

Universidad Nacional de Quilmes

Licenciatura en Biotecnología



Desarrollo de alternativas diagnósticas de tuberculosis bovina

Autor: Carlos Leónidas Leiva

Director: M. V. Sergio Gabriel Garbaccio

Tutor académico: Dr. Víctor Romanowski



**Instituto Nacional
de Tecnología Agropecuaria**

Instituto de Patobiología - Centro Nacional de

Investigaciones Agropecuarias - INTA

Febrero - 2015

Agradecimientos

A mi mamá,
por enseñarme a crecer.

Resumen

En el siguiente trabajo se llevó cabo la puesta a punto y optimización de la técnica LAMP (del inglés *loop-mediated isothermal amplification*) para la detección de *Mycobacterium bovis*, agente etiológico de la tuberculosis bovina. Se realizaron ensayos de sensibilidad analítica con el fin de compararla con la sensibilidad obtenida por PCR convencional llevada a cabo rutinariamente en nuestro laboratorio.

Objetivos

Objetivo General

- Puesta a punto de la técnica LAMP para la identificación de *M. bovis*.

Objetivos Específicos

- Optimización de las condiciones de ensayo LAMP.
- Determinación de sensibilidad de LAMP vs. PCR.

Financiamiento

El siguiente Seminario de Investigación fue realizado en el marco del Programa de Capacitación Anual Gratuito (PROCAGRA) 2013.

Dicho programa es un modelo estratégico de *fundraising* enmarcado en el compromiso social puesto en marcha por la Delegación Castelar de la Fundación ArgenINTA en el Centro Nacional de Investigaciones Agropecuarias (CNIA) con el fin de ampliar el accionar de la fundación. De acuerdo con lo expresado por Jorge J. Pereira, delegado técnico de la Delegación Castelar de la Fundación ArgenINTA, “el Programa tiene como objetivo promover el intercambio científico-tecnológico que generan y ofrecen los once Institutos del CNIA que el INTA posee en su predio de Castelar con el fin de estimular el aprendizaje y la participación de estudiantes de diferentes universidades de todo el país en trabajos de investigación, desarrollo y transferencia”.

El PROCAGRA está destinado a estudiantes de las universidades de todo el país, con más del 75% de sus materias aprobadas, y brinda capacitación en diferentes temas de interés agropecuario. Los estudiantes son guiados por especialistas del CNIA que durante 90 días trabajan estrechamente para profundizar las investigaciones que, como producto final, tienen un informe minucioso y detallado (tesina) con los aportes de la capacitación y sus resultados.

El programa es patrocinado anualmente por el INTA junto a organizaciones empresariales privadas como Biogénesis-Bagó, Biotay, CKC, Rosenbusch, Xenobióticos, Vetanco; y organizaciones sociales como Fundación ArgenINTA y Fundación Argentina de Nanotecnología.

Los centros y los once institutos que integran el CNIA del INTA en su predio de Castelar intervienen activamente en el desarrollo de este programa, debido a que ofrecen anualmente no sólo las temáticas de trabajo, sino infraestructura, equipamiento, recursos económicos y humanos necesarios para que los estudiantes postulados concreten técnicamente su capacitación en los mismos. Paralelamente, las universidades públicas y privadas participan de esta propuesta dado que reciben el ofrecimiento gratuito del financiamiento de las posibles capacitaciones.

Finalmente, un Comité de Selección integrado por los tres Presidentes de los Consejos de Centros del INTA Castelar conjuntamente con un representante de cada una de las organizaciones patrocinadoras, tiene la responsabilidad de seleccionar las temáticas ofrecidas por los Institutos del CNIA, los estudiantes postulados, su priorización y selección final junto con el posterior seguimiento y cumplimiento del programa por todas las partes involucradas, incluida una evaluación final de las presentaciones escritas de los trabajos realizados por los estudiantes, así como el informe de sus respectivos tutores y también el informe administrativo-contable que realiza la Delegación Castelar de la Fundación ArgenINTA al finalizar cada capacitación.

El apoyo financiero a este emprendimiento, que desde el año 2008 vienen concretando las empresas pioneras antes mencionadas, conjuntamente con la Delegación Castelar de la Fundación ArgenINTA, con el respaldo científico-técnico de los Centros e Institutos del CNIA del INTA Castelar, además de la participación de las universidades correspondientes, permite la consolidación de una propuesta que permite mejorar la formación profesional de estudiantes universitarios dentro de un ámbito agropecuario, agroalimentario y agroindustrial.

Tabla de contenidos

Agradecimientos.....	1
Resumen.....	2
Objetivos.....	3
Financiamiento.....	4
1. INTRODUCCIÓN.....	7
1.1 TUBERCULOSIS BOVINA.....	8
1.2 PATOGENIA.....	10
1.3 INMUNOPATOGENIA.....	13
1.4 IMPACTO EN SALUD PÚBLICA.....	15
1.5 IMPACTO ECONÓMICO.....	17
1.6 DIAGNÓSTICO.....	18
1.6.1 DIAGNÓSTICO CLÍNICO.....	18
1.6.2 BACTERIOLÓGICO.....	18
1.6.3 ANATOMO-HISTOPATOLÓGICO.....	19
1.6.4 PRUEBA TUBERCULÍNICA-PPD.....	20
1.6.5 ELISA.....	21
1.6.6 IFN- γ	22
1.6.7 PCR.....	22
1.6.8 LAMP.....	23
2. MATERIALES Y MÉTODOS.....	26
2.1 EXTRACCIÓN DE DNA.....	27
2.2 <i>TOUCH-DOWN</i> PCR.....	27
2.3 LAMP.....	28
2.4 ANÁLISIS DE PRODUCTO DE AMPLIFICACIÓN DE PCR-IS6110 Y LAMP.....	28
2.4.1 OBSERVACIÓN DIRECTA DE PRODUCTO DE AMPLIFICACIÓN DE LAMP.....	28
2.5 OPTIMIZACIÓN DE LAS CONDICIONES DE LAMP.....	29
2.6 DETERMINACIÓN DE LA SENSIBILIDAD DE LOS ENSAYOS PCR Y LAMP.....	29

3. RESULTADOS.....	30
3.1 ANÁLISIS DE PRODUCTO DE AMPLIFICACIÓN DE LAMP.....	31
3.2 OPTIMIZACIÓN DE LAS CONDICIONES DE LAMP.....	31
3.3 DETERMINACIÓN DE LA SENSIBILIDAD DE LOS ENSAYOS PCR Y LAMP	33
4. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES.....	34
5. ANEXO.....	37
5. BIBLIOGRAFÍA.....	39

1. INTRODUCCIÓN

1.1 TUBERCULOSIS BOVINA

La tuberculosis bovina (TBB) es una enfermedad infecciosa de importancia a nivel mundial causada por *Mycobacterium bovis*. Esta bacteria pertenece al complejo *Mycobacterium tuberculosis* (MTBC del inglés *Mycobacterium tuberculosis complex*) junto a *M. tuberculosis*, *M. africanum*, *M. canetti*, *M. microti*, *M. caprae*, *M. pinnipedii*, *M. mungi* y *M. orygis* (1, 2). Las especies de microorganismos pertenecientes al complejo mencionado se caracterizan por poseer un 99,9% de similitud a nivel genómico e idénticas secuencias de RNA ribosomal 16S. Sin embargo, difieren en su fenotipo, rango de hospedadores y patobiología. Durante mucho tiempo se creyó que *M. bovis* era el responsable del origen de la tuberculosis en humanos al momento de la domesticación del ganado hace 10.000-15.000 años atrás debido a un salto en la barrera de especies y la consecuente adaptación a un hospedador humano. Con la obtención de genomas de cepas integrantes del MTBC secuenciados y el advenimiento de estudios de genómica comparativa se demostró que, a pesar que *M. tuberculosis* posee exclusivamente como hospedador a los humanos mientras que *M. bovis* posee un rango de hospedador más amplio, éste último presenta un genoma de menor tamaño debido a la pérdida sucesiva de regiones de DNA. Posiblemente, a causa de la expansión clonal y el carácter detrimental de dichas regiones para el estilo de vida patogénico, convirtiendo a *M. bovis* en patógenos más exitosos para ciertos hospedadores nuevos (3, 4). Paralelamente, mediante el análisis de deleciones y el estudio de mutaciones específicas se observó que es posible que *M. bovis* haya evolucionado a partir de una rama derivada de *M. africanum* y *M. microti*, con *M. tuberculosis* como progenitor de ambos.

El genoma de *M. bovis* es circular y posee 4.345.492 pares de bases (pb) de longitud con un contenido promedio de G+C de 65,63%. A su vez, contiene 3.952 genes que codifican proteínas, incluyendo 42 secuencias de inserción (IS del inglés *insertion sequence*) y un profago. En la figura 1 se observa una representación circular del genoma de una cepa de *M. bovis* altamente virulenta aislada en Inglaterra en 1957, según Garnier y col. (4). Desde afuera hacia adentro, se observan dos círculos que muestran las secuencias codificantes (CDS del inglés *coding sequences*) de las cadenas directa y reversa, respectivamente, con colores que representan su clasificación funcional. Además, se realiza un análisis de secuencia comparativo con *M. tuberculosis*, con las transiciones (en amarillo) y transversiones (en verde), luego las inserciones (en rojo, 1 pb; en negro > 1 pb) y deleciones (en azul, 1 pb; en celeste > 1 pb). Finalmente, en los dos últimos círculos se muestran los reemplazos de secuencia de nuevas regiones en *M. bovis* (en violeta), así como los elementos IS y el profago (en cian).

Las deleciones o pseudogenes corresponden a genes involucrados en la detoxificación, en el transporte y estructuras de superficie celular, en la biosíntesis de cofactores, así como en el metabolismo de ácidos grasos. Dichas deleciones parecen haber ocurrido en el progenitor de las especies que actualmente poseen un rango de hospedador tan diverso como humanos en África, focas en Argentina, cabras en España y tejones en Inglaterra.

Es importante destacar que *M. bovis* posee una composición de la pared celular y de las proteínas secretadas que varía con respecto a la de *M. tuberculosis*, con lo cual Garnier y col. sugieren que el proceso evolutivo de *M. bovis* no se basa en la presencia de genes de virulencia específicos sino que otorgan mayor relevancia a las alteraciones en la expresión génica y en la exposición de componentes de la pared celular.

Las micobacterias del MTBC se caracterizan por ser bacilos Gram positivos, no móviles, aerobios, no esporulantes, ácido-alcohol resistentes, que poseen un crecimiento *in vitro* lento (5, 6). Según la clasificación de riesgo/peligro de la Organización Mundial de la Salud Animal (OIE), *M. bovis* es considerado un microorganismo del grupo III por lo que implica un riesgo individual elevado, así como un riesgo poblacional bajo (7).

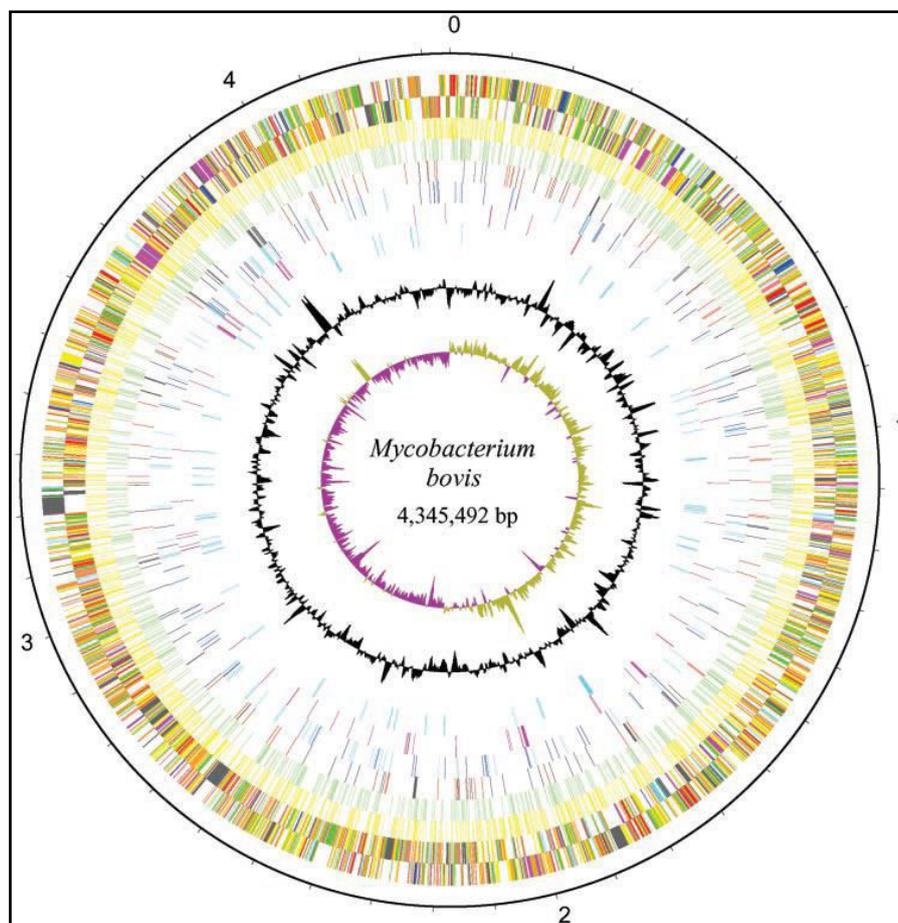


Figura 1. Representación circular del genoma de *M. bovis*. La escala del círculo externo (en negro) está mostrada en megabases. Los círculos internos representan, desde afuera hacia adentro, el contenido de G+C y la relación (G-C)/(G+C) y están mostrados en una escala de 20 kb (4).

