

SECCIÓN ARTÍCULOS CIENTÍFICOS

Micobacterias no tuberculosas autóctonas de La Pampa (Argentina) y su capacidad de reacción cruzada en el diagnóstico de tuberculosis bovina.

Oriani, D.S.; Gastaldo, M.F.; Tortone, C. A.; Staskevich, A.S.; Ramirez P.; Valle, H. y Fernandez, E.  
Pp. 10-18

---

## **Micobacterias no tuberculosas autóctonas de La Pampa (Argentina) y su capacidad de reacción cruzada en el diagnóstico de tuberculosis bovina.**

Oriani, D.S.<sup>1</sup>; Gastaldo, M.F.<sup>1</sup>; Tortone, C. A.<sup>1</sup>; Staskevich, A.S.<sup>1</sup>; Ramirez P.<sup>1</sup>; Valle, H.<sup>2</sup> y Fernandez, E.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional de La Pampa, calle 5 esquina 116, General Pico (6360) La Pampa. ctortone@vet.unlpam.edu.ar

<sup>2</sup> SENASA.

### **RESUMEN**

Para el diagnóstico de la tuberculosis bovina se utiliza un método indirecto que detecta inmunidad celular mediante intradermorreacción del derivado proteico purificado de *Mycobacterium bovis* (PPD bovino). Uno de sus inconvenientes es la aparición de reactores falsos positivos debido a la posibilidad de que *M. bovis* y el resto de las especies del género compartan algunos determinantes antigénicos. En este trabajo se intenta demostrar si existe reacción cruzada con el PPD bovino o PPD aviar cuando se inocula micobacterias no tuberculosas (MNT) vía intramuscular (IM). Se seleccionaron 15 bovinos hembras de destete cruce británica no reaccionantes a las PPDs. Se distribuyeron aleatoriamente en tres grupos de 5 animales cada uno. El grupo BCG se inoculó con una suspensión de *M. bovis* BCG ajustado a 10<sup>4</sup> bact/mL. El grupo MNT se inoculó con 5 mL de una suspensión (15 mg/mL) de un pool de las siguientes cepas seleccionadas: *M. kansasii*, *M. nonchromogenicum*, *M. gordonae*, *M. arupense*, *M. phlei*, *M. fortuitum* y *M. peregrinum*, aisladas de suelos y humedales de la provincia de La Pampa. El grupo control con 5 mL de agua destilada estéril. A los 60 días posteriores a la inoculación se realizó la primera prueba de sensibilidad empleando en tabla del cuello la prueba Cervical Comparada. La misma práctica se realizó a los 135 días posteriores a la descarga de micobacterias. El grupo MNT mostró a los 60 días de inoculación solamente un animal con reacción positiva a la PPD aviar y a la PPB bovina, y un animal sospechoso a PPD bovina desapareciendo dichas reacciones a los 135 días. Estos resultados indican que puede haber reacción inespecífica entre las especies de MNT pero que las mismas no se mantienen en el tiempo.

Palabras clave: micobacterias ambientales, reacción cruzada, tuberculosis bovina, intradermorreacción.

## **Native non-tuberculous mycobacteria from La Pampa (Argentina) and their ability to cross-reaction in the bovine tuberculosis diagnosis.**

