron en Tucumán en ese mismo año una prevalencia de 0,67% (3/449) de reactores positivos a la IDR (Garbaccio *et al.*, 2008). En otro trabajo realizado en hatos de cabras lecheras de la localidad de Suipacha, Buenos Aires, se detectó el 1,58 % de animales positivos a la IDR (Herrera 1997). En la provincia de Santiago del Estero, de un total de 1.550 cabras de 14 establecimientos, se encontraron 7,3% de reacciones IDR sospechosas y ningún animal positivo (Underwood *et al.*, 2003). Asimismo, en la localidad

de Jachal, provincia de San Juan, en un estudio realizado por la Universidad Nacional de La Plata, de 115 caprinos adultos, solamente 10 hembras fueron positivas (8,70%) arrojando un resultado a la medición superior a los 5 mm (La Malfa et al, 2014). Posteriormente, en el año 2015 se demostró la existencia de hallazgos patológicos en 51 cabras provenientes de 8 hatos de pequeños productores de la región de Cuyo, que habían resultado positivos a la prueba tuberculínica (Magnano, 2015).

A pesar de los distintos antecedentes descriptos de la infección en ganado caprino local se estima que los datos están subestimados debido a que, la faena es principalmente en cabritos (2 a 3 meses), los cuales probablemente no presentan lesiones, ya que la TB es una enfermedad de curso crónico; y a que la faena informal se practica en muchas regiones del país en donde la producción se realiza en el ámbito familiar (Magnano et al. 2012; Magnano 2015).

1.9. Leche caprina

La leche, fuente de alimento para muchas culturas, puede servir como vía de excreta de distintos microorganismos patógenos. La fabricación casera de productos lácteos y quesos, especialmente los que se componen de leche sin tratamiento térmico, plantea un grave riesgo para la Salud Pública. Microorganismos del género *Mycobacterium*, tales como *M. bovis*, son capaces de sobrevivir en la leche y en otros productos lácteos. Cabe mencionar que, a diferencia de los quesos de pasta blanda, en los de pasta dura el bacilo es inactivado por el proceso de maduración. Esta bacteria también puede ser encontrada en la forma de bacilos viables

en quesos cremas y yogures producidos a partir de leche cruda durante más de 14 días y en mantequilla por más de 100 días (De la Rua-Domenech 2006).

Debido a la potencialidad de sus beneficios, la leche caprina se presenta hoy como una opción saludable, a pesar de su mayor costo para la venta. La composición láctea caprina varía ampliamente de acuerdo con un gran número de factores como son la raza, la localidad, el período de lactancia, la estación del año, la alimentación, etc.

El código alimentario argentino Capítulo VIII, en su artículo 556 tris (Resolución Conjunta SPR el N°252/2014 y SAGyP N° 218/2014) establece que las leches de cualquier especie que respondan a lo establecido en los artículos 554 y 555 según corresponda, que no hayan sido consideradas no aptas por aplicación del artículo 556, y que hayan sido sometidas o no a filtración simple y/o enfriamiento y/o calentamiento a una temperatura no superior a 40°C o tratamiento de efecto equivalente, deberán responder a los siguientes parámetros de calidad higiénica según corresponda (tabla1). El recuento de bacterias totales en leche de cabra a 30°C deberá cumplir con las siguientes condiciones: el valor correspondiente a la media geométrica de los resultados de las muestras analizadas durante un período de dos meses, con al menos dos muestras al mes, de la leche cruda en el momento de la recepción en el establecimiento de tratamiento térmico y/o transformación, no deberá superar el límite máximo consignado (tabla 1). El recuento de células somáticas tampoco debe superar el límite máximo consignado (tabla1).

Tabla 1: Parámetros de calidad higiénica en leche de cabra

Parámetro	Límite máximo	Metodología	Entrada en vigencia
Recuento total de bacterias (UFC/cm ³) a 30°C	1.000.000	ISO 4833:2003 Microscopía	1 (un) año a partir de la fecha de publicación en el B.O
	500.000		3 (tres) años, a partir de la fecha de publicación en el B.O
Contenido de células somáticas (por cm ³)	2.000.000	Citometría de flujo con contador electrónico de células somáticas sobre la base del ADN	1 (un) año a partir de la fecha de publicación en el B.O
	1.500.000		3 (tres) años, a partir de la fecha de publicación en el B.O

Descripción de los parámetros higiénico sanitarios en leche de cabra adaptado del Código alimentario argentino - leche – modificación Resolución Conjunta (SPRel - SAGyP) 252/2014 y 218/2014.

En todos los casos,1) las muestras correspondientes deberán ser tomadas de cisterna de camión proveniente de tambo, en condiciones de asepsia y en plataforma de recibo del establecimiento de tratamiento térmico y/o transformación. 2) Las empresas deberán llevar los registros de todos los datos individuales que dieron origen a las medias geométricas. 3) Los registros deberán conservarse por lo menos durante un año.

Cada uno de los ítems nombrados contribuye a un producto bien elaborado y en aptas condiciones para poder salir al mercado.

1.10. La leche de cabra en alimentación humana

La leche de cabra constituye una alternativa a la leche de vaca muy beneficiosa en ciertos aspectos de la alimentación humana, sobre todo en los niños. Su composición puede tener variaciones significativas en alguno de los componentes debidos a la raza y la alimentación.

La Organización Mundial de la Salud (OMS) considera que la «salud humana se liga directamente a la salud animal y a la producción». Así, el bienestar del animal es fundamental para su posterior consumo.

El desarrollo de la producción caprina en la Argentina está principalmente en manos de pequeños productores de escasos recursos y bajo nivel sociocultural, constituyéndose en una de las principales actividades para el sustento familiar. Santiago del Estero posee la mayor cantidad de caprinos del NOA. Se trata de la primera experiencia nacional donde se desarrolló una cuenca lechera apuntando a la producción industrial de quesos de cabra.

En Argentina, el principal destino de la producción caprina es el consumo de su carne. Sin embargo, en los últimos tiempos la producción láctea cobró relevancia en la Región del NOA. Si bien es una producción relativamente baja, el volumen obtenido se destina a elaborar quesos de tipo artesanal y para autoconsumo.

Principalmente, las provincias de Jujuy y Salta notaron una mayor demanda de quesos debido a que integran la “Ruta del queso”, emprendimiento turístico que concentra a más de 80 productores desde el año 2008. En su trayecto se pueden encontrar quesos elaborados con

leche entera pasteurizada de cabra de forma artesanal, industrial o de manera más tecnificada.

En ciertas regiones del país el consumo de leche caprina es habitual, pero en las grandes ciudades recién está siendo aceptada, principalmente como alternativa frente a la leche de vaca, ante los cuadros de alergias generadas por esta última.

En lo atinente a su composición química, distintas investigaciones atribuyen a la leche de cabra un contenido lipídico mayor al de la bovina, siendo de 4,4g % y 3,6g % promedio respectivamente.

La leche caprina es, efectivamente, superior a la bovina, aunque la diferencia no sea tan marcada. La grasa láctea caprina aporta mayor cantidad de ácidos grasos de cadena corta y media que la vacuna, lo cual hace que resulten más fáciles de asimilar por nuestro organismo y posean mejor digestibilidad debido a que los glóbulos grasos son más pequeños. Con respecto al perfil lipídico, la presencia de ácidos grasos insaturados en este tipo de leches, contribuye a disminuir el colesterol en sangre y además se destaca el aporte de ácidos grasos esenciales, nutrientes que nuestro organismo no puede sintetizar.

Por otra parte, el contenido proteico es mayor al de la leche bovina, 0,56 g/100 mL y 0,42 g/100 mL de leche respectivamente. Además, al igual que la bovina, aporta 18 de los 20 aminoácidos esenciales y presentan una alta biodisponibilidad. Con respecto a las reacciones alérgicas, estas son atribuidas a la presencia de fracciones proteicas -S1 caseínas, -lactoalbúmina y caseína en la leche de vaca. En caprinos estas fracciones

presentan variantes que las hacen tolerables y fáciles de digerir. En cuanto al aporte de minerales y vitaminas se señala que la leche de cabra es fuente de calcio, fósforo y vitamina A (en su forma activa).

Suele creerse que los quesos de cabra huelen a animal porque estuvieron en contacto con los animales, pero se trata de un concepto erróneo. El aroma debe a la presencia de ácidos grasos volátiles (cáprico, caprílico y caproico) que se producen durante el proceso de maduración (Chacón, 2005).

En resumen, la leche caprina es una alternativa alimentaria que posee valores nutricionales y funcionales adecuados para nuestra salud.

1.11. El manejo de los hatos caprinos

Para el ganado caprino, el espacio que se destina en el corral a un animal depende de su posición social en el interior del rebaño, y está caracterizado por ser la distancia mínima que se establece entre el animal y los demás miembros del grupo.

Las cabras son muy sensibles a los climas extremos debiendo tomarse cuidados para minimizar sus efectos. Son importantes el frío y la lluvia en animales en pastoreo, y son particularmente sensibles los animales con condición corporal baja, por lo que es recomendable brindarles un lugar de resguardo natural o artificial. Los corrales se instalan en lugares altos y bien drenados, orientados de acuerdo con la prevalencia de vientos y la dirección del sol. En climas fríos, se procura la mayor incidencia del sol, mientras que en climas tropicales se procura un corral ventilado y fresco. Los corrales se construyen en una zona no anegable, ya

que los caprinos son particularmente sensibles a la humedad, la que les provoca importantes problemas podales. Esto se debe a que son animales originarios de zonas áridas y montañosas, por lo que no se adaptan fácilmente a la humedad. La pendiente a utilizar es por lo general mayor al 5% para lograr que el agua se escurra rápidamente después de las lluvias y así evitar los problemas que la humedad acarrea en el correcto manejo del rebaño (Gioffredo 2011).

1.12. Sistemas de producción caprina

Sistema extensivo: Se encuentran en los terrenos menos productivos, no aptos para actividades agrícolas ni forestales y generalmente no disponen de otras fuentes de alimentación por lo que emplean grandes extensiones de terreno. La tecnificación es escasa o nula y es común encontrar sobrepastoreo. Estos sistemas componen la mayor parte del inventario y la producción nacional. Los sistemas orientados a producir carne en las zonas áridas, semiáridas y el trópico seco son principalmente de este tipo.

Sistemas semi-intensivo: Se localizan en regiones con mayor productividad, en donde se combina el pastoreo y ramoneo en parte del año, con el aprovechamiento de residuos de cosecha y de la vegetación de áreas marginales.

Sistemas intensivos: Emplean mucho capital y poco terreno, con una administración eficiente y alta tecnificación. Es común que estén bien integrados en la transformación de sus productos, teniendo generalmente

tamaños de rebaños que exceden el mínimo para mantener los gastos familiares básicos. Se ubican en regiones cercanas tanto a sus fuentes de insumos como a sus mercados. Aunque constituyen una minoría, como por ejemplo en el norte y centro de nuestro país.

Habiéndose descrito las limitaciones asociadas al diagnóstico de la tuberculosis en caprinos y la necesidad de contar con técnicas complementarias que faciliten e incrementen la sensibilidad y especificidad para la detección de los caprinos infectados, en el presente trabajo se comparó LAMP con PCR de punto de final y además se estimó la excreción de *M. bovis* por leche.

Hipótesis y Objetivos

CAPITULO II

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

2.1. Hipótesis

Es posible amplificar regiones de ADN genómico del complejo *Mycobacterium tuberculosis* en muestras de leche caprina para la identificación rápida de animales con tuberculosis mediante métodos moleculares.

2.2. Objetivo general

Implementar y adecuar herramientas de biología molecular para detectar *M. bovis* en leche de ganado caprino, para brindar alternativas diagnósticas y estrategias complementarias a las utilizadas en el Plan Nacional de Control y Erradicación de la Tuberculosis bovina de la República Argentina.

3.3. Objetivos específicos

1-Adaptar y evaluar un método de amplificación isotérmica (LAMP) para detectar *M. bovis* en leche cruda caprina.

2-Determinar la sensibilidad y especificidad analítica de LAMP-IS6110.

3-Comparar la sensibilidad y especificidad analítica de LAMP-IS6110 frente a PCR de tiempo final utilizando distintas secuencias blanco.

4-Estimar la sensibilidad, especificidad y concordancia de los métodos moleculares evaluados para la detección de animales con tuberculosis.

5-Estimar la excreción de *M. bovis* por leche mediante PCR en tiempo real.

Materiales y Métodos

CAPITULO III

MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Infraestructura del IABIMO. Sectores destinados a tareas específicas.

La manipulación de cepas y muestras clínicas se realizó en un laboratorio confinado de seguridad biológica en una cabina de bioseguridad Clase II tipo A2, contando con todos los elementos de protección personal (respiradores, guantes, delantal, gafas), de acuerdo con las normas y disposiciones del IABIMO.

Las reacciones de amplificación de ácidos nucleicos se realizaron en un laboratorio exclusivo para este tipo de práctica y de acceso restringido. La vestimenta para el ingreso consiste en la utilización de delantal, cubrezapatos descartables y guantes. Todos los elementos de este laboratorio son de uso exclusivo del mismo (micropipetas, centrífuga, freezers, gradillas, recipientes para hielo, etc.) evitándose el intercambio de material e insumos con otros sectores. Asimismo, cuenta con luz UV con temporizador que se utiliza al iniciar y al culminar la operación, para reducir la posibilidad de contaminaciones por la existencia fortuita de ADN correspondiente al microorganismo en estudio. La incorporación del templado a la mezcla de reacción para PCR se realizó en otro sector, subsuelo del edificio, con otra pipeta utilizando puntas (tips) con filtro. Los termocicladores se ubican en otro sector del IABIMO de uso común por los distintos grupos de trabajo. Los productos de amplificación de las reacciones de PCR de punto final se sometieron a electroforesis horizontal en gel de agarosa en otro cuarto destinado a tal fin.

3.2. Disposición de los residuos

De acuerdo a las normativas del CICVyA-IABIMO, los residuos patogénicos generados se colectaron en bolsa de autoclave, se sometieron a tratamiento térmico por vapor en autoclave y luego se dispusieron en bolsa roja. El caso de residuos especiales se descartaron en bolsa amarilla. Ambos tipos de residuos son retirados por una empresa contratada para tal fin.

3.3. Muestras

3.3.1. Cepas de colección

Para la puesta a punto inicial de los distintos métodos y estrategias de amplificación, por razones de bioseguridad, se trabajó con la cepa vacunal *M. bovis* BCG (Bacilo Calmette Guérin). Esta es una cepa atenuada que se obtuvo por pasajes sucesivos en medio a base de papa y bilis, no produce enfermedad y es empleada para vacunar a seres humanos contra la tuberculosis. Sin embargo, tiene las mismas características generales de un aislamiento de *M. bovis* salvaje utilizándosela como cepa modelo porque no requiere ser manipulada en condiciones de bioseguridad III.

Para la evaluación de la especificidad de las reacciones de amplificación se utilizaron otras especies de micobacterias no tuberculosas (*Mycobacterium smegmatis*, *M. phlei*, *M. fortuitum*, *M. goodii*, *M. intracellulare*, *M. porcinum*, *M. avium* subsp. *avium*, *M. avium* subsp. *paratuberculosis*) y también de *Nocardia* spp, como género

filogenéticamente relacionado ya que pertenece al orden de los Actinomicetales al igual que las micobacterias.

3.3.2. Muestras clínicas de leche caprina

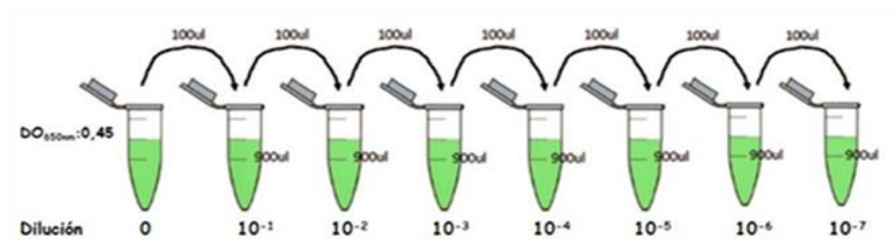
Para evaluar los distintos métodos se utilizaron 32 muestras de leche caprina provenientes de animales libres de tuberculosis de majadas con historial de libres TBB y que previamente fueron sometidos a la prueba de IDR (técnica oficial del SENASA para el diagnóstico de la TBB) con resultado negativo. Estas muestras fueron obtenidas de la Facultad de Ciencias Agrarias de la UNLZ y de un tambo caprino modelo de la localidad de Uribelarrea, provincia de Buenos Aires. Por otra parte, se procesaron 24 muestras de leche de animales con diagnóstico de tuberculosis determinado por IDR y cultivo de lesiones tuberculosas detectadas en los órganos durante la inspección macroscópica de la necropsia (Rocha.2018b; Magnano,2015). De esos animales también se realizó cultivo de hisopado nasal y de leche. Asimismo, los aislamientos fueron confirmados como *M. bovis* por la técnica de hibridación reversa de "Spoligotyping" (Kamerbeek et al., 1997). Estos animales eran provenientes de distintos hatos de la región de Cuyo (Magnano, 2015).

Para la preparación de las cepas para contaminar la leche, se cultivó *M. bovis* BCG en una placa de medio sólido Middlebrook 7H10 (Difco, USA) suplementada con albúmina 5%, dextrosa 4%, AD, en la cual se observaron colonias aisladas (figura 8). Se confirmó previamente la identidad de la cepa de colección por la técnica de hibridación reversa de "Spoligotyping" (espoligotipo SB0120; www.mbovis.org) (Kamerbeek et al., 1997) y

amplificación de los genes *esxA* y *esxB* (Encinas et al., 2018), ausentes en *M. bovis* BCG y presentes en *M. bovis* (anexo).

Se picó una de las colonias aisladas de *M. bovis* BCG en 40 mL de medio líquido Middlebrook 7H9 (Difco, USA) suplementado con 0,5% piruvato de sodio, 0,4% tween 20 y 10% de la mezcla ADC. El cultivo se incubó durante 20 días en agitación (200 rpm) a 37 °C. El crecimiento se monitoreó por espectrofotometría a una longitud de onda de 600nm, hasta alcanzar una densidad óptica (DO) de 0,45 correspondiente a 1×10^8 UFC/mL, según estimación descripta por (Wards y col., 1995). Seguidamente, se alicuotó en fracciones de 1mL, se centrifugó a 4.000 RPM durante 10 min, se descartó el sobrenadante y el *pellet* se lavó con PBS 1x suspendiéndolo y centrifugándolo a 4.000 rpm durante 10 min nuevamente. Luego el *pellet* obtenido fue guardado a -20°C hasta su utilización. Con una de las alícuotas obtenidas, se contaminó leche cruda de cabra con 6×10^7 UFC de *M. bovis* BCG y se realizaron diluciones seriadas 1/10 en leche.

Figura 8. Esquema del proceso de diluciones seriadas 1/10



Contaminación artificial leche cruda caprina, diluciones seriadas 1/10 en leche.

A partir de cada una de las diluciones se extrajo el ADN total utilizando el protocolo descrito para leche de vaca basado en la lisis enzimática con lisozima y proteinasa K seguido de la extracción con solventes orgánicos fenol/cloroformo/alcohol-isoamílico (Zumárraga et al., 2005). Este protocolo fue previamente evaluado con éxito utilizando como matriz leche de cabra (Rocha et al., 2018) y se detalla en la sección de anexos.

3.4. Extracción de ADN

3.4.1. Extracción de ADN a partir de *M. bovis* BCG.

Se realizó la extracción de ADN según el protocolo de (van Embden y col., 1992) (anexo).

3.4.2. Extracción de ADN a partir de micobacterias no tuberculosas y *Nocardia* sp.

Se realizó por lisis por calor. Se colocó una ansada de bacterias en 200 uL de agua apirógena estéril, se calentó a 95°C durante 40 min, y luego se centrifugó a 12.000 RPM durante 5 min. Para la PCR se utilizaron 5uL del sobrenadante.

