

Kars Yöresinde Sığır Tüberkülozunun Yaygınlığının PCR ile belirlenmesi ⁽¹⁾

Ahmet ÜNVER* Halil İ. ATABAY* Vehbi GÜNEŞ** Mehmet ÇİTİL** Hidayet M. ERDOĞAN**

(1) KAÜ Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu tarafından desteklenmiştir (VF 2003-5)

* Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Kars - TÜRKİYE

** Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi, İç Hastalıkları Anabilim Dalı, Kars - TÜRKİYE

Yayın Kodu: 2006/43-A

Özet

Tüberküloz sığırlarda büyük ekonomik kayba yol açan ve insan sağlığını büyük ölçüde tehdit eden önemli bir zoonoz hastalıktır. Hastalığın varlığı dünyanın bir çok bölgesinde ve ülkemizde bildirilmektedir. Çalışmada büyükbaş hayvancılığın yoğun olduğu Kars yöresinde mezbahada kesilen sığırların akciğer ve lenf yumrularında *Mycobacterium bovis*'in yaygınlığı Polymerase Chain Reaction (PCR) ile belirlendi. İncelenen 120 sığırın sekizi (%6.7) PCR ile pozitif bulundu. PCR pozitif dokulardan sadece biri tüberküloz benzeri makroskopik lezyonlara sahipken geri kalan beşi yangı odaklı ve ikisi de patolojik lezyonsuz doku örnekleriydi. Bu sonuçlar hastalığın bölgede yaygın olduğunu ve *M. bovis*'in hastalık olgularında ve karkas muayenelerinde büyük hassasiyetle değerlendirilmesi gerekliliğini ortaya koymaktadır.

Anahtar sözcükler: *Mycobacterium*, Sığır, Tüberküloz, PCR

The Prevalence of Bovine Tuberculosis in Kars District Analyzed by PCR

Summary

Tuberculosis is an important zoonosis threatening animal and human health worldwide. It has a worldwide distribution including Turkey. The prevalence of bovine tuberculosis in Kars district was determined by polymerase chain reaction (PCR) detecting DNA of *Mycobacterium bovis*. Eight (6.7%) lung and mediastinal lymph node samples were found to be positive by PCR among 120 carcasses analyzed. Of the PCR positive tissues, only one had macroscopic pathology lesions similar to that of tuberculosis, five had inflammatory lesions and two had no macroscopic pathology lesions. These results suggest that tuberculosis is an endemic disease in this region and *M. bovis* needs to be considered in disease manifestations and carcass examinations.

Keywords: *Mycobacterium*, Cattle, Tuberculosis, PCR

İletişim (Correspondence)

Phone: +90 474 2426800/1173

e-mail: ahmetunver@hotmail.com

GİRİŞ

İnsan ve evcil hayvanlar için önemli bir sağlık tehdidi olan sığır tüberkülozu büyük ekonomik kayıplara neden olan önemli bir zoonozdur. Hastalık etkeni olan *Mycobacterium bovis*, *M. tuberculosis*, *M. mageritii*, *M. canettii* ve *M. africanum* ile beraber *M. tuberculosis* kompleksi (MTK) olarak adlandırılan grup için de yer alır¹⁻³. *M. bovis* sığırlarda tüberküloza bağlı olarak pnömoni, mastitis ve deri altı apseleri ile beraber merkezi sinir sistemi ve genital sistem enfeksiyonlarına neden olmaktadır^{1,2}.

Tüberküloz, tüm eradikasyon çabalarına rağmen günümüzde uluslararası bir sağlık problemi olma özelliği taşımaktadır. Bilinen coğrafi bir sınırı olmayan tüberkülozis dünyanın birçok bölgesinden bildirilmiştir. İngilterede en yüksek oranda (%12.1) olmak üzere Avrupa Birliği ülkelerinin bazılarında 2004 verilerine göre sığır tüberkülozunun sürevelansı %0.2-5.9 arasında gözlemlenmiştir⁴. Hastalığın Brezilya'daki yaygınlığı %0.9-2.9 arasında tahmin edilmektedir⁵. Afrika'da yaklaşık sığırların %85'i insanların ise %82'si hastalığın endemik olduğu bölgelerde yaşamaktadır⁶. Ülkemizde yapılan çalışmalarda ise sığırlarda tüberküloz prevalansı %0.38 - %1.49 arasında değişen oranlarda tespit edilmiştir⁷⁻¹³.

