



ORIGINAL

Mycobacterium bovis en fauna silvestre de la cuenca lechera de Santa Fe, Argentina



Alejandro A. Abdala^{a,*}, Sergio Garbaccio^b, Martín Zumárraga^b y Héctor D. Tarabla^a

^a Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria, Estación Experimental Agropecuaria Rafaela, Rafaela, Santa Fe, Argentina

^b Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria, Centro de Investigación en Ciencias Veterinarias y Agronómicas, Castelar, Buenos Aires, Argentina

Recibido el 3 de junio de 2014; aceptado el 23 de abril de 2015

Disponible en Internet el 14 de setiembre de 2015

PALABRAS CLAVE

Mycobacterium bovis;
Fauna silvestre;
Didelphis albiventris

Resumen El control y la erradicación de la tuberculosis bovina basados en la detección de los animales infectados y su inmediata faena permitió lograr progresos satisfactorios en varios países y regiones, pero no todos pudieron lograrlo debido principalmente a la presencia de fauna silvestre infectada con *Mycobacterium bovis*. La Argentina aplica desde 1999 estas mismas premisas y ha logrado avances en los rodeos lecheros, aunque no se ha evaluado el factor ambiental como la fauna silvestre. El objetivo de este trabajo fue determinar si la fauna silvestre de la cuenca lechera de Santa Fe está infectada con *M. bovis*.

Se realizó la captura/sacrificio de fauna silvestre presente en 5 rodeos lecheros con altos niveles de reaccionantes positivos a la prueba de tuberculina. Sobre 95 mamíferos silvestres examinados, se aisló *M. bovis* de 7 individuos de comadreja overa (*Didelphis albiventris*), de uno de zorro gris (*Lycolapex gymnocercus*) y de uno de rata (*Rattus norvegicus*). Los sitios anatómicos que produjeron estos aislamientos variaron de acuerdo con las especies; en ninguno de los ejemplares evaluados se observaron lesiones macroscópicas de tuberculosis. Los espigotipos de *M. bovis* aislados con mayor frecuencia de los animales silvestres correspondieron a los tipos 34 (4 aislamientos) y 12 (3 aislamientos); el primero es el más corrientemente aislado del ganado en Argentina. Se discute en este estudio el papel de la comadreja overa (*D. albiventris*) como hospedador circunstancial de *M. bovis*.

© 2015 Asociación Argentina de Microbiología. Publicado por Elsevier España, S.L.U. Este es un artículo Open Access bajo la licencia CC BY-NC-ND (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

* Autor para correspondencia.

Correo electrónico: abdala.alejandro@inta.gob.ar (A.A. Abdala).

KEYWORDS

Mycobacterium bovis;
Wildlife;
Didelphis albiventris

***Mycobacterium bovis* in wildlife of the dairy regions of Santa Fe (Argentina)**

Abstract Control eradication campaigns of bovine tuberculosis based on the «test and slaughter» approach were successful in many countries and regions; however, in some areas the infection persists and one of the main reasons is *Mycobacterium bovis* infection in wild life species. Argentina has applied the same approach since 1999, achieving progress in dairy cattle herds. Nonetheless, the wildlife role has never been investigated. The objective of this study was to determine if wildlife from the Santa Fe dairy area is infected with *M. bovis*.

Wildlife species having a positive tuberculin skin test were captured in five dairy farms. Ninety five wildlife mammals were captured; *M. bovis* was recovered from 7 possums (*Didelphis albiventris*), from one fox (*Lycolapex gymnocercus*) and from one rat (*Rattus norvegicus*). None of the animals exhibited macroscopic lesions. The most frequently isolated *M. bovis* spoligotypes were types 34 (4 isolates) and 12 (3 isolates). Spoligotype 34 is the most frequently isolated type in Argentine cattle. The role of *D. albiventris* as spillover host of *M. bovis* is discussed in this study.

© 2015 Asociación Argentina de Microbiología. Published by Elsevier España, S.L.U. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

Introducción

El agente causal de la tuberculosis bovina (TBb) es *Mycobacterium bovis*, que produce infecciones en animales domésticos y silvestres y en el hombre. En las últimas décadas, numerosos países ejecutaron programas de control y erradicación de la TBb en sus rodeos bovinos, basándose en la detección de los animales infectados y su inmediata faena (procedimiento conocido como *test and slaughter*). A pesar de haberse logrado progresos satisfactorios en extensas regiones, en algunas áreas persistieron las reinfecciones en los rodeos saneados. La causa principal de que esto ocurriera fue la presencia de fauna silvestre infectada^{10,14,17,27,33}.

En Argentina existe desde 1999 un plan oficial de control y erradicación de TBb^{35,36} basado en la misma premisa, aunque no se contempla la indemnización de los productores por el descarte de los animales positivos. Desde su puesta en marcha, el número de rodeos bovinos que fueron declarados libres de tuberculosis (TB), especialmente el de rodeos lecheros, ha ido en constante aumento. Sin embargo, los conglomerados geográficos más afectados aún coinciden con las zonas lecheras, de ellos el más significativo es el que agrupa a los departamentos centrales de la provincia de Santa Fe (Castellanos, La Capital, Las Colonias, San Jerónimo y San Justo), al que se suma parte del departamento San Justo de la provincia de Córdoba³⁰. Los departamentos Castellanos y Las Colonias evidenciaron prevalencias del orden de 7,7% y 4,1%, respectivamente, en vacas, y de 30% y 15,6% en rodeos lecheros^{1,2}. Diversos factores de manejo y del medio ambiente pueden explicar las variaciones de incidencia y prevalencia entre regiones y entre rodeos de una misma región²⁷.

