

# Diagnóstico bacteriológico de tuberculosis bovina en bovinos reactivos positivos a la prueba tuberculínica

GARBACCIO, S.G.<sup>1</sup>; DELGADO, F.O.<sup>1</sup>; ZUMARRAGA, M.J.<sup>2</sup>; RODRIGUEZ, L.R.<sup>3</sup>; HUERTAS, P.S.<sup>1</sup>; GARRO, C.J.<sup>1</sup>

## RESUMEN

*Mycobacterium bovis* es el agente causal de la tuberculosis bovina (TBB), enfermedad zoonótica que afecta la producción láctea y cárnica. En nuestro país, el diagnóstico se realiza a través de la prueba tuberculínica o intradermorreacción aplicándose en el pliegue anocaudal (PAC). Como complemento a la PAC se pueden llevar adelante estudios bacteriológicos a partir de diversas muestras biológicas como secreción nasal, leche y tejidos. A su vez, se puede observar el desarrollo de lesiones y su ubicación anatómica, además de coleccionar muestras para ser analizadas a través de bacteriología e histopatología. El objetivo de este estudio fue evaluar la presencia de *M. bovis* en muestras de secreciones nasales, leche y tejidos pertenecientes a bovinos PAC-positivos y caracterizar lesiones macro y microscópicas compatibles con la TBB. Fueron procesadas 744 muestras pertenecientes a 572 bovinos, provenientes de 24 rodeos lecheros de las provincias de Córdoba, Santa Fe y Buenos Aires. Todos ellos se encontraban, durante este estudio, en etapa de saneamiento presentando una baja prevalencia (entre 0,5 y 4%). Se aisló *M. bovis* en 12,4% (71/572) de los bovinos examinados. Dicho agente provino de muestras de tejidos 36,5% (38/104), seguido de leche 10,7% (23/214) y, por último, desecreciones nasales 3,9% (10/254). Por un lado, el estudio bacteriológico a partir de las muestras de leche y secreciones nasales presentó una limitada efectividad. Por otro lado, el análisis de tejidos resultó de mayor utilidad como diagnóstico complementario, permitiendo confirmar los casos sospechados de TBB.

**Palabras clave:** *Mycobacterium bovis*, bacteriología, tejidos, bovinos.

## ABSTRACT

*Mycobacterium bovis* is the causative agent of bovine tuberculosis (BTB), considered a zoonotic disease. In our country, the diagnosis is based on the application of the tuberculin skin test (TST). Conventional culture, from various biological samples, can complement the TST test results. Regarding this, it is possible to perform sampling and subsequent analysis of nasal discharge, milk and tissues. The latter allows the observation of macroscopic lesions, the anatomical location in addition to collect biological samples to be analyzed by bacteriology and histopathology. The aim of this study was to evaluate the presence of *M. bovis* in samples of nasal secretions, milk and tissues in cattle PAC-positive and characterize gross and microscopic lesions compatible with BTB. A total of 744 samples belonging to 572 cattle from dairy herds in the provinces of Córdoba, Santa Fe and Buenos Aires, were processed. All of them were, during this study, in stage of control of BTB showing a low prevalence (between 0.5 to 4%). About 12.4% (71/572) *M. bovis* isolations from cattle examined

<sup>1</sup>Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA), Instituto de Patobiología, Centro de Investigación en Ciencias Veterinarias y Agronómicas (CICVyA), Hurlingham. Buenos Aires, Argentina. Correo electrónico: garbaccio.sergio@inta.gob.ar

<sup>2</sup>Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA), Instituto de Biotecnología, Centro de Investigaciones en Ciencias Veterinarias y Agronómicas (CICVyA), Hurlingham. Buenos Aires, Argentina

<sup>3</sup>Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA), Instituto de Recursos Biológicos, Centro de Investigación de Recursos Naturales (CIRN), Hurlingham. Buenos Aires, Argentina.

was obtained. These isolations were from tissue samples 36.5% (38/104), followed by milk 10.7% (23/214) and nasal secretions 3.9% (10/254). Bacteriology from milk samples and nasal secretions were of limited effectiveness. On the other hand, tissue analysis was more useful as complementary diagnostic, allowing confirmation of suspected cases of BTB.

**Keywords:** *Mycobacterium bovis*, bacteriology, tissues, cattle.

## INTRODUCCIÓN

La tuberculosis bovina (TBB), cuyo agente etiológico es *Mycobacterium bovis*, es una enfermedad infecciosa de carácter zoonótico que ocasiona serios problemas productivos, económicos y en la salud pública (Grange *et al.*, 2001). Se considera que 500 millones de bovinos estarían infectados con *Mycobacterium bovis* en el mundo, ocasionando una pérdida económica estimada en USD 3 billones (Hewinson *et al.*, 2001). En este sentido, un estudio realizado en Irlanda (Boland *et al.*, 2010) adjudica un 10% de disminución en la producción anual de leche en bovinos positivos a la intradermorreacción a diferencia de aquellos no infectados.