La transmisión de la TBB entre especies puede ser mediante vía digestiva (ingestión de lácteos y sus derivados infectados sin pasteurizar), ocupacional (trabajadores de establecimientos ganaderos, veterinarios, entre otros), cutánea (por invasión directa de mucosas o heridas en la piel), genital o congénita. Sin embargo, la ruta de infección más frecuente es la aerógena mediante la exposición a aerosoles con partículas de gotas que contengan *M. bovis*, siendo el portal de entrada el pulmón. El bovino enfermo puede eliminar microgotas conteniendo entre 100-200 bacilos por mugido, mientras que a través del estornudo y la tos se eliminan 1 o 2 bacterias. Para que la infección se transmita dentro de un rodeo bovino, existen diferentes factores a tener en cuenta como la ruta de infección, la dosis infectiva, el período de contacto con el animal infectado, la frecuencia de excreción, así como el estado inmune del animal. Existen estudios sobre transmisión de *M. bovis* en los cuales se observa que dichos bacilos sobreviven en materia fecal contaminada artificialmente por períodos de hasta 4 meses (9). A pesar de esto, es probable que en condiciones naturales la supervivencia en espacios al aire libre y fuera del huésped sea menor debido al efecto de la luz ultravioleta.

La infección puede afectar no sólo al ganado bovino (huésped primario), sino a humanos, animales domésticos y de granja, como así también a animales que se encuentran en estado salvaje (8, 9). En nuestro país, existen reportes de aislamientos de *M. bovis* en animales silvestres tales como ratas, zorros, comadreja, liebres, felinos, lobos marinos, llamas; y animales de granja como cerdos, cabras y ovejas (10, 11). La transmisión mediante los reservorios y/ o diseminadores salvajes y domésticos de *M. bovis* supone un gran problema para la erradicación de la tuberculosis en el ganado bovino.

Enfermedad	Estatus semestrales																			
	2005		2006		2007		2008		2009		2010		2011		2012		2013		2014	
	ene.- jul.-	jun.- dic.	ene.- jul.-	jun.- dic.	ene.- jul.-	jun.- dic.	ene.- jul.-	jun.- dic.	ene.- jun.	jul.- dic.	ene.- jun.									
Tuberculosis bovina	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■

No hay información disponible para esta enfermedad
 Enfermedad no señalada durante este periodo
 Presencia de la infección pero sin signos clínicos
 Presencia de la enfermedad
 Enfermedad limitada a una o varias zonas

Tabla 1. Reporte del sistema WAHIS-OIE de la presencia por semestre de la TBB en Argentina durante el período 2005-2014 en animales domésticos y salvajes (parte superior y parte inferior de la casilla, respectivamente).

La dosis mínima infectiva para originar la enfermedad depende de la vía de transmisión. Mientras que para una infección vía oral se requiere de una dosis alta de bacilos infectivos (igual o mayor a 10^4 UFC), las infecciones vía aerógena pueden originarse con dosis muy bajas. En estudios *in vitro* donde se infectaron las mucosas respiratorias de 20 terneros con 1000, 100, 10 y 1 UFC, se observó una respuesta inmune específica de IFN- γ e IL-4, resultados positivos al test de la tuberculina y aparición de lesiones compatibles con tuberculosis en la mitad de los animales infectados con solamente 1 UFC conteniendo entre 6-8 bacilos infectivos viables (12).

1.2 PATOGENIA

La TBB es una enfermedad zoonótica cíclica, que posee distintos períodos en su proceso de evolución caracterizados por síntomas, lesiones y estados de hipersensibilidad propios de cada etapa. La evolución de la infección está condicionada a diversos factores ligados al huésped (estado inmunitario, edad, genética, entre otros), al bacilo (número, virulencia, entre otros) y al medio ambiente (8).

Una vez presente la infección tuberculosa, se pueden establecer dos períodos de diseminación de la micobacteria dentro del organismo infectado (figura 2):

- **Primario (o tuberculosis primaria):** Se caracteriza por el transporte de los bacilos dentro de los macrófagos hacia los ganglios linfáticos locales mediante vía linfática. En esta etapa, el sistema inmunológico del animal infectado puede eliminar las micobacterias alcanzando la cura; puede llegar a una estabilización (foco latente), en donde bacilos virulentos permanecen por meses o años enquistados en las lesiones sin desencadenar la enfermedad; o bien, puede evolucionar hacia una generalización precoz inmediata, resultado de la diseminación de los bacilos por todo el organismo mediante vía linfática o hemática con la constante aparición de lesión en diversos órganos y tejidos. Dichas lesiones, típicas de la tuberculosis, son el resultado de un proceso de hipersensibilidad lo suficientemente acentuado como para producir necrosis. El foco necrótico, purulento o caseoso, puede calcificarse y la lesión puede aparecer rodeada de tejido de granulación y por una cápsula fibrosa, originando un granuloma nodular conocido como tubérculo.
- **Post-primario (o tuberculosis secundaria):** La diseminación del bacilo no se lleva a cabo por vía linfohemática, sino mediante vía intracanalicular. Por ejemplo, bronquios y bronquiolos en el pulmón, túbulos renales en el riñón, conductos galactóforos en las glándulas mamarias. De esta manera, los ganglios regionales no se encuentran comprometidos, sino que la lesión es crónica en el órgano infectado con la posterior aparición de granulomas tuberculosos caseosos (focos acinosos y acino-nodosos), bronquitis caseosa, con formación de úlceras debido a la presencia de tubérculos miliares en la bifurcación de la tráquea y bronquios, así como aparición de nódulos y cavernas formadas por la confluencia de los focos antes mencionados en el extremo caudal de los lóbulos diafragmáticos. Normalmente, este período de tuberculosis orgánica crónica puede evolucionar hacia una generalización aguda tardía por vía linfohemática con la consecuente muerte del animal debido a un colapso en la resistencia pulmonar (8).

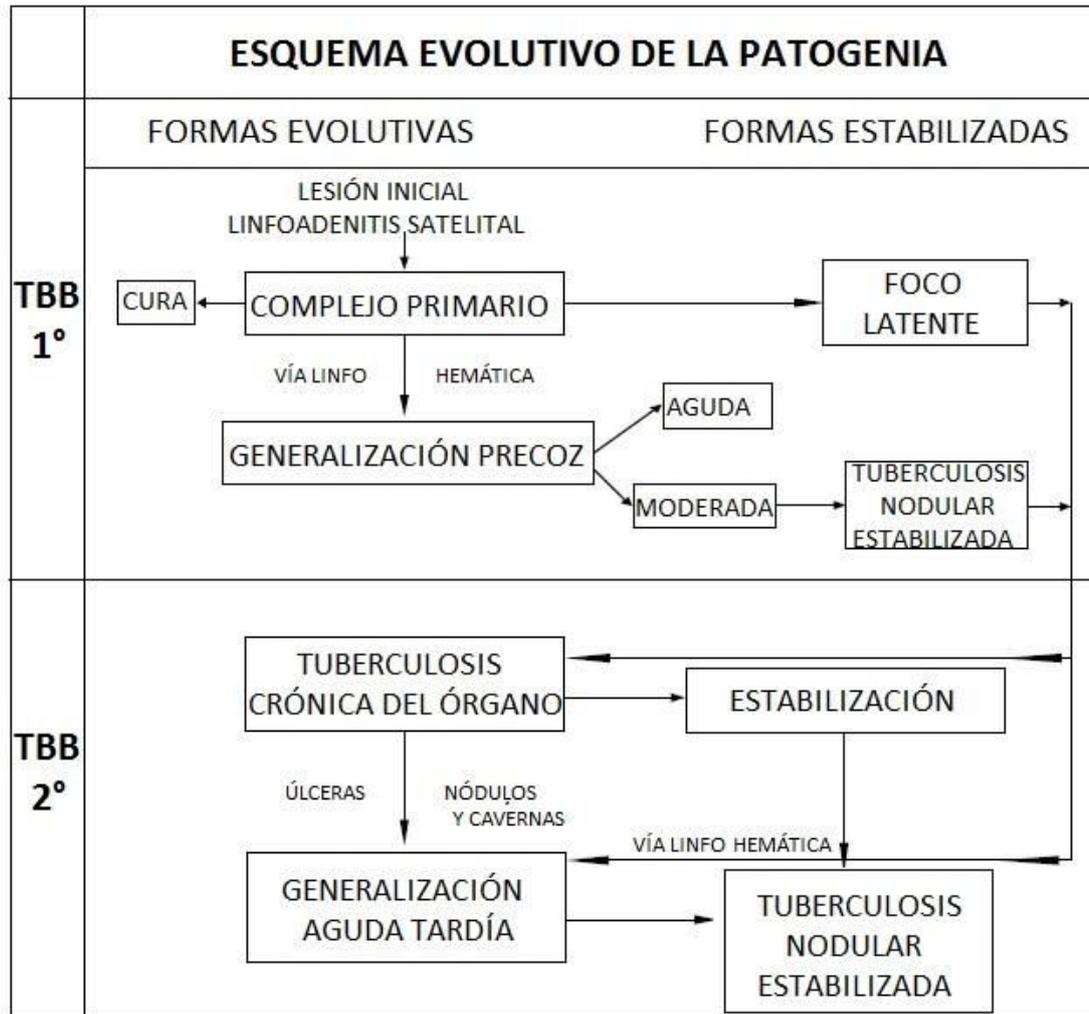


Figura 1. Esquema evolutivo de la patogenia de la tuberculosis bovina (8).

Durante la tuberculosis primaria, el período de generalización inmediata puede presentarse en forma aguda o moderada. La primera, se presenta cuando la diseminación del bacilo en el individuo se lleva a cabo de manera uniforme, con la consecuente infección simultánea en el pulmón y otros órganos. En este caso, se presentan lesiones asociadas a la tuberculosis miliar aguda con formación de tubérculos grises o amarillos de tamaño pequeño (similar a una semilla de mijo), junto con la potencial aparición de lesiones exudativas. Por otra parte, la forma moderada se manifiesta lentamente cuando existe resistencia parcial y diseminación linfohemática paucibacilar (de pocos bacilos). Aquí se presentan lesiones polimorfas en diversos órganos (nodulares, caseo-calcáreas, fibrosas, exudativas, entre otras), dando lugar a diferentes cuadros de tuberculosis. Por ejemplo, la tuberculosis nodular-nodosa, donde se exhiben pocos nódulos de diferentes proporciones que van desde miliares hasta el tamaño de una nuez; la tuberculosis perlada, de carácter exudativo con nódulos de consistencia caseoso-calcificada con un tamaño similar al de una lenteja hasta una ciruela localizados en el pleura, tanto visceral como parietal; y la tuberculosis a grandes nódulos, que raramente se presenta en bovinos.