La participación de la fauna silvestre local ha sido poco estudiada en Argentina: solo se han comunicado aislamientos circunstanciales de *M. bovis* en liebres (*Lepus europaeus*)²³, jabalí (*Sus scrofa*)³ y puma (*Puma concolor*) en cautiverio³¹. Hasta el momento no se han realizado estudios sistemáticos sobre la infección de la fauna autóctona por

M. bovis y su relación con las especies de interés pecuario, por tal motivo, el objetivo del presente trabajo fue determinar si la fauna silvestre existente en la cuenca lechera de Santa Fe está infectada con *M. bovis*.

Materiales y métodos**Localización de rodeos lecheros**

Para efectuar el estudio se seleccionaron 5 rodeos lecheros de la denominada cuenca lechera Santa Fe ubicados en predios en los que se permitiría la captura de animales silvestres (fig. 1). Tres de estos rodeos presentaron prevalencias elevadas en sus vacas a la prueba de tuberculina ano-caudal: el 7 a 29% de animales positivos. Los 2 rodeos restantes tuvieron reaccionantes positivos a tuberculina (2 al 4% sobre el total del rodeo) luego de haber finalizado ambos un programa de saneamiento de esta enfermedad; en uno de ellos se había aislado previamente una cepa de *M. bovis* a partir de lesiones visibles detectadas en frigorífico en uno de sus bovinos.

Las labores de muestreo de fauna se realizaron durante los años 2007 y 2008 y el primer semestre del año 2009.

Captura de animales

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

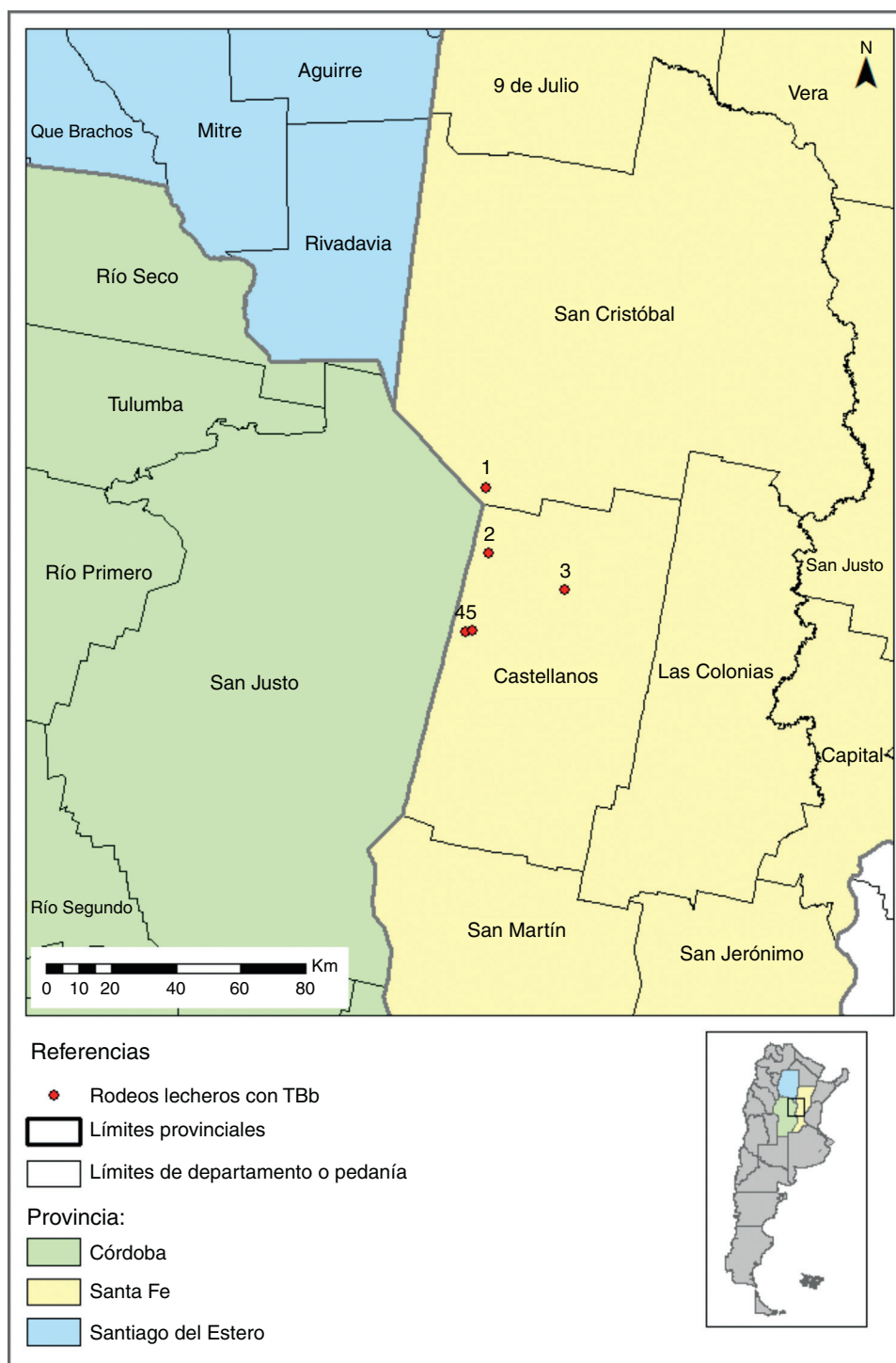


Figura 1 Ubicación de los rodeos lecheros donde se realizaron las capturas de animales silvestres.

y sitios donde se depositan los bovinos muertos de estos establecimientos.

Los roedores capturados fueron manipulados y sacrificados siguiendo normas estándares para roedores del Centers for Disease Control and Prevention²⁶.