İnsanlarda tüberküloz vakaları gelişmiş ve gelişmekte olan ülkelerde son yıllarda büyük ölçüde artmaktadır¹⁴. Dünya Sağlık Örgütü'nün tahminlerine göre 1.7 milyardan fazla insan tüberküloz riski altında olup bu örgütün 2004 yılı raporuna göre ülkemizde her 100 000 kişiden 28'inde klinik tüberküloz olgusu tespit edilmiştir¹⁴. Hastalığın ayrıca insanlardan hayvanlara bulaşma potansiyeli de (antropozoonoz) düşünüldüğünde mikrobakterilerin insan ve hayvan sağlığına oluşturduğu tehditin boyutu daha büyümektedir. Son yıllarda bilinçsiz antibiyotik kullanımı nedeniyle konvansiyonel tedavide kullanılan terapötiklere direnç kazanmış *Mycobacterium* suşlarının sebep olduğu tüberküloz vakalarındaki artış¹⁵ bu hastalığın daha iyi etüt edilmesini gerekli kılmaktadır.

Günümüzde tüberküloz tanısında kullanılan teknikler etkenin kültürel yöntemler ile izole edilmesi, allerjik deri testi, serolojik testler, interferon gama testi, lenfosit transformasyon testi ve ölen ve kesime tabii tutulan hayvanlardan histopatolojik muayenelerdir^{3,11,16-18}. Etken izolasyonu tanıda en etkili ve kesin yöntem olmasına rağmen uzun zaman alması önemli bir sorun oluşturmaktadır. Ayrıca etkenin yüksek

patojeniteye sahip bir zoonoz olması laboratuvar ortamının biyogüvenliliğini tehdit etmektedir. İndirek teşhis yöntemlerinden serolojik testlerin diğer mikrobakteri türleriyle çapraz reaksiyon vermesi yanlış pozitifliklere neden olabilmeleri ve bu testlerin çok düşük seviyedeki serum antikorlarını tespit edememeleri de önemli dezavantajlar olarak ortaya çıkmaktadır³. PPD deri testi tüberküloz teşhisinde yaygınlıkla kullanılmakta olmasına rağmen tekniğin spesifikite ve sensitivitesi ile ilgili sorunlarla karşılaşmaktadır. Tüberküloz etkeni izole edilmesine rağmen PPD negatif ve patolojik bulguların rastlanmadığı olguların varlığı^{10,19} ayrıca özellikle tüberküloz endemik bölgelerde etkenle önceki karşılaşmalardan dolayı hipersensitivite reaksiyonuna bağlı olarak yanlış pozitif sonuçlara da rastlandığı bildirilmiştir^{3,18,19}. Ayrıca *Mycobacterium* etkenlerinin konakçıda oluşturması muhtemel immün anergi olgularını serolojik ve allerjik testlerde yanlış negatif sonuçlara neden olabilmektedir³. Ölen veya kesime tabii tutulan hayvanlarda histopatolojik muayeneler yaygınlıkla kullanılmakla beraber bu yöntemler hastalığın erken dönemlerini belirlemede yetersiz kalmaktadırlar³. Son yıllarda tüberküloz etkenlerinin ortaya konulmasında polimerase chain reaction (PCR) hastalığın teşhisinde kullanılan diğer yöntemlerdeki dezavantajlarının bir çoğunu ortadan kaldırarak hızlı, duyarlı ve spesifik bir teknik olarak başarı ile kullanılmaktadır²⁰⁻²⁵. Kars bölgesinde kesim sonrası karkas muayenesinde granülomatöz lezyonların belirlenmesi ve sonrasında yapılan mikroskopik muayene sonucu tüberkülozun prevalansı bildirilmiş olmasına rağmen bu bölgede *Mycobacterium* etkenlerini ortaya koyan bir çalışma mevcut değildir. Mezbahaneler olarak planlanan bu çalışmada sığır tüberkülozunun Kars bölgesindeki yaygınlığının PCR yöntemi ile araştırılmasını amaçlanmıştır.