1.3 INMUNOPATOGENIA

Los bacilos al ser inhalados por el animal, ingresan a los alveólos pulmonares del tracto respiratorio. Cuando el patógeno sobrepasa la barrera del epitelio ciliado de los bronquios y las defensinas antimicrobianas producidas por los neumocitos, comienza el rol del sistema del complemento como parte de una respuesta innata llevada a cabo mediante una colección de diferentes clases de proteínas solubles que pueden encontrarse en la sangre y otros fluidos. Dichas moléculas proteicas facilitan la captación y posterior destrucción de los patógenos por parte de las células fagocíticas alveolares, como macrófagos, granulocitos y células presentadoras de antígenos (APCs del inglés *antigen-presenting cells*). De esta manera, la micobacteria puede ser opsonizada con proteínas del complemento que luego serán reconocidas por los macrófagos alveolares mediante receptores del sistema de complemento. Si el proceso de opsonización no es activado, el reconocimiento se lleva a cabo mediante proteínas de unión a carbohidratos tales como manosa (MBL del inglés *mannose-binding lectin*) por lo que el sistema del complemento tiene lugar vía mecanismo de las lectinas. Paralelamente, a través de los receptores tipo Toll (TLR del inglés *Toll-like receptors*) presentes en la superficie del macrófago se reconocen patrones moleculares asociados al patógeno (PAMPS del inglés *pathogen-associated molecular patterns*) presentes en la superficie del bacilo. Las micobacterias poseen en su pared celular glucolípidos como los lipomananos que funcionan como ligando de los TLR-2 heterodiméricos. Una vez ocurrida dicha unión, mediante una cascada de señalización, se produce la activación de diferentes familias de factores de transcripción entre los que se encuentran, proteínas activadoras 1 (AP-1 del inglés *activator protein 1*), el factor regulador de interferón (IRF del inglés *interferón regulatory factor*), y el factor NFκB. En consecuencia, se induce la expresión tanto de citoquinas inflamatorias, quimiocinas (citoquinas quimio-atrayentes), péptidos antimicrobianos, así como interferones tipo I.

Un efecto importante de la interacción entre patógenos y macrófagos tisulares es la activación de otros macrófagos y células del sistema inmune innato que liberan pequeñas citoquinas y quimiocinas, tales como IL-6 (interleuquina 6), IL-12 (interleuquina 12), IL-1β (interleuquina 1β), TNF-α (factor de necrosis tumoral α), CXCL8 (IL-8), entre otros. CXCL8 es un quimio-atrayente que permite el reclutamiento al sitio de infección de neutrófilos, basófilos y linfocitos T (LT), mientras que IL-12 conlleva la activación de las células asesinas (NK del inglés *natural killer*) e induce la diferenciación de LT CD4 en linfocitos T_H1. La respuesta inmune innata frente a bacterias intracelulares como las micobacterias tiene como efectores a los fagocitos y a las células NK.

Existen patógenos que inducen una respuesta inmune eficaz, sin embargo estos microorganismos han evolucionado mecanismos especiales para resistir su efecto. Las micobacterias fagocitadas pueden evitar su destrucción y utilizar a los macrófagos como hospedador primario. En este caso, previenen la fusión del fagosoma con los lisosomas, por lo que la bacteria evita la formación de los fagolisosomas que poseen bajo pH y, en consecuencia, su destrucción intracelular.

La respuesta inmune adaptativa tiene lugar cuando macrófagos infectados presentan en su superficie antígenos micobacterianos vía el complejo de

histocompatibilidad mayor II (MHC II del inglés *major histocompatibility complex*) para que puedan ser reconocidos por células T CD4 efectoras por lo que se produce la activación de los linfocitos *naive*. Además, es necesaria una señal coestimuladora que promueva la supervivencia de los linfocitos. Finalmente, las APCs secretan citoquinas, como IL-12 e IFN- γ (interferón Gamma), involucradas en la diferenciación de los células T CD4 hacia linfocitos de subclase T_H1. Cuando estas células efectoras reconocen antígenos, generan, a su vez, las citoquinas previamente mencionadas que favorecerán una mayor diferenciación de linfocitos T_H1, así como una activación de los macrófagos con el fin de destruir las micobacterias. En este sentido, el sistema inmune innato que reconoce en un principio al bacilo, inicia una serie de reacciones que conectan una respuesta innata con una respuesta adaptativa.

Cuando patógenos intracelulares o alguno de sus constituyentes no pueden ser eliminados mediante la activación de los macrófagos mediada por linfocitos T_H1, se desarrolla una respuesta inflamatoria localizada característica denominada hipersensibilidad retardada (del tipo IV) que se caracteriza por la formación de un granuloma. Esta estructura consiste en un núcleo central de macrófagos fusionados que dan origen a células gigantes multinucleadas llamadas células de Langhans, rodeadas primero de grandes macrófagos denominados células epitelioides, y luego por células T, muchas de las cuales pueden ser CD4+. Las células de Langhans son redondas con una distribución multinuclear periférica. Por otro lado, las células epitelioides, similares a las células epiteliales, se caracterizan por poseer un núcleo grande y vesiculoso, un citoplasma abundante con aspecto de eosinófilo pálido, así como un mayor desarrollo del retículo endoplasmático rugoso y del aparato de Golgi, por lo que sugiere una funcionalidad destacada para la secreción (8, 13).

La formación de granulomas es un mecanismo que permite al sistema inmune delimitar la localización de los agentes patógenos que no pueden ser destruidos. En la tuberculosis, el núcleo central de los granulomas se vuelve tan aislado que las células mueren, probablemente por los efectos citotóxicos de los macrófagos activados y la falta de oxígeno. Debido a que el tejido necrótico central posee aspecto de queso, este proceso se conoce como necrosis caseosa. De esta manera, aunque la activación de linfocitos T_H1 puede ocasionar cuadros patológicos, si no se inactivara se produciría una diseminación del bacilo incontrolada con la posterior muerte del animal (13).

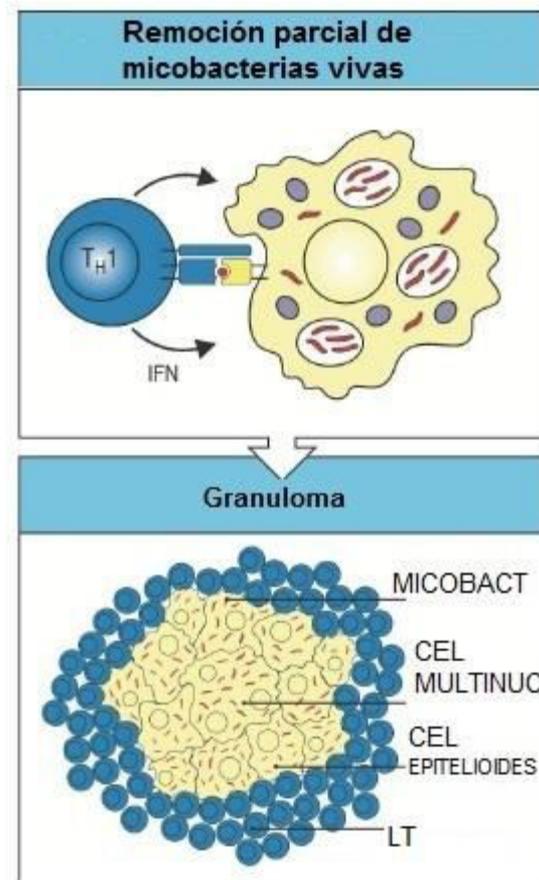


Figura 3. Esquema donde se observa la formación de un granuloma tuberculoso (13).

1.4 IMPACTO EN SALUD PÚBLICA

La TBB conlleva un potencial riesgo en salud pública al tratarse de una zoonosis. En Argentina, la enfermedad humana causada por *M. bovis* representa aproximadamente el 0,5% de los casos con confirmación bacteriológica (11), alcanzando un máximo en regiones de mayor producción lechera como la provincia de Santa Fe (6%). Más de la mitad de los casos están relacionados a una transmisión del tipo ocupacional, ya que los individuos se encuentran vinculados a tareas rurales como lo son empleados en frigoríficos, en playas de faena y en tareas de tambo, veterinarios, laboratoristas, estudiantes rurales y transportistas de leche y ganado.

En nuestro país, la capacidad técnica de la Red Nacional de Laboratorios fue incrementada en los últimos años. Existen 714 laboratorios que efectúan diagnóstico de tuberculosis mediante exámenes microscópicos directos del esputo. En 19 de ellos se realizan pruebas de sensibilidad a las drogas antituberculosas, y en 14, técnicas de identificación fenotípica y genotípica. En el Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias "Dr. Emilio Coni" (INER) dependiente de la Administración Nacional de Laboratorios e Institutos de Salud (ANLIS), así como en los Hospitales Cetrángolo y Muñiz; se realizan rutinariamente cultivos en medios Stonebrink con piruvato con el fin

de seleccionar el crecimiento de *M. bovis* (15).

En un estudio realizado en el INER-ANLIS de la provincia de Santa Fé durante el período 1977-2001 se investigaron muestras de aproximadamente 150.000 personas. De los 4.243 aislamientos bacteriológicos, el 95,8% correspondió a *M. tuberculosis*, el 1,9% a especies del complejo *M. avium* (MAC del inglés *Mycobacterium avium complex*) y el 2,3% a *M. bovis*. Los casos de tuberculosis humana causada por esta última especie, tuvieron localización pulmonar y no se presentaron en niños sino en personas con una edad media de 45 años. Paralelamente, se observó que el 65% de los pacientes tuvo relación laboral directa con el ganado (11). En el último período de estudio (2002-2011) se notificaron 1080 casos de tuberculosis, de los cuales 17 fueron causados por *M. bovis*, observándose una disminución lenta en la frecuencia relativa de la TBB (15).

	Años	N° de casos de tuberculosis	HIV/ SIDA	Casos por <i>M. bovis</i> N° (%)
INER-ANLIS	1978-1981	718	NR ^a	15 (2,08)
	1982-1991	1993	Neg / NR	58 (2,91)
	1992-2001	1380	Neg / NR	23 (1,66)
	2002-2011	1080	Neg / NR	17 (1,57)
Hosp. Cetrángolo	2001-2005	1470	Neg / NR	5 (0,34)
	2006-2011	2485	2421 Neg/ NR -64 Pos	9 (0,36) ^b
Hosp. Muñiz	1971	2157	NR	38 (1,76)
	1977-1982	6361	NR	57 (0,90)
	1981-1991	10240	10.000 Neg/ NR - 240 Pos	97 (0,95) ^c
	1996-2008	9750	NR	39 (0,40)

^aNR = no registrado

^bUn caso HIV+ presentó tuberculosis causada por *M. bovis*

^cDos casos HIV+ presentaron tuberculosis causada por *M. bovis*

Tabla 2. Casos de tuberculosis causados por *M. bovis* en relación al total de casos de tuberculosis diagnosticados (15).

En el Hospital Cetrángolo, ubicado en el partido de Vicente López de la provincia de Buenos Aires, los porcentajes de tuberculosis causadas por *M. bovis* en relación a los casos de tuberculosis diagnosticados fueron de 0,34% y 0,36% durante los períodos 2001-2005 y 2006-2011, respectivamente. Durante el primer período ninguno de los pacientes fue diagnosticado con HIV. En el segundo período, 64 de los 2485 pacientes con tuberculosis resultaron HIV positivos, siendo una de las infecciones tuberculosas originadas por *M. bovis*. Por otro lado, en el Hospital Muñiz, la frecuencia relativa de *M. bovis* disminuyó de 1,8% en 1971 a 0,4% en el período 1996-2008 (15).

Según el sistema mundial de información zoonosaria (WAHIS del inglés *World Animal Health Information Database*) administrado por la OIE, en Argentina se reportaron 13478 casos humanos de TBB durante el período 2005-2014, con un número de casos mortales que llega al 5,29% (713 muertos).

A pesar que la infección originada por *M. bovis* es común en el ganado bovino,

existen barreras de protección para el hombre, tales como el control sanitario por parte de la inspección veterinaria en establecimientos ganaderos; la pasteurización o hervido de la leche (65°C durante 30 minutos); la correcta aplicación y seguimiento de medidas higiénicas-sanitarias, como lo son la limpieza y desinfección; así como el uso de equipos de protección individual, especialmente para prevenir la transmisión respiratoria (14).

1.5 IMPACTO ECONÓMICO

La TBB se convierte en una limitante para el comercio nacional e internacional de productos y subproductos de origen pecuario ya que representa significantes pérdidas productivas al disminuir la producción de carne y leche. En este sentido, Argentina con aproximadamente 3.400.000 bovinos lecheros (15) y siendo un país productor y exportador de carne, lácteos y sus derivados, requiere de una marcada interacción entre los actores involucrados en las distintas cadenas productivas (sector público y privado), con el fin de avanzar en el control y erradicación de la TBB.

Desde el año 2012 se encuentra vigente el Programa Nacional de Control y Erradicación de TBB, aprobado a través de la Resolución N° 128 por el Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria (SENASA) y el Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca (MAGYP). Dicho programa contempla el abordaje sanitarista para cada sistema productivo, normalizando las pautas a seguir para obtener el carácter de establecimiento libre. Al año 2011, la provincia de Tierra del Fuego junto a 6948 establecimientos fueron oficialmente declarados libres de TBB por SENASA (11). Sin embargo, según la OIE, la presencia de la enfermedad al día de la fecha aún se encuentra limitada a una o varias zonas.