En el caso de animales del orden Xenarthra (peludos), Didelphimorphia (comadreas) y Galactis (hurón), se

siguieron las recomendaciones del CICUAE INTA-CICVyA⁸, con la administración de xilazina (Rompun[®], Bayer Argentina) IM en dosis de 5 mg/kg de peso como tranquilizante, antes de la aplicación intracardiaca del eutanásico (T61[®], Intervet Argentina S.A). Las labores de colocación de trampas se realizaron en 2-3 períodos de 5 días por cada establecimiento, entre los meses de mayo y septiembre. Para la captura de

zorros y liebres se recurrió al empleo de armas de fuego. Se contó con la autorización expresa del Gobierno de la Provincia de Santa Fe (Res. 0040/08 Exp. N° 02101-00009273-3).

Las carcasas de los animales se mantuvieron refrigeradas desde su captura-sacrificio hasta su procesamiento, sin superar las 8 h *post mortem*.

Toma de muestras en bovinos

Se procuró el aislamiento de *M. bovis* en los bovinos de todos los rodeos donde se hicieron las capturas de animales silvestres, a fin de determinar las cepas presentes y los espigotipos (spo). Se realizaron necropsias en 3 de los establecimientos y de solo un bovino en cada uno de ellos. Las muestras se obtuvieron de las lesiones macroscópicas compatibles con TB cuando estas se observaron, y de ganglios retrofaríngeos y mediastínicos cuando los bovinos no presentaban lesiones. Las muestras se acondicionaron en recipientes estériles, se refrigeraron inmediatamente después de su obtención y se mantuvieron a -18°C hasta su procesamiento. En el establecimiento donde no se pudieron realizar necropsias ni inspección en frigorífico, se procuró el aislamiento de *M. bovis* a través de hisopados nasales. De igual manera, se procedió en los rodeos que habiendo realizado necropsia de un bovino no se pudo aislar *M. bovis*. Estos muestreos se realizaron a un número de 10 animales positivos a tuberculina en 2 oportunidades por rodeo. La toma de muestras se realizó con hisopos estériles contruidos artesanalmente e introducidos unos 8-10 cm en los ollares de los bovinos y colocados posteriormente en tubos de 50 ml de capacidad que contenían 15 ml de buffer fosfato estéril. Estas muestras fueron mantenidas congeladas a -18°C hasta su procesamiento en el laboratorio de bacteriología.

Toma de muestras en animales silvestres

Para todas las especies silvestres se aplicó una rutina de necropsia que consistió en la apertura de cavidades por la línea media y la observación macroscópica de presencia de lesiones compatibles con TB en órganos. Se tomaron muestras individuales de pulmón y alícuotas de bazo, hígado y riñón, las que se colocaron en contenedores estériles. En los mamíferos de mayor tamaño se recolectaron ganglios retrofaríngeos, submandibulares, tonsilas y preescapulares. Todas las muestras destinadas a estudios bacteriológicos se conservaron a -18°C hasta su procesamiento.

Cultivos bacteriológicos

Las muestras de tejido fueron trituradas utilizando un homogeneizador mecánico (Stomacher® Basic 470, Sedward, England) y descontaminadas por la técnica de Petroff. Ambos procesos se realizaron siguiendo la metodología recomendada por el *Manual de micobacterias* de la AAVLD²¹. Posteriormente se sembraron por duplicado en medios de Löwenstein-Jensen y Stonebrink. Los desarrollos en cultivos fueron coloreados con Ziehl-Neelsen (ZN) para la identificación morfológica de las micobacterias.

Técnicas moleculares

La identificación de aquellos aislamientos con tinción de ZN positiva como pertenecientes al complejo *Mycobacterium tuberculosis* (CMT) se realizó por la técnica de PCR-IS6110, utilizando los cebadores INS1 CGTGAGGGCATCGAGGTGGC e INS2 CGTAGGCGTCGGTGACAAA, de acuerdo con lo descrito por Hermans *et al.*²⁰.

La tipificación molecular de los aislamientos identificados como pertenecientes al CMT se efectuó utilizando la técnica conocida como *Spoligotyping*, de acuerdo con lo descrito por Kamerbeek *et al.*²².

Análisis estadístico

La búsqueda de asociaciones entre aislamiento de *M. bovis* en comadreja overa y variables independientes como el sexo, la prevalencia de infección en vacas lecheras, el tamaño del rodeo y la presencia o ausencia de rodeos reinfestados se efectuó mediante el test exacto de Fischer y el cálculo de los *odds ratio* (OR) con sus correspondientes intervalos de confianza del 95 % (IC del 95 %), utilizándose el *software* SatWin Ep. Scope V. 2.0®.

Resultados

Se capturó a un total de 95 mamíferos y se aisló *M. bovis* de 9 individuos, lo que implica una prevalencia de infección del 9,4%. Siete aislamientos provinieron de comadreja overa (*Didelphys albiventris*), uno de zorro gris (*Lycolapex gymnocercus*) y otro de rata (*Rattus norvegicus*). La prevalencia de infección en comadreas resultó del 12,7% (tabla 1). Ninguno de los individuos capturados presentó lesiones macroscópicas compatibles con TB.

Los aislamientos obtenidos en comadreas fueron a partir del conjunto de ganglios de cabeza (n=4), pulmón (n=2) y *pool* de hígado, bazo y riñón (n=1). En el zorro se obtuvo a partir de nódulos mesentéricos y en la rata de pulmón (tabla 1).

En las capturas de comadreja overa no se encontraron asociaciones significativas entre tasa de aislamiento de *M. bovis* y sexo ($p=0,418$), prevalencia de infección en el rodeo de vacas ($p=0,29$) y tamaño del rodeo ($p=0,293$). Los rodeos con reinfección tuvieron 4 veces más riesgo de aislamiento de *M. bovis* en la fauna silvestre capturada dentro de sus predios que los rodeos infectados ($p=0,045$).