3.4.3. Extracción de ADN a partir de muestras de leche caprina

Dado que uno de los factores limitantes en la amplificación exitosa de un fragmento de ADN es la calidad y cantidad del templado empleado, en este trabajo se utilizó la metodología de extracción mediante solventes orgánicos fenol/cloroformo/isoamílico (F:C:I). También se incluyó un control negativo de extracción que consistió en un tubo limpio al que se le incorporaron todas las soluciones y se lo sometió al mismo procedimiento de extracción que a las muestras (anexo).

3.5. Cuantificación del ADN extraído

Se utilizó un espectrofotómetro de espectro total (220-750nm) (NanoDrop® 1000, Spectrophotometer, Thermo Scientific, USA). Se cuantificó el ADN obtenido en la totalidad de las muestras en cada dilución de trabajo en ng/μL y se evaluó el parámetro A260/280 que indica el grado de pureza obtenido. Asimismo, se evaluó la calidad del mismo mediante electroforesis horizontal de una alícuota en un gel de agarosa al 0,8% con bromuro de etidio 0,5ug/mL y posterior visualización en un transiluminador de luz ultravioleta.

3.6. Detección molecular del complejo *M. tuberculosis* y *M. bovis* en muestras de leche caprina

A partir del ADN extraído, se realizó la amplificación isotérmica mediada por bucles LAMP-IS6110 (Aryan et al., 2010) y se la comparó con la PCR de punto final utilizando como blancos a la secuencia de inserción IS6110 y al gen Rv2807, característicos del CMT. Adicionalmente, se amplificó la secuencia TbD1, presente en *M. bovis*, *M. africanum* y en cepas ancestrales de *M. tuberculosis* (Araújo et al., 2014a). En las cepas modernas de *M. tuberculosis* esta región está delecionada. Por último, para evaluar la presencia de potenciales inhibidores de la polimerasa se amplificó el gen que codifica β actina (Thacker et al., 2011).

Para estimar la excreción de *M. bovis* por medio de la leche se realizó qPCR-TbD1.

3.7. Amplificación Isotérmica Mediada por Bucles (LAMP)

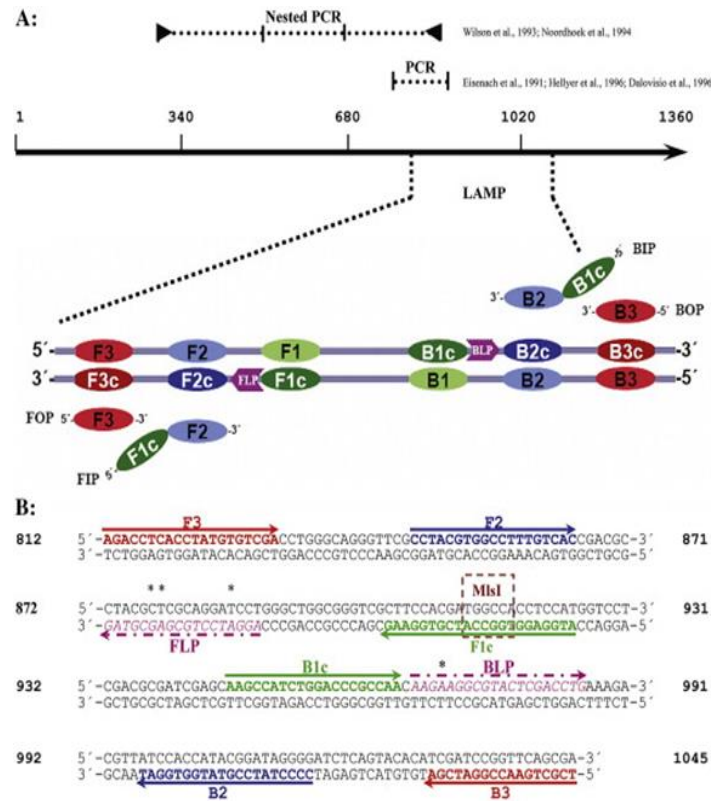
Se evaluó LAMP utilizando como secuencia blanco a la secuencia de inserción IS6110 característica del CMT, utilizando los *primers* descritos por Aryan y col., 2010 (Tabla 2).

Tabla 2: Secuencias de los *primers* usados en LAMP-IS6110

Nombre	Secuencia	Fuente
IS-FOP	AGACCTACCTATGTGTCGA	Aryan et al., 2010
IS-BOP	TCGCTGAACCGGATCGA	
IS-FIP (F1C+F2)	ATGGAGGTGGCCATCGTGGAAGCCTACGTGGCCTTTGTCAC	
IS-BIP (B1c+B2)	AAGCCATCTGGACCCGCCAACCCTATCCGTATGGTGGAT	
IS-FLP	AGGATCCTGCGAGCGTAG	
IS-BLP	AAGAAGGCGTACTCGACCTG	

Secuencias de *primers* utilizados para la detección de IS6110 (característica del CMT) mediante LAMP. FOP: *Primer* externo directo, BOP: *Primer* externo reverso; FIP: *Primer* interno directo; BIP: *Primer* interno reverso; FLP: *Primer* de bucle directo; BLP: *Primer* de bucle reverso.

Figura 9: Esquema de la región IS6110 con las regiones blanco de los primers de LAMP-IS6110



Sitios de hibridación de los primers en la secuencia de inserción IS6110 del complejo *M. tuberculosis*. **A:** Representación esquemática de la secuencia IS6110 completa como barra negra numerada: **B:** la parte inferior de la barra muestra las ocho diferentes regiones reconocidas por los primers de LAMP-IS6110 (tomado de Aryan et al., 2010).

Se prepararon dos mezclas de reactivos, una conteniendo los Primers (10x LAMP primer mix) y otra compuesta por los dNTPs, MgSO₄, Buffer de polimerasa y betaína (2x LAMP mix), según lo descrito por Trangoni y col., 2017 (Tablas 3 y 4).

Tabla 3: Mezcla 1 de reactivos de LAMP (*primers Mix*)

Reactivo	Stock Solución μM	Volumen (μL)	<i>Primers Mix</i> 10x LAMP
H ₂ O	-	48,80	-
FOP (F3)	100	1,60	1,60
BOP (B3)	100	1,60	1,60
FIP (F1c+F2)	100	16,00	16,00
BIP (B1c+B2)	100	16,00	16,00
FLP	100	8,00	8,00
BLP	100	8,00	8,00

Concentración y volúmenes de los *primers* utilizados en la mezcla de reacción 1 de LAMP (adaptado de Trangoni et al., 2017).

Tabla 4: Mezcla 2 de reactivos de LAMP (2x mix)

Reactivo	Stock Solución μM	Volumen (μL)	LAMP Mix
H ₂ O		248	
Betaina	5 M	320	1,6 M
dATP	100 mM	28	2,8 mM
dTTP	100 mM	28	2,8 mM
dCTP	100 mM	28	2,8 mM
dGTP	100 mM	28	2,8 mM
MgSO ₄	100 mM	120	12 mM
Thermo Pool Buffer	10X	200	2X

Reactivos, cantidades y concentraciones para la preparación de mezcla de reacción 2 de LAMP (adaptado de Trangoni et al., 2017).

La reacción se realizó en un volumen final de 25 μL y consistió en una mezcla de 12,5 μL de 2x LAMP mix; 2,5 μL de 10x LAMP *primers mix*;

1µL de Bst polimerasa y 7µL de agua destilada apirógena estéril. Finalmente se incorporaron 2µL de templado en otro ambiente para evitar contaminaciones. La reacción se llevó a cabo a 63°C durante 60min en un baño de agua termostatzado (Vicking modelo Masson 102). Seguidamente la enzima se inactivó por calor a 80°C durante 5min.

Para la detección y visualización del producto de amplificación durante la puesta a punto preliminar de la reacción se realizó una corrida electroforética horizontal en gel de agarosa al 2% en buffer TAE 1x.

Posteriormente, para la optimización del sistema de visualización se evaluaron las siguientes variantes 1) Incorporación a la mezcla de reacción azul de hidroxinaftol (HNB, del inglés *hidroxi naftol blue*) (0,4µL de 7,5mM en volumen final de 25µL) 2) SYBR Gold (Life Technologies) (1 µL 1000x). De este último colorante fluoróforo se colocó 1 µL en el interior de la tapa del tubo de reacción para evitar el contacto con los reactivos, debido a que en dicha concentración actúan como inhibidores de la polimerasa. Al culminar la reacción se puso en contacto el colorante con el producto de amplificación mediante agitación manual vigorosa. Esto permitió la visualización directa sin necesidad de otro equipo, considerándose la reacción positiva al observar coloración anaranjada clara y negativa al observar coloración anaranjada opaca cuando se expone a la luz blanca. También, para mejorar la visualización se los expuso a una fuente de luz azul (lámpara de led 3W, Interelec^R) en la que se observó la fluorescencia verde amarillenta del SYBR Gold, de los productos de reacción que amplificaron la secuencia blanco mientras que los que no amplificaron se vieron opacos.

Además, se evaluó la fluorescencia a la luz ultravioleta de 400nm de longitud de onda en transiluminador de luz UV (UPV 91786).

3.8. PCR de punto Final

Tabla 5: *Primers* utilizados para la detección del CMT, de *M. bovis* y β actina

Nombre	Secuencia 5'3'	Blanco	Tamaño del Producto	Fuente
INS1	CGTGAGGGCATCGAGGTGGC	IS6110	245 pb	Hermans et al., 1990.
INS 2	CGCTAGGCGTCGGTGACAAA			
Forward outer MTC	GGCGGTGGCGGAGTTGAAGGC GATGAG	Rv2807	443 pb	Araújo et al., 2014b.
Forward outer MTC	GCCGCGAGCGAGTCTGGGCGA TGTGTC			
TbD1 FI	GTGCGCGTCGCGGGATTCTAGCT CTAT	TbD1	51 pb	Araújo et al., 2014a.
TbD1 RI	GCGGTCTTCGCCAATGTT			
β ACTINA T. F	TCCCTGGAGAAGAGCTACGA	β actina	98 pb	Thacker et al., 2011.
β ACTINA T. R	AGGAAGGAAGGCTGGAAGAG			

Secuencias de los *primers* utilizados para la detección del CMT (IS6110 y Rv2807), *M. bovis* (TbD1) y β actina.

La PCR-IS6110 se realizó según lo descrito por Zumárraga y col. (2012) y la PCR- Rv2807 según lo descrito por Araújo y col. (2014b) (con modificaciones) y Rocha y col. (2018). La PCR TdD1 fue adaptada a partir de lo descrito por Araújo y col. (2014a).

La mezcla de la reacción consistió en buffer 1x, MgCl₂ (1,5mM en la reacción con los *primers* Rv2807; TbD1 y β actina y 2,5mM en la reacción con los *primers* IS6110); 20nM de cada *primer*; 1.25 U de polimerasa

(GoTaq Polymerase Promega Corp., USA), 0,2mM de cada desoxinucleótido trifosfato (dNTPs) y agua apirógena estéril csp volumen final de 50 µL. La mezcla de reacción se cubrió con una gota de aceite mineral. Como templado, se emplearon 2µL de una dilución 1/20 del ADN extraído según el protocolo anteriormente descrito.

La reacción de amplificación se realizó en un termociclador PTC-100 (MJ Research). Para la amplificación de IS6110 y Rv2807 se utilizó un programa de ciclado *Touch-Down* (tabla 6).

Tabla 6: Programa de ciclado *Touch-Down* para amplificar IS6110 y Rv2807

Programa de ciclado <i>Touch-Down</i>	
96 °C 3 min	Desnaturalización Inicial
96° C 1 min	Desnaturalización
72° C 1 min 8 ciclos (disminuyendo 1 °C/ciclo)	Hibridación
72°C 45 seg	Extensión
96° C 1 min	Desnaturalización
66 °C 1 min 30 ciclos	Hibridación
72° C 1 min.30 seg	Extensión
16 °C infinito	Conservación

Programa de ciclado para la amplificación de las secuencias IS6110 y Rv2807

Para la amplificación de TbD1 se usó el siguiente programa de ciclado (tabla 7):

Tabla 7: Programa de ciclado para amplificar TbD1

Programa de ciclado TbD1	
96°C 3 min	Desnaturalización inicial
96 ° C 1 min	Desnaturalización
53 °C 1 min 30 ciclos	Hibridación
72 °C 1 min	Extensión
72 ° C 10 min	Extensión final
16 °C infinito	Conservación

Programa de ciclado para la amplificación de la secuencia TbD1

Para la amplificación de β -actina se usó el siguiente programa de ciclado (tabla 8):

Tabla 8: Programa de ciclado de β actina

Programa de ciclado β actina	
96°C 3 min	Desnaturalización inicial
96 ° C 1 min	Desnaturalización
55 °C 1 min 30 ciclos	Hibridación
72 °C 1 min	Extensión
72 ° C 10 min	Extensión final
16 °C infinito	Conservación

Programa de ciclado para la amplificación de β -actina

En cada reacción se incluyó un control positivo (ADN extraído de la cepa *M. bovis* BCG), un control de contaminación (agua estéril libre de pirógenos) y un control negativo (ADN de otra especie no relacionada).

Los productos de PCR consistieron en un fragmento de 443pb para Rv2807; de 245pb para IS6110; de 51pb para TbD1 y de 98pb para β actina.

3.8.1. Visualización de las muestras amplificadas por PCR de punto final

Diez microlitros de los productos de PCR se sometieron a electroforesis horizontal en gel de agarosa al 2% (para IS6110; Rv2807 y β actina) y al 3 % (para TbD1) con bromuro de etidio al 0,5ug/mL en buffer TAE 1x. El tamaño del fragmento amplificado se estimó con la ayuda de un marcador de peso molecular (100bp Plus DNA Ladder, AP biotech). La visualización y registro digital se realizó por exposición a la luz ultravioleta en un transiluminador GBOX CHEMI XX6.

3.9. Análisis estadístico

Para el análisis estadístico se utilizó la herramienta Win Epi (Working in Epidemiology) (<http://www.winepi.net/>) desarrollada por Ignacio de Blas, de la Facultad de Veterinaria de la Universidad de Zaragoza, España. Para la evaluación de las pruebas se calculó el valor predictivo positivo (VPP); valor predictivo negativo (VPN); sensibilidad y especificidad, y para la concordancia el índice Kappa (κ). Se consideró un nivel de confianza de 95%. Se consideraron como animales enfermos aquellos de los que se aisló *M. bovis* por cultivo de alguno de sus órganos (prueba de oro del diagnóstico de tuberculosis), mientras que los animales sanos correspondieron a, los que tuvieron cultivo negativo y al grupo de 32 animales IDR negativos provenientes de la Universidad de Lomas de Zamora y de un tambo modelo con largo historial de libre de tuberculosis. Considerando la etapa inicial de evaluación a campo de este trabajo, como estos animales no se faenaron, se asumió que por sus antecedentes de sanidad los cultivos de sus órganos serían negativos. Cabe mencionar que

todas las pruebas moleculares practicadas tuvieron resultados negativos en este grupo de animales. La concordancia se estableció entre cada prueba y el cultivo.

3.10. Criterio de interpretación de resultados de PCR de punto final y LAMP

Aquellas muestras de ADN en las que el producto amplificado fue del tamaño esperado, 245 pb para IS6110 y 443 pb para Rv2807, se consideraron positivas para la detección del CMT, mientras que la amplificación de 51 pb para TbD1, se correspondió con la detección de *M. bovis* / *M. africanum*. En la reacción de LAMP-IS6110 con HNB, al visualizar a la luz blanca el color azul oscuro en el tubo se consideró a la muestra positiva para la presencia del CMT, mientras que con SYBR Gold la reacción positiva fue anaranjada clara (o verde-amarillenta brillante con luz azul). La muestra se consideró negativa cuando se evidenció color anaranjado opaco en el caso de SYBR Gold y celeste en el caso de HNB. En todos los casos, se consideraron los resultados siempre y cuando los controles positivos de PCR hubieran amplificado del tamaño adecuado y, por el contrario, los controles de contaminación, negativos de extracción de ADN y de reactivos de PCR, no hubieran amplificado. Por otra parte, también se consideró la amplificación del control de inhibición de β actina.

Tabla 9: Interpretación de los resultados de PCR de tiempo final

Caso	PCR IS6110 Rv2807	TbD1	β actina	Control negativo de extracción	Control negativo de PCR	Resultado
1	Positivo	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo	Positivo
2	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	No válido
3	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Negativo	No válido
4	Positivo	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo	No válido
5	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo

Criterios de interpretación de los resultados de PCR de tiempo final con cada una de las secuencias blanco evaluadas.

3.11. Estimación de la excreción de *M. bovis* por PCR en tiempo real

Para estimar la excreción de *M. bovis* por leche se realizó una PCR en tiempo real utilizando como secuencia blanco a TbD1. Dicha reacción se realizó en un termociclador StepOnePlus (Applied Biosystems, ThermoFisher, Scientific, USA), utilizando los *primers* descritos en la tabla 5 (Araújo et al., 2014a). La mezcla de reacción consistió en la utilización de la enzima ADN polimerasa Platinum™ Taq (ThermoFisher), 0,1 μ L; buffer 10x 2 μ L; MgCl₂ 1,2 μ L; dNTPs (0,2mM c/u) 0,4 μ L; ROX 0,4 μ L; SYBR Green I (10x) 0,4 μ L; ,*primers* (concentraciones evaluadas 25 nM y 12,5 nM) 1 μ L y 2 μ L del templado (20 a 200 ng/ μ l), y agua apirógena estéril csp volumen final de 20 μ L.

Esta mezcla contiene SYBR Green I como fluoróforo y ROX como referencia interna. El ciclo de amplificación consistió en desnaturalización inicial a 95°C por 5 min, seguido de 40 ciclos de desnaturalización a 95°C por 15 segundos, hibridación 52°C 1 min y extensión a 72°C durante 1 min.

Seguidamente, se realizó la curva de disociación a 95°C por 15 segundos, 60°C 1 min y 95°C por 15 segundos. Para la curva estándar se partió de una muestra de leche contaminada con 1×10^7 UFC/mL (2,77 ng/uL de ADN) de *M. bovis* BCG, se realizaron 5 diluciones seriadas 1/10 por duplicado en leche y se extrajo el ADN. Se seleccionaron 8 muestras de animales tuberculosos.

Resultados

CAPITULO IV

RESULTADOS

4.1. Obtención del inóculo de *M. bovis* BCG para la contaminación experimental de leche fluida de cabra

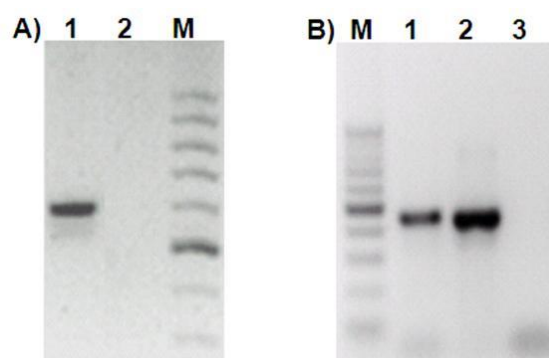
Se empleó la cepa *M. bovis* BCG caracterizada previamente en el laboratorio por "Spoligotyping" (figura 9) y PCR de los genes *esxA* y *esxB*, que codifican las proteínas Esat-6 y Cfp-10 respectivamente, delecionadas en la cepa vacunal *M. bovis* BCG (figura 10).

Figura 10: Espoligotipo de la cepa *M. bovis* BCG



Se muestra el espoligotipo de las cepas de referencia *M. tuberculosis* H37Rv y *M. bovis* BCG. El código asignado a *M. bovis* BCG es el SB0120 (www.mbovis.org).