En nuestro país, las pérdidas económicas producidas por la tuberculosis bovina se estiman en USD 63.000.000/año. Entre las causas de pérdida más importantes se encuentran el peso de los animales afectados detectados en faena (36%), la producción de leche (13%), así como el decomiso parcial o total en frigoríficos o mataderos (10%) (16).

1.6 DIAGNÓSTICO

1.6.1 CLÍNICO

Los signos clínicos de la enfermedad incluyen debilidad, pérdida de apetito y peso, fiebre intermitente, así como tos y diarrea. Su aparición depende de la distribución de los tubérculos en el individuo. No obstante, en muchos casos los síntomas característicos no son observados, inclusive aun cuando la enfermedad afecta a varios órganos (7). Los síntomas clínicos evidentes suelen diagnosticarse cuando los ganglios linfáticos superficiales se ven comprometidos debido a que los mismos aumentan hasta 20 veces su tamaño original (8).

1.6.2 BACTERIOLÓGICO

A nivel laboratorio y para la identificación del agente etiológico se emplea la bacteriología (aislamiento y caracterización del agente) como test diagnóstico por excelencia (“gold standard”).

Antes de realizar el cultivo, es necesario realizar una homogeneización del tejido con ácido sulfúrico 10%, ácido oxálico 5%, con detergente (cloruro de hexadecilpiridinio 0,375-0,75%) o bien mediante método de Petroff (con hidróxido de sodio 2-4%). De esta manera, se destruyen los microorganismos contaminantes. La mezcla ácida o básica es agitada durante 10-15 minutos a temperatura ambiente, neutralizada y centrifugada. El sobrenadante se descarta y el *pellet* obtenido se siembra en medios de cultivo sólidos. El medio Stonebrink permite un crecimiento de colonias de *M. bovis* ya que es específico, a diferencia del medio Lowenstein-Jensen que no permite un desarrollo apropiado para este bacilo. Ambos medios pueden ser a base de huevo o ágar y contener piruvato o bien piruvato con glicerol. Finalmente, se incuban únicamente a 37°C con o sin CO₂ durante un período mínimo de 8 semanas y hasta, preferentemente, 10-12 semanas. La primera observación se realiza a las 48 horas con el fin de detectar contaminación secundaria. Las observaciones siguientes se realizan cada semana. Cuando aparecen colonias, se preparan extendidos a los cuales se les realiza la tinción de Ziehl-Neelsen (Z-N) con el fin de identificar los bacilos alcohol-resistentes (BAAR).

Se puede realizar un análisis presuntivo mediante la observación de la morfología de las colonias. De todas maneras, cada aislamiento debe ser confirmado, con el fin de diferenciar *M. bovis* del resto de los integrantes del MTBC. En un medio sólido apropiado con piruvato, las colonias típicas de *M. bovis* se caracterizan por ser lisas y de color amarillentas. En contraste, *M. tuberculosis* puede formar colonias rugosas con aspecto de coliflor y difíciles de desprender del medio; mientras que las colonias de las especies del MAC pueden ser lisas, húmedas y de color blanco grisáceas.

El crecimiento en presencia de drogas y a concentraciones diferentes de las mismas depende si los medios son a base de huevo o ágar. *M. bovis* es sensible a hidracida del ácido 2-tiofeno carboxílico e hidracida del ácido isonicotínico en medios que poseen huevo y sin piruvato. Un análisis fenotípico de *M. bovis* muestra resultados negativos a los ensayos de producción de niacina y nitrato. Para el ensayo de amidasas, resulta positivo para la ureasa y negativo para la nicotinamidasas y pirazinamidasas. Paralelamente, este bacilo se caracteriza por ser un organismo microaerófilo y no-cromogénico (7, 8).

Se ha reportado que sobre animales reaccionantes al test de tuberculina, en el 70% de los casos se evidenciaron lesiones compatibles con tuberculosis en tejidos pulmonares, mientras que *M. bovis* fue aislado de hisopados nasales en el 19% de los casos confirmados PPD positivos (17), dejando en claro la potencial existencia de reacciones falsas negativas en bacteriología, además de requerir un lapso de tiempo considerable para lograr el aislamiento y caracterización del agente etiológico. Dichos resultados falsos negativos suelen estar asociados a la incorrecta toma y acondicionamiento de las muestras, como así también al método de decontaminación utilizado que no sólo elimina microorganismos contaminantes sino que además presenta efectos perjudiciales para las propias micobacterias. Por lo expuesto es que resulta necesaria la búsqueda de técnicas diagnósticas más rápidas, sencillas y sensibles capaces de complementar a la bacteriología convencional (11).

1.6.3 ANATOMO-HISTOPATOLÓGICO

El análisis histopatológico es de carácter presuntivo y puede realizarse si el tejido presenta lesiones tuberculosas características.

Microscópicamente, pueden identificarse lesiones del tipo productivo o exudativo. Las del primer tipo poseen carácter netamente celular y con una disposición concéntrica de los diferentes tipos de células, formando una lesión circunscripta. Se observan, desde el núcleo hacia afuera, células de Langhans, células epitelioides, macrófagos y, finalmente, linfocitos. En contraste, la lesión exudativa presenta un carácter infiltrativo debido a la amplia difusión de *M. bovis*, con la presencia de un exudado fibrinoso que contiene las células anteriormente mencionadas y una alta concentración de neutrófilos. Solamente en la TBB, ambos tipos de lesiones tienden a sufrir una necrosis central que puede calcificarse y que, microscópicamente, se observa como una masa homogénea eosinófila clara sin detalles celulares. Como las lesiones son paucibacilares, los microorganismos ácido-alcohol resistentes teñidos mediante Z-N podrían no ser detectados. De todas maneras, con el fin de establecer un diagnóstico histopatológico positivo, es excluyente la presencia de células epitelioides (7, 8).

El diagnóstico de la TBB a partir de una lesión macroscópica presenta dificultades ya que su aspecto, tamaño, color, consistencia y distribución dependen de la vía de entrada y del período de diseminación de la bacteria. Paralelamente, es

necesario tener en cuenta la similitud de la TBB con otros procesos granulomatosos como la actinomicosis, actinobacilosis, carcinomas metastásicos, granulomas a hongos, parásitos y cuerpos extraños como pelos y cristales (8).

1.6.4 PRUEBA TUBERCULÍNICA-PPD

La labor diagnóstica de la TBB tiene como protagonista a la intradermorreacción o prueba tuberculínica- derivado proteico purificado (PPD del inglés *purified protein derivative*). Es un test de *screening* que detecta inmunidad celular mediante una reacción local de hipersensibilidad del tipo retardada (tipo IV) con el fin de establecer un diagnóstico *in vivo*. Dicha respuesta se encuentra mediada por linfocitos T_H1 específicos para la tuberculina.

Las APCs recolectan, procesan y presentan la tuberculina, de modo tal que los linfocitos T_H1 pre-existentes reconocen los complejos de MCH II junto con péptidos del antígeno e inician una liberación de citoquinas inflamatorias que incluyen al $TNF-\beta$ e $IFN-\gamma$. En consecuencia, estos mediadores químicos inducen la expresión de moléculas de adhesión en el endotelio vascular, el cual se activa con el fin de reclutar fagocitos y acumular fluidos, aumentando la permeabilidad de los vasos sanguíneos. La reacción de hipersensibilidad retardada se lleva a cabo de manera lenta, entre 24-72 horas, debido a que la inflamación es pequeña y los linfocitos T_H1 específicos demoran en llegar al sitio de inyección (13).

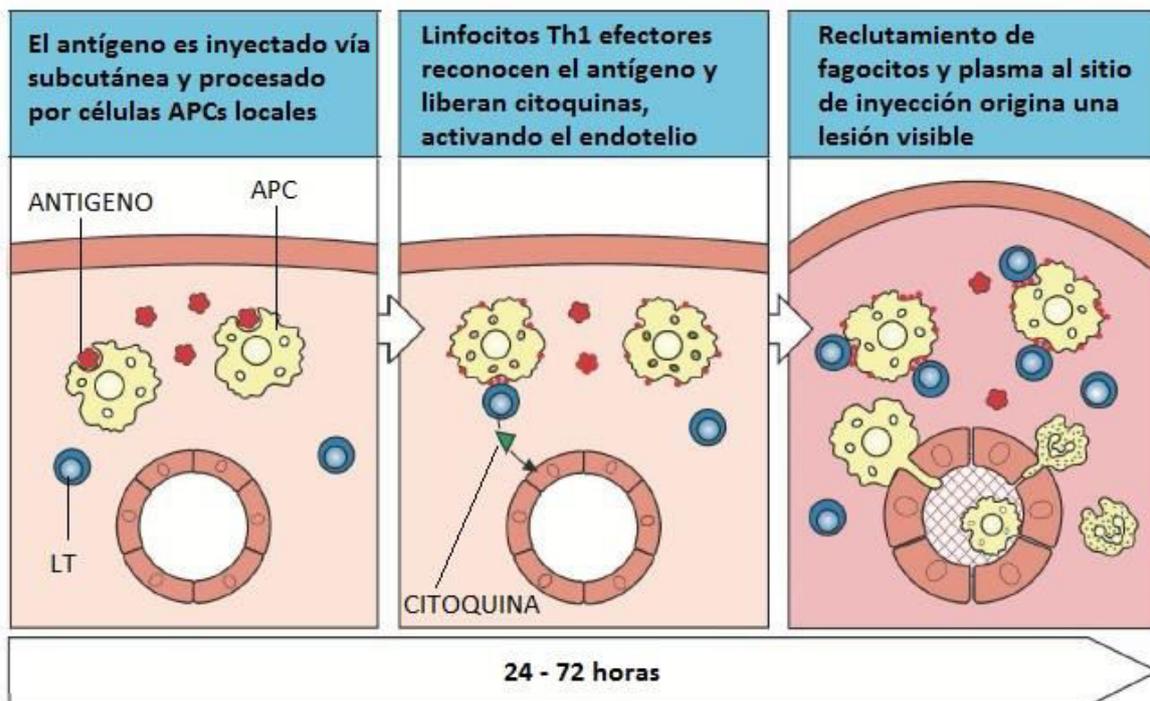


Figura 4. Esquema de una reacción de hipersensibilidad tipo IV (13).

El objetivo de la inyección con tuberculina-PPD es clarificar si la causa de la hipersensibilidad en un animal sospechoso es debida a una infección con *M. bovis*. A nivel internacional y nacional, funciona como procedimiento básico para el saneamiento, control y erradicación de la TBB, siendo la vía de aplicación intradérmica la única aceptada oficialmente.

Las pruebas tuberculínicas pueden ser de diferente composición, así como poseer distintos sitios de aplicación. La prueba ano-caudal (AC) y la prueba cervical simple (CS) de saneamiento, ambas con PPD bovino, se llevan a cabo rutinariamente; mientras que la prueba cervical comparativa (CC) donde se aplican en paralelo PPD bovino y PPD aviar, se utiliza cuando es requerida para estudios epidemiológicos o ante la sospecha de posibles reacciones inespecíficas. La PPD bovina es elaborada con *M. bovis* cepa AN5 de 1 mg/ml de concentración, a diferencia de la PPD aviar que es elaborada con *M. avium* cepa D4 y con una concentración de 0,5 mg/ml.

Es necesario tener en cuenta que si bien estas pruebas tienen una alta especificidad (90-99,8%), su sensibilidad es variada oscilando entre 70-85% (30). El diagnóstico PPD negativo en un animal infectado depende de diversos factores tales como el tiempo de exposición al bacilo, desensibilización post-tuberculinización, estados avanzados de la infección asociado a un cuadro generalizado y anergia, inmunosupresión causada por mala alimentación o durante el post-parto, así como debido a una incorrecta dosificación, lectura, baja potencia del reactivo, entre otras causas propias de la técnica. Por esta razón, es necesario tener en cuenta que las pruebas negativas no son garantía sanitaria suficiente excepto que el animal o los animales provengan de un rodeo certificado libre. De todas maneras, en nuestro país la intradermorreacción continúa siendo la prueba por excelencia con el fin de mejorar el estado sanitario de los rodeos bovinos (6, 18).