### **ABSTRACT**



To diagnose bovine tuberculosis, it is employed an indirect method that detects cellular immunity through the purified *Mycobacterium bovis* protein derivative intradermal reaction (bovine PPD). One of its inconveniences is the emergence of false positive reactors due to the possibility of *M. bovis* and the rest of the gender species to share certain antigens. The aim of this paper is to demonstrate if a crossed reaction exists in bovine PPD or aviary PPD when nontuberculous mycobacteria (NTM) is inoculated via an intramuscular injection. Fifteen British crossed female bovines nonreactive to both PPDs were selected, to be later randomly distributed in three groups of five animals each. The BCG group was inoculated with a *M. bovis* BCG suspension at  $10^4$  bact/ml. The MNT group was inoculated with a pool of selected strains (5 ml, 15mg/ml): *M. kansasii*, *M. nonchromogenicum*, *M. gordonae*, *M. arupense*, *M. phlei*, *M. fortitum*, and *M. peregrinum*; all of them were taken from soils from La Pampa and wetlands. The control group was inoculated with 5ml of sterile distilled water. 60 days after the inoculation, the first sensibility test was done at the bovine's cervical anterior area of neck through comparative intradermal reaction. The same test was done again 135 days after the inoculation of mycobacteria. After 60 days of the inoculation, the MNT group showed a single animal with a positive reaction to aviary PPD and bovine PPB, both disappearing 135 days after inoculation. These results indicate that unspecified reactions between the MNT species can appear, but that they do not last in time.

Keywords: environmental mycobacteria, cross reaction, Bovine tuberculosis, intradermal reaction

## INTRODUCCIÓN

Las micobacterias no tuberculosas (MNT) o micobacterias ambientales se distribuyen geográficamente con nichos específicos en el ambiente (Lin *et al.*, 2009) y esto se ve afectado por factores asociados con la actividad humana y la fauna presente pudiéndose encontrar como saprófitas o comensales. No son patógenas obligadas, pero pueden causar infecciones oportunistas en individuos inmunocomprometidos e incluso en inmunocompetentes, produciendo lesiones compatibles con tuberculosis (TB) (Vaerewijck *et al.*, 2005). Sin embargo, no sólo es relevante que las MNT pueden ser patógenas, sino que ciertas especies pueden interferir con el diagnóstico de la TB (Scherrer *et al.*, 2019). Los antígenos compartidos entre las distintas especies de micobacterias pueden ser responsables de las reacciones cruzadas inmunológicas de sus hospedadores y reducir la especificidad de las pruebas de diagnóstico inmunológico comunes, así como también la eficacia de la vacuna BCG (Jenkins *et al.*, 2017).

Para el diagnóstico de la tuberculosis bovina en nuestro país se utiliza un método indirecto que detecta inmunidad celular mediante intradermorreacción (IR) del derivado proteico purificado de *Mycobacterium bovis* (PPD bovino) y en ella se basa el Programa Nacional de Control y Erradicación de la Tuberculosis (SENASA 128/2012) sin dejar de mencionar que es el método de referencia de la Organización Internacional de Sanidad Animal (OIE). Asimismo, el PPD derivado de *Mycobacterium avium* se utiliza para detectar paratuberculosis en los rodeos. Existen pruebas diagnósticas específicas para diferenciar estas enfermedades como la prueba cervical comparada (CC). Uno de sus inconvenientes es la aparición de reactores falsos positivos debido a la posibilidad de

que *M. bovis* y el resto de las especies del género compartan algunos determinantes antigénicos. En rodeos donde se llevan a cabo los planes de control y erradicación de la tuberculosis es donde se comienza a detectar la aparición de reacciones falsas positivas por la aparición de otras micobacterias capaces de producir estados alérgicos en los animales, incluso lesiones compatibles con TB. Sin embargo, desde ya hace algunos años, existe controversia respecto a la importancia de las MNT como fuente de reacciones cruzadas cuando se realiza el diagnóstico de la TB (Bernardelli *et al.*, 2017). También se ha informado que la presensibilización a MNT influye en el diagnóstico de ganado infectado con *M. bovis* porque tanto la prueba cutánea como las pruebas diagnósticas de IFN $\gamma$  se vieron comprometidas (Hope *et al.*, 2005).