Figura 11: PCR de los genes *esxA* y *esxB*

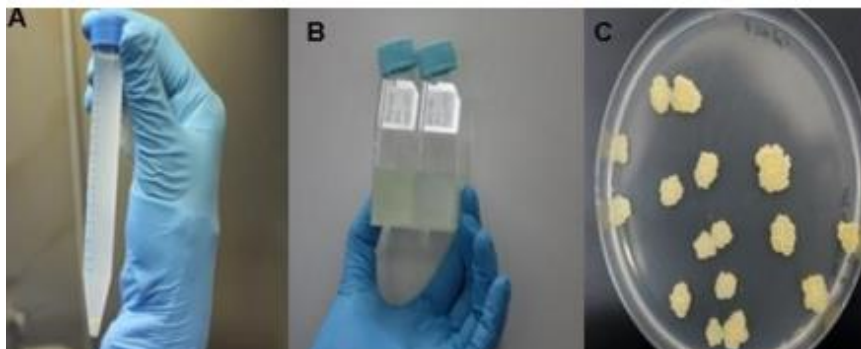


A) Amplificación de *esxA* (288pb) 1: *M. bovis* salvaje; 2: *M. bovis* BCG; M: 50bp DNA Ladder, Promega. B) Amplificación de *esxB* (450pb). 1: *M. bovis* salvaje; 2: *M. bovis* AN5; 3: *M. bovis* BCG; M: 100bp DNA Ladder, Promega.

El crecimiento *in vitro* de la cepa seleccionada para realizar la infección experimental se realizó en medio sintético Middlebrook 7H9 con glicerol 10% y tween 80 0,5% y al cabo de 20 días, luego de alcanzar una DO de 0,7, se obtuvo el inóculo de contaminación (figura 11 A y B). Se

confirmó la morfología bacteriana caracterizada por colonias irregulares y aspecto seco opaco en medio sólido Middlebrook 7H10 (Figura 11C).

Figura 12: Cultivos de *M. bovis* BCG



A y B: Se muestra un cultivo en medio líquido (7H9) y otro en medio sólido (7H10) de la cepa *M. bovis* BCG empleada para el ensayo de contaminación artificial de leche fluida caprina. **C:** colonias características de *M. bovis* BCG en medio (7H10).

A partir de este inóculo se realizó la contaminación artificial de la leche fluida caprina, según el esquema mostrado en la figura 8 de la sección “materiales y métodos”.

4.2. Extracción de ADN a partir de la contaminación con *M. bovis* de leche fluida caprina.

Una vez finalizadas las extracciones de ADN se obtuvieron, los valores de densidad óptica (DO), mediante espectrofotometría. Se detallan los parámetros asociados a cantidad y calidad del material genético en las 24 muestras analizadas.

Tabla 10: Cuantificación del ADN de las muestras de leche de animales IDR positivos

Muestra	ng/μL	260/280	Muestra	ng/μL	260/280
212	162,35	1,77	89	152,30	1,90
9	70,60	2,53	217	2,33	1,45
238	86,94	2,53	207	42,27	2,86
93	487,09	1,92	202	56,01	2,10
208	32,0	1,83	85	120,23	1,98
84	22,35	1,50	11	409,05	1,97
90	79,26	2,01	236	73,78	1,94
210	161,42	1,70	214	17,43	2,11
228	337,65	2,10	SC3	257,60	2,32
92	182,45	2,11	005	239,43	1,56
SC2	236,57	1,92	209	269,88	1,92
SC1	257,20	2,32	232	157,20	1,93

Valores de las cuantificaciones del ADN de todas las muestras de animales IDR positivos. 260/280 pureza y calidad cuantificación (ng/μL).

Tabla 11: Cuantificación del ADN de las muestras de leche de animales IDR negativos.

Muestra	ng/μL	260/280	Muestra	ng/μL	260/280
351	91,95	1,83	025	239,43	2,15
390	51,30	1,02	026	162,35	2,51
381	38,15	0,76	225	161,42	1,98
60	107,73	2,15	05 N	236,57	2,46
99	75,75	1,15	00 N	161,42	2,21
032	49,57	1,23	83	70,15	1,89
033	144,73	1,83	96	487,09	1,93

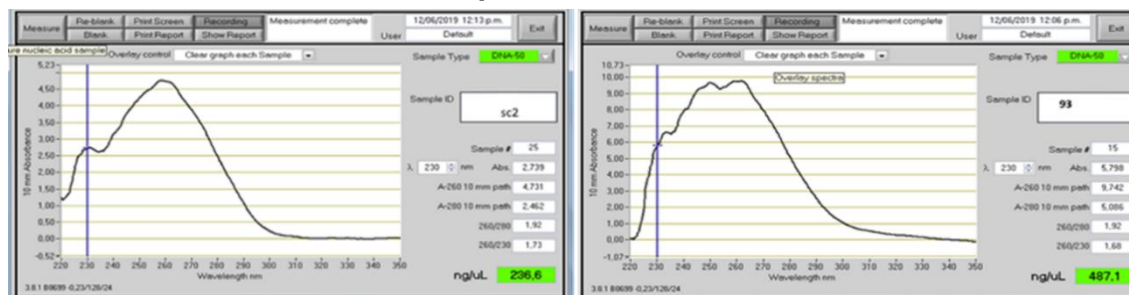
63	156,0	1,89	95	214,57	2,02
081	230	1,85	75	182,45	1,86
001	175	1,95	78	70,89	1,89
14	70,15	1,403	86	120,35	1,75
035	409,06	1,98	88	148,50	1,89

Valores de las cuantificaciones del ADN extraído de muestras de animales IDR negativos. 260/280 pureza y calidad cuantificación (ng/μL);

Se obtuvo variabilidad con respecto a la concentración de ADN en ng/μL (A260), en relación a la pureza de las muestras (A260/A280) y en cuanto a la cuantificación absoluta de la muestra de ADN total.

Se observa en los siguientes gráficos, la concentración (ng/μL) obtenida en la muestra N° 93 con resultado negativo a la detección de CMT y de la muestra SC2 con resultado positivo a la detección de CMT. Dichos gráficos muestran el valor de 260/280 de ambas extracciones de ADN realizadas con fenol/cloroformo/isoamílico, procedimiento aplicado en todas las muestras que se procesaron en este trabajo. Estos resultados son indicativos de la calidad y cantidad del material genético obtenido para las reacciones de amplificación.

Figura 13: Curvas obtenidas de la cuantificación del ADN por espectrofotometría



Cuantificación de ADN de una muestra positiva (SC2) y de una muestra negativa (93). Se observa las curvas con pico a 230/260 que indica una buena calidad de del ADN obtenido.

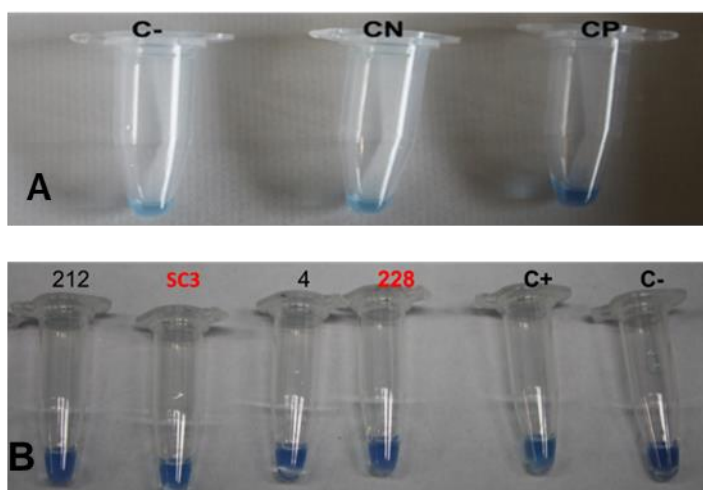
Para determinar la especificidad de los métodos se procesaron y analizaron 32 muestras correspondientes a animales no reactivos a la prueba de tuberculina y muestras de MNT.

4.3. Amplificación Isotérmica Mediada por Bucles (LAMP)

En este trabajo se puso a punto el método de amplificación por bucles para detectar al complejo *M. tuberculosis* en muestras de leche caprina. Se evaluaron dos variantes de visualización del producto de amplificación. 1) Incorporación a la mezcla de reacción de azul de hidroxinaftol (HNB) y 2) SYBR Gold (Life Technologies) colocado en el interior de la tapa del tubo de reacción y posterior agitación luego de culminada la reacción.

Con HNB las amplificaciones se visualizan de color azul intenso mientras que las reacciones negativas se ven de color celeste.

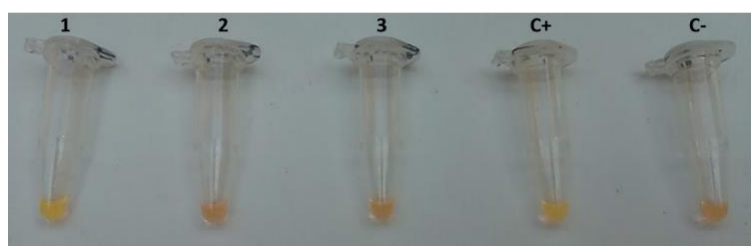
Figura 14: Visualización de LAMP con HNB



A y B: visualización de la amplificación por LAMP con colorante HNB, tubos 212 y 4 resultado negativo, tubos SC3 y 228 amplificación positiva, CN y C-: control negativo. CP y C+ control positivo *M. bovis* (BCG)

Con SYBR Gold las reacciones en las que hubo amplificación se visualizaron a la luz blanca de color anaranjado claro mientras que aquellas en las que no hubo amplificación fueron anaranjado opaco.

Figura 15: Visualización de LAMP con SYBR Gold.



Visualización de la amplificación por LAMP con colorante SYBR Gold, tubo1: muestra SC3 (resultado positivo); tubo 2: muestra 212 (resultado negativo) y tubo 3: muestra 4 (resultado negativo), C-. control negativo y C+. control positivo *M. bovis* (BCG).

Como puede observarse en las fotos descriptas anteriormente, con la utilización de HBN, no se logra diferenciar de manera clara una reacción positiva de otra negativa ya que el cambio de coloración es sutil, caso contrario a lo que ocurre con la utilización de SYBR Gold con el que la

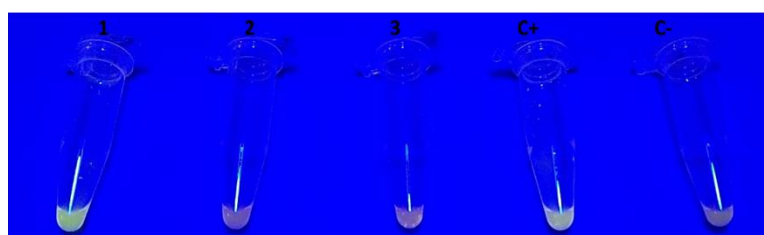
diferenciación es bien notoria. En base a estos resultados se decidió utilizar SYBR Gold para la reacción de LAMP-IS6110.

4.3.1. Evaluación de la visualización de la reacción de LAMP-IS6110 con SYBR Gold en distintas condiciones de iluminación.

Se evaluaron diferentes fuentes de luz para determinar cuál de ellas permitía la mejor visualización del producto amplificado y la mejor diferenciación respecto al control negativo.

Figura 16: Visualización de LAMP-IS6110 en distintas condiciones de iluminación.

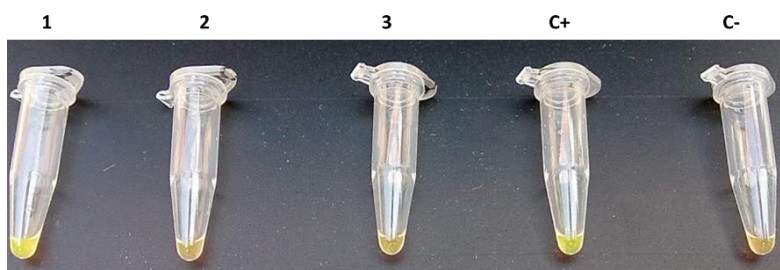
A)



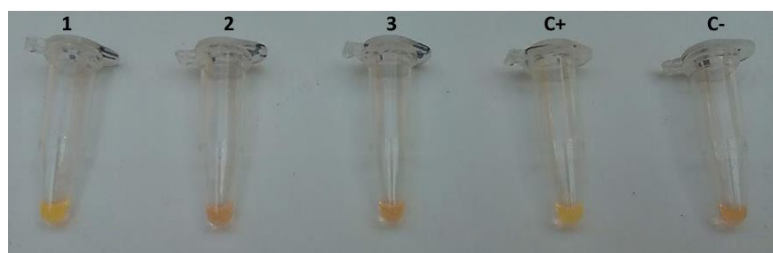
B)



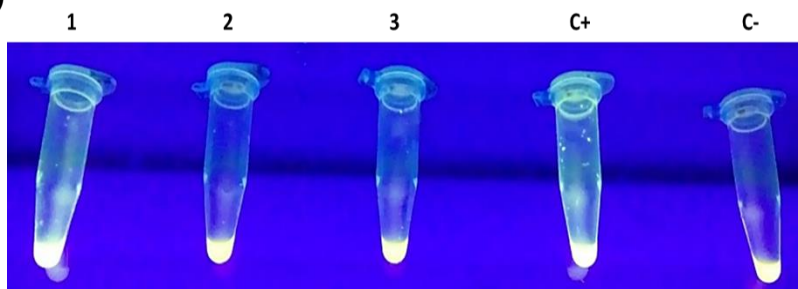
C)



D)



E)



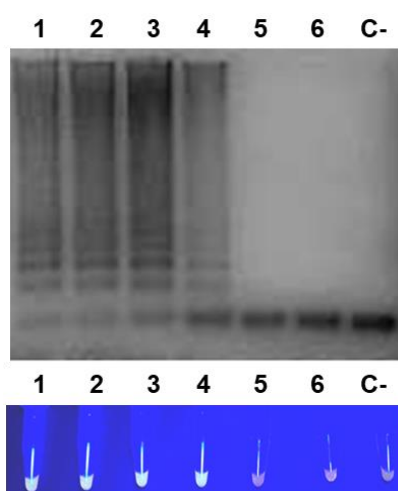
LAMP-IS6110. A) Exposición a luz azul. B) Exposición a luz blanca sobre fondo azul. C) Exposición a la luz solar sobre fondo negro. D) Exposición a la luz solar sobre fondo blanco. E) Exposición a la luz ultravioleta. 1: *Mycobacterium bovis* 2: *Mycobacterium smegmatis* 3: *Mycobacterium phlei* C+: Control positivo (*M. bovis* BCG) C-: Control negativo (agua).

En esta evaluación preliminar pudo observarse que la exposición a la luz UV no permitió diferenciar entre las reacciones en las que hubo amplificación de la que no, ya que en todos los casos hubo fluorescencia. Con las restantes fuentes de luz y condiciones de iluminación fue posible la diferenciación entre las muestras que amplificaron de las que no. Sin embargo, la visualización de la reacción se facilitó cuando los tubos fueron expuestos a una fuente de luz azul ya que se observa una fluorescencia verde amarillenta en las muestras en las que hubo amplificación diferenciándose de aquellas en las que no hubo amplificación. Tanto *Mycobacterium smegmatis* como *Mycobacterium phlei* no amplificaron por LAMP-IS6110.

4.3.2. Determinación de la sensibilidad analítica / límite de detección de LAMP-IS6110

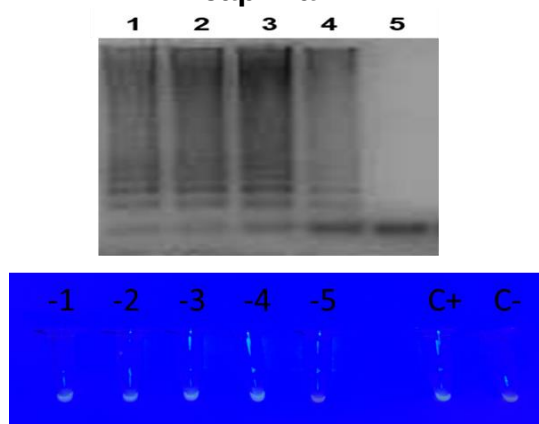
Se determinó la sensibilidad analítica, tanto en agua como en leche fluida caprina, realizando diluciones seriadas 1/10 de *M. bovis* BCG en agua y leche respectivamente. Los resultados se presentan en las figuras 17 y 18.

Figura 17: Límite de detección de LAMP-IS6110 en agua.



LAMP-IS6110 con SYBR Gold como indicador fluorescente de amplificación. Diluciones seriadas 1/10 de ADN en agua. Se observan cuatro reacciones positivas, tubos 1 a 4 con fluorescencia amarillo verdosa y el bandeo característico observado luego de electroforesis horizontal en agarosa al 2 %.

Figura 18: Límite de detección de LAMP-IS6110 en leche fluida caprina



LAMP-IS6110 con SYBR Gold como indicador fluorescente de amplificación. Diluciones seriadas 1/10 de *M. bovis* en leche fluida caprina. Se observan cuatro reacciones positivas tubos 1 a 4 con fluorescencia amarillo verdosa y el bandeo característico observado luego de electroforesis horizontal en agarosa al 2 %.

Como puede observarse en las figuras descriptas anteriormente, tanto en agua como en leche se obtuvo el mismo límite de detección 7×10^3 UFC/mL

Tabla 12: Límite de detección de LAMP-IS6110

Secuencia Blanco	Agua	Leche
LAMP	7×10^3	7×10^3

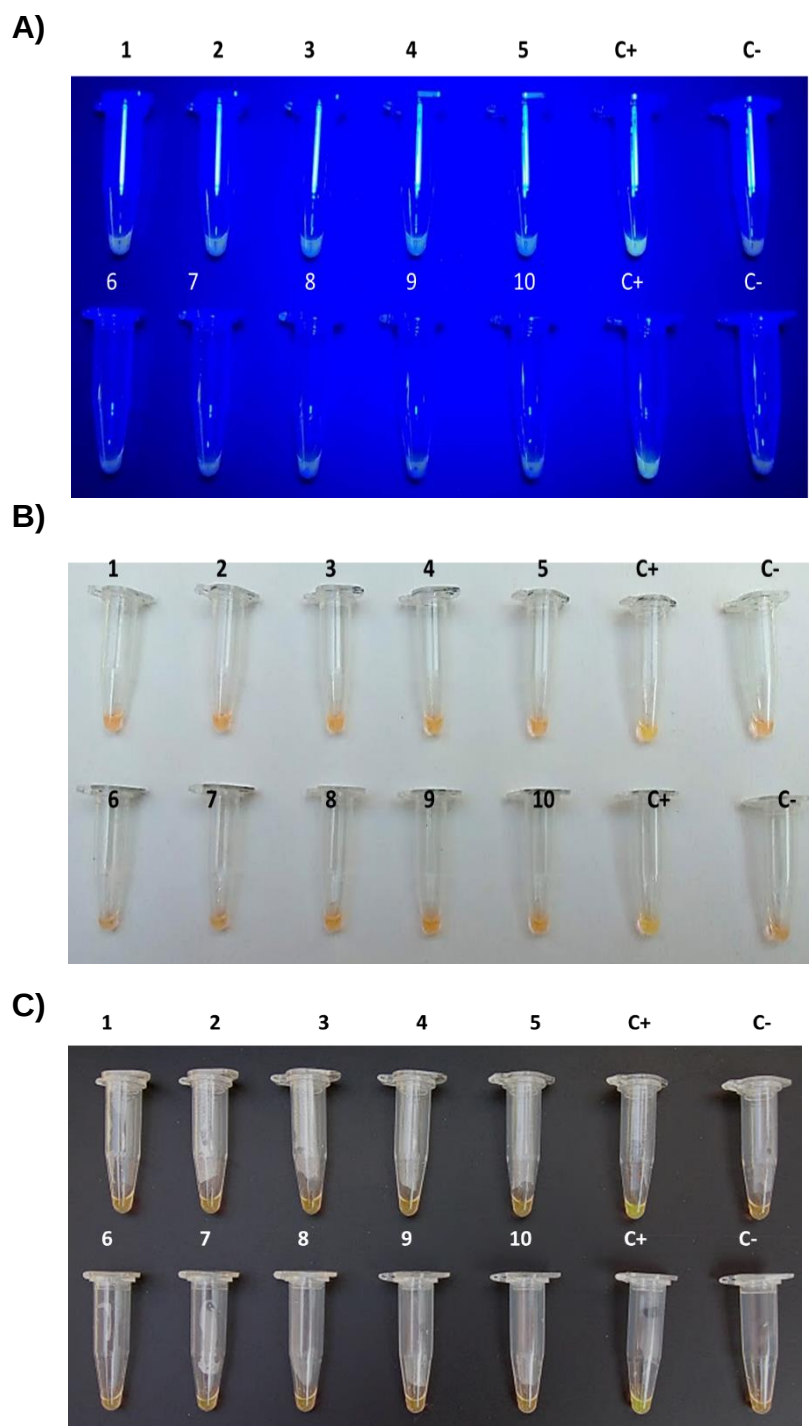
Límite de detección (UFC/mL) de LAMP-IS6110 en leche y agua.