MATERYAL ve METOT

Örnekler: Çalışmanın materyalini Ekim 2005 – Nisan 2007 döneminde Kars ilinde özel ve kamuya ait mezbahanelerde kesim sonrası imkanlar dahilinde 120 sığır karkasından rastgele alınan 120'şer adet akciğer ve mediastinal lenf yumrusu örnekleri oluşturdu. Organ örneklerinin mikroskopik lezyonlar açısından incelenmesinin ardından her bir organdan yaklaşık 1 g doku parçası aseptik şartlarda alınarak her bir karkas için iki organ örneği karıştırılarak 5 ml PBS içerisinde stomacher ile homojenize edildi.

DNA izolasyonu: Homojenizasyon sonucu elde edilen hücre süspansiyonundan 200 µl DNA izo-

lasyonunda kullanıldı. Hücre süspansiyonu üzerine 50 µg Proteinase K (MBI Fermantes) ve 400 µl NETS lizis tampon solusyonu (NETS buffer; 0.01M NaCl, 1mM EDTA, 0.01M Tris-HCl pH 7.6 ve %0.05 Sodyum Dodesil Sülfat) eklendi. Karışım 65°C'de 2 saat inkübe edildikten sonra eşit miktarda (600 µl) fenol, kloroform ve izoamil alkol (25:24:1 oranında) karışımı ilave edilerek karıştırıldı. Karışımından sonra tüpler 13 000 rpm'de 7 dakika boyunca santrifüj edildi. Tüpün üst kısmında oluşan akıcı bölüm başka bir steril mikrosantrifüj tüpüne aktarılarak üzerine eşit miktarda kloroform ve izoamil alkol (24:1 oranında) karışımı ilave edilerek karıştırıldı. Karışım 13.000 rpm'de 7 dakika boyunca santrifüj edildi. Oluşan akıcı bölüm yine başka bir steril mikrosantrifüj tüpüne aktarılarak üzerine 0.1 volüm 3M sodyum asetat ve 2.5 volüm mutlak alkol ilave edilerek -20°C'de 2 saat veya gece boyunca inkübe edildi. Presipite olan DNA, mikrotüpü 13.000 rpm 7 dakika santrifüjünden sonra çöktürüldü. Pelet absolut alkol ve %70'lik etanol ile iki defa yıkandıktan sonra 15-20 dakika kuruması için beklendi. DNA peleti 100 µl steril distile deiyonize su ile sulandırılıp PCR'da template (kalıp) olarak kullanıldı²².

Polymerase Chain Reaction (PCR) ile *M. bovis* DNA amplifikasyonu: Her bir örnek için 0.2 ml'lik steril mikrotüp içinde 50 µl'lik reaksiyon karışımı 5 µl 10x PCR buffer, 250 µmol her bir dNTP, 2 ünite Taq DNA polimeraz (MBI Fermantes Litvanya), 50 pmol her bir forward ve reverse primeri (Thermo Electron Corp., ABD) ve 5 µl ekstrakte edilmiş DNA ilave edilerek hazırlandı. PCR'da primer olarak *M. bovis*'i belirleyebilen BW8 (5' ACAGGC GAGCCCGGATCTGCT 3') ve BW9 (5' GGTC AGCTCGC TTGCGGCGCTG 3') kullanıldı²². Termal şartlar ise; 94°C'de 5 dk başlangıç denatürasyonu, 40 siklus oluşan 94°C'de 1 dk denatürasyon, 68°C'de 2 dk birleşme (annealing) ve 72°C'de 2 dakika sentez ve çoğalma (extension) ve 72°C'de 7 dk son ekstenzyon şeklinde MJ Mini

(BioRad, CA, ABD) cihazında uygulandı. PCR ürünleri %1 agaroz jeli elektroforez ile ayrıldıktan sonra etidyum bromür boyama ile UV illuminatörde (UVP, ABD) gözlemlendi. DNA fragman büyüklükleri eşzamanlı koşturulan DNA marker'ı (Gene Ruler "100 bp" MBI Fermantes) ile kıyaslanarak tespit edildi.