Algunos investigadores sugieren que la cercanía genética entre micobacterias atípicas particulares y especies del complejo *Mycobacterium tuberculosis* (MTBC) generalmente indica un mayor nivel de homología para ciertos antígenos protectores compartidos. Esto da como resultado un nivel más alto de respuestas inmunitarias de reacción cruzada en comparación con otras micobacterias atípicas que están genéticamente más alejadas. Así se explicaría los diferentes efectos de las micobacterias ambientales sobre los distintos estudios que se han reportado en cuanto al diagnóstico y prevención de la tuberculosis. En otras palabras, la dirección del sistema inmunitario del huésped en respuesta a la exposición a MTBC dependería del tipo de micobacteria ambiental que se encontrara en su exposición inicial (Jenkins *et al.* 2017). Estudios realizados por Water *et al.* (2006) demostraron que la infección de terneros con *Mycobacterium kansasii*, aislado de un ganglio piogranulomatoso compatible con TB, provoca respuestas específicas que pueden confundir la interpretación de las pruebas de tuberculosis bovina.

Se ha informado que algunas especies, por ejemplo, *M. kansasii*, *Mycobacterium marinum*, *Mycobacterium avium* Complex (MAC) que comprende un grupo de micobacterias relacionadas, incluida *Mycobacterium szulgai*, dan infecciones esporádicas en humanos y animales (Griffith, 2010; Hughes *et al.*, 2005). Ocasionalmente, se informa que las lesiones causadas por estos patógenos son similares a la TB, como se observa en la infección con *M. kansasii* (Water *et al.*, 2006). Además, varios de estos microorganismos también se han descrito como responsables de la respuesta inmunitaria de reacción cruzada lo que lleva a resultados falsos positivos (Jenkins *et al.*, 2017). Otros investigadores han identificado genes y proteínas expresadas por miembros del MCTB y MNT no patógenas. Se ha demostrado la presencia de dichas proteínas en PPD bovina y PPDs de MNT seleccionadas (Gcebe *et al.*, 2016) reforzando la hipótesis de las reacciones inespecíficas en el diagnóstico inmunológico.

En nuestras primeras investigaciones determinamos la presencia y diversidad de MNT en suelos de la provincia de La Pampa, Argentina (Oriani y Sagardoy, 2002), y en distintas fuentes de agua de la ciudad de General Pico y zonas de influencia (Tortone *et al.*, 2019). Luego continuamos tratando de establecer si las distintas especies autóctonas son capaces de interferir con el diagnóstico de la tuberculosis bovina. Con resultados anteriores (Oriani y Sagardoy, 2007) se demostró que algunas especies de MNT aisladas de suelos al ser inoculadas en *Mus musculus* provocaron lesiones granulomatosas, además se observaron reacciones cruzada a la PPD bovina en cobayos

inoculados con cepas de MNT aisladas de suelos de la provincia de La Pampa (Bernardelli *et al.*, 2017). En un ensayo sobre un total de 50 animales con antecedentes de tuberculosis se practicó la tuberculinización en la tabla del cuello empleando PPD bovina, PPD aviar y sensitinas de *Mycobacterium phlei* y de *Mycobacterium fortuitum*, estas últimas elaboradas a partir de cepas provenientes de suelos pampeanos. Los resultados mostraron que el 6% de los reactivantes positivos a la PPD bovina no reaccionaron a las sensitinas de *M. phlei* y *M. fortuitum*. Cabe resaltar que en este trabajo se observó un 16% de reacciones sospechosas a las nombradas sensitinas (Oriani *et al.*, 2011). Teniendo en cuenta estos antecedentes nuestro próximo objetivo fue seleccionar cepas de MNT aisladas a partir de suelos y distintas fuentes de agua e inocularlas intramuscular a bovinos para estudiar el efecto directo sobre el diagnóstico de la tuberculosis bovina a través de la prueba de IR. En este trabajo se muestran los primeros resultados obtenidos.

## MATERIALES Y MÉTODOS

**Cepas de MNT empleadas:** Se seleccionaron cepas de MNT aisladas de suelos y aguas de acuerdo a su prevalencia y su capacidad de formación de biofilm. La identificación de los aislamientos se realizó a través de pruebas fenotípicas y/o métodos moleculares (PRA, secuenciación parcial de 16SrARN y secuenciación de *hsp65*) (Tortone *et al.*, 2018). Las cepas seleccionadas fueron: *M. phlei* (ID:35), *M. kansasii* (ID:15), provenientes de suelos y *M. fortuitum* (ID:117), *Mycobacterium nonchromogenicum* (ID:69), *Mycobacterium gordonae* (ID: 44A), *Mycobacterium arupense* (ID: 88B), y *Mycobacterium peregrinum* (ID: 122) recuperadas de distintas fuentes de agua.