La tipificación molecular de los aislamientos obtenidos de la fauna silvestre corroboró que estos pertenecían a la especie *M. bovis*. Se identificaron 4 spo diferentes. A partir de 4 comadreas y de una rata se aisló en 4 ocasiones el spo 34 y en 3 el spo 12. Se detectó en una sola oportunidad el spo 96, obtenido de zorro, y el spo 122, proveniente de una comadreja (tabla 1).

En todos los establecimientos estudiados se obtuvo al menos una cepa de *M. bovis* en alguna de las especies de animales silvestres capturados (tabla 2).

Se realizaron necropsias de bovinos en 3 de los 5 establecimientos; se observaron lesiones macroscópicas de TBb en un animal del cual se logró aislamiento (tabla 2). El otro aislamiento se obtuvo de lesiones observadas en frigorífico cuando del rodeo se enviaron animales a faena (tabla 2).

Tabla 1 Presencia de *M. bovis* en fauna silvestre de 5 establecimientos con rodeos lecheros ubicados en Santa Fe, Argentina

Especie	Total de capturas	Machos	Hembras	Presencia de lesión macroscópica	N.º de individuos con aislamiento positivo/ sexo	Sitio anatómico del aislamiento	Espoligotipo de <i>M. bovis</i> (frecuencia de aislamiento)
Ratón de campo (<i>Akodon</i> sp.)	4	1	3	No			
Laucha de campo (<i>Calomys</i> sp.)	3	1	2	No			
Ratón colilargo (<i>Oligoryzomys</i> sp.)	2	1	1	No			
Rata (<i>Rattus norvegicus</i>)	9	4	5	No	1 ♀	Pulmón	12 (1)
Ratón común (<i>Mus musculus</i>)	1	1		No			
Cuis común (<i>Cavia aperea</i>)	7	4	3	No			
Comadreja overa (<i>Didelphys albiventris</i>)	55	23	32	No	5 ♂ 2 ♀	Nódulos linfáticos de cabeza y carcasa; pulmón y pool de hígado, bazo y riñón	12 (2) 34 (4) 122 (1)
Peludo (<i>ChaetophRACTUS vellosus</i>)	7	6	1	No		-	
Zorro gris (<i>Lycolapex gymnocercus</i>)	2	1	1	No	1 ♂	Nódulo mesentérico	96 (1)
Hurón menor (<i>Galictis cuja</i>)	1	-	1	No			
Liebre europea (<i>Lepus europaeus</i>)	4	3	1	No			
Total	95	45	50		9		

Los intentos realizados para obtener más aislamientos utilizando la técnica de hisopados nasales sobre bovinos positivos a tuberculina no produjeron resultados positivos. Los aislamientos de *M. bovis* provenientes de estos establecimientos correspondieron al spo 21 para el establecimiento 2 (obtenido en frigorífico) y al spo 98 para el establecimiento 5 (tabla 2).

Discusión

El aislamiento de *M. bovis* en fauna autóctona de Argentina está en relación con la capacidad de *M. bovis* de infectar a un amplio rango de hospedadores^{12,29}. La infección en especies de carnívoros y omnívoros parece ocurrir como consecuencia de la presencia de la infección en bovinos u otros rumiantes^{5,11,13,32,34,37,39}.

La prevalencia de infección por *M. bovis* sobre el total de animales silvestres capturados, que fue del 9,4%, se considera elevada y podría estar relacionada con los altos niveles de infección que presentaban los rodeos bovinos que cohabitaban con ellos. Se han observado prevalencias de infección también elevadas (>4%) en carnívoros y omnívoros en un área donde existe un huésped silvestre de mantenimiento, como lo es el ciervo de cola blanca (*Odocoileus virginianus*)³⁹ en el estado de Michigan, EE. UU.⁵.

La prevalencia de infección por *M. bovis* en comadrejas overas (*D. albiventris*) obtenida en este estudio (12,7%) fue superior a la descrita en comadrejas de América del Norte (*Didelphis virginiana*), las cuales adquieren la infección por consumo de despojos de ciervos de cola blanca (*O. virginianus*) y donde tampoco presentaron lesiones visibles o sospechosas de TB^{5,39}.

Tabla 2 Aspectos epidemiológicos de tuberculosis bovina en los 5 rodeos lecheros investigados

Rodeo	Bovinos reaccionantes positivos a tuberculina AC	Necropsia de bovinos/ inspección frigorífico	Lesiones macroscópicas compatibles con TB en bovinos	Realización de hisopados nasales	Aislamiento de <i>M. bovis</i> de bovinos	Espoligotipos aislados de bovinos	Aislamiento de <i>M. bovis</i> fauna silvestre (cantidad y especie)
1	29% vacas en lactancia	Necropsia	No	Sí	No	-	Sí (1 zorro)
2	Reinfección 4% rodeo total	Inspección frigorífico	Sí	No	Sí	21	Sí (3 comadreja)
3	13% vacas en lactancia	Necropsia	No	Sí	No	-	Sí (1 rata)
4	Reinfección 2% rodeo total	No	-	Sí	No	-	Sí (3 comadreja)
5	7,3% vacas en lactancia	Necropsia	Sí	No	Sí	98	Sí (1 comadreja)

El aislamiento de *M. bovis* en animales silvestres sin lesiones visibles ha sido informado tanto en especies consideradas reservorios⁹ como en aquellas consideradas hospedadores finales^{5,13,25}. Esta falta de identificación de lesiones en animales silvestres infectados puede deberse a varios factores, entre ellos la metodología utilizada en las necropsias y los muestreos, así como los relacionados con la virulencia de la cepa de *M. bovis*, la resistencia natural del huésped, la especie y la edad del animal¹⁸.