Referans suşları: PCR'de pozitif kontrol olarak kullanılmak amacıyla BW8 ve BW9 primerlerinin bağlanabildiği referans suşlarından *M. tuberculosis* H37Rv İnönü Üniversitesi, Tıp Fakültesi'nden temin edildi. Lowenstein-Jensen besiyerinde kültürü yapılmış bu referans suş sağlıklı bir hayvanın akciğer ve lenf yumrusundan homojenize edilen hücreler ile karıştırılarak yukarıda bahsedilen metotta olduğu gibi DNA izolasyonuna tabii tutuldu ve bu DNA, PCR'da pozitif kontrol olarak kullanıldı. Bu teknikte negatif kontrol olarak bütün PCR içeriğine sahip template (kalıp) DNA yerine steril damıtık su içeren ve aynı termal ortamda tutulan karışım kullanıldı.

BULGULAR

Çalışma kapsamında incelenen toplam 120 sayıda ait 120'şer adet akciğer ve mediastinal lenf yumrusu

Tablo 1. Doku örneklerinin *M. bovis* PCR sonuçları.

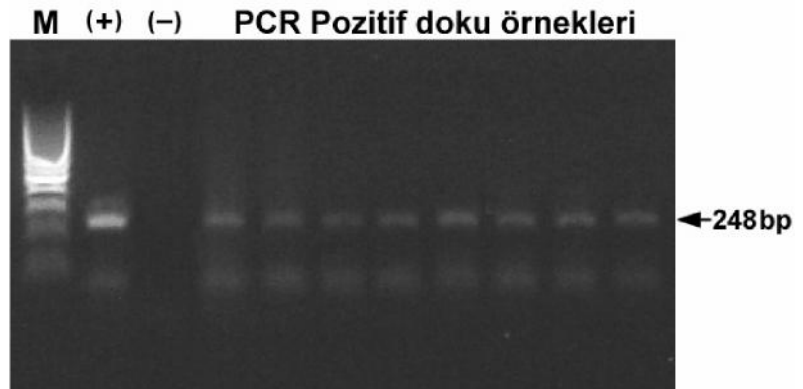
Table 1. *M. bovis* PCR results of the tissues analysed.

Saptanan bozukluk	PCR sonuçları		
	Pozitif	Negatif	%
Tüberküloz benzeri granümatöz kazeifiye lezyonlu dokular (n = 1)	1	0	100
Yangı odaklı dokular * (n = 17)	5	12	29.4
Makroskopik lezyon gözlemlenmeyen dokular * (n = 102)	2	100	1.9
Toplam (n =120)	8	112	6.7

* : Akciğer ve mediastinal lenf yumrusu örneklerinin her ikisinde beraber gözlemlenen bulgular.

Şekil 1. Agaroz jel elektroforezini takip eden PCR ürünlerinden elde edilen resim. M: moleküler standart (Gene Ruler "100 bp"). (+) : *M. tuberculosis* H37Rv ile karıştırılmış normal dokudan elde edilmiş DNA, (-): DNA şablonu (template) ilave edilmemiş kontrol.

Fig 1 . Agarose gel picture of PCR products stained with ethidium bromide. M: molecular size markers (Gene Ruler "100 bp"). (+): DNA from spiked normal tissues with *M. tuberculosis* H37Rv, (-): no template control.