El programa de control y erradicación de TBB en Argentina se basa en la identificación y eliminación de animales infectados mediante la aplicación intradérmica de la prueba anocaudal (PAC) (Secretaría de Agricultura, 2012). Además, se establece el monitoreo y la vigilancia epidemiológica en frigoríficos donde los animales son inspeccionados con el fin de hallar lesiones compatibles con TBB (LCT).

La PAC ocupa un lugar protagónico en el diagnóstico, es la prueba de referencia a nivel mundial, utilizada ampliamente como prueba tamiz para el diagnóstico *in vivo* de la enfermedad. De acuerdo a la normativa vigente (Secretaría de Agricultura, 2012), un establecimiento ganadero lechero debe demostrar la ausencia de reactores en todos los bovinos mayores de 3 meses, durante dos PAC consecutivas para ser certificado como "Establecimiento Libre de TBB".

Diversos estudios otorgan a la PAC distintos valores de efectividad, oscilando en un rango del 70% al 90% y del 75% al 99,8% para sensibilidad y especificidad respectivamente (Costello *et al.*, 1997; De Kantor *et al.*, 1984; Francis, 1978).

Estos valores se encuentran relacionados con la prevalencia de cada predio ya puede influir directamente en el valor predictivo del ensayo diagnóstico.

La posibilidad de un resultado falso positivo en un animal infectado puede deberse principalmente a reacciones inespecíficas ocasionadas por otras micobacterias patógenas (*M. avium*, *M. avium* subsp. *paratuberculosis*) y ambientales (De la Rúa-Domenech *et al.*, 2002).

La observación de LCT puede resultar un buen complemento diagnóstico, mientras que la utilización de métodos diagnósticos tales como bacteriología e histopatología permite generar información adicional a la PAC con el fin de comprender de manera detallada la situación sanitaria de animales sospechados de TBB. En este sentido diversos estudios demostraron el uso diagnóstico de la bacteriología a partir de secreciones nasales (De Souza Figueiredo *et al.*,

2010; Neill *et al.*, 1998), de leche (Pérez *et al.*; 2002; Zarden *et al.*, 2013) y de tejidos (Liébana *et al.*, 1995; Whipple *et al.*, 1996), por lo que se la consideró como técnica de referencia en el diagnóstico confirmatorio de TBB.

El objetivo de este trabajo fue aislar e identificar *M. bovis* a partir de secreción nasal, de leche y de tejidos provenientes de bovinos positivos a la PAC, describiendo además la presentación de lesiones compatibles con TBB.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Se realizó un estudio observacional transversal entre enero de 2005 y enero de 2012. Se seleccionaron 572 bovinos de raza Holando-Argentino provenientes de 24 rodeos lecheros de las provincias de Córdoba, Santa Fe y Buenos Aires. Dichos rodeos, presentaron una prevalencia aparente que osciló entre 0,5 y 4%; encontrándose en etapa de saneamiento durante este trabajo. Todos los bovinos incorporados a este estudio resultaron positivos a la PAC, llevada a cabo según la normativa vigente (Secretaría de Agricultura 1999 y 2012). Las muestras biológicas recolectadas fueron las siguientes:

### Ante mortem

#### Secreción nasal

Se recolectaron muestras de secreción nasal utilizando hisopos estériles, previa sujeción del animal en cepo. Se obtuvieron dos muestras por animal introduciendo el hisopo en cada ollar al menos 3 veces con movimientos ascendentes y descendentes. Las muestras fueron conservadas a 4 °C y luego decontaminadas utilizando el método de Petroff (Jorge *et al.*, 2005). Posteriormente fueron sembradas por duplicado en los medios Stonebrink y Löwenstein Jensen e incubadas a 37 °C durante dos meses. Los desarrollos micobacterianos obtenidos fueron observados en microscopio (baciloscopía), previa tinción de Ziehl Neelsen (ZN) a fin de evidenciar la presencia de bacilos ácido alcohol resistentes (BAAR).

#### Leche

Se higienizó y desinfectó la glándula mamaria según los procedimientos previstos en la rutina de ordeño descrito en la "Guía de Buenas Prácticas en explotaciones lecheras" (FAO, 2012). Tras la eliminación de las primeras secreciones de cada cuarto mamario, se recolectaron por duplicado muestras conformadas por los cuatro cuartos mamaros de cada animal (50 ml cada uno). Las muestras fueron refrige-

radas a 4 °C y luego procesadas con la misma metodología descripta para la muestra de secreción nasal.

## Post mortem

### Tejidos

Los bovinos positivos a la PAC fueron sometidos a necropsia o inspección detallada en frigorífico, observando y describiendo presencia de lesiones compatibles con TBB. Posteriormente se recolectaron muestras por duplicado, tuvieran o no LCT. Una de ellas fue conservada a 4 °C y la otra fijada en solución tamponada de formaldehído al 10% para la realización de estudios bacteriológico e histopatológico respectivamente.