1.6.5 ELISA

El ensayo ELISA (del inglés *Enzyme-linked Immunosorbent Assay*) ha sido estudiado con el fin de complementar a la prueba tuberculínica. Sin embargo, la respuesta inmune humoral en la infección tuberculosa no es uniforme ya que la producción de anticuerpos contra el bacilo se ve incrementada en etapas avanzadas, mientras que en estados iniciales es muy variable. Paralelamente, los resultados de especificidad y sensibilidad mediante el test de ELISA han sido muy fluctuantes. Por estas razones, la obtención de un sistema único que sea confiable, económico y de fácil automatización aún no ha sido generado. Es posible una optimización del test mediante el uso de antígenos como MB70, proteína inmunodominante de *M. bovis* y componente activo del PPD, capaz de desarrollar una respuesta de hipersensibilidad retardada, así como proliferación linfocitaria (6, 17).

1.6.6 IFN- γ

El ensayo de Interferón Gamma (IFN- γ) es un test de diagnóstico *in vitro* utilizado como complemento de la prueba tuberculínica con el objetivo de evaluar la inmunidad celular de un animal sospechoso. Este ensayo consiste en la cuantificación indirecta de la citoquina IFN- γ liberada por linfocitos a partir de una muestra de sangre. Su excreción requiere, tras una incubación de 16-24 horas que los linfocitos hayan sido naturalmente sensibilizados. Técnicamente, requiere el uso de anticuerpos monoclonales anti-IFN- γ de *M. bovis* ya que la captura y detección de la citoquina se realiza mediante un ELISA sándwich. Luego de la etapa de revelado, se observan los valores de densidad óptica arrojados en el ELISA infiriendo posibles reactores positivos en base al dosaje de esta citoquina liberada *in vitro*.

El ensayo de Interferón Gamma, o dosaje de IFN- γ , presenta varias ventajas como una alta sensibilidad y especificidad diagnóstica (del 93,6% y del 96,2%, respectivamente), según un estudio realizado en Australia. Paralelamente, no requiere una segunda movilización del ganado para realizar la lectura de la reacción, como sí lo necesita la prueba tuberculínica. Sin embargo, es necesario tener presente el tiempo entre la toma de muestra de sangre y la ejecución del ensayo, el cual debe realizarse en un período máximo de 8 horas; así como el costo del *kit* de diagnóstico ya que en nuestro país no es producido a escala nacional (6, 7, 17).

1.6.7 PCR

Los ensayos basados en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR del inglés *polymerase chain reaction*) surgieron como métodos prometedores comparados con aquellos de rutina, acortando los tiempos de diagnóstico de 2 a 3 días. Este ensayo molecular es capaz de diagnosticar TBB con resultados comparables al cultivo (6).

Actualmente, se realiza utilizando diversos cebadores (*primers*) capaces de flanquear segmentos específicos del genoma micobacteriano. Uno de los fragmentos de DNA objetivo más utilizados es la secuencia de inserción IS6110, característica de las micobacterias pertenecientes al MTBC y presente usualmente, entre 1 a 5 copias dentro del genoma de *M. bovis* (19). En este sentido, se llevaron a cabo numerosos trabajos científicos proponiendo el uso de PCR como complemento efectivo a realizar dentro de los laboratorios de diagnóstico de TBB. Al día de la fecha, se han realizado estudios utilizando PCR a partir de muestras clínicas tanto de tejido (20, 21) e hisopado nasal (22, 23), como así también a partir de muestras de leche (17).

La aplicación de los ensayos de PCR no tiene como objetivo reemplazar la metodología de confirmación tradicional, sino complementarla, por ejemplo, en la resolución de situaciones dudosas que se presentan durante los ensayos convencionales. No obstante, en países en vías de desarrollo donde los porcentajes de TBB son mayores, el equipamiento y personal entrenado necesario para llevarlos a cabo hacen que dicha técnica molecular posea una insuficiente adopción en los sistemas de diagnóstico (6).

1.6.8 LAMP

Si bien el ensayo de PCR presenta un amplio uso tanto en el ámbito de la investigación como para fines de diagnóstico, hace varios años surgieron diferentes técnicas que no requieren de ciclos variables de temperatura (24). Entre ellas se encuentra el método de amplificación isotérmica LAMP desarrollado por Notomi y col. en el año 2000 (25). Este ensayo se presenta como una técnica rápida, económica y sencilla. Mediante LAMP se amplifica DNA con alta sensibilidad a una temperatura constante entre 50-65°C, debido a la acción de la polimerasa *Bst* (proveniente de *Bacillus stearothermophilus*) que posee actividad de desplazamiento de hebra. Paralelamente, la amplificación es altamente específica ya que se utiliza un juego de cuatro a seis *primers* diseñados para reconocer, respectivamente, de seis a ocho regiones de la secuencia objetivo de DNA. Los *primers* pueden dividirse en tres tipos: internos, externos y de unión al bucle. Los productos de amplificación son estructuras con formas circulares que poseen varias repeticiones invertidas de la secuencia objetivo, así como estructuras del tipo coliflor con múltiples bucles.

En la figura 5 se esquematizan los *primers* externos, denominados FOP (del inglés *forward outer primer*) y BOP (del inglés *backward outer primer*), que son homólogos a las regiones F3 y B3 de la región objetivo, respectivamente. El *primer* interno FIP (del inglés *forward inner primer*) contiene la secuencia codificante de F2 en el extremo 3' unido directamente con la región F1c (complementaria a la secuencia F1) en el extremo 5', mientras que el *primer* BIP (del inglés *backward inner primer*) contiene la región codificante de B2 en el extremo 3' anclado con la secuencia B1c (complementaria a B1) en el extremo 5'. Las dos regiones de ambos *primers* internos se encuentran unidas mediante un espaciador TTTT. Los *primers* FLP (del inglés *forward loop primer*) y BLP (del inglés *backward loop primer*) que se unen al bucle contienen la secuencia complementaria a una parte de la secuencia entre F1 y F2, y entre B1 y B2, respectivamente.

El mecanismo de reacción de LAMP puede dividirse en tres etapas. El paso inicial (paso I) comienza cuando el *primer* FIP se une a la región F2c mediante su secuencia F2, no así la región F1c, para dar comienzo a la síntesis con desplazamiento de hebra. Luego, FOP, que es agregado en menor concentración que los *primers* internos, hibrida con su secuencia complementaria (F3c) para dar al lugar a la siguiente polimerización. De esta manera, se obtienen dos estructuras, una de las cuales posee un bucle en su extremo 3'. El *primer* BIP se une a esta última mediante su región B2, inicia la síntesis y forma una estructura en forma de horquilla (*dumb-bell structure*). Rápidamente, dicha secuencia al hibridarse sobre sí misma, permite la hibridación de las regiones F1 y F1c dejando un extremo 3' disponible para que la polimerasa *Bst* comience a agregar nucleótidos. La estructura de bucle (*stem-loop structure*) que resulta da lugar al comienzo de la etapa de amplificación (paso II). En este paso, la hebra bucle funciona como DNA molde, permitiendo que FIP hibride en el bucle para iniciar la síntesis de nucleótidos. Aquí, se produce una molécula intermediaria que contiene una copia invertida de la secuencia objetivo y un bucle formado por la hibridación de las regiones B1 y B1c. El último paso, denominado elongación de la hebra y repetición de etapa II (paso III) se caracteriza por la formación de estructuras

con bucles de mayor longitud, así como nuevas estructuras de bucles iniciadoras de nuevas etapas de amplificación mediante las subsiguientes polimerizaciones dependientes de los primers FIP y BIP junto con las auto-polimerizaciones de las hebras. Así, cuando se lleva a cabo la reacción de LAMP se obtiene como producto de amplificación una mezcla compleja con formas circulares que poseen varias repeticiones invertidas de la secuencia objetivo, así como estructuras del tipo coliflor con múltiples bucles (Ver ANEXO).

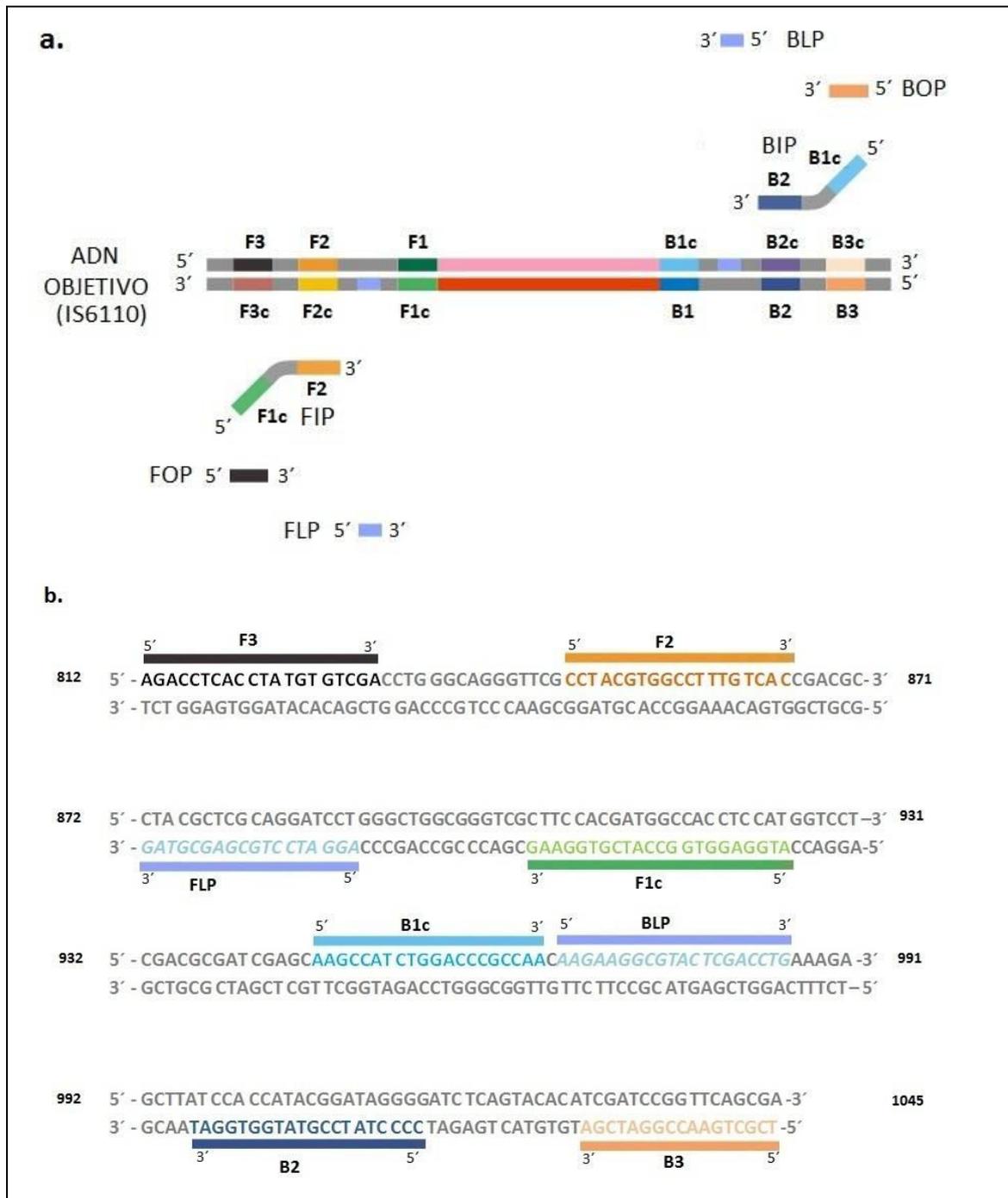


Figura 5. (a.) Esquema de las regiones de las ocho regiones de IS6110 reconocidas por los *primers* en LAMP. (b.) Posición de hibridación y orientación de los *primers* en LAMP (27).

La técnica de LAMP, en comparación con los ensayos convencionales de PCR, no solo disminuye los tiempos de obtención de resultados de 2 días a 3 o 4 horas, sino que permite obtener una alta tasa de síntesis de DNA, originando grandes cantidades de iones pirofosfato (PP_i), los cuales precipitan al reaccionar con el magnesio con la consecuente formación de turbidez, capaz de observarse a simple vista.

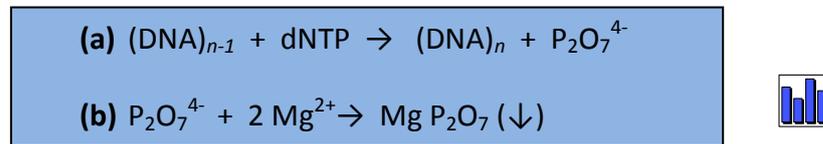


Figura 6. Reacciones involucradas en la formación de turbidez en LAMP. (a.) Iones pirofosfato $\text{P}_2\text{O}_7^{4-}$ son liberados de los dNTPs durante la polimerización. (b.) Iones pirofosfato reaccionan con el magnesio del buffer para dar lugar al precipitado (26).