El aislamiento de *M. bovis* en ratas (*R. norvegicus*) fue comunicado previamente en 2 relevamientos de fauna silvestre, publicados en 1982²⁴ y 2002¹², correspondientes a las áreas endémicas del sur del Reino Unido, como Dorset y Gales, donde se informaron niveles bajos de infección, del orden del 2,2 y el 1,2%, respectivamente. Se considera esta especie como muy resistente a la enfermedad, ya que la inoculación experimental con dosis altas de *M. bovis* no produce desarrollo de lesiones^{12,24}. Esto hace de la rata un hospedador poco probable de transmitir la infección a otras ratas o a otras especies de animales, dada la escasa probabilidad de excreción de *M. bovis*²⁴.

El hallazgo de la infección en uno de los 2 zorros capturados es coincidente con otros trabajos del Reino Unido^{12,13,24} y EE. UU.^{5,6}, en los que también se obtuvo *M. bovis* de zorros. En estos casos, los aislamientos de *M. bovis* se obtuvieron siempre a partir de linfonodos como los faríngeos, mediastínicos, bronquiales y mesentéricos, los que en su mayoría carecían de lesiones visibles^{6,12,13,24}. El hábito de estos animales de ingerir carroña hace que la principal vía de ingreso de la infección sea la digestiva, al consumir los despojos de los animales que actúan como reservorios de TB y que están presentes en su medio ambiente^{6,13,24,28,39}.

La vía digestiva puede ser también una vía de excreción de *M. bovis* en los zorros infectados, aunque la mayoría no presente lesiones macroscópicas. A pesar de esta incertidumbre en el desarrollo de la enfermedad en la especie,

el riesgo de transmisión de la TB a los bovinos no parecería ser alto¹³. La baja cantidad de zorros obtenidos en el presente trabajo se debió a las dificultades que la captura de esta especie presenta en las provincia de Santa Fe, pues al no estar legalizada su caza es difícil contar con la ayuda de cazadores deportivos, lo cual hubiera permitido obtener mayor número de muestras y así determinar con mayor representatividad el peso de la infección en esta especie.

La tasa de aislamientos obtenidos en comadreas overas a partir de ganglios de la cabeza (4/7) y de *pool* de órganos como bazo, hígado y riñón (1/7) indicaría que la digestiva podría ser la principal vía por la cual las comadreas adquieren la infección, lo que se corresponde con su capacidad de alimentarse de carroña. La localización en pulmón de *M. bovis* (2/7) orienta hacia otra de las vías probables de entrada de la bacteria a esta especie, en la que se requeriría un estrecho contacto entre la comadreja y el animal infectado excretor. La comadreja es un animal nocturno que merodea las instalaciones rurales en búsqueda de alimento, la interacción con bovinos puede darse en estos espacios o bien en la proximidad de su hábitat, que para el caso de los rodeos lecheros seleccionados fueron las estrechas arboledas y los pajonales ubicados contiguos a los alambrados perimetrales de las pasturas.

Otra posible explicación del aislamiento de *M. bovis* a partir del pulmón de esta especie puede estar en su comportamiento. Estos animales son principalmente solitarios y de carácter agresivo entre congéneres, esta conducta es bien pronunciada entre machos. Durante la época de apareamiento, las hembras suelen ser agresivas con los machos pero estos no responden a la agresión¹⁹. Es probable que durante estos contactos ocurra la eliminación de aerosoles por parte de individuos infectados; de esta manera, la infección se trasladaría de un animal a otro. En el presente trabajo las infecciones se detectaron mayoritariamente en machos, pero esto no tuvo peso estadístico ($p=0,418$).

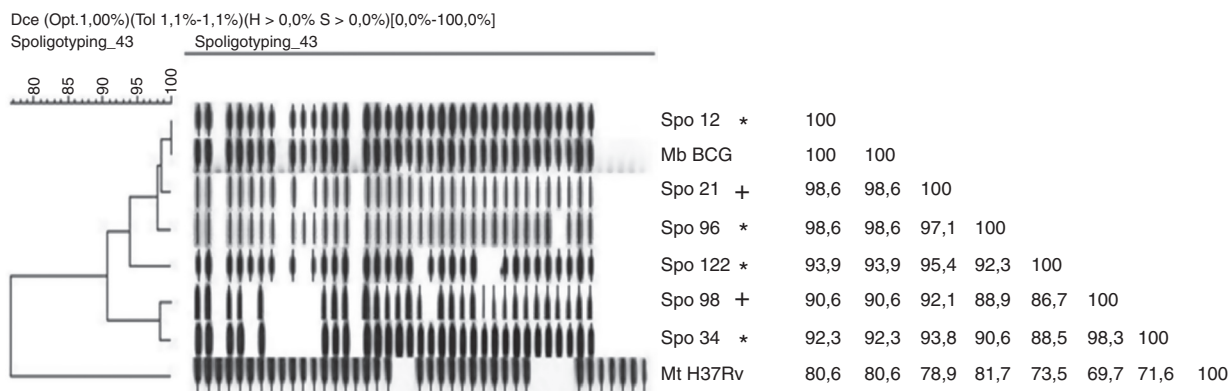


Figura 2 Dendrograma y matriz de similitud entre espoligotipos de *M. bovis* aislados de animales silvestres y de bovinos de la cuenca lechera de Santa Fe y las cepas de referencia *M. bovis* BCG y *M. tuberculosis* H37Rv.

*: aislamientos obtenidos en fauna silvestre; +: aislamientos obtenidos en bovinos

Esta ruta de los aerosoles se mostró eficaz en infecciones experimentales en comadrejas de América del Norte (*D. virginiana*) y llevó al desarrollo de lesiones, particularmente en pulmones¹⁶.