**Inóculo:** El volumen inoculado vía intramuscular (IM) fue de 5 mL. El grupo BCG (control positivo) se inoculó con una suspensión de *M. bovis* BCG ( $10^4$  bact/mL) en PBS estéril (Gonzalez Gonzalez *et al.*; 2012). El grupo MNT se inoculó con un pool de las cepas de MNT seleccionadas resuspendidas en PBS estéril (15 mg/mL) a partir de su cultivo en medio Löwenstein Jensen a 35°C. Se utilizó la metodología descrita en (Kantor, 1979) para la preparación de una suspensión bacteriana en comparación con una suspensión bacilar patrón de turbiedad. Se tomó  $10 \pm 1$  mg de bacilos a partir del cultivo de cada cepa con un ansa estéril y para cada dosis. Se disolvieron en un frasco estéril con 20 perlas de vidrio de 3-5 mm de diámetro conteniendo el volumen adecuado de PBS estéril para 5 dosis. El grupo control fue inoculado con 5 mL IM de agua destilada estéril (ADE).

**Animales:** se seleccionaron 15 bovinos hembras de destete, de madres no reactivas a la prueba de la PPD con buen estado corporal y sanitario, distribuidas en tres grupos: Grupo I MNT (5 animales), Grupo II BCG (5 animales) y Grupo III control (5 animales). Fueron mantenidos en un sistema pastoril extensivo, en un lote separado del resto de los animales del establecimiento (Unidad demostrativa experimental y productiva, UDEP, FCV-UNLPam). Todos los estudios y procedimientos se realizaron de acuerdo con un protocolo aprobado por el CAICUAE (Comisión Asesora Interna para el Cuidado y Uso de Animales de Experimentación) siguiendo los lineamientos del Reglamento Institucional para el cuidado y uso de Animales de experimentación de La UNLPam (Res.233/2018 CS). Los animales se identificaron con números de caravana y el uso de chips electrónicos.

**Metodología de sensibilización y corroboración:** Los animales se inocularon de la manera descripta, conformando los tres grupos de forma aleatoria. Sesenta días previos a la inoculación, a los 15 animales del ensayo se les realizó intradermorreacción para corroborar su negatividad a ambas PPDs. 60 días posteriores a la inoculación de las MNT y BCG se realizó la primera de las pruebas de PPD empleando PPD bovina y aviar en tabla del cuello, prueba cervical comparada (CC). Este mismo esquema se realizó a los 135 días posteriores.

**Prueba de PPD:** se realizó según lo establecido en la resolución 528-2012-SENASA, utilizando derivado proteico purificado de tuberculina bovina (PPD bovina), elaborada con *Mycobacterium bovis* (Cepa «AN5») de 1mg/ml de concentración y la PPD aviar elaborada con una cepa de *Mycobacterium avium* (Cepa «D4») de 0,5 mg/ml de concentración, autorizadas en el país por el Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria, controladas y aprobadas por este Organismo. Las tuberculinas utilizadas fueron preparadas de acuerdo con los requerimientos de la Organización Mundial de la Salud en lo que respecta a: orígenes de los materiales, métodos de producción, precauciones, sustancias agregadas libres de contaminantes, identidad, seguridad, potencia, especificidad y ausencia de agentes sensibilizantes (Bernardelli, 2007).