Durante la última década, se realizaron progresos considerables sobre la técnica LAMP y su utilización en el diagnóstico de micobacterias. Tal es el caso del trabajo realizado por Aryan y col.(27) quienes desarrollaron un ensayo de detección de las especies del MTBC basado en la amplificación de la secuencia IS6110 (LAMP-IS6110); obteniendo una sensibilidad analítica de una copia del genoma (5 fg) por reacción. En el año 2003, Iwamoto y col. (28) utilizaron LAMP para detectar el gen *gyrB* (MTBC, *M. avium* y *M. intracellulare*), obteniendo un límite de detección (LD) de 5 copias del genoma. Más tarde, en el año 2011, Zhang y col. (29) describieron una variante de amplificación del gen *mpt83* para detección de *M. bovis*, obteniendo un LD de 10 copias del genoma. Cabe destacar que para la realización de LAMP no se requieren equipos costosos como termocicladores y transiluminadores, sino que las reacciones de amplificación pueden llevarse a cabo con el uso de equipamiento de bajo costo como bloques térmicos, y bajo observación directa basada en la turbidez de los productos amplificados. Por lo antes mencionado y teniendo en cuenta la necesidad de laboratorios capaces de realizar diagnóstico molecular confirmatorio de la prueba tuberculínica (16), nuestro trabajo tuvo como objetivo la puesta a punto de la técnica LAMP IS6110, estableciendo el límite mínimo de detección en relación con la técnica PCR convencional para, posteriormente, utilizar esta herramienta a partir de muestras clínicas de tejido bovinos sospechados de TBB.

2. *MATERIALES Y MÉTODOS*

2.1 Extracción de DNA

La extracción total de DNA de micobacterias se realizó utilizando parte de la metodología convencional de Fenol:Cloroformo:Isoamílico y de un kit comercial (*DNeasy Blood and Tissues*, Qiagen). Dicha metodología se lleva rutinariamente en el laboratorio sobre muestras de tejidos bovinos sospechados de TBB.

Los tejidos fueron disgregados en agua destilada mediante un equipo homogeneizador (Masticator IUL SA). Luego, las muestras fueron tratadas con buffer de lisis (Tris-EDTA 1X, SDS 10% y proteinasa K (10mg/ml) e incubadas a 65°C durante toda la noche. En un principio, dichas muestras fueron extraídas con Fenol: Cloroformo: Alcohol isoamílico (24:24:1) y centrifugadas a 12000 rpm por 10min; luego, el sobrenadante fue trasvasado agregando una solución de Cloroformo: Alcohol isoamílico (24:1) y centrifugado nuevamente. Con el sobrenadante obtenido se continúa el procedimiento de extracción a partir del punto 3 según lo descrito en el protocolo de purificación de DNA total a partir de muestras de tejido del *kit* comercial (Qiagen) (31).

2.2 Touch down-PCR (PCR-IS6110)

Las amplificaciones se llevaron adelante según la metodología propuesta por Zumárraga y col. (17). La mezcla de amplificación contuvo *buffer Taq* 1X (Tris-HCl 10 mM, KCl 50 mM, Tritón X-100 0,1%, pH 9,0), MgCl₂ 2,5 mM, dNTPs 0,8 mM, primers (INS1 e INS2) 1 μM, 5 μl de DNA molde y DNA polimerasa *Taq* 1,25 U, en un volumen final de 50 μl.

Luego de una desnaturalización inicial de 96°C por 3min., la reacción se llevó a cabo inicialmente en 8 ciclos de 96°C por 1 min., con una temperatura de alineamiento comenzando a 72°C por 1 min. (con una disminución en 1°C/ ciclo), y una temperatura de extensión a 72°C por 1 min. Finalmente, se realizaron 30 ciclos de 96°C por 1 min., 65°C por 1 min., 72°C por 2 min., y una extensión final a 72°C por 8 min.

En cada reacción de PCR, se incluyeron controles positivos con DNA de *M. bovis* AN5 y controles negativos conformados por la master mix de PCR sin el agregado de DNA.

2.3 LAMP

Las amplificaciones se llevaron a cabo según Aryan y col. (6) La mezcla de amplificación contuvo *buffer ThermoPol Reaction 1X* (Tris-HCl 10 mM, KCl 50 mM, DTT 1 mM, EDTA 0,1 mM, glicerol 50%, Triton X-100 0,1%, pH 7,4) (New England Biolabs), betaína 0,8 M (Sigma-Aldrich), *primers* internos (FIP/BIP) 1,6 mM, *primers* externos (FOP/BOP) 0,2mM, *primers* de unión al bucle (FLP y BLP) 0,8 mM, dNTPs 2 mM, MgSO₄ 6 mM, 5µl de DNA molde y DNA polimerasa *Bst* (New England Biolabs) 8 U, en un volumen final de 25 µl.

Luego de una desnaturalización inicial de 96°C por 3min., la reacción se realizó a una temperatura constante de 65°C y finalmente la enzima fue inactivada mediante calor a 92°C por 2min. Durante una etapa inicial de puesta a punto del ensayo, fue probada la variante LAMP sin realizar el paso de desnaturalización inicial.

Nombre	Secuencia (5'-3')	Target	Tamaño de Amplicón (pb)	Referencias
INS1 ^a	CGTGAGGGCATCGAGGTGGC	IS6110	Banda única 245	17
INS2 ^a	GCGTAGGCGTCGGTGACAAA			
IS-FOP ^b	AGACCTCACCTATGTGTCGA	IS6110	Varias bandas entre 100 y 400 (patrón "en escalera")	27
IS-BOP ^b	CGCTGAACCGGATCGA			
IS-FIP ^b	ATGGAGGTGGCCATCGTGGAAGCCTACGTGGCCTTTGTAC			
IS-BIP ^b	AAGCCATCTGGACCCGCCAACCCCTATCCGTATGGTGGAT			
IS-FLP ^b	AGGATCCTGCGAGCGTAG			
IS-BLP ^b	AAGAAGGCGTACTCGACCTG			

^a Primers de PCR-IS6110

^b Primers de LAMP-IS6110

Tabla 3. Primers utilizados en las diferentes amplificaciones.

2.4 Análisis de producto de amplificación de PCR-IS6110 y LAMP

Se prepararon geles de agarosa 2% p/v (Biodynamics) con solución TAE 1X y Bromuro de etidio 10mg/ml (Promega).

2.4.1 Observación directa de producto de amplificación de LAMP

Los productos de amplificación de LAMP se detectaron a simple vista mediante la formación de turbidez blanca como resultado positivo.

2.5 Optimización de las condiciones de LAMP

Se evaluaron los efectos de las concentraciones de betaína (0,2M, 0,8M, 3,2M) y DNA polimerasa *Bst* (8, 16, 32U) para mejorar las condiciones de la reacción LAMP.

2.6 Determinación de la sensibilidad de los ensayos PCR y LAMP

Se evaluarán la sensibilidad de ambos ensayos utilizando como molde de DNA de la cepa de referencia *M. bovis* AN5. Se realizaron diluciones seriadas 1/10 (desde 10^{-1} a 10^{-6}) partiendo de una muestra de DNA con una concentración de 30,8 ng/ μ l ($6,16 \times 10^6$ copias del genoma).

3. RESULTADOS

3.1 Análisis del producto amplificado de reacción LAMP

Los productos de amplificación mediante LAMP fueron analizados con electroforesis en gel de agarosa, además de la observación directa mediante la turbidez. Esto último, de acuerdo a las lecturas seriadas cada 15min. realizadas durante 90min. Esta medición fue repetida en tres ensayos. Los resultados obtenidos indicaron que la evidencia de turbidez fue óptima a los 60min. en todos ellos. En solo un ensayo, se observó un tiempo óptimo mínimo de lectura a los 45min.

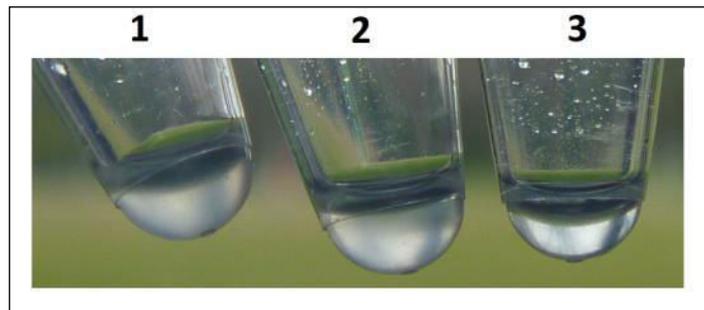


Figura 6. Análisis directo de producto amplificado mediante observación de turbidez. (1) Control Positivo (C+) (2) Dilución 10⁻¹ del C+ (3) Control Negativo C-.

Más allá de las dos modalidades de revelado de los resultados de amplificación, para los ensayos donde se visualizaron los productos de amplificación con *Sybr Green*, la presencia de DNA se observó claramente mediante el cambio de color de naranja a verde. El viraje fue visto mediante observación directa y a través de un transiluminador donde las muestras con amplicones de DNA en grandes cantidades, producto de LAMP, se ven brillante (resultados no mostrados).

3.2 Optimización de las condiciones de LAMP

Se presentó dificultades en la evaluación de MgSO₄ para LAMP ya que aparecieron contaminaciones que impidieron ajustar la concentración óptima de su uso, por lo tanto se continuó trabajando con la concentración previamente descrita en el trabajo de Aryan y col. (27).

Solo se obtuvieron resultados válidos para las pruebas con diferentes concentraciones de DNA polimerasa *Bst* y betaína. No se estimó necesario la evaluación de concentración óptima de dNTPs, al encontrarse en exceso en la reacción; ni de diferentes concentraciones de primers.

Resultados

Se obtuvieron resultados de amplificación positivos a una temperatura de 63°C (resultados no mostrados) utilizando un bloque térmico.

Como puede observarse en la figura 7A, al evaluar diferentes concentraciones de polimerasa *Bst* se observó que con 8 y 16 U, el patrón típico de escalones se encuentra levemente más nítido que al utilizar 32 U de la polimerasa en la reacción.