### Bacteriología

Las muestras recolectadas fueron agrupadas en tres conjuntos denominándolas de la siguiente manera: cabeza (CAB), conformado por ganglios linfáticos (GI) retrofaríngeos y submandibulares; respiratorio (RES): ganglios traqueobronquiales, mediastínicos y pulmón; y finalmente digestivo (DIG): GI mesentéricos, hepáticos e hígado. Los tejidos fueron refrigerados y luego homogeneizados mecánicamente durante 3 min. (Masticator Basic IUL Instruments modelo N.º 470) para luego continuar con la decontaminación (método de Petroff) y siembra de igual manera a lo descripto para las muestras anteriores. Aquellos bovinos que presentaron más de un aislamiento de BAAR en diferentes órganos fueron considerados como único resultado.

### Caracterización patológica

Se revisaron los órganos previamente descriptos considerando LCT a toda área de necrosis de color blanco-amarillento (focal o multifocal), con o sin mineralización, encapsulada o no por tejido conectivo (Neill *et al.*, 1988). Las muestras fijadas en solución de formaldehído al 10% fueron procesadas para estudio microscópico siguiendo procedimientos de rutina, hasta obtener secciones de 3 µm de espesor, las cuales se colorearon con hematoxilina y eosina. Se consideró compatible con la infección por *M. bovis* a todo aquel acúmulo de macrófagos epitelioides acompañado de linfocitos pudiendo o no presentar un centro de necrosis y mineralización, células gigantes de tipo Langhans, y tejido conectivo limitando la lesión. En aquellos órganos con LCT se realizó la coloración de ZN sobre cortes de tejido a fin de identificar BAAR.

### Identificación de micobacterias

Los crecimientos obtenidos en los medios de cultivos en los cuales se detectaron BAAR fueron identificados a través de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), utilizando como blanco la secuencia de inserción (IS) 6110 (propia del complejo *Mycobacterium tuberculosis*) (Hermans *et al.*, 1990). Los aislamientos positivos fueron genotipificados

por Spoligotyping, según lo descripto por Kamerbeek *et al.* (1997). Fueron considerados aislamientos positivos al Complejo *Mycobacterium tuberculosis* aquellos PCR (IS) 6110 positivos, mientras que fueron considerados *M. bovis*, los positivos a PCR (IS) 6110 seguidos de Spoligotyping. Los aislamientos negativos a PCR fueron analizados por PCR-hsp65 con el objetivo de identificar especies comprendidas dentro del género *Mycobacterium*, de acuerdo a lo descripto por Telenti *et al.* (1993).

La extracción de ADN a partir de colonias desarrolladas en los medios de cultivo se realizó por lisis térmica colocando estas en 250 µL de agua bidestilada estéril e incubándolas a 95 °C durante 45 min.

Las condiciones de amplificación para ambos casos se realizaron de acuerdo a lo descripto por Zumárraga *et al.* (2005).

## RESULTADOS

Los resultados obtenidos se resumen en la tabla 1. A continuación se describen los hallazgos obtenidos a partir de cada muestra biológica analizada.

### Aislamientos en secreción nasal

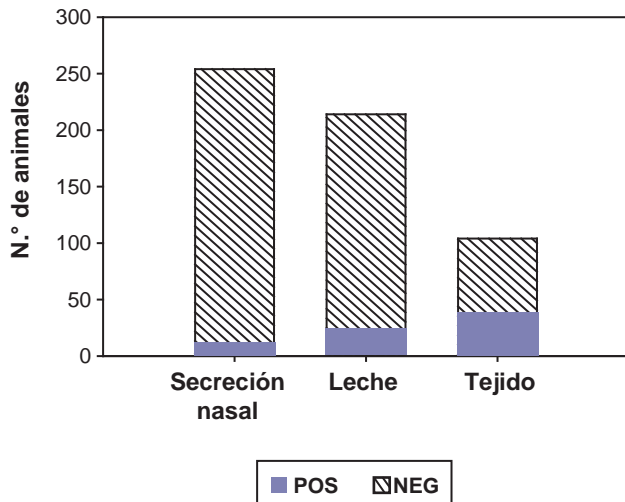
Se analizaron 254 muestras correspondientes a bovinos seleccionados, desarrollando BAAR en el 11,4% (29/254) de estos. De estos aislamientos 3,9% (10/29) fueron identificados como *M. bovis* mediante Spoligotyping. Los 19 aislamientos restantes fueron positivos a PCR-hsp65, considerándolos por tanto como *Mycobacterium spp.*

### Aislamiento en leche

Se analizaron 214 muestras correspondientes a bovinos seleccionados, obteniéndose aislamiento en 17% (37/214) de las muestras. De ellos, el 62% (23/37) fueron identificados como *M. bovis*. El 38% (14/37) restante correspondieron a especies del género *Mycobacterium spp.* tras haber resultado positivo a PCR-hsp65.