## RESULTADOS

Se pudo observar que *M.bovis* BCG produce intradermorreacción contra PPD bovino y se mantiene, por lo menos hasta 135 días (Grafico 1) no observándose reacción a la PPD aviar (gráfico 2). Los resultados individuales de la prueba CC en este grupo dieron positivos o sospechosos (Cuadro 1). El grupo MNT mostró a los 60 días de inoculación un animal (20%) con reacción positiva a la PPD aviar (diferencia en el grosor de la piel de 25mm) y a la PPB bovina (diferencia en el grosor de 11 mm). También se detectó un animal (20%) sospechoso a PPD bovina (diferencia de grosor de 3 mm), desapareciendo las reacciones en ambos casos a los 135 días. El grupo control no reaccionó a la PPD bovina y PPD aviar en las dos lecturas posteriores (60 y 135 días).

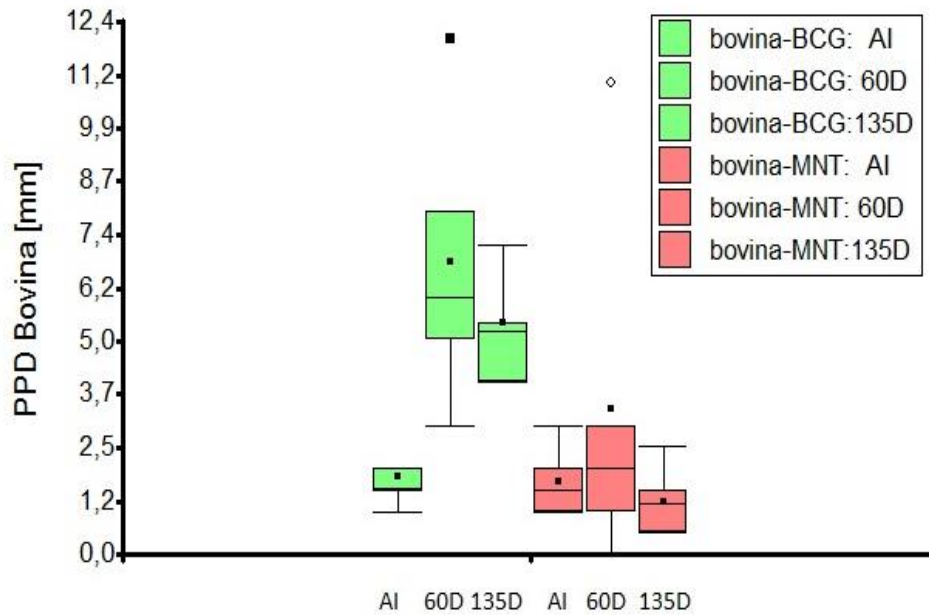


Grafico 1: Comparación de las lecturas de la PPD bovina en el grupo de terneras inoculadas con BCG y con MNT. En este diagrama de cajas se puede observar valor de la media, máximos y mínimos típicos y valores atípicos. *Bovina BCG*: lectura de la prueba de intradermorreacción a PPD bovina en el grupo de animales inoculados con *M.bovis BCG*. *Bovina MNT*: lectura de la prueba de intradermorreacción a PPD bovina en el grupo de animales inoculados con MNT. AI: antes de inocular. 60D: lectura a los 60 días posinoculación. 135D: lectura a los 135 días posinoculación.