Asimismo, se determinó el límite de detección por tubo de reacción para LAMP-IS6110 siendo de 35 UFC tanto para agua como leche.

4.3.3. Evaluación de la especificidad de LAMP-IS6110

Para evaluar la especificidad del LAMP-IS6110 se utilizó ADN de otras especies de micobacterias (*Mycobacterium smegmatis*, *M. phlei*, *M. fortuitum*, *M. gordonae*, *M. intracellulare*, *M. porcinum*, *M. avium* subsp. *avium*, *M. avium* subsp. *paratuberculosis*) y de *Nocardia*, como género filogenéticamente relacionado ya que pertenece al orden de los Actinomicetales al igual que las micobacterias. En este caso también se evaluaron las distintas fuentes y condiciones de iluminación.

Figura 19: Evaluación de la especificidad de LAMP-IS6110, visualización de la reacción en distintas condiciones de iluminación.



Ensayo de especificidad de LAMP-IS6110. A) visualización con luz azul. B) visualización con luz blanca sobre fondo blanco. C) visualización con luz blanca sobre fondo negro. 1: *Mycobacterium intracellulare*, 2: *Nocardia farcinica* 3: *Nocardia* sp 4: *Mycobacterium gordonae* 5: *Mycobacterium fortuitum* 6: *Mycobacterium phlei* 7: *Mycobacterium smegmatis* 8: *Mycobacterium avium* 9/10: *Mycobacterium porcium* C+: control positivo C-: Control negativo.

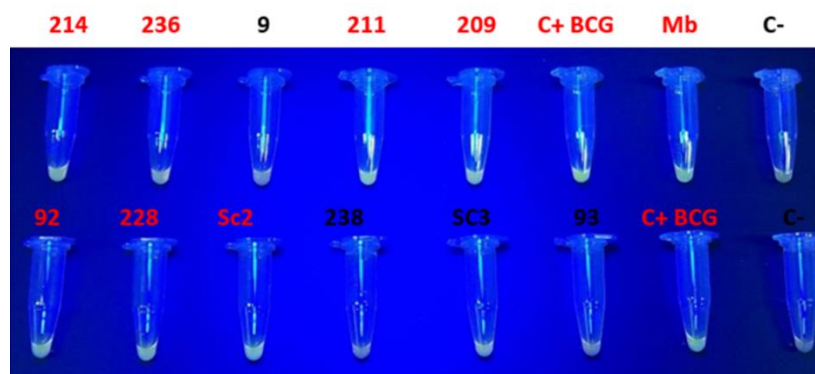
Como puede observarse en ningún caso se obtuvo amplificación con las MNT indicando la especificidad del LAMP-IS6110. Del mismo modo que en el ensayo preliminar, con todas las fuentes de luz y condiciones de iluminación fue posible la diferenciación entre las muestras que amplificaron de las que no. Sin embargo, la visualización de la reacción se facilitó cuando los tubos fueron expuestos a una fuente de luz azul ya que se observó una fluorescencia verde-amarillenta en las muestras en las que hubo amplificación, diferenciándose de aquellas en las que no hubo amplificación. Asimismo, se evaluaron 32 muestras provenientes de animales libres de tuberculosis no obteniéndose amplificación en ninguno de los casos.

4.3.4. Evaluación de la sensibilidad de LAMP-IS6110 en muestras de leche provenientes de animales reaccionantes a la IDR

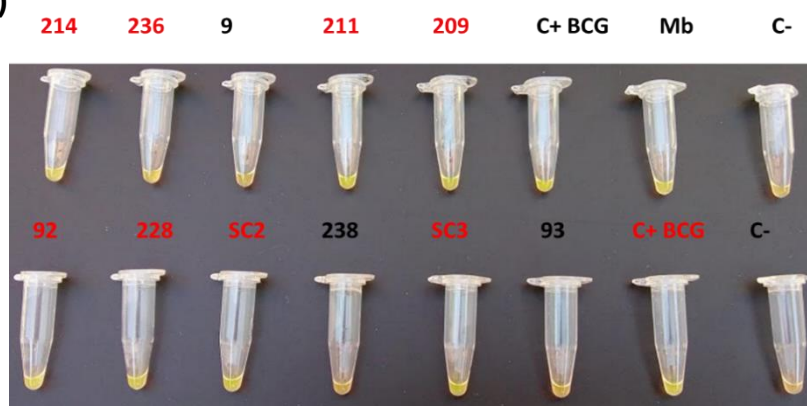
Para la evaluación de LAMP-IS6110 en muestras clínicas, se procesaron 24 muestras de leche de animales con diagnóstico de tuberculosis de las cuales 12 (50 %) fueron positivas por LAMP-IS6110. También se procedió a evaluar distintas fuentes de luz y condiciones de iluminación para determinar cuál de ellas permitía la mejor visualización del producto amplificado y la mejor diferenciación respecto del control negativo.

Figura 20: Evaluación de la sensibilidad de LAMP-IS6110 en muestras de leche, visualización de la reacción en distintas condiciones de iluminación

A)



B)



LAMP-IS6110 en muestras de leche de animales reaccionantes positivos a la PPD. A) Exposición a la luz azul. B) exposición a la luz solar. C+: Control positivo. C-: Control negativo. Los números de las muestras destacadas en color rojo corresponden a un resultado positivo mientras que en negro se indican las muestras con resultado negativo.

4.4. Evaluación de diferentes secuencias blanco de PCR para la detección del complejo *M. tuberculosis* y *M. bovis*

En este trabajo se evaluaron dos secuencias blanco de PCR para detectar al complejo *M. tuberculosis* (IS6110 y Rv2807) y una para *M. bovis* (TbD1). Se determinó la sensibilidad analítica de cada una, tanto en agua como en leche fluida caprina.

Para esto se partió de un cultivo con una concentración de 7×10^7 UFC/mL con el que se contaminó agua y leche fluida cruda caprina y se procedió a

la realización de diluciones seriadas 1/10 en agua y leche respectivamente, y se procedió a la extracción de ADN total, para las distintas reacciones de PCR. Asimismo, se compararon los resultados obtenidos entre las distintas secuencias blanco de PCR evaluadas, cuyos resultados se muestran a continuación en la tabla 13 y en las figuras 21 a 26.

Tabla 13: Límite de detección de PCR

Secuencia blanco	Agua	Leche
IS6110	7×10^2	7×10^2
Rv2807	7×10^4	7×10^5
TbD1	7×10^2	7×10^2

Límite de detección en agua y en leche con las diferentes secuencias para la amplificación de CMT y *M. bovis* expresados en UFC/mL.

En la tabla 13 puede observarse que, tanto en agua como en leche, la mayor sensibilidad analítica se alcanzó con IS6110 y TbD1, alcanzando ambas el mismo límite de detección (7×10^2 UFC/mL).

Por otra parte, con Rv2807 además de haber tenido una menor sensibilidad analítica respecto de las otras secuencias evaluadas, se observó que en leche la reacción fue menos sensible que en agua.

Asimismo, se determinó el límite de detección por tubo de reacción, obteniéndose los siguientes resultados.

Tabla 14: Límite de detección por tubo de reacción PCR

Secuencia Blanco	Agua	Leche
IS6110	3,5	3,5
Rv2807	350	3500
TbD1	3,5	3,5

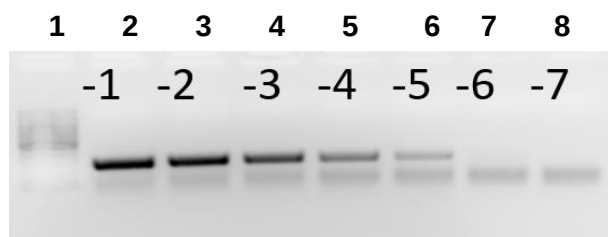
Límite de detección por tubo de reacción de PCR expresado en UFC.

En la tabla 14 se destaca que con las secuencias IS6110 y TbD1, tanto en agua como en leche, se requiere de 3,5 UFC por tubo de reacción para obtener un resultado positivo. Por otra parte, para obtener una PCR Rv2807 positiva son necesarias 350 UFC en agua y 3500 en leche por tubo de reacción de 50uL

4.4.1. PCR -IS6110 Touch-Down

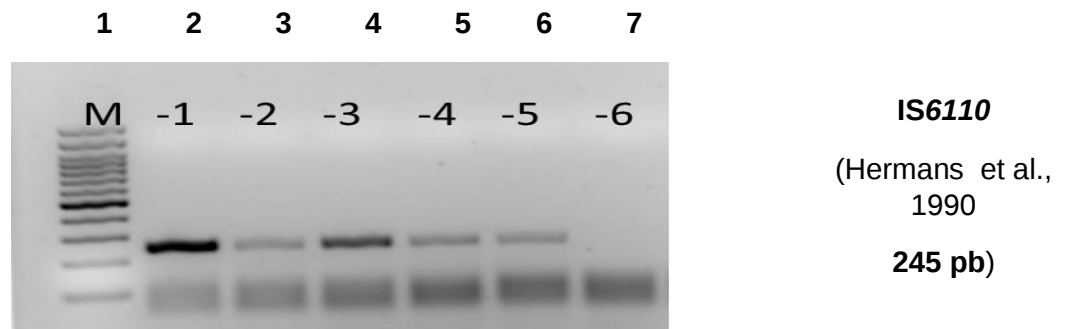
Como se observa en las figuras 21 y 22, tanto en la curva de diluciones de *M. bovis* en agua como en la de leche se obtuvo la misma sensibilidad analítica que corresponde a 7×10^2 UFC/mL.

Figura 21: Límite de detección de PCR-IS6110 TD en agua



Gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio (0,5µg/mL) mostrando los productos de PCR IS6110. Diluciones seriadas 1/10 de *M. bovis* en agua. M: marcador de peso molecular 100 pb (Trans) calles 1 a 5 muestran amplificaciones positivas, mientras que las calles 6 y 7, amplificaciones negativas.

Figura 22: Límite de detección de PCR-IS6110 TD en leche

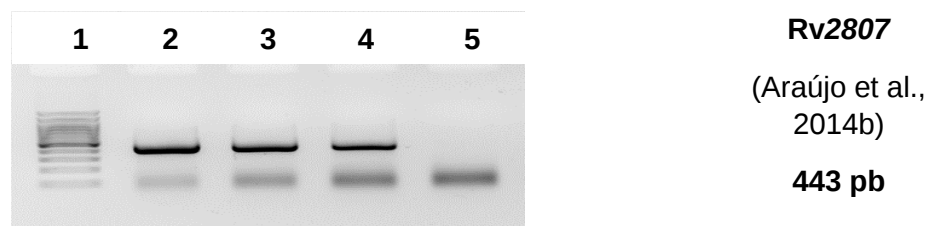


Gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio (0,5µg/mL) mostrando los productos de PCR IS6110.. Diluciones seriadas 1/10 de *M. bovis* en leche. Calle 1 M: marcador de peso molecular 100 pb (Trans). Calles 2 a 6 amplificación positiva. Calle 7: amplificación negativa.

4.4.2. PCR-Rv2807 Touch-Down

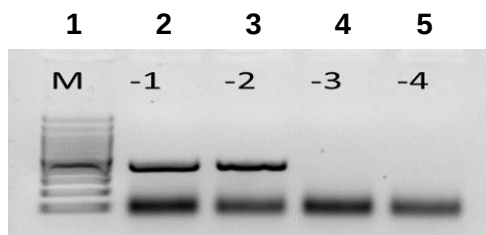
Se observa en las figuras 23 y 24 los límites de detección con la secuencia Rv2807 en agua y en leche. En la curva de diluciones de *M. bovis* en leche hubo una disminución de un orden en la sensibilidad respecto a la curva de diluciones en agua.

Figura 23: Límite de detección de PCR-Rv2807 TD en agua



Gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio (0,5 µg/mL) mostrando los productos de PCR Rv2807. Diluciones seriadas 1/10 de *M. bovis* en agua. Calle 1 M: marcador de peso molecular 100 pb (Trans). Calles 2 a 4 amplificación positiva. Calle 5: amplificación negativa.

Figura 24: Límite de detección de PCR-Rv2807 TD en leche

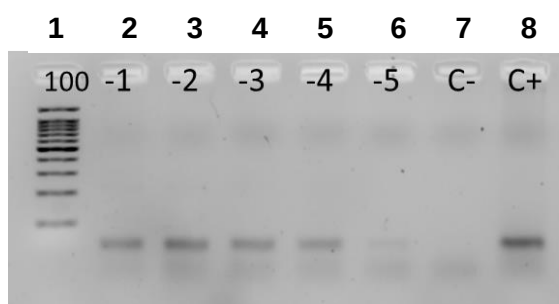


Gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio (0,5 µg/mL) mostrando los productos de PCR Rv2807. Diluciones seriadas 1/10 de *M. bovis* en leche Calle 1 M: marcador de peso molecular 100 pb (Trans). Calles 2 y 3 amplificaciones positivas. Calles 4 y 5 amplificaciones negativas.

4.4.3. PCR-TbD1

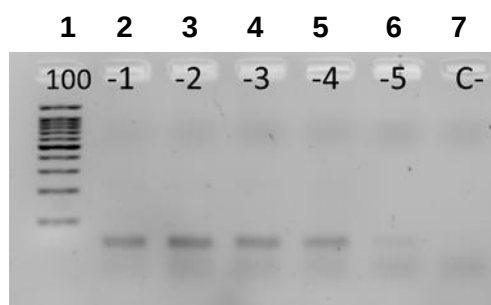
Se observa en las figuras 25 y 26 las amplificaciones con la secuencia TbD1, demostrando que tanto en agua como en leche se obtuvo el mismo límite de detección siendo de 7×10^2 UFC/mL.

Figura 25: Límite de detección de PCR-TbD1 en agua



Gel de agarosa al 3% teñido con bromuro de etidio (0,5 µg/mL) mostrando los productos de PCR-TbD1. Diluciones seriadas 1/10 de *M. bovis* en agua. Calle 1: marcador de peso molecular de 100 pb (Trans); calles 2 a 6) amplificaciones positivas, calle 7 C- control negativo y calle 8 C+ control positivo (*M. bovis* BCG).

Figura 26: Límite de detección de PCR-TbD1 en leche

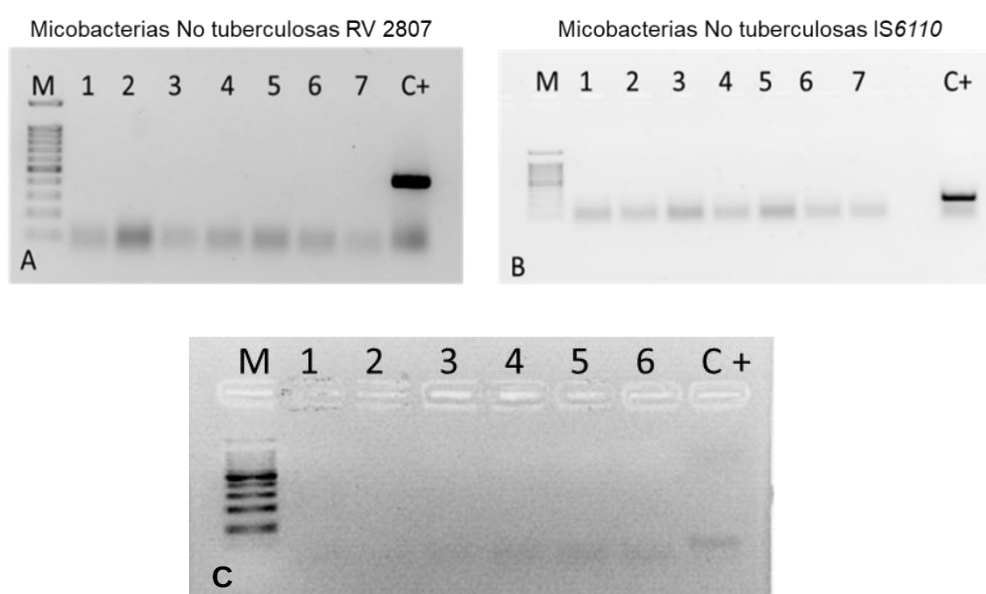


Gel de agarosa al 3% teñido con bromuro de etidio (0,5 µg/mL) mostrando los productos de PCR-TbD1. Diluciones seriadas 1/10 de *M. bovis* en leche. Calle 1: marcador de peso molecular de 100 Pb (Trans) calles 2 a 6 amplificaciones positivas; calle 7 C- control negativo

4.4.4. Especificidad de la PCR

Para determinar la especificidad de cada secuencia blanco de PCR (Rv2807, IS6110 y TbD1) se sometieron a PCR distintas micobacterias no tuberculosas y también *Nocardia sp.*, género que pertenece al orden de los Actinomycetales como las micobacterias. Cabe mencionar que todas las especies evaluadas son cepas de colección del laboratorio. En las figuras 27 se observa la ausencia de amplificaciones lo que confirma la especificidad de cada sistema de amplificación.

Figura 27: Especificidad de la PCR de punto final

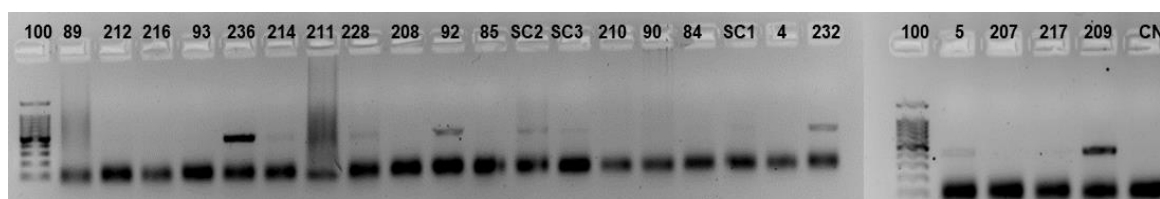


PCR-Rv2807-TD (A) ; PCR-IS6110-TD (B) y PCR TbD1 (C) de micobacterias no tuberculosas y *Nocardia sp.*. Geles de agarosa al 2% (A y B) y 3% (C) representativo teñido con bromuro de etidio (0,5µL/mL). M: marcador de peso molecular 100 pb (100 pb DNA Ladder, Trans). 1: *Nocardia farcinica*; 2: *Nocardia sp.*; 3: *Mycobacterium porcinum*; 4: *Mycobacterium phlei*; 5: *Mycobacterium avium* subsp. *avium*; 6: *Mycobacterium smegmatis*; 7 Control negativo; C+: control positivo *M. bovis* BCG..

4.4.5. Evaluación de la sensibilidad y especificidad de la PCR en muestras clínicas de leche

Para evaluar los diferentes métodos en muestras clínicas de animales reaccionantes a la prueba diagnóstica oficial del SENASA para animales en pie, se procesaron 24 muestras de leche de animales con diagnóstico de tuberculosis por IDR, inspección macroscópica y posterior confirmación por cultivo de las lesiones detectadas y por “Spoligotyping”. Asimismo, se analizaron 32 muestras de animales con diagnóstico negativo de tuberculosis que resultaron negativas con las tres secuencias blanco analizadas por PCR de punto final (Rv2807; IS6110 y TdD1).