Muestreo	Tipo de muestra	N.º de animales analizados	Aislamientos <i>M. bovis</i> (%)
Ante mortem	Secreción nasal	254	10 (3,9)
	Leche	214	23 (10,7)
Post mortem	Tejidos	104	38 (36,5)
Total		572	71

**Tabla 1.** Resumen de los aislamientos obtenidos a partir de las distintas muestras analizadas.



**Figura 1.** Números de aislamientos de *M. bovis* obtenidos según el tipo de muestra analizada.

### Aislamientos en tejidos

#### Bacteriología

Fueron analizadas 276 muestras provenientes de necropsias o frigoríficos, de 104 bovinos PAC positivos. Se obtuvo un 36,5% (38/104) de aislamientos pertenecientes al complejo *Mycobacterium tuberculosis*, tal como se muestra en la figura 1. En el 76% (29/38) de estos fue confirmado la presencia de *M. bovis*, no pudiéndose realizar en el 24% (9/38) restantes. El 42% (16/38) de estos aislamientos fueron obtenidos a partir de muestras de RES el 21% (8/38) en muestras de CAB y el 18,5% (7/38) de DIG respectivamente. Se obtuvieron 18,5% (7/38) aislamientos en dos tejidos diferentes pertenecientes al mismo animal: 4 de ellos fueron en CAB y RES; 2 en CAB y DIG y el restante en RES y DIG. En ningún bovino se logró obtener aislamiento a partir de los tres grupos de tejidos muestreados.

De los aislamientos pertenecientes al complejo *Mycobacterium tuberculosis*, el 79% (30/38) provino de bovinos con LCT mientras que un 8% (3/38) correspondieron a aislamientos obtenidos de bovinos que no presentaron LCT. El 13% (5/38) restante no fue inspeccionado *post mortem*.

#### Descripción de los hallazgos patológicos

Fueron inspeccionados el 84% (87/104) de los bovinos en estudio, encontrándose en el 56% (49/87) LCT. En el 61% (30/49) se aisló *M. bovis*.

De aquellos animales con LCT se observó en el 78% (38/49) la presencia de una sola lesión, mientras que el 16% (8/49) presentó 2 lesiones y en el 6% (3/49) de los casos hubo 3 o más lesiones.

La histopatología se realizó sobre 43 bovinos seleccionados, de los cuales el 56% (24/43) presentó LCT. Por una

parte, en 9% (4/43) de ellos no se habían encontrado lesiones macroscópicas durante la inspección. Por otra parte, en el 87,5% (21/24) de los animales con lesiones microscópicas se aisló *M. bovis*.

### DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos a partir de secreción nasal sugieren que el aislamiento del agente en dicha muestra es de baja sensibilidad para detectar *M. bovis* en bovinos positivos a la PAC. En este trabajo se obtuvieron valores inferiores a los hallados en otros estudios, en los cuales las proporciones de aislamientos de *M. bovis* en bovinos naturalmente infectados fueron superiores a la aquí descrita (3,9%), variando entre 6,7% y 20% de los bovinos estudiados respectivamente (Neil *et al.*, 1988; Rempt, 1954). Estas diferencias podrían adjudicarse a factores tales como la eliminación intermitente de micobacterias (De Souza Fregueiredo *et al.*, 2010), la presencia de micobacterias no viables en el material colectado, o que la metodología de descontaminación utilizada afecte la sobrevivencia de las micobacterias (Cousins *et al.*, 1992; Stewart *et al.*, 2013). Otro factor para considerar es la posible presencia de bovinos falso positivos a la PAC dentro del grupo en estudio, sumado a que no todos pudieron ser inspeccionados *post mortem*. Debe considerarse además el límite de detección propio del ensayo bacteriológico para el cual se requieren valores superiores a 10 o 100 microorganismos viables para lograr un resultado positivo. Esta cantidad de microorganismos se asocia generalmente a una etapa avanzada de la enfermedad por lo que en ciertos estadios de esta no serían detectables (Barry *et al.*, 1993; Bates *et al.*, 1986). En este sentido, fue descrito a partir de infecciones experimentales un incremento en los niveles de eliminación por esta vía durante las primeras 4 semanas posinfección, decreciendo posteriormente (Kao *et al.*, 2007). Así mismo fue descrito que durante la infección pueden suceder períodos prolongados en los cuales no se logra aislar el microorganismo a partir de secreción nasal (Kao *et al.*, 2007; McCorry *et al.*, 2005; Neill *et al.*, 1998).

En el caso de las muestras de leche, los aislamientos obtenidos en este trabajo (10,7%) han sido superiores a resultados previamente descritos por Pérez *et al.* (2002); quienes detectaron *M. bovis* en el 0,7% de las muestras de bovinos PAC positivos, utilizando metodología similar. Por su parte, Romero *et al.* (1999) no obtuvieron aislamientos tras analizar 200 muestras de leche provenientes de bovinos PAC positivos. Estas diferencias podrían relacionarse con aspectos similares a aquellos anteriormente mencionados para secreción nasal.

Desde el punto de vista de la salud pública estos hallazgos refuerzan la necesidad de asegurar el tratamiento térmico de la leche destinada a consumo (pasteurización). Asimismo, desde el aspecto sanitario-productivo, debe considerarse que aquellos bovinos eliminadores por esta vía pueden facilitar la transmisión de la enfermedad a sus crías o a un grupo de terneros que bajo sistemas de crianza artificial son alimentados con leche cruda (Evangelista *et al.*, 1996; Garro *et al.*, 2011; Garro *et al.*, 2011).