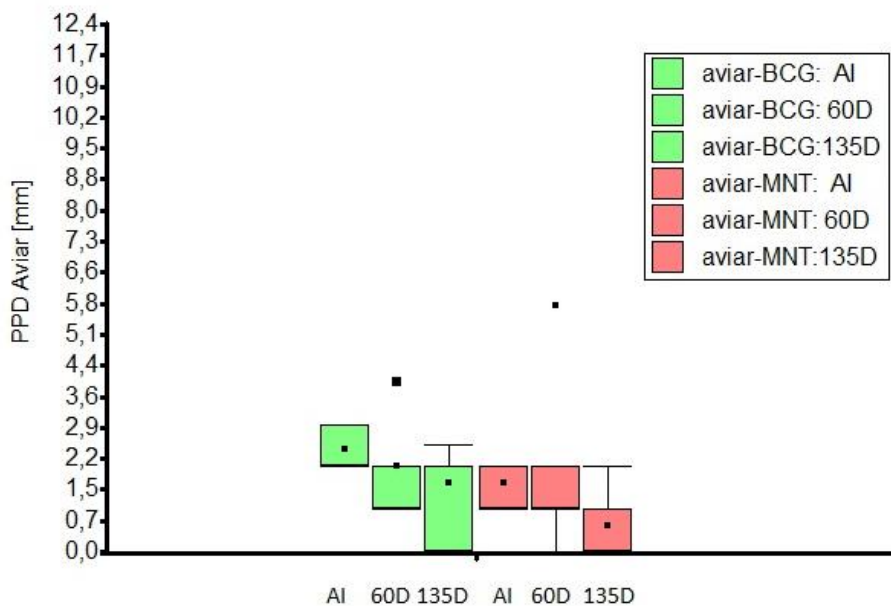


Grafico 2: Comparación de las lecturas de la PPD aviar en los grupos de terneras inoculadas con BCG y con MNT. En este diagrama de cajas se puede observar valor de la media, máximos y mínimos típicos y valores atípicos. *Bovina BCG*: lectura de la prueba de intradermorreacción a PPD bovina en el grupo de animales inoculados con *M.bovis BCG*. *Bovina MNT*: lectura de la prueba de intradermorreacción a PPD bovina en el grupo de animales inoculados con MNT. AI: antes de inocular 60D lectura a los 60 días posinoculación.



135D: lectura a los 135 días posinoculación. (Valor hallado aviar- MNT a los 60D de 25 mm no mostrado en el gráfico)

**Cuadro 1** Resultados de la Intradermorreacción

GRUPO	Lectura a los 60 días	Lectura a los 135 días
I (BCG)	PPD bovina 100% positivo PPD aviar 40% positivo	PPD bovina 100% positivo PPD aviar no reactivo
II (NTM)	PPD bovina 20% positivo PPD aviar 20% positivo PPD aviar 20% sospechoso	PPD bovina no reactivo PPD aviar no reactivo
III (CONTROL)	No reactivo	No reactivo

PPD: derivado proteico purificado de tuberculina

## DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

De acuerdo a Griffith et al. (2007), conocer las especies de micobacterias, en una región proporciona información sobre los factores de exposición geográficamente específicos, asociados al clima, al medio ambiente y a la fauna presente. Esto llevaría a pensar que las especies autóctonas de MNT en una región geográfica determinada pueden interferir de manera diferente en el diagnóstico de la tuberculosis bovina. Además, diferentes respuestas inmunes están asociadas con diferentes especies o cepas de micobacterias y/o a su virulencia (Demangel *et al.*, 2005) así como a la resistencia natural a la tuberculosis (González Ruiz *et al.*, 2018).

Nuestros resultados indican que puede existir reacción inespecífica entre las especies de MNT autóctonas y el diagnóstico de la TB por IR no manteniéndose en el tiempo. Coincidimos con otros investigadores en que los animales pueden sensibilizarse con las micobacterias ambientales y que se debería continuar realizando ensayos en rodeos bovinos con diferentes historias sanitarias con respecto a la tuberculosis. También consideramos que es necesario evaluar la presencia de determinados antígenos, como ESAT-6 y CFP-10, en las cepas de MNT aisladas en nuestra provincia, ya que se ha descrito que algunas especies o cepas los comparten con el MTBC (Vordeirmer *et al.*, 2007, Sherrer *et al.*, 2019). La identificación de proteínas inmunogénicas homólogas de las MNT capaces de provocar respuestas inmunitarias de reacción cruzada con antígenos de MTBC debería ser objetivo de una investigación más profunda. También es necesario valorar distintas vías de inoculación (aerógenas y/o digestivas) que se aproximen más a la exposición real del agente etiológico.

## REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

Bernardelli, A. (2007) Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria Producción y control de tuberculina bovina y aviar. Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria. Derivado Proteico Purificado (DPP). Bs.As. Argentina. <https://www.argentina.gob.ar/sites/default/files/file1011-tuberbov.pdf>

Bernardelli A.; Oriani D. S.; Alonso, B. (2017). *Elaboración y prueba de potencia de sensitinas correspondientes a Mycobacterium phlei y Mycobacterium fortuitum aisladas de suelos pampeanos en la*

Demangel, C.; Garnier, T.; Rosenkrands, I.; Cole, S. T. (2005). *Differential effects of prior exposure to environmental mycobacteria on vaccination with Mycobacterium bovis BCG or a recombinant BCG strain expressing RD1 antigens*. Infection and immunity, 73(4), 2190-2196. <https://doi.org/10.1128/IAI.73.4.2190-2196.2005>

Gcebe, N.; Michel, A.; Gey van Pittius, N. C.; Rutten, V. (2016). *Comparative Genomics and Proteomic Analysis of Four Non-tuberculous Mycobacterium Species and Mycobacterium tuberculosis Complex: Occurrence of Shared Immunogenic Proteins*. Frontiers in microbiology, 7, 795. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00795>

González González, X. E.; Jaramillo Meza, L.; Lascurain Ledezma, R.; Torres Barranca, J.; Quevillon Cardinal, E.L.; Díaz Otero, F. (2012). *Evaluación de subpoblaciones de linfocitos T en bovinos vacunados contra la tuberculosis bovina: estudio longitudinal comparativo*. Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias, 3(2), 137-154. [http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S2007-11242012000200001](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2007-11242012000200001)

González Ruiz, S.; Cantó Alarcón, G. J.; Rodríguez-Hernández, E.; Flores Villalba, S.; Román Ponce, S. I.; Milián Suazo, F. (2018). *Resistencia natural contra la tuberculosis en ganado*. Revisión. Revista mexicana de ciencias pecuarias, 9(2), 328-345. <https://doi.org/10.22319/rmcp.v9i2.4396>

Griffith, D. E.; Aksamit, T.; Brown-Elliott, B. A.; Catanzaro, A.; Daley, C.; Gordin, F.; et al. ATS Mycobacterial Diseases Subcommittee, American Thoracic Society, & Infectious Disease Society of America (2007). *An official ATS/IDSA statement: diagnosis, treatment, and prevention of nontuberculous mycobacterial diseases*. American journal of respiratory and critical care medicine, 175(4), 367-416. <https://doi.org/10.1164/rccm.200604-571ST>

Griffith, D. E. (2010). *Nontuberculous mycobacterial lung disease*. Current opinion in infectious diseases, 23(2), 185-190. <https://doi.org/10.1097/QCO.0b013e328336ead6>

Hope, J. C.; Thom, M. L.; Villarreal-Ramos, B.; Vordermeier, H. M.; Hewinson, R. G.; Howard, C. J. (2005). *Exposure to Mycobacterium avium induces low-level protection from Mycobacterium bovis infection but compromises diagnosis of disease in cattle*. Clinical and experimental immunology, 141(3), 432-439. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2249.2005.02882.x>

Hughes, M. S., Ball, N. W.; McCarroll J.; Erskine M.; Taylor M. J.; Pollock J. M.; et. al. (2005). *Molecular analyses of mycobacteria other than the M. tuberculosis complex isolated from Northern Ireland cattle*. Vet. Microbiol. 108:101-112. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2005.03.001>

Kantor IN. (1979). *Bacteriología de la Tuberculosis Humana y Animal*. Centro Panamericano de Zoonosis. (Series Monográficas y Científicas CPZ-11). Ramos Mejia, Buenos Aires, p47.