örneğinin makroskopik muayenesinde 18 adet sığıra ait her iki organda da yangı odakları (hiperemi ve normalden büyük lenf yumrusu) saptandı. Bunlardan bir tanesine ait lenf yumrusunda ise tüberküloz lezyonlarına benzerlik gösteren granüloamatöz kazeifikasyon belirlendi. Tüberküloz benzeri lezyonlara sahip bu örnek ile beraber yangı odaklarına sahip toplam altı adet örnek (%6.7) PCR pozitif bulundu (Tablo 1, Şekil 1). Geri kalan 12 yangı odaklarına sahip dokuların PCR negatif oldukları gözlemlendi. Herhangi bir makroskopik lezyonun rastlanmadığı 102 dokudan ikisi PCR pozitif iken geri kalan 100 örnek negatif bulundu.

TARTIŞMA ve SONUÇ

Tüberküloz sığırlarda büyük ekonomik kayba yol açan ve insan sağlığını büyük ölçüde tehdit eden önemli bir uluslararası sağlık problemi dir ^{1-3,6,19}. Kars yöresi sığırlarında PCR ile saptanan *M. bovis* spesifik DNA'sının % 6.6 gibi büyük bir oranda gözlemlenmesi hastalığın bölgede yaygın olduğunu ve *M. bovis*'in hastalık olgularında ve mezbahada karkas muayenelerinde daha dikkatli değerlendirilme gerekliliğini göstermiştir.

M. bovis insanlara aerosol yolla veya kontamine süt ve/veya süt ürünlerinin tüketimi yoluyla bulaşabilmektedir ^{1,6,19}. Ayrıca pulmoner tüberkülozlu insanlar etkenleri sağlıklı sığırlara bulaştırabilmektedirler ^{1,6,19}. Hastalığın insan ve sığırlardaki bu iki yönü enfeksiyon potansiyeli ile beraber Kars bölgesinde aile tipi yetiştiriciliğin oldukça yaygın olduğu düşünüldüğünde çalışmada ortaya konulan sığır tüberkülozunun yaygınlığı beşeri hekimlikte de dikkate alınmalıdır.

Tüberkülozun teşhisi bir takım zorluklar içermektedir ^{3,17,18}. Kültürel yöntemler oldukça uzun zaman almakta, iden tifi kasyon için biyokimyasal testlere ihtiyaç duyulmakta ve laboratuvar şartlarında biyolojik tehlike oluşturmaktadır ²³. Allerjik ve serolojik testler ise sensitivite ve spesifite ile ilgili problemleri beraberlerinde getirmektedirler ¹⁶⁻¹⁸. PCR yönteminin uygulanması klasik yöntemlerde karşılaşılan problemlerin aşılmasında önemli bir alternatif olarak görülmektedir ²⁰⁻²⁵. Bu çalışmada PCR *Mycobacterium* etkenlerinin belirlenmesinde başarı ile kullanılmış ve makroskopik patoloji lezyonları ile belirlenemeyecek sığır tüberkülozu olgularını ortaya koyabilmektedir.

Kesim sonrası makroskopik patoloji lezyonlarına dayanarak Burdur, Bursa, Kars ve Konya yörelerinde

yapılan çalışmalarda sığır tüberkülozu prevalansı sırası ile %0.3 ^{8,11}, 0.57 ⁹, 0.9 ¹⁰ ve 1.2 ⁸ olarak bildirilmiştir. Kayseri ilinde yapılan bir çalışmada ise BACTEC radio metrik yöntem ile sığır tüberkülozu prevalansı %1.49 olarak bulunmuştur ¹². Solmaz ve ark. ¹³ yaptıkları bir çalışmada ise Van bölgesinde yetiştirilen sığırların burun akıntısı örneklerinin %1.4'ünde PCR ile *M. bovis*'i belirlemişlerdir ¹³. Bu çalışmadaki 120 karkas örneğinden alınan 120'şer akciğer ve lenf yumrusu örnekleri makroskopik patoloji yönünden değerlendirildiğinde tüberküloz benzeri granüloamatöz lezyonların sadece bir adet örnekte (%0.83) belirlenmiş olması hastalığın yaygınlığının diğer bölgelerde bu yöntem ile belirlenen oranlara paralellik göstermiştir. Ancak, bu organ örneğinin yanında, yangı odaklı 5 adet organda ve herhangi bir patolojik lezyonun gözlemlenmediği 2 adet organda *M. bovis*'in PCR ile belirlenmesi sonucu bu çalışmada tüberküloz prevalansı yüksek bir oranda (%6.7) bulunmuştur. Bu sonuç, hastalığın Kars yöresinde diğer yörelere göre daha yaygın olduğunu ve PCR gibi oldukça duyarlı teknikler kullanıldığında hastalık prevalansının diğer bölgelerde bildirildiğinden daha yüksek olabileceğini düşündürmektedir.