La proporción de aislamientos obtenida en tejidos (36,5%) fue inferior a aquella descrita en Brasil (51,5%) (Cardoso *et al.*, 2009) y en Gran Bretaña (50%) (Liébana *et al.*, 1995), pero mayor a lo reportado en Etiopía (11%) (Berg *et al.*, 2009). Esta diferencia podría relacionarse con algunas de las variables previamente mencionadas, tales como el tipo y cantidad de muestras recolectadas por animal en estudio, la metodología de descontaminación aplicada en cada caso, como así también el bajo número de micobacterias viables que puede presentarse en un tejido con LCT (Araujo *et al.*, 2005; Miller *et al.*, 2002). Cabe remarcar además que los bovinos analizados provinieron de establecimientos en saneamiento y con baja prevalencia. Si bien la PAC es considerada una técnica específica, su valor predictivo positivo disminuiría, incrementando por ende la probabilidad de que algunos de los animales incluidos en este estudio hayan sido falsos positivos. Este aspecto pudo afectar directamente la eficiencia en el aislamiento de *M. bovis* a partir de las distintas muestras analizadas (secreción nasal, leche y tejidos).

La observación de presencia o ausencia de lesiones macroscópicas es útil para el diagnóstico en frigoríficos o durante la necropsia. De acuerdo a los resultados obtenidos, resulta mayor la probabilidad de hallar LCT al realizar una meticulosa revisión *post mortem*. En frigoríficos comerciales el tiempo destinado para la inspección y toma de muestras es limitado y tal vez la presencia de una sola lesión no llegue a evidenciarse. La proporción de aislamiento de *M. bovis* a partir de LCT fue del 61%. En este sentido, en un ensayo realizado entre 4 laboratorios de Argentina para establecer el porcentaje de recuperación por cultivo de *M. bovis* a partir de muestras de tejidos con LCT se obtuvieron valores similares a los presentados en este trabajo (Garbaccio *et al.*, 2016).

Los aislamientos obtenidos a partir de muestras de tejidos (36,5%) fueron superiores a aquellos logrados en muestras de secreción nasal (3,9%) y de leche (10,7%). Dicha diferencia puede atribuirse a que el microorganismo en el hospedador establece una forma de vida intracelular, siendo esta la forma en la que se encuentran en los tejidos blancos. Por ello, este tipo de muestra cobra mayor relevancia al momento de pretender un aislamiento de *M. bovis*.

En concordancia con lo descrito por Whipple *et al.* (1996), la mayoría de los aislamientos fueron obtenidos de órganos respiratorios (42%), seguidos por las muestras pertenecientes a CAB (21%), resultando los aislamientos de DIG los menos frecuentes (18,5%). Estos resultados indican que al igual que lo descrito en otros trabajos, la vía de transmisión más importante en bovinos adultos es la respiratoria (Goodchild *et al.*, 2001; Morris *et al.*, 1994; O'Reilly *et al.*, 1995; Pritchard, 1988).

A diferencia de lo ocurrido con las muestras de secreción nasal y de leche, no se obtuvieron aislamientos de *Mycobacterium spp.* en muestras de tejidos. Estos hallazgos se podrían relacionar con que micobacterias consideradas atípicas pueden encontrarse normalmente en el medioambiente (Oriani *et al.*, 2002), posibilitando su presencia en

vías aéreas y glándula mamaria, y por ende en la muestra de secreciones nasales y de leche respectivamente.

Por una parte, con respecto a los hallazgos de LCT, la mayoría de los bovinos (78%) presentaron una sola lesión; valor superior al 66% descrito por Corner (1994) y Corner *et al.* (2012). Esta información indicaría la necesidad de realizar una inspección minuciosa de los tejidos durante la faena o la necropsia para evitar la posible liberación a consumo de material contaminado.

Por otra parte, el 8% de los aislamientos obtenidos de tejidos provino de bovinos que no presentaron LCT durante la inspección *post mortem*. En este sentido, Whipple *et al.* (1996) describieron una proporción aún mayor (10%) de aislamientos logrados a partir de tejidos que no presentaron LCT. Resultados similares se obtuvieron tras el estudio histopatológico ya que 9,3% de los casos considerados positivos a este ensayo, no habían presentado lesiones visibles macroscópicamente.

De acuerdo a lo descrito en distintos trabajos (Garbaccio *et al.*, 2010; Parra *et al.*, 2008), la incorporación de PCR directa de tejido resultaría complementaria a la metodología aquí realizada (inspección de lesiones, bacteriología e histopatología); mejorando la sensibilidad como así también disminuyendo el tiempo de laboreo requerido para la bacteriología (2 días versus 60 días).