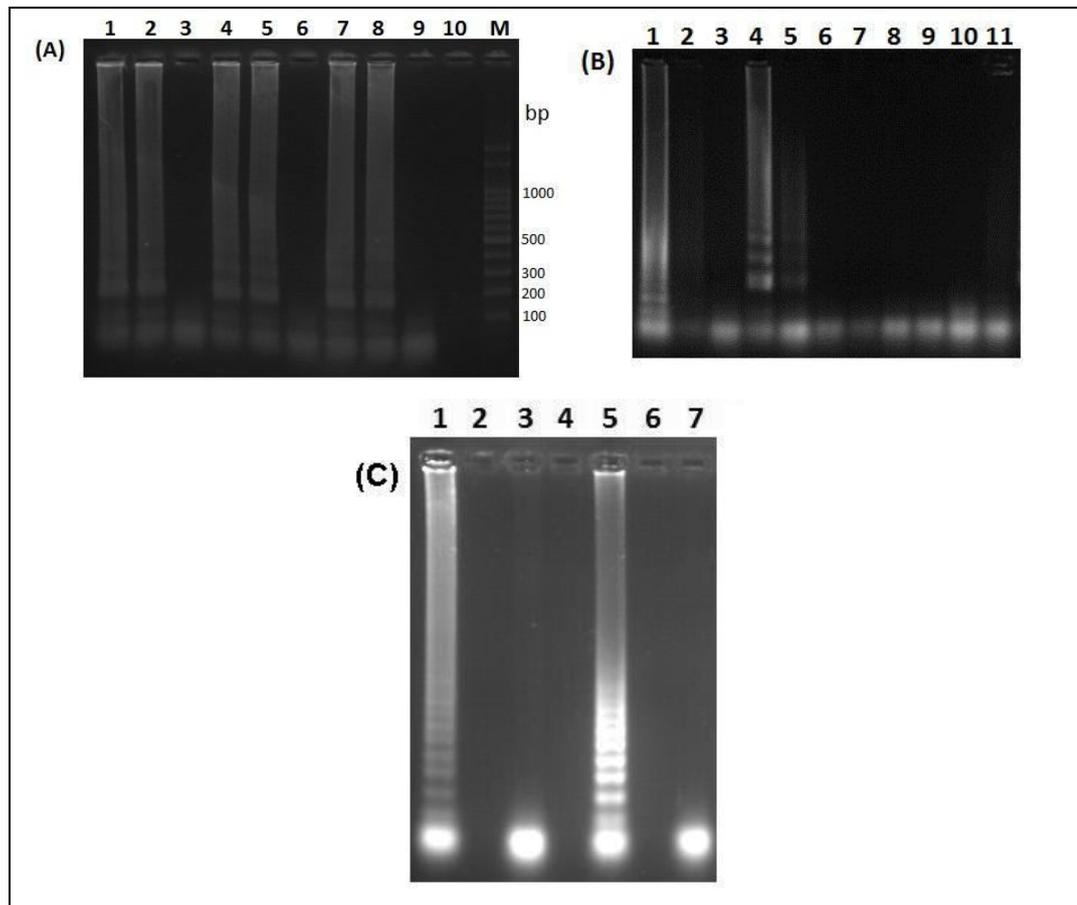


Figura 7. Análisis electroforético de LAMP con diferentes concentraciones de reactivos.
(A) El efecto de polimerasa *Bst*: calle 1 y 2: utilizando 8U ante DNA puro y DNA diluido 1/10 respectivamente; calle 4 y 5: utilizando 16 U ante DNA puro y DNA diluido 1/10, respectivamente; calle 7 y 8: utilizando 32 U ante DNA puro y DNA diluido 1/10, respectivamente; calle 3, 6, 9: C-; calle 10: sin siembra; calle M: marcador de Peso Molecular 1000pb (Productos Bio-Lógicos). (B) El efecto de betaína: calle 1 y 2: utilizando 0,2 M ante DNA puro y DNA diluido 1/10 respectivamente; calle 4 y 5: utilizando 0,8 M ante DNA puro y DNA diluido 1/10, respectivamente; calle 7 y 8: utilizando 3,2 M ante DNA puro y DNA diluido 1/10, respectivamente; calle 3, 6, 9: C-; (C) El efecto de la desnaturalización inicial: Calles 1 y 3: C+ y C- sin desnaturalización inicial, respectivamente; Calles 5 y 7: C+ y C- con desnaturalización inicial, respectivamente; Calles 2, 4, 6: sin siembra.

Por otro lado, según la figura 7B, se observó que manteniendo una concentración de $MgSO_4$ igual a 6mM, pero con una concentración de 0,2 M de betaína se afectó el ciclo de amplificación inicial originando un patrón no característico, mientras que a una concentración de 3,2 M de betaína se interrumpe la actividad de la polimerasa. Paralelamente, se puede notar que la

concentración ideal de betaína fue de 0,8 M, mientras que una master-mix sin betaína (calle 10) no lleva a una amplificación.

No se observan resultados cuando al DNA es sembrado sólo.

En la figura 7C, se observa producto de amplificación con o sin el paso inicial de desnaturalización a 96°C por 3min. La calle 5 muestra un patrón electroforético más nítido que la calle 1.

De esta manera, se establecieron las condiciones óptimas para el desarrollo de LAMP, llevando a cabo la amplificación a 65°C por 1hr30min y utilizando en la preparación de la master-mix, los siguientes reactivos y concentraciones: betaína 0,8 M, MgSO₄ 6mM, dNTPs (2 mM), 1,6 mM de primer FIP/BIP, 0,2 mM de FOP/BOP, 0,8 mM de FLP/BLP y 8 U de DNA polimerasa *Bst*.

3.3 Determinación de la sensibilidad de los ensayos PCR y LAMP

Según puede observarse en la figura 8, los límites mínimos de detección para los ensayos LAMP y PCR, mediante observación de electroforesis en gel de agarosa, fueron hasta la dilución 10⁻⁴ y 10⁻³ respectivamente. De esta manera y tras la repetición de los ensayos, la PCR convencional resultó la más sensible, al ser capaz de detectar una dilución por encima de LAMP.

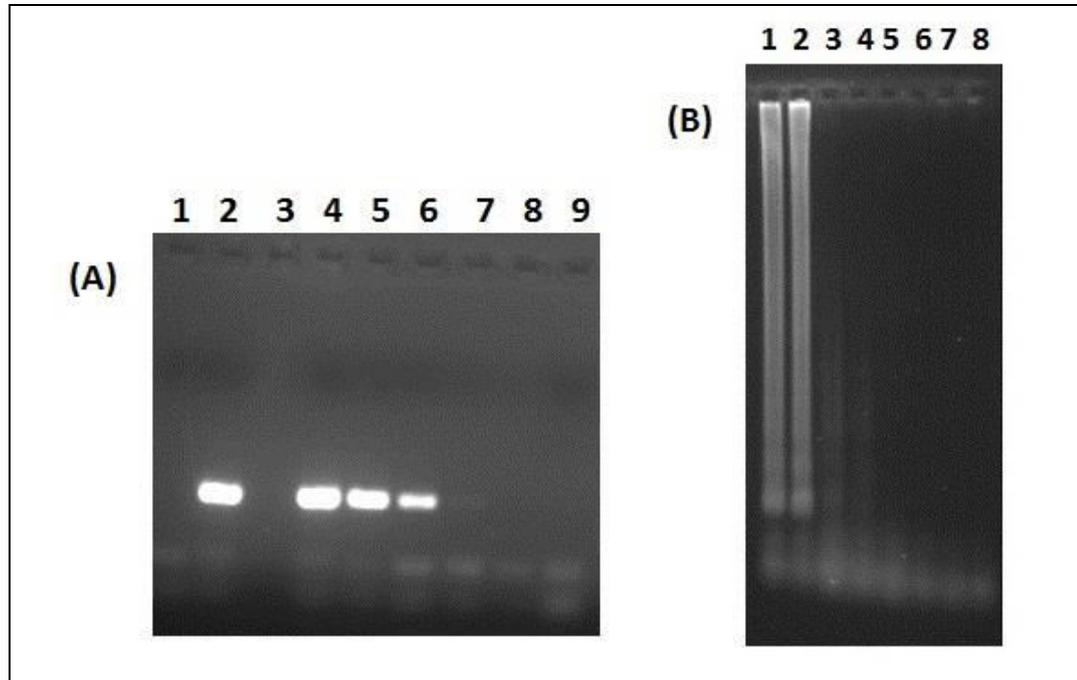


Figura 8. Comparación de la sensibilidad de PCR-IS6110 y LAMP-IS6110. (A) LD de PCR-IS6110 en electroforesis de 15 µl de cada master-mix usando gel de agarosa 2% con Bromuro de Etidio. Calle 1: C-; Calle 2: C+; Calle 3: sin siembra; Calles 4, 5, 6, 7, 8 y 9: diluciones seriadas 1/10 (desde 10⁻¹ a 10⁻⁶, respectivamente) (B) LD de LAMP-IS6110 en electroforesis de 10 µl de cada master-mix usando gel de agarosa 2% con Bromuro de Etidio. Calle 1: C+; Calles 2, 3, 4, 5, 6 y 7: diluciones seriadas 1/10 (desde 10⁻¹ a 10⁻⁶, respectivamente); calle 8: C-.

4. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

Mediante la observación de turbidez a simple vista se observaron amplificaciones con resultados positivos a partir de los 60min de transcurrida la reacción, en coincidencia con lo descrito por Zhang y col. (29) y a diferencia de lo observado por Aryan y col. (27), donde se sugiere un tiempo menor de lectura. De esta manera, se presenta la posibilidad de contar con un resultado en un corto plazo, menor inclusive que aquel requerido por la PCR convencional.

El fragmento mayor de la DNA polimerasa *Bst* posee actividad de desplazamiento de doble hebra, por lo que LAMP fue realizado con o sin desnaturalización inicial a 96°C por 3min., con el fin de corroborar dicha actividad. Como se observa en la figura 7C se confirma la amplificación no dependiente del calentamiento inicial. A diferencia del protocolo propuesto por Aryan y col. (27), estos resultados indicarían que es posible evitar este paso inicial y, por lo tanto, el agregado de la enzima *Bst* aparte de la preparación de la master-mix no sería necesario. Además de este aspecto, la posibilidad de evitar el paso de desnaturalización y posterior apertura de los tubos para agregar la enzima polimerasa evitaría el riesgo de posibles contaminaciones por esta manipulación adicional.

Los productos de amplificación observados en los geles de las imágenes 7 y 8, coinciden con los patrones clásicos “escalonados” para las reacciones de LAMP, en donde se observan bandas en un rango de peso molecular entre 100 y 400pb (estructuras circulares más pequeñas) y luego se visualiza producto amplificado (chorreado) hasta el pocillo del gel (estructuras más largas). Al realizar las corridas electroforéticas se prepararon los geles directamente con o sin bromuro de etidio para, después de la corrida, colocarlo inmerso en una solución con el mismo. Se observó que el patrón característico de “escalones” se visualiza mejor (bandas nítidas con la disminución de un bandas inespecífico), cuando se prepara el gel con bromuro de etidio directamente.

Es necesario resaltar que se obtuvieron resultados no esperados por la aparición de contaminaciones, donde los controles negativos resultaron positivos. Ante esta situación, se prepararon nuevas soluciones de reactivos, maximizando las medidas tendientes a evitar el riesgo de contaminación. Luego de varios intentos fallidos se logró estabilizar el ensayo LAMP, obteniendo resultados correctos pero, al momento de realizar una nueva curva de diluciones con los reactivos nuevos, no se pudieron obtener resultados. De esta manera, es necesario aclarar que la figura 7B muestra la primer curva de dilución realizada con reactivos preparados antes de mi trabajo realizado en el marco del PROCAGRA. En consonancia con otros trabajos publicados, es probable que el límite de detección, a partir de la puesta a punto realizada durante el trabajo, sea mayor a la aquí presentada. Resta aún continuar evaluando LAMP y su límite de detección ya que probablemente se obtengan mejores resultados, en términos de sensibilidad analítica, que los aquí detallados.

Si bien la utilización del espectrofotómetro *Nanodrop* puede brindar un resultado aproximado acerca de la concentración de DNA de *M. bovis* AN5. Sería importante, en caso de contar con mayor cantidad de DNA, corroborar la concentración de DNA, utilizado en la curva de sensibilidad, mediante espectrofotometría a longitud de onda 260nm.

En la figura 7A se observa el resultado de una PCR-IS6110, en donde se obtuvieron las bandas esperadas (245pb). En las calles 4,5, 6 se observaron bandas nítidas, mientras que en la calle 7 solo se visualizó una banda débil. De esta manera, el

ensayo de PCR-IS6110 presentó un límite de detección de aproximadamente 616 copias del genoma (dilución 10^{-4}). Por otro lado, en la figura 7B del ensayo de LAMP-IS6110 se observó resultado positivo en las calles 2, 3 y 4, mientras que solamente en las calles 1 y 2 se pudo apreciar levemente la estructura de escalones típica de LAMP. En este último ensayo se obtuvo un límite de detección de aproximadamente 6160 copias del genoma (dilución 10^{-3}), el cual es un logaritmo menor que el límite de detección obtenido por PCR-IS6110. Estos resultados no coinciden con otros trabajos previamente publicados (15, 17), donde se describieron valores mayores de sensibilidad al ensayo de LAMP.