Esta susceptibilidad a *M. bovis* de comadrejas, muy semejante a la observada en comadrejas de América del Sur, fue comprobada también por otras vías, como la digestiva y la intramuscular¹⁶. La eliminación de *M. bovis* fue evaluada en materia fecal y se comprobó que muy pocos animales eliminaban la bacteria por esta vía, independientemente de la ruta y la dosis utilizadas para establecer la infección^{15,16}.

El hecho de que no se observaron lesiones visibles, a pesar de los aislamientos logrados en varios individuos de comadrejas, hace suponer una lenta evolución de la enfermedad cuando la infección ocurre naturalmente en esta especie, sin afectar la condición corporal de los individuos. En forma similar, ni la condición corporal ni tampoco el comportamiento parecieron estar afectados en las comadrejas originarias de América del Norte que desarrollaron lesiones en las inoculaciones experimentales, aunque estos animales no sobrepasaron los 90 días postinoculación, ya que fueron sacrificados¹⁶.

Debido a la semejanza entre ambas comadrejas (*D. virginiana* y *D. albiventris*), que pertenecen al mismo género junto con otras especies más del continente americano³⁸, es de esperar una susceptibilidad similar de la comadreja sudamericana *D. albiventris* a *M. bovis*. En el estado de Michigan (EE. UU.) se considera a *D. virginiana* como un probable hospedador circunstancial o «*spillover host*» de *M. bovis*; esto significa que si bien puede ser un potencial reservorio, no tendría un papel importante en la transmisión del organismo a los ciervos y bovinos^{15,16}. Estos antecedentes también permitirían formular la hipótesis de que la especie *D. albiventris* podría ser otro hospedador circunstancial o «*spillover host*» de *M. bovis*.

Los spo encontrados en los 2 aislamientos obtenidos de bovinos (21 y 98) no se correspondieron con los spo de los aislados de animales silvestres. Esto tal vez se deba a las pocas oportunidades que se tuvo de realizar necropsias en los bovinos y de obtener material para cultivo. El uso de hisopados nasales como método para obtener aislamientos de *M. bovis* a partir de bovinos vivos y positivos a la PT no

se mostró competente para tal fin, por lo menos en este trabajo. Ambos spo han sido previamente detectados en aislamientos de bovinos en Argentina, el spo 21 es el segundo en frecuencia a nivel nacional⁴⁰.

Los patrones de spo 34 (4/9) y 12 (3/9) de *M. bovis* obtenidos de 6 ejemplares de comadrejas y de la rata también registran numerosas notificaciones de aislamiento en bovinos de Argentina, encabezando este *ranking* el spo 34, que agrupa al 45 % de aislamientos^{7,40,41}. En la provincia de Santa Fe, estos ocupan el primer y el tercer lugar en frecuencia de aislamiento en bovinos (Zumárraga, comunicación personal). El spo 96 obtenido del zorro es el segundo aislamiento de este tipo registrado en el país, ya que el primero se obtuvo de un puma en cautiverio (Traversa, comunicación personal). Por otra parte, este se diferencia del spo 12 por la ausencia de un solo espaciador (el n.º 35), ambos patrones están relacionados en un 98,6 % (fig. 2). Esto sería un posible indicador de que el spo 12 habría sido el precursor del spo 96, originado mediante la pérdida del espaciador 35. Cabe destacar que según la teoría evolutiva de las micobacterias del complejo *M. tuberculosis* propuesta por Brosch *et al.*⁴, aquella habría sido unidireccional en el sentido de pérdida de material genético en forma progresiva. En el mismo marco evolutivo, el spo 98 habría derivado del spo 34 por la pérdida del espaciador 23 (fig. 2).

El spo 122 obtenido de una comadreja representa un patrón único y exclusivo, tanto de hospedador como de país (Argentina); este no se ha detectado en ninguna otra especie ni país, y no está registrado en la base de datos internacional (www.mbovis.org). Este spo se diferencia del spo 21 por la ausencia de los espaciadores 22, 28 y 29 (fig. 2).

Esta correlación entre los spo circulantes en los bovinos de Argentina y los obtenidos en los animales silvestres objeto de captura indica el pasaje de la infección de los primeros a las especies silvestres en una de las zonas lecheras más importantes de la Argentina.

Se concluye que las especies autóctonas de comadreja overa, zorro gris y rata son susceptibles de adquirir la infección de *M. bovis* cuando comparten hábitat con bovinos con alto nivel de infección. La presencia de spo de *M. bovis* en fauna silvestre detectados previamente en bovinos demuestra la transmisión desde el bovino hacia los otros hospedadores.

Debido al aislamiento de *M. bovis* de comadreja overa puede considerarse a esta especie como un probable hospedador circunstancial o «*spillover host*» de este importante patógeno. Sin embargo, la importancia que la infección en esta especie silvestre puede tener sobre los programas de control y erradicación de la TBb vigentes en esta región de Argentina se conocerá cuando los niveles de infección de los rodeos bovinos decrezcan notoriamente.

Responsabilidades éticas

Protección de personas y animales. Los autores declaran que los procedimientos seguidos se conformaron a las normas éticas del comité de experimentación humana responsable y de acuerdo con la Asociación Médica Mundial y la Declaración de Helsinki.

Confidencialidad de los datos. Los autores declaran que en este artículo no aparecen datos de pacientes.

Derecho a la privacidad y consentimiento informado. Los autores declaran que en este artículo no aparecen datos de pacientes.

Financiación

Proyecto Específico AESA - 202831 «Tuberculosis» Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria, Argentina.

Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

Agradecimientos

A Roxana Galarza, Miguel Marin, Oscar Warnke, Santiago Nava, Mario Argañaraz y Ariel Risso, por su valiosa colaboración en las tareas de campo. A Marcelo Signorini, por su colaboración en el análisis estadístico. A los compañeros del Área de Recursos Naturales y Suelos de la EEA INTA Rafaela. A los colegas veterinarios Adalberto Racca, Juan M. Ferglio, Elvio Ballari, Julio Rho y Rubén Morra, por su estimada ayuda en la selección de los rodeos, y a los productores y su personal, que colaboraron y permitieron los muestreos en sus campos.