M. bovis'in, *Pasteurella* spp., *Mannheimia haemolytica*, *Haemophilus somnus* ve *Arcanobacter pyogenes* gibi mikroorganizmalarla sinerjik aktivite gösterdiği gibi bazı dokularda bu tür etkenlerle beraber izole edilmiştir ^{1,2,19}. Bunlarla beraber *Pseudomonas auruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus* spp. ve *Escherichia coli* gibi diğer dokular da yangı odakları oluşturabilecek bazı mikroorganizmalar tüberküloz ile ortak seyredebilir ^{1,2,19}. Bu çalışmada tüberküloz benzeri lezyon göstermemeye yönelik olarak yangı odakları ihtiva eden 17 dokudan altısı PCR pozitif diğerleri ise PCR negatif bulunmuştur. PCR negatif yangı odaklı dokuların piyogen başka mikroorganizmalar içermesi ihtimali düşünülmektedir. Hiçbir makroskopik patoloji lezyonu göstermediği halde PCR pozitif bulunan iki adet örneğin hastalığın ilk dönemlerinde olması ihtimal dahilindedir.

Bu çalışma Kars bölgesinde sığır tüberkülozunun yaygın olduğunu, *Mycobacterium* etkenlerinin beşeri gereksinimlere veteriner hekimlikte dikkate alınması gerekliliğini ortaya koymuştur. Bu hastalıkla ilgili bölgedeki etkin koruma, kontrol ve eradikasyon stratejilerinin ve enfeksiyon dinamiklerinin belirlenmesi için, insan ve diğer evcil hayvanları kapsayan detaylı klinik ve moleküler epidemiyoloji çalışmalarının yapılması gerekliliği ortaya çıkmıştır.

TEŞEKKÜR

M. tuberculosis H37Rv suşunu sağlayan Prof. Dr. Rıza Durmaz'a (inönü Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji AD) ve makroskobik patoloji katkılarından dolayı Dr. M. Karaman, Dr. H. Özen ve Dr. R. Tunca'ya teşekkür ederiz.