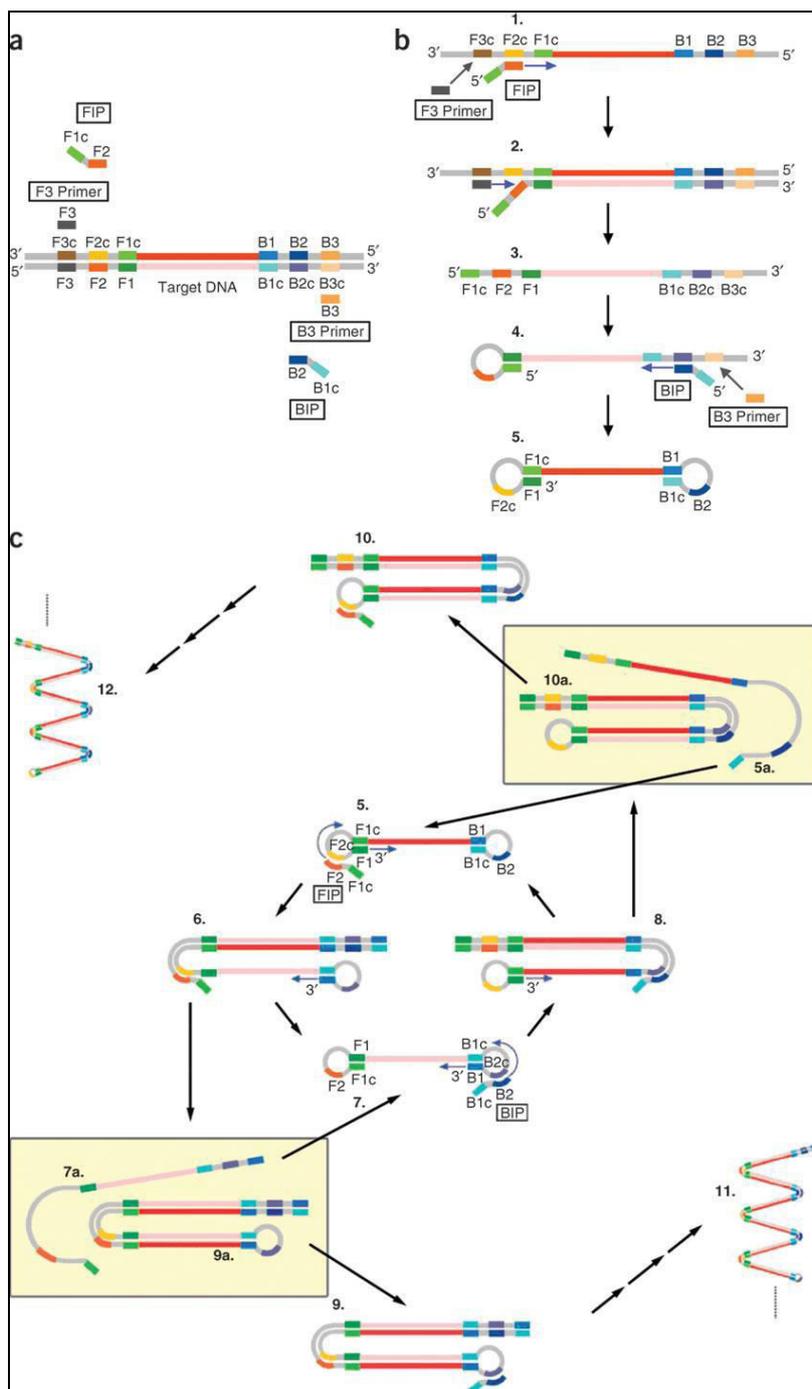
En cuanto a la tecnología LAMP, se plantea la misma como una alternativa de diagnóstico que podría complementarse a los métodos de diagnosis regulares. Considerando sus beneficios y limitaciones, el uso de LAMP permitiría obtener resultados en tiempos relativamente más cortos en comparación con las técnicas de diagnóstico convencionales, así como también su potencial aplicación dentro de un laboratorio de baja infraestructura.

Una de las ventajas remarcables de la técnica LAMP es la disminución de los tiempos de diagnosis, con la posibilidad de acortar los tiempos de una PCR convencional de 5hs a 2 o 3hs. Así mismo la posibilidad de realizar la amplificación a temperatura constante, permite la utilización de artefactos sencillos y económicos como termobloques; sin requerir la utilización de equipamiento costoso durante el proceso. Posteriormente, al ser un ensayo con una alta tasa de síntesis de DNA, resulta práctica e interesante la posibilidad de visualizar a simple vista los productos amplificados sin la utilización de geles de agarosa y transiluminadores, a partir de la turbidez formada por la concentración elevada de pirofosfato de magnesio. Esto posibilita no solo la independencia de electroforesis en agarosa y transiluminadores para revelar el producto amplificado, sino que además posibilita la observación de los resultados inmediatamente luego de la amplificación, haciendo la técnica más rápida que la PCR convencional.

Por otro lado, cabe remarcar que el valor comercial de la enzima polimerasa *Bst* es cuatro veces superior al de la *Taq* polimerasa utilizada en la PCR convencional. Otra limitación de LAMP es el riesgo de aparición de contaminaciones, por ejemplo, con amplicones. El hecho que esto haya ocurrido a lo largo del trabajo, imposibilitó continuar indagando en potenciales variantes tendientes a mejorar la sensibilidad analítica aquí presentada, como así también en su utilización directa sobre muestras clínicas.

En síntesis, el trabajo aquí presentado deja establecido potenciales mejoras a realizar sobre LAMP, entendiéndose que resta aún continuar trabajando en este ensayo para su incorporación como técnica complementaria al diagnóstico convencional de la tuberculosis bovina, a partir de diversas muestras clínicas como, por ejemplo, hisopados, tejidos y leche.

5. ANEXO



Anexo 1. Principio de la técnica de amplificación isotérmica mediada por bucles (LAMP) con un juego de cuatro primers. Las etapas de la reacción son tres: inicial (a), de amplificación (b) y de elongación y repetición de etapa de amplificación (c). Existen 6 regiones que flanquean al DNA objetivo: F3, F2, F1, B1c, B2c y B3c desde el extremo 5'OH (F3c, F2c, F1c, B1, B2 y B3 son sus regiones complementarias desde el extremo 5'PO4). Se sintetizan dos pares de primers: dos interiores (FIP y BIP) y dos exteriores (FOP y BOP). (b) Estructura inicial en donde la región F2 del primer FIP se hibrida con su región complementaria (F2c) dentro del DNA objetivo para comenzar la polimerización. Luego, el primer FIP (F3) se complementa a F3c para dar lugar a un molde de simple hebra gracias a la actividad de desplazamiento de hebra y elongación de la polimerasa Bst. Posteriormente, se sintetiza DNA a partir del molde de simple hebra utilizando como cebador BIP (B3), dando lugar a la estructura 5 que posee bucles en sus extremos. (c) Paso de amplificación a partir de la estructura 5: FIP se hibrida con su región complementaria (F1+F2c). Luego de varios pasos, se genera la estructura 7 que es complementaria a la estructura 5, así como desde la estructura 8 se genera nuevamente la estructura 5. Las estructuras 9 y 10 son producidas a partir de las estructuras 6 y 8, respectivamente. Estructuras con bucles más largas son generadas también (11 y 12). Las reacciones de elongación son iniciadas desde los subproductos del paso cíclico de amplificación, generando varios tamaños de productos.

6. BIBLIOGRAFÍA

Bibliografía

- (1) Jakko van Ingen y col. (Marzo de 2013). Characterization of *Mycobacterium orygis*. *Emerging Infectious Diseases*, 19 (3), 521-522.
- (2) Alexander Kathleen A. y col. (Agosto de 2013). Novel *Mycobacterium tuberculosis* complex pathogen, *M. mungi*. *Emerging Infectious Diseases*, 16 (8), 1296-1299.
- (3) Brosch R y col. (Marzo de 2002). A new evolutionary scenario for the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99 (6), 3684-3689.
- (4) Garnier Thierry y col. (Junio de 2003). The complete genome sequence of *Mycobacterium bovis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100 (3), 7877-7882.
- (5) Ashford David A. y col. (Abril de 2001). Epidemiology of selected mycobacteria that infect humans and other animals. *Revue scientifique et technique OIE*, 20 (1), 325-337.
- (6) Garbaccio, Sergio G. (2006). Diagnóstico In Vivo e In Vitro de la tuberculosis bovina. *Temas de zoonosis III (Asociación Argentina de Zoonosis)*, Cap. 25, 222-226.
- (7) OIE. World Organization for Animal Health. (2009). Bovine tuberculosis. *OIE terrestrial manual*. Cap. 2.4.7, 1-16.
- (8) Torres Pedro M. (2000). Patogenia. *Actualización en Tuberculosis Bovina (SAGPyA - INPPAZ OPS/OMS-SENASA)*. Cap. 4, 18-20.
- (9) Good Margaret y col. (Febrero de 2011). Perspectives on the history of bovine TB and the role of tuberculin in bovine TB eradication. *Veterinary Medicine International*, 2011, 1-11.
- (10) Abdala Alejandro A. y col. (Octubre de 2007). Aislamiento de *Mycobacterium bovis* en fauna silvestre. *Anuario 2006. EEA Rafaela. Producción Animal*, 2006, 23-24.
- (11) Torres Pedro M. (2013). Situación de la tuberculosis bovina en la República Argentina. [en línea]. <<http://www.senasa.gov.ar//Archivos/File/File6832-TubBRepAa.pdf>> [consulta: 14 enero 2015].
- (12) Dean Gillian S. y col. (Octubre de 2005). Minimum infective dose of *Mycobacterium bovis* in cattle. *Infection and immunity*, 73 (10), 6467-6471.
- (13) Kenneth Murphy. (2012). Janeway's Immunobiology 8th Edition. Ed. Garland Science, 48-50, 75-78, 201-203, 354, 377-381, 514, 539.
- (14) de Kantor Isabel N. y col. (Junio de 2008). Bovine tuberculosis in Latin American countries. Current situation and recommendations. Taller auspiciado por la OIE en el 3er Congreso Latinoamericano de zoonosis. [en línea]. <http://www.inta.gob.ar/documentos/bovine-tuberculosis-in-latin-american-countries.-current-situation-and-recommendations/at_multi_download/file/Bovine_Tuberculosis%28Sept%2015%29%5B1%5D.pdf> [consulta: 14 enero 2015].
- (15) De Kantor Isabel N. y col. (2012). La tuberculosis zoonótica en la Argentina. *Medicina (Buenos Aires)*, 72 (6), 514-520.
- (16) Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca/ Servicio Nacional de Sanidad Animal y Calidad Agroalimentaria. (Marzo de 2012). Plan nacional de control y erradicación de la tuberculosis bovina. Resolución N° 128/12. [en línea]. <<http://www.cvpba.org/assets/files/RES%20SENASA%20128-2012%20PLAN%20NACIONAL%20DE%20CONTROL%20Y%20ERRADICACION%20DE%20LA%20TUBERCULOSIS%20BOVINA.pdf>> [consulta: 14 enero 2015].

Bibliografía

- (17) Zumárraga, Martín J y col. (2005). Use of a touch-down polymerase chain reaction to enhance sensitivity of *Mycobacterium bovis* detection. *Journal of Veterinary diagnostic Investigation*, 17, 232-238.
- (18) Torres Pedro M. (2000). Tuberculosis bovina. Pruebas tuberculínicas (inoculación, lectura e interpretación). Preguntas y respuestas. [en línea]. <<http://www.senasa.gov.ar/Archivos/File/File1008-5.pdf>> [consulta: 14 enero 2015].
- (19) Otaol Isabel y col. (Junio de 2008). Mapping of IS6110 insertion sites in *Mycobacterium bovis* isolates in relation to adaptation from the animal to human host. *Veterinary Microbiology*, 129, 333-341.
- (20) Garbaccio, Sergio G. y col. (2010). Evaluation of an immunomagnetic capture method followed by PCR to detect *Mycobacterium bovis* in tissue samples from cattle. *Revista Argentina de Microbiología*, 42, 247-253.
- (21) Parra A. y col. (Marzo de 2008). Development of a molecular diagnostic test applied to experimental abattoir surveillance on bovine tuberculosis. *Veterinary Microbiology*, 127, 315-324.
- (22) Romero Rosa E. y col. (1999). Identification of *Mycobacterium bovis* in bovine clinical samples by PCR species-specific primers. *Canadian Journal of Veterinary Research*, 63, 101-106.
- (23) Vitale Fabrizio y col. (1998). Detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex in cattle by PCR using milk, lymph nodes, aspirates and nasal swabs. *Journal of Clinical Microbiology*, 36, 1050-1055.
- (24) Tanner Nathan. Improved reagents for isothermal amplification. [en línea]. <http://www.neb-online.de/isothermal_amp.pdf> [consulta: 14 enero 2015].
- (25) Notomi Tsugunori y col. (2000). Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic acids research*, 28 (12), e63.
- (26) Mori Yasuyoshi y col. (2001). Detection of loop-mediated isothermal amplification reaction by turbidity derived from magnesium pyrophosphate formation. *Biochemical and biophysical research communications*, 289, 150-154.
- (27) Aryan Ehsan y col. (2010). A novel and more sensitive loop-mediated isothermal amplification assay targeting IS6110 for detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Microbiological Research*, 165, 211-220.
- (28) Iwamoto Tomotada y col. (2003). Loop-mediated isothermal amplification for direct detection of *Mycobacterium tuberculosis* Complex, *M. avium*, and *M. intracellulare* in Sputum Samples. *Journal of clinical microbiology*, 41 (6), 2616-2622.
- (29) Zhang Jun y col. (2010). Development of a loop-mediated isothermal amplification assay for the detection of *Mycobacterium bovis*. *The veterinary journal*. 14
- (30) de la Rúa-Domenech Ricardo y col. (2006) Ante mortem diagnosis of tuberculosis in cattle: a review of the tuberculin tests, γ -interferon assay and other ancillary diagnostic techniques. *Research in Veterinary Science*, 81, 190-210.
- (31) Quiagen. (Julio de 2006). Purification of Total DNA from Animal Tissues (Spin-Column Protocol). *Qiasymphony blood and tissue handbook*. 28.