Los resultados presentados en este trabajo indican la importancia del diagnóstico bacteriológico a partir de las distintas muestras analizadas. El aislamiento de *M. bovis* a partir de leche y secreción nasal tendrían limitada utilidad diagnóstica, aunque son muestras de fácil obtención, a partir del animal en pie. Por el contrario, el análisis bacteriológico de tejidos sería de mayor relevancia diagnóstica tal como fue descrito por Mantilla *et al.* (2009). Su utilización permitiría comprender eventos sanitarios que requieran de un análisis detallado, como sería el caso de un predio libre de TBB donde se presentan nuevos reactores a la PAC o aquellos con un bajo número de reactores, sospechados de posibles resultados falsos positivos a la PAC. De esta manera, el cultivo seguido de la tipificación molecular permite avanzar en la resolución de situaciones específicas, brindando además información complementaria acerca de las cepas circulantes en un predio o región y su potencial uso desde el punto de vista epidemiológico.

La implementación efectiva de las distintas técnicas diagnósticas disponibles debería ser tenida en cuenta para su uso estratégico en función de los programas provinciales o nacionales de control y erradicación de la tuberculosis bovina.

## BIBLIOGRAFÍA

- ARAÚJO, C.P.; LEITE, C.Q.; PRINCE, K.A.; DOS SANTOS GONÇALVES JORGE, K.; ALVES ROSA OSORIO, A.L. 2005. *Mycobacterium bovis* identification by a molecular method from post-mortem inspected cattle obtained in abattoirs of Mato Grosso do Sul, Brazil. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. Vol. 100, N.º 7, 749–752.
- BARRY, T.; GLENON, M.; SMITH, T.; GANNON, F. 1993. Detection of *Mycobacterium bovis* in bovine blood by combined PCR and DNA probe methods. Vet. Rec. 132: 66–67.