Figura 28: PCR-Rv2807 *Touch-Down* en muestras de leche



A y B: PCR-Rv-2807-TD. Gel de agarosa al 2% representativo teñido con bromuro de etidio (0,5µL/mL). Se observan los productos de PCR de 443 pb de Rv2807 de las muestras de leche. CN: Control negativo (agua). 100 (marcador de peso molecular de 100 pb; Trans).

En este trabajo fueron analizadas 24 muestras: 11 (45,8%) resultaron positivas por PCR-Rv2807-TD y las 13 (54,2%) restantes resultaron negativas.

Luego se procedió a la evaluación de la PCR-IS6110-TD, cuyos resultados se muestran a continuación en la figura 29.

Figura 29: PCR-IS6110 Touch-Down en muestras de leche



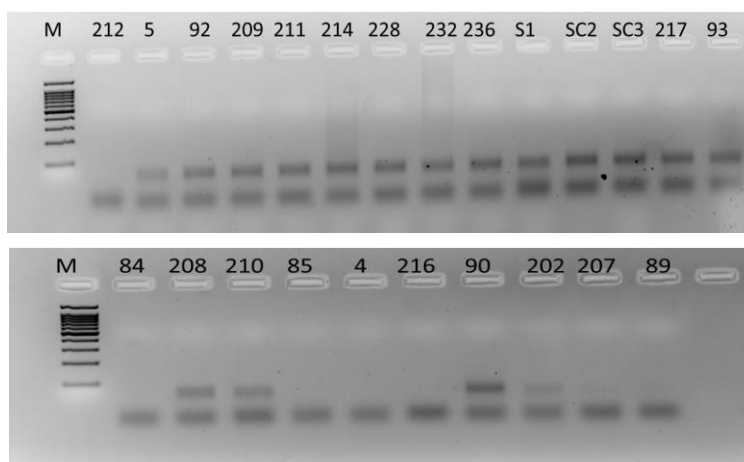
A y B: PCR-IS6110-TD. Gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio (0,5µL/mL). Se observan los productos de PCR de 245 pb de PCR IS6110 de las muestras de leche. CN: Control negativo (agua). C+: control positivo (*M. bovis* BCG). M: marcador de peso molecular de 100 pb (100 pb DNA Ladder, Trans).

De las 24 muestras analizadas mediante la amplificación de PCR-IS6110: 11 (45,8%) resultaron positivas por PCR-IS6110 y 13 (54,2%) restantes resultaron negativas.

Finalmente se evaluó la PCR-TbD1 que permite identificar *M. bovis*. (Araújo et al., 2014a).

Como se observa en la figura 30, de las 24 muestras analizadas hubo amplificación por TbD1 en 19 (70,8%) muestras, mientras que en 7 no se obtuvo amplificación. De esta manera esta secuencia fue con la que se obtuvo mayor positividad en muestras de animales naturalmente infectados.

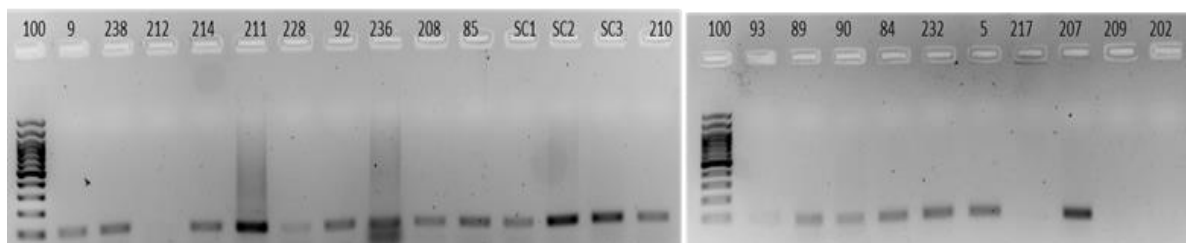
Figura 30: PCR-TbD1 en muestras de leche



PCR-TbD1 en leche. Gel de agarosa al 3% teñido con bromuro de etidio (0,5µL/mL). Se observan los productos amplificados de 51 pb a partir de las muestras clínicas de leche. Calle1: M marcador de peso molecular de 100 pb (100 pb DNA Ladder, Trans).

Adicionalmente, para detectar la inhibición de la polimerasa ante la presencia de distintas sustancias que actúan como tal, se amplificó el gen que codifica β actina cuyo producto es de 98 pb.

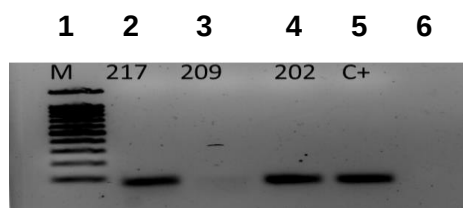
Figura 31: PCR- β actina



PCR β -actina. Gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio (0,5 µg/mL) mostrando la amplificación de β -actina (98 pb).

Se observa amplificación positiva en la mayoría de las muestras, con excepción de las muestras 217; 209 y 202 (Figura 31). Estas muestras se volvieron a procesar, realizando una dilución 1/20 en agua del ADN. De esta manera los inhibidores también se diluyeron y se obtuvo amplificación como se observa en la figura 32.

Figura 32: PCR β actina de muestras inhibidas y diluidas en agua



PCR β -actina. Gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio (0,5 μ g/mL) mostrando la amplificación de β -actina (98 pb). Se observa amplificación positiva en las muestras 217; 209 y 202. Calle 5: C+ Control positivo (ADN extraído de un tejido bovino). Calle 6: Control negativo (agua).

A partir de los resultados obtenidos con las muestras que estaban inhibidas se volvieron a realizar las PCR con las distintas secuencias blanco evitando así un resultado falso negativo. Las tres muestras resultaron positivas por PCR-TbD1 y además una de ellas (209) también fue positiva tanto por PCR-Rv2807 TD y PCR-IS6110 TD (tabla 15).

Tabla 15: Resultados de los distintos métodos aplicados en las muestras de los animales naturalmente infectados

Caravanas	Cultivo de tejido		Cultivo de hisopado nasal		Leche			Spoligo	Lesiones macroscópicas
	ST	LJ	ST	LJ	LAMP-IS6110	PCR 2807/6110	PCR-TbD1		
004	-	-	-	-	-	-	-	-	sin lesiones
005	+		-	-	+	+	+	SB0140	sistema respiratorio
084	-	-	-	-	-	-	-		sistema respiratorio
085	-	-	-	-	-	-	-	-	solo ganglios retrofaringeos
089	+	-	-	-	-	-	+	SB0140	sistema respiratorio
090	+	-	-	-	-	-	+	SB0140	sistema respiratorio
092	+		-	-	+	+	+	SB0140	sistema respiratorio
093	+		-	-	-	-	+	SB0140	generalizada
202	+	-	-	-	-	-	+	SB0140	sistema respiratorio

207	+		-	-	-	-	+	SB0140	sistema respiratorio
208	+	-	-	-	-	-	+	SB0140	sistema respiratorio
209	-	-	-	-	+	+	+		sistema respiratorio
210	+	-	-	-	-	-	+	SB0140	sin lesiones
211	+	-	-	-	+	+	+	SB0140	Sistema respiratorio y digestivo
212	-	-	-	-	+	-	-	-	sin lesiones
214	-	-	-	-	+	+	+	-	sistema digestivo
216	-	-	-	-	-	-	-	-	sin lesiones
217	+		+	-	-	-	+	SB0140	sistema respiratorio y digestivo
228	+	+	-	-	+	+	+	SB0140	generalizada
232	+	+	-	-	+	+	+	SB0140	Sistema respiratorio
236	-	-	-	-	+	+	+	-	Sistema respiratorio
SC 1	-	-	-	-	+	+	+	-	sin lesiones
SC 2	-	-	-	-	+	+	+	-	sin lesiones
SC 3	+		-	-	+	+	+	SB0140	sistema respiratorio

Resultados globales de las pruebas diagnósticas aplicadas en las cabras faenadas. Cultivo de tejido, hisopado nasal, PCR y LAMP en leche cruda, tipificación por "Spoligotyping" y presencia de lesiones tuberculosas macroscópicas. ST: Medio Stonebrink. LJ: Medio Löwenstein Jensen. Spoligo: espoligotipo. Todos los cultivos realizados a partir de muestras de leche resultaron negativos.

La comparación de los resultados obtenidos mediante los distintos métodos permitió determinar que con excepción de una sola muestra (212) hubo concordancia entre LAMP-IS6110 y PCR IS6110 y Rv2807 Esta muestra había tenido cultivo negativo y resultado negativo de PCR IS6110; Rv2807 y TbD1, pero positivo por LAMP-IS6110.

Once muestras detectadas por LAMP-IS6110 concordaron con TbD1, por otra parte, hubo 4 muestras negativas por ambos métodos.

Las 14 muestras que tuvieron cultivo positivo fueron positivas por PCR TbD1, por otra parte, de los 10 cultivos negativos, 5 tuvieron PCR-TbD1 negativa.

La PCR-IS6110 y la PCR-Rv2807 tuvieron una concordancia del 100%. Detectaron el mismo número de muestras positivas (11), de las cuales 6 tuvieron aislamiento de *M. bovis* por cultivo. Por otra parte, hubo 5 muestras que tuvieron PCR IS6110 y Rv2807 negativa y cultivo positivo. Hubo concordancia en los resultados de 7 muestras con cultivo positivo, LAMP-IS6110 y PCR-IS6110 y Rv2807.

El espoligotipo detectado fue el SB0140 (www.mbovis.org) que se corresponde con el más frecuente entre los aislamientos estudiados de Argentina.

Figura 33: Espoligotipo detectado en los aislamientos de *M. bovis*.



Tipificación por "Spoligotyping" de cinco aislamientos de *M. bovis*. El espoligotipo detectado fue el SB0140 (www.mbovis.org).

4.6. Análisis estadístico

Para evaluar las pruebas diagnósticas se calculó el valor predictivo positivo, el valor predictivo negativo, la sensibilidad y especificidad mientras que para la concordancia entre pruebas se calculó el índice kappa (κ). En la tabla 16 se resumen los resultados obtenidos.

Tabla 16: Evaluación y concordancia de las pruebas diagnósticas respecto al cultivo (prueba de oro)

	LAMP-IS6110	PCR-IS6110	PCR-Rv2807	PCR-TbD1
VPP	50	54,5	54,5	73,7
VPN	81,8	82,2	82,2	100
Sensibilidad	42,9	42,9	42,9	100
Especificidad	85,7	88,1	88,1	88,1
Índice K	0,3 (concordancia débil)	0,33 (concordancia débil)	0,33 (concordancia débil)	0,787 (concordancia adecuada)
Intervalo de confianza Kappa se(0)	(0,039-0,561)	(0,075-0,592)	(0,075-0,592)	(0,531-1,043)
Intervalo de confianza Kappa se(1)	(0,098-0,502)	(0,113-0,554)	(0,113-0,554)	(0,617-0,958)

VPP (valor predictivo positivo); VPN (valor predictivo negativo); κ (índice Kappa). El VPP, VPN, la sensibilidad y la especificidad se expresaron en %, mientras que la índice kappa como probabilidad (0-1). Se consideraron como animales enfermos aquellos de los que se aisló *M. bovis* por cultivo (prueba de oro del diagnóstico de tuberculosis), mientras que los animales sanos correspondieron a los que tuvieron cultivo negativo y los 32 provenientes de un hato con historial de libre de tuberculosis. La concordancia se realizó respecto al cultivo. El análisis se realizó con la herramienta WinEpi (<http://www.winepi.net/>). Se consideró un nivel de confianza de 95%.

Tabla 17: Evaluación de LAMP-IS6110

	Cultivo -	Cultivo +	TOTAL
LAMP-IS6110 -	36	8	44
LAMP-IS6110 +	6	6	12
TOTAL	42	14	56

Evaluación de LAMP-IS6110 respecto al cultivo (prueba de oro)

Tabla 18: Evaluación de PCR- IS6110/Rv2807-TD

	Cultivo -	Cultivo +	TOTAL
PCR-IS6110/Rv2807 -	37	8	45
PCR-IS6110/Rv2807 +	5	6	11
TOTAL	42	14	56

Evaluación de PCR IS6110/Rv2807-TD; respecto al cultivo (prueba de oro)

Tabla 19. Evaluación de PCR-TbD1

	Cultivo -	Cultivo +	TOTAL
PCR-TbD1 -	37	0	37
PCR-TbD1 +	5	14	19
TOTAL	42	14	56

Evaluación de TbD1 respecto al cultivo (prueba de oro)

Se observaron diferencias notables al comparar las pruebas moleculares evaluadas, respecto del cultivo (Tabla 16). La sensibilidad de las pruebas, fue de 100% para PCR-TbD1 (Tablas 16 y 19), y 42,9 tanto para LAMP-IS6110 como para PCR-IS6110/Rv2807-TD (Tablas 16, 17 y 18). La especificidad fue de 88,1% para PCR-TbD1 y PCR-IS6110/Rv2807-TD y de 85,7% para LAMP-IS6110. El VPP máximo se obtuvo con PCR-TbD1 (73,7%), seguido por PCR-IS6110/Rv2807-TD (54,5%) y LAMP-IS6110 (50%). Por otra parte, el VPN de PCR-TbD1 fue de 100%, seguido por PCR-IS6110/Rv2807-TD (82,2%) y LAMP-IS6110 (81,8%). Con respecto a la concordancia de las pruebas respecto del cultivo, el mayor grado de concordancia se obtuvo con PCR-TbD1 (0,787 adecuado), mientras que con LAMP-IS6110 y PCR-IS6110/Rv2807-TD el grado de acuerdo fue débil (0,3 y 0,33 respectivamente) (Tabla 16).

Por otra parte, la concordancia entre PCR-IS6110-TD y PCR-Rv2807-TD fue del 100% mientras que entre LAMP-IS6110 y PCR-IS6110/Rv2807-TD solamente hubo un resultado discordante (tabla 20) (coeficiente Kappa 0,945, grado de concordancia excelente; nivel de confianza 95%, intervalo de confianza Kappa se (0): 0,684-1,207; intervalo de confianza Kappa se (1): 0,839-1,051).

Tabla 20: Concordancia entre LAMP-IS6110 y PCR-IS6110/Rv2807-TD

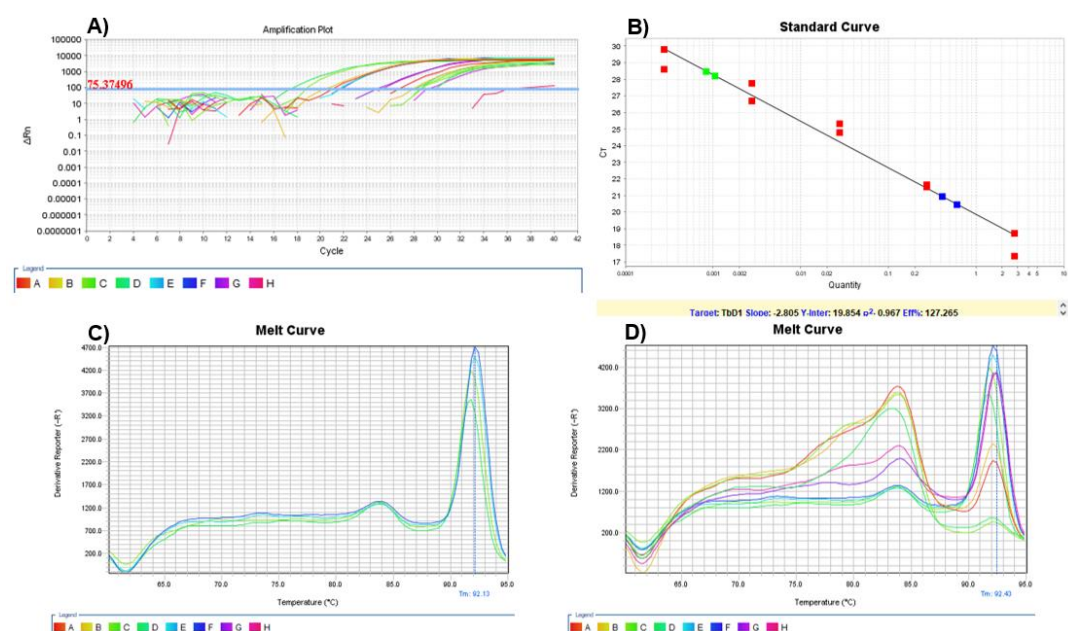
	PCR-IS6110/Rv2807 -	PCR-IS6110/Rv2807 +	TOTAL
LAMP-IS6110 -	44	0	44
LAMP-IS6110 +	1	11	12
TOTAL	45	11	56

4.7. Estimación de excreción de *M. bovis* en leche fluida caprina

Para estimar la excreción de *M. bovis* en leche fluida de cabra, se inició la puesta a punto de un método de PCR en tiempo real con SYBR Green I para realizar la cuantificación del ADN de *M. bovis* en dicha matriz. Se utilizaron los *primers* TbD1 (Araújo et al., 2014a). Se realizaron pruebas de los mismos a 25 nM y 12,5 nM con el objetivo de minimizar la formación de dímeros. Se aplicó el método de cuantificación absoluta mediante curva standard. Para la construcción de dicha curva se partió de una extracción de ADN realizada en una muestra de leche contaminada con 7×10^7 UFC/mL (2,77 ng/uL de ADN) de *M. bovis* BCG y se realizaron diluciones seriadas 1/10 en leche y se extrajo el ADN correspondiente. Se realizaron las reacciones por duplicado. El coeficiente de correlación lineal (R) obtenido fue de 0,967. En conjunto con la mencionada curva se corrió por duplicado

un panel de 8 muestras seleccionadas de animales naturalmente infectados, de las cuales solamente dos pudieron contemplarse para el análisis y estimar los niveles de excreción. Esto se debe a que el sistema aún requiere de ciertas mejoras, para minimizar la formación de dímeros y mejorar la sensibilidad de la reacción, variables que se optimizarán en futuras determinaciones. En la figura 34 se observa el incremento de la formación de dímeros de *primers* cuando la concentración del ADN de *M. bovis* disminuye en las sucesivas diluciones de la curva standard (figura 34 C y D).

Figura 34: Gráficos de la PCR-TbD1 en tiempo real



Gráficos de la qPCR TbD1. A) Diferencia de fluorescencia vs número de ciclos; B) Curva standard de diluciones 1/10 de ADN de *M. bovis* BCG (Ciclo umbral CT vs ng). En verde se identifica la muestra 228 y en azul la 92 D) Curva de disociación de los puntos de la curva con alta concentración de ADN. D) Curva de disociación de los puntos de la curva con baja concentración de ADN.

La cuantificación del ADN de las dos muestras incluidas en el análisis (92 y 228) fue diferente, con valores de Ct de 20,69 y 28,3 respectivamente. Esto se corresponde con niveles de excreción diferentes

siendo de 0,513 ng (32.414 UFC) para la 92 y 0,001 ng (60 UFC) para la 228. Al estimar la concentración excretada por mL de leche correspondería a $1,29 \times 10^7$ UFC/mL para la muestra 92 y $2,4 \times 10^4$ UFC/mL para la 228. Ambas muestras fueron positivas por PCR en tiempo final utilizando las tres secuencias blanco (Rv2807, IS6110 y TbD1). La muestra 228 provenía de un animal con lesiones generalizadas y cultivo positivo, tanto de tejidos como hisopado nasal, mientras que la 92 tenía lesiones en el sistema respiratorio y cultivo positivo de tejidos. Con lo cual en las dos muestras analizadas no pudo establecerse una relación de la excreción de *M. bovis* por leche respecto a la patología de la enfermedad.

Esta primera aproximación a la metodología nos sirvió para evaluar diferentes reactivos y condiciones de reacción y constituiría una experiencia preliminar o piloto.