Bibliografía

- Abdala AA, Tarabla HD, Bertero S, Torres P. Vigilancia epidemiológica de la tuberculosis bovina en el Depto. Castellanos, Santa Fe. *Rev Med Vet.* 1999;80:357-60.
- Abdala AA, Tarabla HD, Bertero S. Estimación de la prevalencia de tuberculosis bovina en rodeos lecheros del departamento Las Colonias, Santa Fe. *Revista FAVE-Ciencias Veterinarias.* 2002;1:13-20.
- Bernardelli A, Zumárraga M, Alonso B, Cataldi A, Sanguinetti R. Tuberculosis en fauna salvaje [CD-ROM]. XIX Congreso Panamericano de Ciencias Veterinarias, resumen 409, word00633. Buenos Aires, Argentina. 2004.
- Brosch R, Gordon SV, Marmiesse M, Brodin P, Buchrieser C, Eiglmeier K, Garnier T, Gutierrez C, Hewinson G, Kremer K, Parsons LM, Pym AS, Samper S, van Soolingen D, Cole ST. A new evolutionary scenario for the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *PNAS.* 2002;99:3684-9.
- Bruning-Fann CS, Schmitt SM, Fitzgerald SD, Payeur JB, Whipple DL, Cooley TM, Carlson T, Friedrich P. *Mycobacterium bovis* in coyotes from Michigan. *J Wildl Dis.* 1998;34:632-6.
- Bruning-Fann CS, Schmitt SM, Fitzgerald SD, Fierke JS, Friedrich PD, Kaneene JB, Clarke KA, Butler KL, Payeur JB, Whipple DL, Cooley TM, Miller JM, Muzo DP. Bovine tuberculosis in free-ranging carnivores from Michigan. *J Wildl Dis.* 2001;37:58-64.
- Cataldi AA, Gioffré A, Santángelo MP, Alito A, Caimi K, Bigi F, Romano MI, 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? *Rev Argent Microbiol.* 2002;34:1-6.
- Comité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales de experimentación del Centro de Investigación en Ciencias Veterinarias y Agronómicas del INTA (CICUAE INTA-CICVyA) [On line] [consultado Jul 2007]. Disponible en: <http://inta.gob.ar/documentos/cicuae-comite-institucional-para-el-cuidado-y-uso-de-animales-de-experimentacion>.
- Clifton-Hadley RS, Wilesmith JW, Stuar FA. *Mycobacterium bovis* in the European badger (*Meles meles*): Epidemiological findings in tuberculous badger from a naturally infected populations. *Epidemiol Infect.* 1993;111:9-19.
- Clifton-Hadley RS, Wilesmith JW, Richards MS, Upon P, Johnston S. The occurrence of *Mycobacterium bovis* infection in cattle in and around an area subset to extensive badger (*Meles meles*) control. *Epidemiol Infect.* 1995;114:179-93.
- Defra. Bovine TB. The scientific evidence. Final report of the independent scientific report on cattle TB 2007. [On line] [consultado Ene 2011]. Disponible en: <http://www.defra.gov.uk/foodfarm/farmanimal/disease/atoz/tb/isgreport/final.report.pdf>.
- Delahay RJ, de Leeuw ANS, Barlow AM, Clifton-Hadley RS, Cheeseman CL. The status of *Mycobacterium bovis* infection in UK Wild mammals: A review. *Vet J.* 2002;164:90-105.
- Delahay RJ, Smith GC, Barlow AM, Walker N, Harris A, Clifton-Hadley RS, Cheeseman CL. Bovine tuberculosis infection in wild mammals in the South-West region of England: A survey prevalence and semi-quantitative assessment of the relative risks to cattle. *Vet J.* 2007;173:287-301.
- De Lisle GW, Mackintosh CG, Bengis RG. *Mycobacterium bovis* in free-living and captive wildlife, including farmed deer. *Rev Sci Tech.* 2001;20:86-111.
- Diegel KL, Fitzgerald SD, Berry DE, Church SV, Reed WM, Sikarskie JG, Kaneene JB. Experimental inoculation of North American opossums (*Didelphis virginiana*) with *Mycobacterium bovis*. *J Wildl Dis.* 2002;38:275-81.
- Fitzgerald SD, Zwick LS, Diegel KL, Berry DE, Church SV, Sikarskie JG, Kaneene JB, Reed WM. Experimental aerosol inoculation of *Mycobacterium bovis* in North American opossums (*Didelphis virginiana*). *J Wildl Dis.* 2003;39:418-23.
- Gallagher J, Clifton-Hadley RS. Tuberculosis in badger; a review of the disease and its significance for other animals. *Res Vet Sci.* 2000;69:203-17.
- Gavier-Widen D, Cooke M, Gallagher J, Chambers MA, Gortázar C. A review of infection of wildlife host with *Mycobacterium bovis* and the diagnostic difficulties of the no visible lesion presentation. *N Z Vet J.* 2009;57:122-31.
- Gordon C. *Didelphis albiventris* [On line]. Animal DiversityWeb [consultado 22 Sept 2011]. Disponible en: <http://animaldiversity.ummz.umich.edu/site/accounts/information/didelphis.albiventris.html>.
- Hermans PWM, van Soolingen D, Bik EM, De Hass PEW, Dale JW, van Embden JDA. Insertion element IS987 from *Mycobacterium bovis* BCG is located in a hot-spot integration region for insertion