- BATES, J.; BRENNAN, P.; DOUGLAS, W.G.; FEELY, J.C. 1986. Improvements in the diagnosis of tuberculosis. *Am Rev Resp Dis*. 134: 415–417.
- BERG, S.; FIRDESSA, R.; HABTAMU, M.; GADISA, E.; MENGISTU, A.; YAMUAH, L.; AMENI, G.; VORDERMEIER, M.; ROBERTSON, B.D.; SMITH, N.H.; ENGERS, H.; YOUNG, D.; HEWINSON, G.R.; ASEFFA, A.; GORDON, S.V. 2009. The Burden of Mycobacterial Disease in Ethiopian Cattle: Implications for Public Health. *PLoS One*. 4(4): e5068.
- BOLAND, F.; KELLY, G.E.; GOOD, M.; MORE, S.J. 2010. Bovine tuberculosis and milk production in infected dairy herds in Ireland. *Preventive Veterinary Medicine*. 93,153–161.
- CARDOSO, M.A.; CARDOSO, R.F.; HIRATA, R.D.C.; HIRATA, M.H.; LEITE, C.Q.F.; SANTOS, A.C.B.; SIQUEIRA, V.L.D.; OKANO, W.; ROCHA, N.S.; LONARDONI, M.V.C. 2009. Direct Detection of *Mycobacterium bovis* in Bovine Lymph Nodes by PCR. *Zoonoses and Public Health*, 56, 465–470.
- CORNER, L.A. 1994. Post mortem diagnosis of *Mycobacterium bovis* infection in cattle. *Vet. Microbiol.*, 156(1-2):162–71.
- CORNER, L.A.; GORMLEY, E.; PFEIFFER, D.U. 2012. Primary isolation of *Mycobacterium bovis* from bovine tissues: conditions for maximising the number of positive cultures. *Vet. Microbiol*. 156(1-2):162–71.
- COSTELLO, E.; EGAN, J.W.; QUIGLEY, F.C.; O'REILLY, P.F. 1997. Performance of the single intradermal comparative tuberculin test in identifying cattle with tuberculous lesions in Irish herds. *Vet. Rec*, 141(9):89–95.
- COUSINS, D.V.; WILTON, S.D.; FRANCIS, B.R.; GOW, B.L. 1992. Use of polymerase chain reaction for rapid diagnosis of tuberculosis. *J Clin Microbiol*, 30(1):255–258.
- DE LA RUA-DOMENECH, R.; GOODCHILD, A.T.; VORDERMEIER, H.M.; HEWINSON, R.G.; CHRISTIANSEN, K.H.; CLIFTON-HADLEY, R.S. 2006. Ante mortem diagnosis of tuberculosis in cattle: a review of the tuberculin tests, gamma-interferon assay and other ancillary diagnostic techniques. *Res. Vet. Sci*. 81 (2), 190–210.
- DE KANTOR, J.N.; ODEÓN, A.C.; STEFFAN, P.E.; AUZA, M.J.; MADRID, C.R.; MARCHEVSKY, N. 1984. Sensitivity of the cervical and the caudal fold tuberculin tests with *M. bovis* in infected cattle of Argentina. *Rev. sci. tech. Off. Int. Epiz*. 3 (1), 137–142.
- DE SOUZA FIGUEIREDO, E.E.; CARVALHO, R.C.; SILVESTRE, F.G.; LILENBAUM, W.; FONSECA, L.S.; SILVA, J.T.; PASCHOALIN, V.M. 2010. Detection of *Mycobacterium bovis* DNA in nasal swabs from tuberculous cattle by a multiplex PCR. *Braz. J Microbiol*, 41(2):386–90.
- EVANGELISTA, T.B.R.; DE ANDA, J.H. 1996. Tuberculosis in dairy calves: risk of *Mycobacterium spp.* exposure associated with management of colostrum and milk. *Preventive Veterinary Medicine*, 27, 23–27.
- FAO PRODUCCIÓN Y SANIDAD ANIMAL. 2012. Guía de buenas prácticas en explotaciones lecheras. (Disponible: <http://www.fao.org/3/a-ba0027s.pdf> verificado 23 de septiembre de 2016).
- FRANCIS, J. 1978. The sensitivity and specificity of various tuberculin tests using bovine PPD and other tuberculins. *Vet Rec*. 103:420–425.
- GARBACCIO, S.G.; CATALDI, A.A. 2010. Evaluation of an immunomagnetic capture method followed by PCR to detect *Mycobacterium bovis* in tissue samples from cattle. *Rev Argent Microbiol*. 42(4):247–53.
- GARBACCIO, S.; BARANDIARAN, S.; FERNANDEZ, A.; MACIAS, A.; MAGNANO, G.; MARTINEZ VIVOT, M.; PEYRÚ, M.; CATALDI, A. 2016. Interlaboratory test: Isolation of *Mycobacterium bovis* from granulomatous lesions in bovine. *Rev. Argent Microbiol*. 48 (2):161–5.
- GARRO, C.; COBOS ROLDÁN, M.; ORIANI, S.; GARBACCIO, S. 2011. Tuberculosis en terneros: resultados de un estudio prospectivo. *Rev. elect. vet. Volumen 12, N.º 12, 1–11.*
- GARRO, C.; MORRIS, W.; DELGADO, F.; GARBACCIO, S. 2011. Tuberculosis bovina en terneros. *Veterinaria Argentina*. Vol. xxviii. N.º 276, 1–10.
- GRANGE, J.M. 2001. *Mycobacterium bovis* infection in human beings. *Tuberculosis*. 81(1/2): 71–77.
- GOODCHILD, A.V.; CLIFTON-HADLEY, R.S. 2001. Cattle-to-cattle transmission of *Mycobacterium bovis*. *Tuberculosis*. 81, 23–41.
- HERMANS, P.W.; VAN SOOLINGEN, D.; DALE, J.W.; SCHUIJTEMA, A.R.; MCADAM, R.A.; CATTY, D.; VAN EMBDEN, J.D. 1990. Insertion element IS986 from *Mycobacterium tuberculosis*: a useful tool for diagnosis and epidemiology of tuberculosis. *J. Clin. Microbiol*. Vol. 28 (9):2051–2058.
- HERWINSON, G. 2001. Introduction to *M. bovis* issue. *Tuberculosis*. 81(1-2): 3.
- JORGE, M.; ALITO, A.; BERNARDELLI, A.; CANAL, A.; CATALDI, A.; CICUTA, M.; GENTILE, F.; KISTERMAN, J.C.; MAGNANO, G.; MARTINEZ VIVOT, M.E.; ORIANI, D.S.; PAOLICCHI, F.; PEREZ, A.; ROMANO, M.I.; SCNEIDER, M.; TORRES, P.; ZUMARRAGA, M.J. 2005. Manual de diagnóstico de micobacterias de importancia en medicina veterinaria. Comisión Científica de Micobacterias, Asociación Argentina de Veterinarios de Laboratorio de Diagnóstico. 20–28.
- KAMERBEEK, J.; SCHOOLS, L.; KOLK, A.; VAN AGTERVELD, M.; VAN SOOLINGEN, D.; KUIJPER, S.; BUNSCHOTEN, A.; MOLHUIZEN, H.; SHAW, R.; GOYAL, M. VAN EMBDEN, J. 1997. Simultaneous detection and strain differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* for diagnosis and epidemiology. *J. Clin. Microbiol.*; 35:907–914.
- KAO, R.R.; GRAVENOR, M.B.; CHARLESTON, B.; HOPE, J.C.; MARTIN, M.; HOWARD, C.J. 2007. *Mycobacterium bovis* shedding patterns from experimentally infected calves and the effect of concurrent infection with bovine viral diarrhoea virus. *J. R. Soc. Interface*. 4, 545–551.
- LIÉBANA, E.; ARANAZ, A.; MATEOS, A.; VILAFRANCA, M.; GOMEZ-MAMPASO, E.; TERCERO, J.C.; ALEMANY, J.; SUAREZ, G.; DOMINGO, M.; DOMINGUEZ, L. 1995. Simple and Rapid Detection of *Mycobacterium tuberculosis Complex* Organisms in Bovine Tissues Sample by PCR. *J Clin Microbiol*. 35(1):33–36.
- MANTILLA, G.J.; ORTIZ, M.M.; ACOSTA, A.M.; ACOSTA, G.R.; SOUSA, Z.J. 2009. Diagnóstico de tuberculosis bovina por aislamiento bacteriológico o histopatológico de vacunos reactivos a la prueba de tuberculina. *MV Rev. de Cien. Vet*. Vol. 25 N.º 1, 7–9.
- MCCORRY, T.; WHELAN, A.O.; WELSH, M.D.; MCNAIR, J.; WALTON, E.; BRYSON, D.G.; HEWINSON, R.G.; VORDERMEIER, H.M.; POLLOCK, J.M. 2005. Shedding of *Mycobacterium bovis* in the nasal mucus of cattle infected experimentally with tuberculosis by the intranasal and intratracheal routes. *Vet. Rec*. 157, 613–618.
- MILLER, J.M.; JENNY, A.L.; PAYEUR, J.B. 2002. Polymerase chain reaction detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex and *Mycobacterium avium* organisms in formalin fixed tissues from culture negative ruminants. *Vet. Microbiol*. 87, 15–23.
- MORRIS, R.S.; PFEIFFER, D.U.; JACKSON, R. 1994. The epidemiology of *Mycobacterium bovis* infections. *Vet. Microbiol*. 40,153–177.