Discusión

CAPITULO V

DISCUSION

Para producir alimentos sanos, de calidad y responder a las exigencias de los mercados, en nuestro país debemos contar con rodeos libres de enfermedades. Para esto es necesario perfeccionar los sistemas de prevención, control y erradicación de las mismas, como es el caso de la tuberculosis en animales, que no solo afecta a especies de importancia pecuaria sino también al hombre por tratarse de una zoonosis.

En nuestro país, el plan de control y erradicación de la tuberculosis bovina es de alcance nacional (SENASA, Resol 128/12) y contempla a la especie caprina como uno de los hospedadores susceptibles e intermediarios del principal agente causal de la tuberculosis en animales, *M. bovis*.

El sistema de vigilancia epidemiológica en los bovinos se basa en el resultado de la prueba intradérmica a campo y en la inspección de las reses faenadas en busca de lesiones compatibles con tuberculosis, pudiendo ser decomisados en forma total o parcial según el protocolo descrito por SENASA (Resol 128/12), constituyendo ésta una de las últimas barreras de protección al consumidor.

Si bien en el marco del PNCETBB se aplica un conjunto de procedimientos para la inspección de animales en faena para rodeos lecheros y cárnicos, tanto bovinos como caprinos, en estos últimos, su aplicación presenta ciertas limitaciones. La faena de cabritos de producción

de carne, se realiza entre los 2 y 3 meses de edad, tiempo en el que generalmente no se formarían lesiones tuberculosas visibles debido al corto tiempo de contacto, a diferencia de lo que sucede con la producción de bovinos, limitándose así la detección de lesiones de una enfermedad de curso generalmente crónico (Kantor et al., 1987).

A su vez, la producción caprina en nuestro país se desarrolla en el marco de explotaciones familiares, donde es frecuente la faena informal. Debido a esto, es probable que la verdadera ocurrencia de la TB caprina en nuestro país esté subestimada (Magnano 2015). Sin embargo, los casos con presentación de mastitis tuberculosa son muy poco frecuentes, siendo el consumo de leche cruda obtenida de esos animales un importante riesgo para la salud pública (Smith, 2010; O'Reilly y Daborn, 1995).

Para determinar el estado de TB en el individuo o rebaño se utilizan distintas pruebas de diagnóstico. Pruebas que miden la inmunidad mediada por células (CMI) como prueba única de tuberculina intradérmica (SITT) o prueba intradérmica única. La prueba comparativa de tuberculina (SICTT) y el ensayo IFN- γ han demostrado una mayor sensibilidad y especificidad que las pruebas basadas en la detección de la respuesta inmune humoral (Gutiérrez et al., 1998; Zanardi et al., 2013). Sin embargo, hay una falta de estandarización de SITT y SICTT en caprinos y ciertos aspectos como la inyección del sitio (cuello u hombro) o la interpretación de los resultados varían entre los estudios (Alvarez et al., 2008; Zanardi et al., 2013) y generalmente se aplican siguiendo los estándares desarrollados en el ganado bovino. Entre los ensayos serológicos el ELISA ha demostrado una

gran capacidad para detectar animales anérgicos en una etapa avanzada de infección (Gutiérrez et al., 1998; Zanardi et al., 2013).

La revisión bibliográfica del diagnóstico de TB en cabras por Bezos y col. (2012a y b), proporciona una visión general de las herramientas *in vivo* para el diagnóstico de tuberculosis caprina, incluidas las estimaciones de la sensibilidad y especificidad de las pruebas realizadas en estas especies. Este estudio destacó la necesidad de evaluar las pruebas de diagnóstico actuales, desarrolladas para el ganado, en las especies hospedadoras objetivo y para determinar las características de rendimiento de las pruebas contra las especies individuales de MTC. La literatura indica la importancia de la TB en cabras y la necesidad de diseñar una estrategia de control nacional factible en el ganado de los países donde la TB es endémica en el ganado bovino. Para minimizar la propagación de la tuberculosis entre los animales en la misma granja, se debe considerar primero un manejo adecuado mediante la separación de especies entre el ganado cuando sea posible; segundo un programa activo de vigilancia ante TB *pre-mortem* en rebaños de cabras; y por último vigilancia *post-mortem* de TB activa y precisa en el matadero.

A pesar de que el seguimiento sanitario en esta especie es dificultoso, y que la industria láctea está en crecimiento en varias regiones del país, la utilización de técnicas complementarias para la detección de infección por MTC en caprinos, permitirá que se aborde con mayor atención a este problema como sucede en otras partes del mundo (Pesciaroli et al; 2014).

En el presente trabajo se evaluaron diferentes métodos moleculares con el fin de aportar nuevas herramientas diagnósticas complementarias a las oficiales para la detección de animales con TB mediante el análisis de leche fluida caprina, alimento que cobra cada vez más importancia en el país y a nivel mundial por sus características nutricionales. Además, esta estrategia permite asegurar la calidad del producto de forma rápida y sencilla, aportando valor agregado a esta industria en desarrollo.

La composición de dicho fluido biológico varía tanto en las diferentes especies como en las diferentes razas de una misma especie. La calidad nutricional de la leche caprina es superior a la bovina, destacándose la alta concentración de calcio (Chacon et al., 2005). Para el diagnóstico molecular por PCR este dato no es menor, ya que este elemento es un inhibidor de la ADN polimerasa, requiriéndose de procedimientos eficientes tanto en la extracción como en la purificación del material genético que se obtiene a partir de esta matriz (Abu Al-Soud et al., 1998).

Previamente hemos logrado establecer que la leche caprina es una matriz que permite la detección de micobacterias (Rocha, 2018) al igual que se ha descrito en leche proveniente de otras especies (Zumárraga et al., 2012).

En la puesta a punto de la PCR-IS6110 en leche de bovinos, se estableció que con la dilución del ADN obtenido 1/20 en agua, se lograba contrarrestar los efectos de los inhibidores de la muestra sin condicionar la sensibilidad (Zumárraga et al., 2012). A pesar de que la leche de cabra es más rica en calcio, y este elemento es un gran inhibidor de la PCR, pudimos observar que realizando la misma dilución del ADN extraído a partir de

leche caprina, en la mayoría de los casos también se logra la amplificación, sin que los inhibidores afecten la reacción. En este trabajo se detectaron tres muestras con inhibidores, pero que luego de realizar una dilución adicional del ADN en agua se logró contrarrestar dicho efecto.

La técnica de PCR permite detectar material genético de micobacterias en diferentes muestras como tejido, materia fecal y leche (Araújo et al., 2014b). De esta última, hay múltiples reportes en bovinos (Zumárraga et al., 2012; Ereqat et al., 2013; Timms et al., 2015). Sin embargo, no hay reportes en leche fluida caprina a nivel local.

Si bien la técnica de PCR de punto final aquí empleada es reproducible, existen factores que impactan en la eficiencia de la amplificación de una determinada región genómica, como por ejemplo la calidad del ADN templado a utilizar. En este marco, existen múltiples kits comerciales (Husakova et al., 2020) y diferentes estrategias para concentrar y extraer el ADN de las micobacterias, entre ellas la captura con perlas magnéticas (Dundas et al., 2008). Sin embargo, como estos insumos todavía son excesivamente costosos en el mercado local, es que se seleccionó un protocolo que permitiera la extracción de ADN con buen rendimiento y calidad. Por ello, en este trabajo se utilizó el método de extracción con solventes orgánicos (fenol /cloroformo/alcohol isoamílico), mediante un protocolo que se había estandarizado en el laboratorio (Zumarraga et al 2005). En este trabajo pudimos comprobar que el rendimiento, en cuanto a la calidad del material genético extraído y su concentración, fueron aceptables como pudo determinarse por espectrofotometría. Esto se correlaciona con los resultados obtenidos

previamente en leche caprina (Rocha et al., 2018), donde se compararon dos métodos de extracción. En dicho trabajo, se concluyó que el método de extracción de solventes orgánicos demostró resultados superiores, tanto en la calidad como en la cantidad del material genético obtenido, en comparación a un método de extracción que utiliza mini columnas de silica comercial. Asimismo, se correlaciona con los resultados obtenidos en leche bovina en rodeos de la provincia de Santa Fe (Zumárraga et al., 2012). En ese trabajo se demostró la presencia *M. bovis* en leche de tanques de tambos de diferentes rodeos bovinos, aún de establecimientos certificados oficialmente libres de la enfermedad.

Como primera etapa, se realizó la comparación de la PCR de punto final con la modificación de *Touch-Down* (Zumárraga et al., 2005) utilizando diferentes secuencias genómicas IS6110 y Rv2807, y TbD1 con el fin de evaluar la sensibilidad analítica.

La diferencia en la sensibilidad obtenida con cada sistema de amplificación evaluado, puede atribuirse a distintos factores que la afectan como la matriz a partir de la cual se extraen los ácidos nucleicos, su composición, la calidad de ADN obtenido, etc.)

La mayor sensibilidad analítica en leche se obtuvo con IS6110 y TbD1, siendo el límite de detección de 7×10^2 UFC/mL contra 7×10^5 UFC/mL para Rv2807, Por otra parte, con LAMP-IS6110 el límite de detección alcanzado fue de 7×10^3 UFC/mL.

Este valor se comparó con el trabajo realizado previamente con Rocha y col., (2018) en el que aplicó el mismo protocolo de contaminación

artificial de leche caprina, realizando la extracción con el método fenol cloroformo isoamilico y usando PCR-IS6110 *Touch-Down*, pudiendo detectar hasta $1,5 \times 10^4$ UFC/mL. En ese caso la sensibilidad fue menor a la detectada en este trabajo de tesis.

Este valor también se corresponde con lo publicado previamente por Zumárraga y cols. (2005). En ese trabajo también se realizó el mismo protocolo de contaminación artificial de leche bovina con *M. bovis*, la extracción de ADN con fenol/cloroformo/isoamílico y la PCR-IS6110 *Touch-Down*, pudiendo detectar hasta 1×10^3 UFC/mL (Zumárraga et al., 2005), sensibilidad menor a la detectada en este trabajo de tesis.

Al analizar las secuencias evaluadas, hemos corroborado que La PCR-IS6110 y la PCR-Rv2807 detectaron el mismo número de muestras positivas (11) concordando en 6 de los 14 cultivos positivos. Por otra parte, las PCR-IS6110 y Rv-2807 concordaron en 5 muestras que fueron negativas, pero con cultivo positivo. Asimismo, de las 24 muestras analizadas 14 muestras que tuvieron cultivo positivo fueron positivas por PCR-TbD1, por otra parte, de los 10 cultivos negativos, 5 tuvieron PCR-TbD1 negativa. Por otra parte, el 58,3% (14/24) de los animales IDR positivos fueron confirmados como tuberculosos por cultivo, y el 72,2% (13/18) de las lesiones detectadas durante la necropsia tuvieron aislamientos de *M. bovis*. Esto también pone de manifiesto la importancia que tiene los métodos tradicionales de diagnóstico *in vivo* y *post-mortem*.

Cabe aclarar que todos los cultivos de leche de los animales confirmados como tuberculosos fueron negativos. Esto se correlaciona con las distintas experiencias realizadas en el laboratorio con leche de vaca,

tanto de animales individuales (Bernardelli et al., 2005) como de tanque (Zumárraga et al., 2012), en la que todos los cultivos dieron resultado negativo, aun tratándose de animales tuberculosos. La leche constituye una muestra compleja de procesar por su alto contenido de grasa y además es muy frecuente la contaminación durante el prolongado tiempo de incubación de los cultivos. Asimismo, todas las muestras de animales libres de tuberculosis tuvieron resultados negativos tanto por PCR con las secuencias Rv2807, TbD1 e IS6110 como por LAMP-IS6110.

Todos los aislamientos de *M. bovis* que fueron tipificados por "Spoligotyping" tuvieron el espoligotipo SB0140, que es el más frecuente entre los aislamientos estudiados de Argentina (Zumárraga et al., 2013). Por otra parte, este genotipo también es frecuente en aquellos países que tuvieron relaciones comerciales con el Reino Unido y fueron importadores de razas británicas (Cataldi et al., 2002; Smith et al., 2011).

En este trabajo se realizaron curvas de diluciones para determinar el límite de detección en agua y leche, con las diferentes secuencias blanco. Hemos observado que el límite de detección en leche aumentó (menor sensibilidad analítica) en un orden de dilución para Rv2807, en comparación con el límite de detección obtenido en la curva de agua. Esto puede atribuirse a distintos factores como la estabilidad de los *primers*, la complejidad de la composición de la matriz evaluada, y también al tiempo de conservación del ADN luego de ser extraído. Sin embargo, con LAMP-IS6110 y PCR-IS6110 y TbD1 no hubo diferencias.

Por esta razón se recomienda realizar las curvas de diluciones con muestras nuevas para reducir los efectos de la degradación del ADN.

Los resultados de PCR positiva en leche de los animales con IDR positiva y cultivos de tejidos negativos, podría explicarse considerando que el proceso de descontaminación de la muestra previo al cultivo puede inactivar al 90 % de los bacilos viables, situación crítica cuando las lesiones son microscópicas y la carga bacilar es baja. Asimismo, la excreción de bacilos por leche podría ocurrir antes de que se formen y visualicen lesiones.

Si bien la PCR es uno de los métodos moleculares más aplicables para la detección de patógenos, debido a su rapidez, especificidad, y sensibilidad, este método también tiene algunas limitaciones, como por ejemplo el tiempo que insume el ciclado y la electroforesis (5 horas en promedio), la utilización de equipamiento costoso como lo es el termociclador, la cuba de electroforesis, la fuente de poder, el transiluminador de luz ultravioleta y registrador fotográfico, y por último para la detección de los productos de PCR se requiere el uso de químicos mutagénicos como lo es bromuro de etidio, aunque éste ya está siendo reemplazado por otros colorantes más seguros como el SYBR Safe, SYBR Gold y Gel Red, entre otros. Dichas limitaciones han condicionado la aplicación de este método en laboratorios bien equipados y con buena infraestructura en cuanto a bioseguridad. En este sentido, surgió la imperiosa necesidad de contar con métodos más simples y eficientes que puedan aplicarse en laboratorios de baja complejidad (Keikha, 2018). Estas características las reúne el LAMP. De este modo, una de las ventajas de la reacción de LAMP-IS6110 que se evaluó en este trabajo, fue la duración del procedimiento experimental, en comparación con la PCR. Solamente

se necesitaron 60 min de incubación para completar el ensayo LAMP-IS6110 en comparación con las 3 hs de ciclado del ensayo de PCR de punto final. Sumado a esto hay que considerar que en LAMP la visualización es instantánea mientras que la PCR de punto final requiere de la realización de una la electroforesis horizontal para separar y visualizar los productos amplificados, actividad que insume otras dos horas aproximadamente.

En este trabajo, hemos utilizado un LAMP-IS6110 para identificar a caprinos infectados con TB mediante la detección del complejo *M. tuberculosis*, a partir de muestras de leche fluida. Se obtuvieron resultados positivos en el 50% (12/24) de las muestras provenientes de animales tuberculosos, 6 de las cuales fueron confirmados por cultivo. Los *primers* de este LAMP-IS6110 fueron descritos por Aryan y col., (2010), quienes aplicaron la reacción para la detección del CMT en muestras de humanos obteniendo mayor sensibilidad que las muestras por PCR anidada. Asimismo, se determinó que el método de LAMP-IS6110 fue un orden de dilución menos sensible respecto de PCR-IS6110 *Touch-Down* y TbD1. En los protocolos LAMP, uno de los colorantes que se utiliza para la visualización de los productos amplificados es el SYBR Green. Dicho colorante se comercializa en solución de DMSO con una concentración de 10.000 x. Se lo utiliza en qPCR en una concentración de 0,16x mientras que en LAMP a 1.000x. Esto trae como consecuencia la inhibición de la polimerasa Bst y por lo tanto la adición del colorante a la mezcla de reacción se realiza generalmente después de culminada la misma. Esto tiene como riesgo la contaminación ya que requiere la apertura de los tubos. Como alternativa, se lo puede introducir en el tubo, pero manteniéndose separado

físicamente del resto de los reactivos hasta que finalice la reacción (Trangoni et al., 2017). En este trabajo se utilizó SYBR Gold y se lo agregó en el interior de la tapa del tubo de la reacción. Una vez culminada la reacción, mediante una ligera agitación se puso en contacto con el resto de los reactivos y los productos de amplificación, lográndose la visualización sin necesidad de la apertura de los tubos. Trangoni y col. (2017), describieron esta estrategia de LAMP en sistema cerrado para la detección visual por punto final de *Brucella spp.* y *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*.

Por otra parte, en el presente trabajo también se utilizó el colorante HNB. Se observó que la diferencia entre un resultado positivo de uno negativo era muy sutil y subjetivo (dependiente del operador) mientras que cuando se utilizó SYBR Gold se logró una buena visualización diferencial tanto con luz blanca y solar como con luz azul, con la que se mejoró aún más el sistema de detección de los productos amplificados. No se obtuvieron buenos resultados cuando se expusieron los tubos a una fuente de luz UV, ya que los controles negativos también fluorescían.

Si bien un resultado positivo no permitiría conocer si la infección se da por *M. bovis* o por otro miembro del CMT como *M. caprae*, hasta el momento esta especie no ha sido detectada entre los aislamientos de cabra analizados en nuestro país. Además, esta especie tampoco fue identificada en otros países de la región como Brasil (Carneiro et al; 2019; Zumárraga et al., 2013 y 2008). Esto constituye una estrategia que nos permite contar con una herramienta adecuada para la identificación de casos de TB causados por esa especie, en caso que llegara a ingresar al país e infecte

a los rebaños caprinos. Cabe destacar que en otras regiones como la península Ibérica la infección en caprinos ocurre principalmente por *M. caprae* (Aranaz et al., 1999 y 2003; Rodríguez et al., 2011).

En lo que respecta a la estimación de la excreción de *M. bovis* por leche, se realizaron experiencia piloto para poner a punto el sistema de qPCR-TbD1. En las dos muestras que pudieron analizarse se observó una gran variación en la concentración del ADN de *M. bovis* detectado. Estas muestras provinieron de animales con distinto grado de patología, lesiones generalizadas en un caso y lesiones en el sistema respiratorio en el otro. El animal más afectado fue el que menos bacilos excretó por leche. En este ensayo la evaluación se realizó considerando un único momento de la infección, el cual fue previo a la faena de los animales. Se requiere continuar con la optimización del método para futuros estudios como establecer el riesgo de diseminación en el tiempo, ya que cuando los animales con tuberculosis excretan micobacterias por leche lo hacen en forma intermitente, y también poder establecer una asociación con la patología del animal.

Los resultados obtenidos en este trabajo constituyen la base para proseguir con los ensayos correspondientes a las validaciones ya que se requiere del análisis de un mayor número de muestras con las correspondientes réplicas biológicas y técnicas. Cabe mencionar que la logística de colección, remisión y procesamiento de muestras se vio afectada durante la pandemia, condicionando el análisis de más muestras. Sin embargo, los resultados obtenidos con las muestras analizadas hasta el momento fueron óptimos y alentadores para continuar con este trabajo.

Considerando estos antecedentes y los resultados obtenidos en este trabajo de investigación en el que se evaluaron distintas secuencias blanco de PCR de punto final y también un método de amplificación isotérmica es que se puede concluir que el método de LAMP-IS6110 en leche, puesto a punto en esta tesis, reúne todas las características para poder ser transferido e implementado en laboratorios de baja complejidad en distintos puntos del país creando una nueva perspectiva para encarar la problemática de la enfermedad en Argentina ya que podría aplicarse a campo como herramienta preliminar *point of care* en las tareas de vigilancia epidemiológica de majadas libres de la enfermedad como técnica de rápida identificación del complejo *M. tuberculosis*, en casos de brotes de la enfermedad o de majadas en etapa de saneamiento complementariamente a las técnicas oficiales de diagnóstico e incluso podría utilizarse en muestras de leche de tanque. Cabe mencionar que una de las principales ventajas de trabajar con muestras de leche es que se pueden tomar tantas muestras como sean necesarias.