Lin, M. Y.; Reddy, T. B.; Arend, S. M.; Friggen, A. H.; Franken, K. L.; van Meijgaarden, K.; et. al. (2009). *Cross-reactive immunity to Mycobacterium tuberculosis DosR regulon-encoded antigens in individuals infected with environmental, nontuberculous mycobacteria*. Infection and immunity, 77(11), 5071-5079. <https://doi.org/10.1128/IAI.00457-09>

Jenkins A.O.; Michel A.; Rutten V. (2017). *Original Mycobacterial Sin, a consequence of highly homologous antigens?* Veterinary Microbiology Vol. 203, 286-293. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2017.03.028>

Oriani, D.S.; Sagardoy, M.A. (2002). *Nontuberculous mycobacteria in soils of La Pampa province (Argentina)*. Rev. Arg. Microbiol. 34:132-137

Oriani, D.S.; Sagardoy, M.A. (2007). *Lesiones en Mus musculus inoculados con Mycobacterium phlei, Mycobacterium kansasii y Mycobacterium fortuitum aislados de suelos pampeanos (República Argentina)* In Vet. 9(1): 43-51

Oriani, S. D.; Dubarry, J. R.; Errea, A. R.; Vera, O. A, María, A. E.; Cavagión, L. J.; et.al. (2011); *Asociación entre el diagnóstico de Tuberculosis bovina por intradermorreacción, la anatomopatología, la bacteriología y la posible interferencia con micobacterias ambientales*. Revista Ciencia Veterinaria. 13 (1): 42-47. <https://cerac.unlpam.edu.ar/index.php/veterinaria/article/view/1859>

Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria. (2012). Disponible en <http://www.senasa.gob.ar/normativas/resolucion-128-2012-senasa-servicio-nacional-de-sanidad-y-calidad-agroalimentaria>



Scherrer, S.; Landolt, P.; Friedel, U.; Stephan, R. (2019). *Distribution and expression of esat-6 and cfp-10 in non-tuberculous mycobacteria isolated from lymph nodes of slaughtered cattle in Switzerland*. *Journal of veterinary diagnostic investigation* : official publication of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, Inc, 31(2), 217–221. <https://doi.org/10.1177/1040638718824074>

Tortone, C.A.; Zumárraga, M.J.; Gioffre, A.K.; Oriani, D.S. (2018) *Utilization of molecular and conventional methods for the identification of nontuberculous mycobacteria isolated from different water sources*. *Int J Mycobacteriol*; 7:53–60. [https://doi.org/10.4103/ijmy.ijmy\\_192\\_17](https://doi.org/10.4103/ijmy.ijmy_192_17)

Tortone, C. A.; Oriani, D. S.; Staskevich, A. S.; Oriani, A. S.; Gino, L. M.; Marfil, M. J.; et.al. (2019). *Diversidad de especies de micobacterias no tuberculosas aisladas en ambientes acuáticos de la ciudad de General Pico, La Pampa, Argentina*. *Rev. Arg. Microbiol.*, 51(3), 259–267. <https://doi.org/10.1016/j.ram.2018.08.005>

Vaerewijck, M. J.; Huys, G.; Palomino, J. C.; Swings, J.; Portaels, F. (2005). *Mycobacteria in drinking water distribution systems: ecology and significance for human health*. *FEMS microbiology reviews*, 29(5), 911–934. <https://doi.org/10.1016/j.femsre.2005.02.001>

Vordermeier, H. M.; Brown, J.; Cockle, P. J.; Franken, W. P.; Drijfhout, J. W.; Arend, S. M.; et. al. (2007). *Assessment of cross-reactivity between Mycobacterium bovis and M. kansasii ESAT-6 and CFP-10 at the T-cell epitope level*. *Clinical and vaccine immunology: CVI*, 14(9), 1203–1209. <https://doi.org/10.1128/CVI.00116-07>

Waters, W. R.; M. V. Palmer, T. C.; Thacker, J. B.; Payeur, N. B.; Harris, F. C.; Minion, R.; et. al. (2006). *Immune responses to defined antigens of Mycobacterium bovis in cattle experimentally infected with Mycobacterium kansasii*. *Clin. Vaccine Immunol.*, 13:611–619. <https://doi.org/10.1128/CVI.00054-06>