- elements in *Mycobacterium tuberculosis* complex strain. *Infect Immun*. 1991;9:2695–705.
21. Jorge MC, Alito A, Bernardelli A, Canal A, Cataldi A, Cicuta M, Gentile F, Kistermann J, Magnano G, Martinez Vivot M, Orinai S, Paolicchi F, Pérez A, Rictacco V, Romano M, Scheneider M, Torres P, editores. Manual de diagnóstico de micobacterias de importancia en medicina veterinaria. 1.^a ed. Santa Fe: Asociación Argentina de Veterinarios de Diagnóstico, Imprenta Acosta Hnos: 2005. p. 132.
 22. Kamerbeek J, Schouls L, Koll A, Van Agterveld M, Van Soolingen D, Kuijper S, Bunschoten A, Molhuizen H, Shaw R Goyal M, Van Embdem J. Simultaneous detection and strain differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* for diagnosis and epidemiology. *J Clin Microbiol*. 1997;35:907–14.
 23. Kantor IN, de la Vega E, Bernardelli A. Infección por *Mycobacterium bovis* en liebres en Provincia de Buenos Aires. *Rev Med Vet*. 1984;65:268–70.
 24. Little TWA, Swan C, Thompson HV, Wilesmith JW. Bovine tuberculosis in domestic and wild mammals in an area of Dorset. III. The prevalence of tuberculosis in mammals other than badgers and cattle. *J Hyg (Lond)*. 1982;89:225–34.
 25. Lugton IW, Wobese G, Morris RS, Caley P. Epidemiology of *Mycobacterium bovis* infection in feral ferrets (*Mustela furo*) in new Zealand: I. Pathology and diagnosis. *N Z Vet J*. 1997;45:140–50.
 26. Mills JN, Chils JE, Zsiazek TG, Peters CJ. Methods for trapping and sampling small mammals for virologic testing. *CDC*. 1995:7–32. Atlanta.
 27. Morris RS, Pfeiffer DU, Jackson R. The epidemiology of *Mycobacterium bovis* infections. *Vet Microbiol*. 1994;40:153–77.
 28. O'Brien DJ, Schmitt SM, Fitzgerald SD, Berry DE, Hickling GJ. Managing the wildlife reservoir of *Mycobacterium bovis*: The Michigan, USA, experience. *Vet Microbiol*. 2006;112:313–23.
 29. O'Reilly LM, Daborn C. The epidemiology of *Mycobacterium bovis* infections in animals and man: A review. *Tuber Lung Dis*. 1995;76:1–46.
 30. Pérez AM, Ward MP, Torres P, Ritacco V. Use of spatial statistic and monitoring data to identify clustering of bovine tuberculosis in Argentina. *Prev Vet Med*. 2002;56:63–74.
 31. Quse V, Falzoni E, Fundación Temaikén. Patología en fauna silvestre. Manual y atlas. Buenos Aires: Ed. Vazquez Mazzini; 2008. p. 63-8.
 32. Renwick AR, White PCL, Bengis RG. Bovine tuberculosis in southern African wildlife: A multi-species host-pathogen system. *Epidemiol Infect*. 2006;135:529–40.
 33. Ryan TJ, Livingstone PG, Ramsey DS, de Lisle GW, Nugent G, Collins DM, Buddle BM. Advances in understanding disease epidemiology and implications for control and eradication of tuberculosis in livestock: The experience from New Zealand. *Vet Microbiol*. 2006;112:211–9.
 34. Schmitt SM, Fitzgerald SD, Cooley TM, Bruning-Fann CS, Sullivan L, Berry D, Carlson T, Minnis RB, Payeur JB, Sikarskie J. Bovine tuberculosis in free-ranging white-tailed deer from Michigan. *J Wildl Dis*. 1997;34:749–58.
 35. SENASA (Servicio Nacional de Sanidad y calidad Agroalimentaria). Plan Nacional de Control y Erradicación de la Tuberculosis Bovina. Resolución N.º 115/99. Mimeo. 1999;62.
 36. SENASA (Servicio Nacional de Sanidad y calidad Agroalimentaria). Plan Nacional de Control y Erradicación de la Tuberculosis Bovina en la República Argentina. Resolución N.º 128/2012. [On line] [consultado Dic 2012]. Disponible en: www.senasa.gov.ar/contenido.php?to=n&in=1526&io=20050.
 37. Serraino A, Marchetti G, Sanguinetti V, Rossi MV, Zanoni RG, Catozzi L, Bandera A, Dini W, Mignone W, Franzetti F, Gori A. Monitoring of transmission of tuberculosis between wild boars and cattle: Genotypical analysis of strains by molecular epidemiology techniques. *J Clin Microbiol*. 1999;37:2766–71.
 38. Wilson DE, Reeder DM. 2005. Mammal species of the world. A taxonomic and geographic reference. 3rd ed. Johns Hopkins University Press. [On line] [consultado Set 2011]. Disponible en: <http://www.press.jhu.edu>.
 39. Witmer G, Fine AE, Gionfriddo J, Pipas M, Shively K, Piccolo K, Burke P. Epizootiologic survey of *Mycobacterium bovis* in wildlife and farm environments in northern Michigan. *J Wildl Dis*. 2010;37:58–64.
 40. Zumárraga M, Martin C, Samper S, Alito A, Latini O, Bigi F, Roxo E, Cicuta ME, Errico F, Castro Ramos M, Cataldi A, van Soolingen D, Romano MI. Usefulness of spoligotyping in molecular epidemiology of *Mycobacterium bovis*-related infections in South America. *J Clin Microbiol*. 1999;37:296–303.
 41. Zumárraga MJ, Meikle V, Bernardelli A, Abdala A, Tarabla H, Romano MI, Cataldi A. Use of touch-down polymerase chain reaction to enhance the sensitivity of *Mycobacterium bovis* detection. *J Vet Diagn Invest*. 2005;17:232–8.