Por todo lo expuesto la hipótesis propuesta fue contrastada y aceptada, sustentando a las técnicas moleculares para la detección de *M. bovis* como herramientas de apoyo al “Plan Nacional de Control y Erradicación de la tuberculosis bovina”.

Conclusiones

CAPITULO VI

CONCLUSIONES

-Se logró poner a punto y adaptar un sistema cerrado de amplificación isotérmica mediada por bucles (LAMP-IS6110) para ser transferida e implementada en laboratorios de baja complejidad como método preliminar de diagnóstico mientras que PCR-TbD1 como método de laboratorios de referencia.

-La matriz, leche de cabra, afectó el límite de detección de PCR-Rv2807 respecto a la curva de diluciones en agua, contrariamente a lo observado con IS6110, TbD1 y LAMP-IS6110 que fueron similares.

- Se detectó la presencia de animales con tuberculosis mediante el análisis de la leche con distinta sensibilidad diagnóstica, siendo máxima para PCR-TbD1 y seguida por LAMP-IS6110, PCR-IS6110 *Touch-Down* y PCR-Rv2807 *Touch-Down*, que tuvieron la misma sensibilidad.

-La excreción de *M. bovis* por leche fue variable en las dos muestras de los animales tuberculosos analizadas en un único tiempo, requiriéndose de continuar con la optimización del método para futuros estudios.

Conclusión final

Los resultados obtenidos en este trabajo podrían contribuir con el control sanitario de calidad total en la cadena de producción, aportando una potencial herramienta complementaria para la identificación de rodeos

caprinos infectados, en el marco del Plan Nacional de Control y Erradicación de la Tuberculosis bovina (Resol. 128/12, SENASA).

Abreviaturas

CAPITULO VII

ABREVIATURAS

ADN: Ácido desoxirribonucleico.

BAAR: Bacilos ácido alcohol resistentes.

BCG: Bacilo de Calmette-Guerin.

BSL II: cabina de seguridad biológica nivel 2.

Ct: Ciclo *threshold* (umbral).

CMT: Complejo *Mycobacterium tuberculosis*

CICVyA: Centro de Investigación de Ciencias Veterinarias y Agronómicas.

dNTPs: Desoxnucleótidos trifosfato.

D.O: Densidad óptica.

F:C:I: Fenol, cloroformo, alcohol isoamilico.

H₂O: Agua.

HNB: *Hidroxy Naphthol Blue*.

IABIMO: Instituto de Agrobiotecnología y Biología Molecular.

INF-γ: Interferón gamma.

IDR: Intradermoreacción.

LAMP: *Loop-mediated isothermal amplification* (amplificación isotérmica mediada por bucles).

M. bovis: *Mycobacterium bovis*.

mL: mililitro.

MNT: Micobacterias no tuberculosas.

ng: nanogramo.

OADC: Ácido oleico albúmina glucosa y catalasa.

pb: Pares de bases.

PBS: *Phosphate Buffered Saline* (buffer fosfato salino).

PPD: Derivado proteico purificado.

PCR: Reacción en Cadena de la Polimerasa.

qPCR: PCR cuantitativa.

SENASA: Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria.

TB: Tuberculosis.

TbD1: Deleción 1 en *Mycobacterium tuberculosis*.

TBB: Tuberculosis bovina.

TD: *Touch-Down*

UNLZ: Universidad Nacional de Lomas de Zamora.

UFC: Unidad formadora de colonia.

μL : microlitro.

UV: Ultravioleta.

VPP: valor predictivo positivo.

VPN: valor predictivo negativo.

Bibliografía

CAPITULO VIII

BIBLIOGRAFIA

Abdala, A. A., Garbaccio, S., Zumárraga, M., & Tarabla, H. D. (2015). *Mycobacterium bovis* en fauna silvestre de la cuenca lechera de Santa Fe, Argentina. *Revista Argentina de Microbiología*, 47(3), 174–182. <https://doi.org/10.1016/j.ram.2015.04.005>

Abu Al-Soud, W., & Rådström, P. (1998). Capacity of nine thermostable DNA polymerases to mediate DNA amplification in the presence of PCR-inhibiting samples. *Applied and Environmental Microbiology*. <https://doi.org/10.1128/aem.64.10.3748-3753.1998>

Aguilar León D., Zumárraga M. J., Jiménez Oropeza R., Gioffré A. K., Bernardelli A., Orozco Estévez H., Cataldi A. A., Hernández Pando R. *Mycobacterium bovis* with Different Genotypes and from Different Hosts Induce Dissimilar Immunopathological Lesions in a Mouse Model of Tuberculosis".*Clinical and Experimental Immunology* 2009 Jul; 157(1):139-47.

Alvarez, S., Mendez, P., Díaz, C., Briggs, H., & Fresno, M. (2008). Forage from the Canary Isles (Spain) adapted to arid lands. *Journal of Animal and Veterinary Advances* Vol 7 (3) 359-363..

Aoyaki K. 2001. PCR. En: A. S. Gerstein (ed.). *Molecular biology problems solver: A laboratory guide*. Wiley-Liss, Inc. Electronic, pp. 292-328.

Aranaz, A., Liebana, E., Gomez-Mampaso, E., Galán, J. C., Cousins, D., Ortega, A., Blázquez, J., Baquero, F., Mateos, A., Suárez, G., & Domínguez, L. (1999). *Mycobacterium tuberculosis* subsp. *caprae* subsp. nov.: A taxonomic

study of a new member of the *Mycobacterium tuberculosis* complex isolated from goats in Spain. International Journal of Systematic Bacteriology. 49 (3):1263-73 <https://doi.org/10.1099/00207713-49-3-1263>

Aranaz, A., Cousins, D., Mateos, A., & Domínguez, L. (2003). Elevation of *Mycobacterium tuberculosis* subsp. caprae Aranaz et al. 1999 to species rank as *Mycobacterium caprae* comb. nov., sp. nov. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. 53 (6):1785-9 <https://doi.org/10.1099/ijms.0.02532-0>

Araújo, C. P., Osório, A. L. A. R., Jorge, K. S. G., Ramos, C. A. N., Filho, A. F. S., Vidal, C. E. S., Roxo, E., Nishibe, C., Almeida, N. F., Júnior, A. A. F., Silva, M. R., Neto, J. D. B., Cerqueira, V. D., Zumárraga, M. J., & Araújo, F. R. (2014a). Detection of *Mycobacterium bovis* in bovine and bubaline tissues using nested-PCR for TbD1. PLoS ONE, 9(3). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0091023>

Araújo CP, Osório AL, Jorge KS, Ramos CA, Souza Filho AF, Vidal CE, Vargas AP, Roxo E, Rocha AS, Suffys PN, Fonseca AA Jr, Silva MR, Barbosa Neto JD, Cerqueira VD, Araújo FR. 2014b. Direct detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex in bovine and bubaline tissues through nested-PCR. Braz J Microbiol. (2014b) Aug 29;45(2):633-40. doi: 10.1590/s1517-83822014000200035.3

Aryan, E., Makvandi, M., Farajzadeh, A., Huygen, K., Bifani, P., Mousavi, S. L., Fateh, A., Jelodar, A., Gouya, M. M., & Romano, M. (2010). A novel and more sensitive loop-mediated isothermal amplification assay targeting IS6110 for detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex. Microbiological Research, 165(3), 211–220. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2009.05.001>

Barandiaran, S., Martínez Vivot, M., Falzoni, E., Marfil, M. J., Pérez Tort, G., Rovatti, P., Fernández, M., Iachini, R., Satek, F., Duchene, A., & Zumárraga, M. J. (2017). *Mycobacterioses* in dogs and cats from Buenos Aires, Argentina. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*. 29 (5):729-732. <https://doi.org/10.1177/1040638717713795>

Barkway, C. P., Pocock, R. L., Vrba, V., & Blake, D. P. (2011). Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assays for the species-specific detection of *Eimeria* that infect chickens. *BMC Veterinary Research*. 3;7:67. <https://doi.org/10.1186/1746-6148-7-67>

Bernardelli A., Nicola A., Alonso B., Alonso Z., Ulens K., Morcillo N., Cordero G., Cataldi A., Zumárraga M., Paolicchi F., Torres P., Kistermann J.C., Esteves Madero J. 2005. Tuberculosis bovina: evaluación de técnicas de diagnóstico. *Revista de Medicina Veterinaria* 2005, 86 (5), 183-194.

Bezos, J.; Álvarez, J.; Mínguez, O.; Marqués, S.; Martín, O.; Vigo, V.; Pieltain, C.; Romero, B.; Rodríguez, S.; Casal, C.; Mateos, A.; Domínguez, L.; de Juan, L. (2012a). Evaluation of specificity of tuberculosis diagnostic assays in caprine flocks under different epidemiological situations. *Research in Veterinary Science*, 93(2): 636-640.

Bezos, J., Álvarez, J., Romero, B., Aranaz, A., & Juan, L. de. (2012b). Tuberculosis in goats: Assessment of current in vivo cell-mediated and antibody-based diagnostic assays. In *Veterinary Journal*. 191 (2) :161-5 <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2011.02.010>

Blázquez, J., Espinosa de Los Monteros, L. E., Samper, S., Martín, C., Guerrero,

- A., Cobo, J., Van Embden, J., Baquero, F., & Gómez-Mampaso, E. (1997). Genetic characterization of multidrug-resistant *Mycobacterium bovis* strains from a hospital outbreak involving human immunodeficiency virus-positive patients. *Journal of Clinical Microbiology*, 35(6), 1390–1393.
- Cadmus, S. I., Adesokan, H. K., Jenkins, A. O., & Van Soolingen, D. (2009). *Mycobacterium bovis* and *M. tuberculosis* in Goats, Nigeria. In *Emerging Infectious Diseases*. 15(12): 2066–2067. <https://doi.org/10.3201/eid1512.090319>
- Cataldi A.A., Gioffré A., Santángelo M.P., Alito A., Caimi K., Bigi F., Romano M.I., Zumárraga M. 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*. (2002), 34:1-6.
- Carneiro PAM, Pasquatti TN, Takatani H, Zumárraga MJ, Marfil MJ, Barnard C, Fitzgerald SD, Abramovitch RB, Araújo FR, Kaneene JB. (2019). Molecular characterization of *Mycobacterium bovis* infection in cattle and buffalo in Amazon Region, Brazil. *Vet Med Sci*. 2019 Sep 30. doi: 10.1002/vms3.203.
- Chacón, A. (2005). Aspectos nutricionales de la leche de cabra (*Capra hircus*) y sus variaciones en el proceso agroindustrial. *Agronomía Mesoamericana Vol.* 16, Nº. 2, 2005, págs. 239-252.
- Crawshaw, T., Daniel, R., Clifton-Hadley, R., Clark, J., Evans, H., Rolfe, S., & de la Rua-Domenech, R. (2008). TB in goats caused by *Mycobacterium bovis*. *The Veterinary Record*, 163 (4), 127.
- Cousins, D. V., Williams, S. N., Ross, B. C., & Ellis, T. M. (1993). Use of a repetitive element isolated from *Mycobacterium tuberculosis* in hybridization studies

with *Mycobacterium bovis*: a new tool for epidemiological studies of bovine tuberculosis. *Veterinary Microbiology*. 37, (1–2), 1–17.
[https://doi.org/10.1016/0378-1135\(93\)90178-A](https://doi.org/10.1016/0378-1135(93)90178-A)

de la Rua-Domenech, R. (2006). Human *Mycobacterium bovis* infection in the United Kingdom: Incidence, risks, control measures and review of the zoonotic aspects of bovine tuberculosis. *Tuberculosis (Edinburgh, Scotland)*, 86 (2), 77–109. <https://doi.org/10.1016/j.tube.2005.05.002>

Dundas, N., Leos, N. K., Mitui, M., Revell, P., & Rogers, B. B. (2008). Comparison of automated nucleic acid extraction methods with manual extraction. *Journal of Molecular Diagnostics*. <https://doi.org/10.2353/jmoldx.2008.070149>

Dukes, J. P., King, D. P., & Alexandersen, S. (2006). Novel reverse transcription loop-mediated isothermal amplification for rapid detection of foot-and-mouth disease virus. *Archives of Virology*. **151**, pages1093–1106
<https://doi.org/10.1007/s00705-005-0708-5>

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

Ereqat, S., Nasereddin, A., Levine, H., Azmi, K., Al-Jawabreh, A., Greenblatt, C. L., Abdeen, Z., & Bar-Gal, G. K. (2013). First-time detection of *Mycobacterium bovis* in livestock tissues and milk in the West Bank, Palestinian Territories. *PLoS Neglected Tropical Diseases*.
<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002417>.

Espy, M.J., Uhl, J.R., Sloan, L. M., Buckwalter, S. P., Jones, M. F., Vetter, E. A., Yao, J. D. C., Wengenack, N. L., Rosenblatt, J. E., Cockerill 3rd, F. R., Smith, T. F. (2006). Real-time PCR in clinical microbiology: applications for routine laboratory testing; Clin. Microbiol. Rev., 19(1):165-256. doi: 10.1128/CMR.19.1.165-256.2006.

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

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

Garnier, T., Eiglmeier, K., Camus, J.-C., Medina, N., Mansoor, H., Pryor, M., Duthoy, S., Grondin, S., Lacroix, C., Monsempe, C., Simon, S., Harris, B., Atkin, R., Doggett, J., Mayes, R., Keating, L., Wheeler, P. R., Parkhill, J., Barrell, B. G., ... Hewinson, R. G. (2003). The complete genome sequence of *Mycobacterium bovis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100 (13), 7877–7882. <https://doi.org/10.1073/pnas.1130426100>

Gioffredo, J. (2011). Sanidad en ovinos y caprinos. Enfermedades metabólicas. Sitio Argentino de Producción Animal. http://www.produccion-animal.com.ar/sanidad_intoxicaciones_metabolicos/enfermedades_caprinos/43-metabolicas.pdf

Gupta, R. S., Lo, B., & Son, J. (2018). Phylogenomics and comparative genomic

studies robustly support division of the genus *Mycobacterium* into an emended genus *Mycobacterium* and four novel genera. *Frontiers in Microbiology*, 9, 1–41. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00067>.

Gutiérrez, M., Tellechea, J., & García Marín, J. F. (1998). Evaluation of cellular and serological diagnostic tests for the detection of *Mycobacterium bovis*-infected goats. *Veterinary Microbiology*. 62; (4) 15; 281-290. [https://doi.org/10.1016/S0378-1135\(98\)00217-X](https://doi.org/10.1016/S0378-1135(98)00217-X)

Hermans, P.W., A.R. Schuitema, D. van Soolingen, C.P. Verstynen, E.M. Bik, J.E. Thole, A.H. Kolk and J.D.A. van Embden, (1990). Specific detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex strains by polymerase chain reaction. *J. Clin. Microbiol.*, 28: 2051–2058

Herrera, M. 1997. Determinación de reaccionantes a PPD bovina y aviar en rodeos lecheros caprinos y ovinos. Tesis de grado. Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional del Centro de la provincia de Buenos Aires, Tandil, Argentina.

Higino, S. S. D. S., Pinheiro, S. R., de Souza, G. O., Dib, C. C., do Rosário, T. R., Melville, P. A., Alves, C. J., & de Azevedo, S. S. (2011). *Mycobacterium bovis* infection in goats from the Northeast region of Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology*. 42 (4) 1437–1439. <https://doi.org/10.1590/S1517-838220110004000028>.

Hiko, A., & Agga, G. E. (2011). First-time detection of *Mycobacterium* species from goats in Ethiopia. *Tropical Animal Health and Production*. 43; 133–139. <https://doi.org/10.1007/s11250-010-9665-4>

Husakova M, Kralik P, Babak V, Slana I. (2020). Efficiency of DNA Isolation

Methods Based on Silica Columns and Magnetic Separation Tested for the Detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in Milk and Faeces. Materials (Basel). 12; 13 (22): 5112. doi: 10.3390/ma13225112.

Javed, M. T., Aranaz, A., de Juan, L., Bezos, J., Romero, B., Álvarez, J., Lozano, C., Mateos, A., & Domínguez, L. (2007). Improvement of spoligotyping with additional spacer sequences for characterization of *Mycobacterium bovis* and *M. caprae* isolates from Spain. Tuberculosis. 87,(5) 437-44. <https://doi.org/10.1016/j.tube.2007.04.002>

Kamerbeek, J., Schouls, L., Kolk, A., Van Agterveld, M., Van Soolingen, D., Kuijper, S., Bunschoten, A., Molhuizen, H., Shaw, R., Goyal, M., & Van Embden, J. (1997). Simultaneous detection and strain differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* for diagnosis and epidemiology. Journal of Clinical Microbiology. <https://doi.org/10.1128/jcm.35.4.907-914.1997>

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

Keikha, M. (2018). LAMP method as one of the best candidates for replacing with PCR method. In Malaysian Journal of Medical Sciences. 25(1): 121–123 <https://doi.org/10.21315/mjms2018.25.1.11>.

Kralik, .P and Ricchi, M. (2017). A Basic Guide to Real Time PCR in Microbial Diagnostics: Definitions, Parameters, and Everything. Front. Microbiol., 8: 108. doi: 10.3389/fmicb.2017.00108

Li, Y., Fan, P., Zhou, S., & Zhang, L. (2017). Loop-mediated isothermal

amplification (LAMP): A novel rapid detection platform for pathogens. In
Microbial Pathogenesis. 107, 54-61,
<https://doi.org/10.1016/j.micpath.2017.03.016>

Liébana, E., Aranaz, A., Urquía, J. J., Mateos, A., & Domínguez, L. (1998).
Evaluation of the gamma-interferon assay for eradication of tuberculosis in a
goat herd. Australian Veterinary Journal. 76 (1) 50-53.
<https://doi.org/10.1111/j.1751-0813.1998.tb15686.x>

Magnano, M. . G. (2015). Evaluacion de tecnicas diagnosticas en tuberculosis
caprina en areas con alta y baja prevalencia de la region central de la
Republica Argentina. Tesis doctoral. Facultad de Veterinaria, Universidad
Nacional de Río Cuarto.

Magnano, G., Macías, A., Sticotti, E., Mació, M., Scheneider, M., Abate Daga, F.,
Sánchez, J., Degorgis, A., Delgado, G., Getzrow, N., Rodríguez, M.,
Camuñas, C., Flaquer, L., Berenguer, H., Vecco, J., Fernández, C., Martín,
A., Gaetano, D., Ciallella, M., Enrique, M., Rossi, S., Morilla, J. Giraudo, J.
(2012). Tuberculosis caprina: descripción de hallazgos patológicos en
animales positivos a la prueba tuberculínica. Revista Del Colegio de
Veterinarios de La Provincia de Buenos Aires, 52–53.

Magnano, G., Severina, W., Macias, A., Sanchez, J., Sticotti, E., Macio, M.,
Schneider, M., Bérnago, E., Giraudo, J. (2016). Impacto de la tuberculosis
bovina sobre la producción láctea en un establecimiento de la provincia de
Córdoba. Revista Veterinaria Argentina, (36), 1–12.

Marfil, M. J., Huertas, P. S., Garbaccio, S. G., Barandiaran, S., Martínez Vivot, M.,
Garro, C., Alonso, B., Eirin, M. E., & Zumárraga, M. J. (2018). Detection of
Viable *Mycobacterium bovis* in Lungs and Livers Sold in Butchers' Shops in

Buenos Aires, Argentina. Foodborne Pathogens and Disease. 15 (12).
<https://doi.org/10.1089/fpd.2018.2467>

Meng, Y., Zhang, H., Liang, H., Zeng, L., Xiao, H., & Xie, C. (2013). Development of a loop-mediated isothermal amplification assay for rapid detection of iridovirus in the Chinese giant salamander. Journal of Virological Methods. 194, (1–2); 211-216. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2013.08.024>

Menzies, f. D., & Neill, S. D. (2000). Cattle-to-Cattle Transmission of Bovine Tuberculosis. The Veterinary Journal, 160 (2), 92–106.
<https://doi.org/10.1053/tvjl.2000.0482>

Nagamine, K., Hase, T., & Notomi, T. (2002). Accelerated reaction by loop-mediated isothermal amplification using loop primers. Molecular and Cellular Probes. 16, (3) 223-229. <https://doi.org/10.1006/mcpr.2002.0415>

Notomi, T., Okayama, H., Masubuchi, H., Yonekawa, T., Watanabe, K., Amino, N., & Hase, T. (2000). Loop-mediated isothermal amplification of DNA. Nucleic Acids Research. 28, (12) e63. <https://doi.org/10.1093/nar/28.12.e63>

O'Reilly, L.; Daborn, C. 1995. The epidemiology of *Mycobacterium bovis* infections in animals and man: A review. Tubercle and Lung Disease. 76(1): 1–46.