- NEILL, S.D.; HANNA, J.; O'BRIEN, J.J.; MCCRACKEN, R.M. 1998. Excretion of *Mycobacterium bovis* by experimentally infected cattle. *Vet. Rec.* 123, 340–343.
- NEILL, S.D.; O'BRIEN, J.J.; MCCRACKEN, R.M. 1988. *Mycobacterium bovis* in the anterior respiratory tracts in the heads of tuberculin-reacting cattle. *Vet. Rec.* 122: 184–186.
- O'REILLY, L.M.; DABORN, C.J. 1995. The epidemiology of *Mycobacterium bovis* infections in animals and man: A review. *Tubercle and Lung Disease.* 76, Supplement 1, 1–46.
- ORIANI, D.S.; SAGARDOY, M.A. 2002. Nontuberculous mycobacteria in soils of La Pampa province (Argentina). *Rev Argent Microbiol.*; 34 (3):132–7.
- PARRA, A.; GARCÍA, N.; GARCÍA, A.; LACOMBE, A.; MORENO, F.; FREIRE, F.; MORAN, J.; HERMOSO DE MENDOZA, J. 2008. Development of a molecular diagnostic test applied to experimental abattoir surveillance on bovine tuberculosis. *Vet. Microbiol.* Vol.18; 127(3-4): 315–24.
- PÉREZ, A.; RENIERO, A.; FORTEIS, A.; MEREGALLI, S.; LÓPEZ, B.; RITACCO, V. 2002. Study of *Mycobacterium bovis* in milk using bacteriological methods and the polymerase chain reaction. *Rev Argent Microbiol.* 34(1):45–51.
- PRITCHARD, D.G. 1988. A century of bovine tuberculosis 1888-1988: conquest and controversy. *Review. J Comp Pathol.* 99 (4): 357–99.
- REMPT, D. 1954. *Veterinary work in the Netherlands 1953.* Netherland Veterinary Service. 80.
- ROMERO, R.E.; GARZÓN, D.L.; MEJÍA, G.A.; MONROY, W.; PATARROYO, M.E.; MURILLO, L.A. 1996. Identification of *Mycobacterium bovis* in Bovine Clinical Samples by PCR Species-Specific Primers. *Can J Vet Res.*63: 101–106.
- SENASA/SAGPyA, 1999. Secretaría de Agricultura, Dirección de Sanidad Animal, Argentina, "Plan Nacional de Control y Erradicación de la Tuberculosis Bovina," Resolución N.º 115/99.
- SENASA/SAGPyA, 2012. Secretaría de Agricultura, Dirección de Sanidad Animal, Argentina, "Plan Nacional de Control y Erradicación de la Tuberculosis Bovina," Resolución N.º 128/2012.
- STEWART, L.D.; MCNAIR, J.; MCCALLAN, L.; GORDON, A.; GRANT, I.R. 2013. Improved detection of *Mycobacterium bovis* infection in bovine lymph node tissue using immunomagnetic separation (IMS)-based methods. *PLoS One.* 8(3):e58374.
- TELENTI, A.; MARCHESI, F.; BALTZ, M.; BALLY, F.; BOTTGER, E.C.; BODMER, T. 1993. Rapid identification of mycobacteria to the species level by polymerase chain reaction and restriction enzyme analysis. *J. Clin. Microbiol.* 31, 175–178.
- WHIPPLE, D.L.; BOLIN, C.A.; MILLER, J.M. 1996. Distribution of lesions in cattle infected with *Mycobacterium bovis*. *J. Vet. Diagn. Invest.* 8, 351–354.
- ZARDEN, C.F.; MARASSI, C.D.; FIGUEIREDO, E.E.; LILENBAUM, W. 2013. *Mycobacterium bovis* detection from milk of negative skin test cows. *Vet. Rec.*; 172 (5):130.
- ZUMÁRRAGA, M.J.; MEIKLE, V.; BERNARDELLI, A.; ABDALA, A.; TARABLA, H.; ROMANO, M.I.; CATALDI, A. 2005. Use of touch-down polymerase chain reaction to enhance the sensitivity of *Mycobacterium bovis* detection. *J. Vet. Diagn. Invest.* 17: 232–238.