Palmer, M. V. (2013). *Mycobacterium bovis*: Characteristics of wildlife reservoir hosts. In Transboundary and Emerging Diseases (Vol. 60, Issue SUPPL1, pp. 1–13). <https://doi.org/10.1111/tbed.12115>

Paolicchi, F; Morsella, C; Mendez, L; Zumarraga, M; Eirin, M; Frers, E.; Disalvo, V. “Evaluación de un kit de gamma interferón bovino para el diagnóstico de tuberculosis bovina en la Argentina”. Reunión Científica Técnica de la AAVLD. Rio Cuarto, Córdoba, Argentina. 16 al 17 de noviembre de 2018.

- Pesciaroli, M., Alvarez, J., Boniotti, M. B., Cagiola, M., Di Marco, V., Marianelli, C., Pacciarini, M., & Pasquali, P. (2014). Tuberculosis in domestic animal species. *Research in Veterinary Science*. (97) S78-S85. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2014.05.015>
- Pollock, J. M., Buddle, B. M., & Andersen, P. (2001). Towards more accurate diagnosis of bovine tuberculosis using defined antigens. *Tuberculosis*. 81, (1–2), 65-69. <https://doi.org/10.1054/tube.2000.0273>
- Renwick, a R., White, P. C. L., & Bengis, R. G. (2007). Bovine tuberculosis in southern African wildlife: a multi-species host-pathogen system. *Epidemiology and Infection*, 135(4), 529–540. <https://doi.org/10.1017/S0950268806007205>
- Rocha R.V., Marfil, M.J., Macias A.F., Magnano G.G., Sticoti E.E., Macio M.N., Schneider M.O., Bigi F., .Eirin M.E., Zumárraga M.J. (2018a). Utilización de la reacción en cadena de la polimerasa- para la detección de *Mycobacterium bovis* en leche caprina. XXII Reunión Científico Técnica de la AAVLD , 15 – 17 de noviembre de 2018, Río Cuarto, Córdoba, Argentina.
- Rocha R.V. (2018b) *Aplicación de un método molecular para la detección de Mycobacterium bovis en leche fluida caprina* (Tesina de Tecnicatura) Universidad Nacional de Lomas de Zamora..
- Rodríguez, S.; Bezos, J.; Romero, B.; de Juan, L.; Álvarez, J.; Castellanos, E.; Moya, N.; Lozano, F.; Tariq Javed, M.; Sáez-Llorente, J.; Liébana, E.; Mateos, A.; Domínguez, L.; Aranaz, A. 2011. *Mycobacterium caprae* infection in livestock and wildlife, Spain. *Emerging Infectious Disease*, 17(3): 532-535
- Rothel, J. S., Jones, S. L., Corner, L. A., Cox, J. C., & Wood, P. R. (1992). The gamma-interferon assay for diagnosis of bovine tuberculosis in cattle:

conditions affecting the production of gamma-interferon in whole blood culture. Australian Veterinary Journal. 69 (1) 1-4.
<https://doi.org/10.1111/j.1751-0813.1992.tb09848.x>

Salyers A.A. and Whitt D.D., 1994. Tuberculosis. En: Bacterial pathogenesis: a molecular approach. Salyers A.A. y Whitt D.D. (Eds.). ASM Press, Washington, D.C., Cap. 26, 307-320.

Savan R, Igarashi A, Matsuoka S, Sakai M. (2004). Sensitive and rapid detection of edwardsiellosis in fish by a loop-mediated isothermal amplification method. Appl Environ Microbiol. 70(1):621-4. doi: 10.1128/aem.70.1.621-624.2004.

SENASA (2012). Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria. In *Resolución 128/12: Vol. 511/*.
<http://www.senasa.gob.ar/normativas/resolucion-655-2017-senasa-servicio-nacional-de-sanidad-y-calidad-agroalimentaria>

Sirichaisinthop, J., Buates, S., Watanabe, R., Han, E. T., Suktawonjaroenpon, W., Krasaesub, S., Takeo, S., Tsuboi, T., & Sattabongkot, J. (2011). Short report: Evaluation of loop-mediated isothermal amplification (LAMP) for malaria diagnosis in a field setting. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene. 85: (4). <https://doi.org/10.4269/ajtmh.2011.10-0676>

Smith, B. 2010. Medicina interna de grandes animales. 4ta edición. Ed. ELSEVIER, 661-662.

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 Soolingen D., Costello E., Aseffa A., Proaño-Perez F., Portaels F., Rigouts L., Cataldi A. A., Collins D. M., Boschirolì 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. European 1: a globally important clonal complex of *Mycobacterium bovis*. *Infection, Genetics and Evolution*, 2011 Aug; 11(6):1340-51.

Tribulo, H., Tribulo, R., Chesta, P., Colla, C., Schneider, M., Magnano, G. Y Giraudo, J. 2002. Estudio de la prevalencia de brucelosis y tuberculosis en hatos caprinos de la región centro y norte de la provincia de Córdoba. Póster presentado en la “XIV Reunión Científico Técnica de la Asociación Argentina de Veterinarios de Laboratorios de Diagnóstico”. Noviembre de 2002, Villa General Belgrano, Córdoba.

Thacker, T. C., Harris, B., Palmer, M. V., & Waters, W. R. (2011). Improved specificity for detection of *Mycobacterium bovis* in fresh tissues using IS6110 real-time PCR. *BMC Veterinary Research*, 7(50), 1–5. <https://doi.org/10.1186/1746-6148-7-50>.

Timms, V. J., Mitchell, H. M., & Neilan, B. A. (2015). Optimisation of DNA extraction and validation of PCR assays to detect *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *Journal of Microbiological Methods*. [112](#); 99-103. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2015.03.016>

Thoen O, Philip A. LoBue P.A., Enarson D.A., Kaneene J.B., de Kantor, IN. (2009).

tuberculosis: a re-emerging disease in animals and humans. *Veterinaria Italiana*, 45 (1) 135-181.

Tomita, N., Mori, Y., Kanda, H., & Notomi, T. (2008). Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) of gene sequences and simple visual detection of products. *Nature Protocols*. **3**; 877–882 <https://doi.org/10.1038/nprot.2008.57>

Trangoni, M. D., Gioffré, A. K., Cerón Cucchi, M. E., Caimi, K. C., Ruybal, P., Zumárraga, M. J., & Cravero, S. L. (2015). LAMP technology: Rapid identification of *Brucella* and *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *Brazilian Journal of Microbiology*. (46) 2. <https://doi.org/10.1590/S1517-838246220131206>

Trangoni, M. D., Gioffré, A. K., & Cravero, S. L. (2017). A closed-tube loop-mediated isothermal amplification assay for the visual endpoint detection of *Brucella* spp. and *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. In *Methods in Molecular Biology*. 221-229. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7037-7_14

Underwood, S. C., Decaminada, E. C., Grimoldi, F., Moras, E. V., & Carfagnini, J. C. (2003). Estudio de La Prevalencia de Brucelosis, Tuberculosis y Paratuberculosis En Cabras Lecheras y Carniceras Pertenecientes a Minifundistas de Santiago Del Estero. *Revista Argentina de Producción Animal*, Vol. 23 (1), 53-61.

van Embden JD, van Soolingen D, Small PM, Hermans PW. (1992). Genetic markers for the epidemiology of tuberculosis. *Res Microbiol*. 1992 May; 143 (4):385-91. Review. PMID: 1360692

van Ingen, J., Rahim, Z., Mulder, A., Boeree, M. J., Simeone, R., Brosch, R., & van

- Soolingen, D. (2012). Characterization of *Mycobacterium orygis* as *M. tuberculosis* Complex Subspecies. *Emerging Infectious Diseases*, 18 (4), 653–655. <https://doi.org/10.3201/eid1804.110888>
- Wang, F., Jiang, L., & Ge, B. (2012). Loop-mediated isothermal amplification assays for detecting Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in ground beef and human stools. *Journal of Clinical Microbiology*. <https://doi.org/10.1128/JCM.05612-11>
- Wards B, Collins D, de Lisle G. Detection of *Mycobacterium bovis* in tissues by polymerase chain reaction. *Vet Microbiol* 1995; 43: 227-40.
- Zanardi, G., Boniotti, M. B., Gaffuri, A., Casto, B., Zanoni, M., & Pacciarini, M. L. (2013). Tuberculosis transmission by *Mycobacterium bovis* in a mixed cattle and goat herd. *Research in Veterinary Science*. *Research in Veterinary Science*, 95(2):430-433. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2013.04.019>
- Zhang, Y. C. (2013). Pathogen diagnosis of children sepsis by LAMP technology. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*. [https://doi.org/10.1016/S1995-7645\(13\)60032-2](https://doi.org/10.1016/S1995-7645(13)60032-2)
- Zumárraga, M. J., Arriaga, C., Barandiaran, S., Cobos-Marín, L., de Waard, J., Estrada-Garcia, I., Figueiredo, T., Figueroa, A., Giménez, F., Gomes, H. M., Gonzalez-y-Merchand, J. A., Macías, A., Milián-Suazo, F., Rodríguez, C. A. R., Santillán, M. A., Suffys, P. N., Trangoni, M. D., Zárraga, A. M., & Cataldi, A. (2013). Understanding the relationship between *Mycobacterium bovis* spoligotypes from cattle in Latin American Countries. *Research in Veterinary Science*. 94 (1) 9-21. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2012.07.012>
- Zumárraga M.J and Cataldi A.A. (2010). I6110 Loop-mediated isothermal

amplification assay (LAMP) vs. Touch Down (TD) IS6110 PCR to detect *Mycobacterium tuberculosis* complex. IV Simposio fronteras del conocimiento en tuberculosis y otras micobacteriosis; V Reunión SLAMTB. 22-25 de agosto de 2010, Zacatecas, México.

Zumárraga M., Cataldi A., Roxo E., Benesi F.J., Scacchetti de Almeida C.A., Harry Birgel Jr. E., Paes A.C., Benites N. R., Vasconcellos S.A., Pinheiro S.R. (2008). Perfil de spoligotyping de *Mycobacterium bovis* aislados de caprinos (*Capra hircus*) no Brasil. 35º Congresso Brasileiro de Medicina Veterinária, Conbravet. 19-22 de Octubre, Gramado, Brasil.

Zumárraga, M. J., Martínez Vivot, M., Marticorena, D., Bernardelli, A., Fasán, R., Iachini, R., & Cataldi, A. A. (2009). *Mycobacterium bovis* in Argentina: Isolates from cats typified by spoligotyping. Revista Argentina de Microbiologia, 41 (4), 215–217.

Zumárraga, 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. (1).
<https://doi.org/10.1177/104063870501700303>

Zumárraga, M J, Soutullo, A., García, M. I., Marini, R., Abdala, A., Tarabla, H., Echaide, S., López, M., Zervini, E., Canal, A., & Cataldi, A. A. (2012). Detection of *Mycobacterium bovis*-infected dairy herds using PCR in bulk tank milk samples. Foodborne Pathogens and Disease, 9 (2) 132–137.
<https://doi.org/10.1089/fpd.2011.0963>

Anexos

CAPITULO IX

ANEXOS

9.1. Extracción de ADN a partir de un cultivo de micobacterias

- 1- Resuspender una anizada de micobacterias en 400 uL de Buffer TE 1x.
- 2- Inactivar por calentamiento a 80°C durante 20 min.
- 3- Incubar con 50 uL de lisozima (10mg/mL) una hora a 37°C (preferible 12 hs.).
- 4- Incubar a 65°C durante 10 min con 75 uL de SDS (10%) / 10 uL de proteinasa K (10mg/mL).
- 5- Agregar 100 uL de NaCl 5M, 100uL de CTAB, agitar en vortex hasta que tome un aspecto lechoso, e incubar a 65°C durante 10 min.
- 6-Agregar 750 uL de cloroformo/alcohol isoamílico (24:1), agitar y centrifugar a 12000 rpm durante 5 min.
- 7- Transferir la fase acuosa (superior) a otro tubo, agregar 450 uL de alcohol isopropílico, e incubar a -20°C por lo menos durante 30 min (preferible 12 h).
- 8- Centrifugar a 12000 rpm durante 15 min a temperatura ambiente.
- 9- Descartar el sobrenadante, agregar 1 mL de etanol (70%) frío, centrifugar 5 min, y descartar el sobrenadante.
- 10- Centrifugar brevemente 10 segundos, eliminar el etanol remanente con pipeta, y dejar secar por evaporación a temperatura ambiente o 5 min. a 60°C.

11- Resuspender en 20 uL de buffer TE 0,1x.

12- Una vez disuelto el ADN, conservar a -20°C .

**9.2. Método de extracción Fenol/Cloroformo/Alcohol Isoamílico
(Zumárraga et al., 2012)**

1) Centrifugar 50mL de leche a 3.000 RPM durante 20 min.

2) Tomar 250uL del pellet y 250uL del sobrenadante (capa de grasa) y colocarlos en un tubo de 2mL.

3) Agregar 100uL de Buffer TE1x (Tris-EDTA) y se homogenizar,

4) Agregar 100 μL de SDS 10% y 20 μL de proteinasa K (10mg/mL), e incubar a 65°C durante 40 min

5) Incubar a 100°C durante 10 min.

6) Realizar dos extracciones con igual volumen (vol.) de (F:Cl:I) 25:24:1 (saturado con buffer Tris10mM, pH 8, EDTA 1mM; Sigma Aldrich). Se agrega (F:Cl:I), se mezcla por inversión aproximadamente treinta veces, y luego se centrifuga durante 10 min. a 12.000 rpm. El sobrenadante se transfiere a un tubo limpio, y se agrega un nuevo volumen de F:Cl:I, y se procede de la misma manera.

7) Realizar una extracción con cloroformo / alcohol isoamílico (Cl:I) 24:1.

Al sobrenadante del paso anterior, se le agrega igual volumen de Cl:I, se mezcla por inversión aproximadamente 30 veces, y luego se centrifuga durante 10 min. a 12000 rpm y se transfiere el sobrenadante a un nuevo tubo.

- 8) Agregar 100 μ L de NaCl 5M.
- 9) Agregar 0,6 vol de isopropanol e incubar a -20°C durante 12hs.
- 10) Centrifugar a 12.000 rpm durante 15 min.
- 11) Descartó el sobrenadante y realizar dos lavados con etanol 70% frío.
- 12) Centrifugar 10 seg., eliminar el exceso de alcohol con pipeta y dejar secar a 65°C durante 5min.
- 13) Suspender en 20 μ L de agua libre de DNAsas.
- 14) Realizar una dilución 1/20 con agua libre de DNAsas.

9.3. “Spoligotyping” (Kamerbeek et al., 1997)

Se utilizó el *Spoligotyping kit* (Ocimum Biosolutions Company, Hyderabad, India) según el protocolo siguiente:

9.3.1. Amplificación de la región de repeticiones directas (DR):

La mezcla para la amplificación de la región DR consistió en : buffer (Tris-HCl 10 mM, pH 9,0; KCl 50 mM, y Tritón X-100 al 0,1%), 2 mM de MgCl_2 , 0,2 mM de cada dNTP, 20 pmoles de cada iniciador (DRa GGTTTTGGGTCTGACGAC, biotinilado en el extremo 5' y DRb CCGAGAGGGGACGGAAAC), 10ng de templado y 1,25U de Taq ADN polimerasa, en un volumen final de 50 μ L. El programa de ciclado fue 96°C 3 min. seguido de 30 ciclos de 96°C 1 min. 55°C 1 min. 72°C 30 seg. y una extensión final a 72° durante 10 min.

9.3.2. Hibridación de los productos de PCR a la membrana conteniendo los oligonucleótidos espaciadores y detección.

- a) Lavar la membrana filtro a 60 °C durante 5 min. en 250 mL de SSPE 2x/SDS 0,1% con agitación.
- b) Ubicar la membrana en el *miniblotter* sobre una almohadilla sintética, con la fase donde fueron fijados los oligonucleótidos espaciadores hacia arriba y en sentido perpendicular a la siembra de los productos amplificados (la membrana tiene dos líneas marcadas con tinta, las cuales deben quedar sobre la línea de agujeros superior e inferior del *miniblotter*)
- 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 colocar el tubo inmediatamente en hielo.
- e) Quitar por aspiración el buffer residual contenido en el *miniblotter*.
- 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 sin agitación. La primera y la última ranura del *miniblotter* debe llenarse con buffer.
- g) Aspirar las muestras y quitar la membrana del *miniblotter*.
- h) Lavar la membrana dos veces en 250 mL de SSPE 2x /SDS 0,5% durante 10 min. a 60°C con agitación.

- i) Colocar la membrana en una botella de hibridación, dejarla enfriar, 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) Quitar la membrana de la botella de hibridación, y realizar dos lavados con 250 mL de SSPE 2x / SDS 0,5% de 10 min. c/u a 42°C con agitación.
- k) Realizar dos lavados con 250 mL de SSPE 2x, de 5 min. c/u, a temperatura ambiente con agitación.
- 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 sensible (Hyperfilm- ECL, Amersham) en un cassette durante 5min.
- n) Revelar el film en cuarto oscuro.

9.3.3. Deshibridación de la membrana

Para reutilizar la membrana es necesario remover los productos de PCR hibridados.

- 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.

9.3.4. Interpretación del “Spoligotyping”

Un patrón de “Spoligotyping” (espoligotipo) es definido por la presencia o ausencia de cada uno de los 43 espaciadores. Así, una muestra es identificada como *Mycobacterium bovis* cuando están ausentes los espaciadores 3; 9; 16; y 39 a 43.

9.4. PCR de los genes *esxA* y *esxB*

Para la amplificación de *esxA* se utilizaron los primers *esxAfLM* (GAGAGATCTCATGACAGAGCAGCAGTGGAATTTC) y *esxArLM* (GTTGGATCCTGCGAACATCCCAGTGACG), que amplifican un producto de 288pb. Para la amplificación de *esxB* se usaron los primers *esxBf* (TGACAACAGACTTCCCGG) y *esxBr* (CGATACCCGCGAAATTC) que amplifican un fragmento de 450 pb. La mezcla de la reacción consistió en buffer 1x, MgCl₂ 1,5mM; 20nM de cada primer; 1,25 U de polimerasa (GoTaq Polymerase Promega Corp., USA), 0,2mM de cada desoxinucleótido trifosfato (dNTPs) y agua apirógena estéril csp volumen final de 50 µL. El programa de ciclado fue el mismo para ambos genes. 95°C 3 min seguido de 30 ciclos de 95°C 1 min a, 55°C 1 min a y 72°C 30 seg. con una extensión final a 72°C durante 5 min (Encinas et al., 2018). Los productos de PCR fueron sometidos a electroforesis en agarosa al 2% con bromuro de etidio y visualizados por exposición a la luz UV.

9.5. Preparación de las soluciones

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

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

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

CTAB/NaCl: Disolver 4,1 gr de NaCl en 80 mL de agua destilada. Mientras se agita agregar 10 g de CTAB, (bromuro de N-cetil-N,N,N, trimetil amonio). Si es necesario, calentar la solución a 65°C. Llevar a 100 mL con agua destilada (Kamerbeek et al., 1997).

Lisozya 10mg/mL (se prepara en la concentración mencionada en agua).

Proteinasa K 10mg/mL (se prepara en la concentración mencionada en agua).