KAYNAKLAR

1. **Carter GR, Wise DJ:** Essentials of veterinary bacteriology and mycology, Iowa State Press, Ames, Iowa, ABD, 2004.
2. **Rebhun WC, Guard C, Richards CM:** Diseases of dairy cattle. Williams and Wilkins, Londra, İngiltere, 1995.
3. **Palmer MV, Waters WR:** Advances in bovine tuberculosis diagnosis and pathogenesis: What policy makers need to know. *Vet Microbiol*, 112, 181-190, 2006.
4. **Reviriego Go rdejo FJ, Vermeersch JP:** Towards eradication of bovine tuberculosis in the European Union. *Vet Microbiol*, 112, 101-109, 2006.
5. **de Kantor I N, Ritacco V:** An update on bovine tuberculosis programmes in Latin and Caribbean countries. *Vet Microbiol*, 112, 111-118, 2006.
6. **Cosivi O, Grange JM, Daborn CJ, Raviglione MC, Fujikura T, Cousins D, Robinson RA, Huchzermeyer HF, de Kantor I, Meslin FX:** Zoonotic tuberculosis due to *Mycobacterium bovis* in developing countries. *Emerg Infect Dis*, 4, 59-70, 1998.
7. **Bozoğlu H, Sağlam YS, Bas AT:** Erzurum ve çevresindeki mezbahanelerde kesilen sığırlarda *Mycobacterium* spp. izolasyonu ve lezyonların histopatolojik incelenmesi. *Etlik Vet Mikrobiol Derg*, 9, 45-56, 1997.
8. **Ortatatlı M, Çiftçi MK, Tuzcu M:** Sığırlarda tüberküloz ve diğer granülomatöz pnömoniler üzerinde patolojik incelemeler. *Vet Bil Derg*, 14, 139-150, 1998.
9. **Diker F:** Bursa yöresinde çeşitli ırk sığırlarda görülen tüberküloz lezyonlarının organlara dağılışı ve histoloji yapıları. *Pendik Hayv Hast Merk Araş Enst Derg*, XX (2): 78-94, 1989.
10. **Beytut E:** Kars ili ve yöresinde sığırlarda tüberküloz insidensi ve lezyonların lokalizasyonu üzerine patolojik incelemeler. *Kafkas Üniv Vet Fak Derg*, 7, 15-25, 2001.
11. **Ozmen O, Kurşun O, Ozcelik M:** Bovine tuberculosis in Burdur, southern Turkey: epidemiological, pathological and economic study. *Int J Tuberc Lung Dis*, 9, 1398-1402, 2005.
12. **Gümüşsoy KS, Atasever A, Aydın F, Özcan M, Beyaz L, Hızlısoy H, Abay S:** Kayseri Bölgesinde sığırlarda tüberkülozun prevalansı. VII. Ulusal Veteriner Mikrobiyoloji Kongresi, 26-28 Eylül 2006, Side, Antalya. Sayfa 112. 2006
13. **Solmaz H, İlhan Z, Aksakal A, Gülhan T, Ekin İH, Boynukara B:** Van Bölgesinde sığırtüberkülozun poli meraz zincir reaksiyonu yöntemi ile saptanması. VII. Ulusal Veteriner Mikrobiyoloji Kongresi, 26-28 Eylül 2006, Side, Antalya. Sayfa 146, 2006
14. **WHO reports,** <http://www.who.int/topics/tuberculosis/en/>, erişim tarihi: 20.12.2006.
15. **Hart CA, Kariuki S:** Antimicrobial resistance in developing countries. *BMJ*, 317, 647-650, 1998.
16. **de la Rua-Domenech R, Goodchild AT, Vordermeier HM, Hewinson RG, Christensen KH, Clifton-Hadley RS:** 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, 190-210, 2006.
17. **Rothel JS, Jones SL, Corner LA, Cox JC, Wood PR:** The gamma-interferon assay for diagnosis of bovine tuberculosis in cattle: Conditions affecting the production of gamma-interferon in whole blood culture. *Aust Vet J*, 69, 1-4, 1992.
18. **Waters WR, Thacker TC, Greenwood R, Esfandiari J, Lyashchenko KP:** Effects of different tuberculin skin-testing regimens on gamma interferon and antibody responses in cattle experimentally infected with *Mycobacterium bovis*. *Clin Vaccine Immunol*, 13, 387-394, 2006.
19. **Pritchard DG:** A century of bovine tuberculosis 1888-1988: Conquest and controversy. *J Comp Path*, 99, 357-399, 1988.
20. **Folgueira L, Delgado R, Palenque E, Noriega AR:** Detection of *M. tuberculosis* DNA in clinical samples by using a simple lysis method and polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol*, 31, 1019-1021, 1993.
21. **Fries JW, Patel R J, Piessens WF, Wirth DF:** Detection of untreated *Mycobacterium* by using PCR and specific DNA probes. *J Clin Microbiol*, 29, 1744-1747, 1991.
22. **Wards BJ, Collins DM, de Lisle GW:** Detection of *Mycobacterium bovis* in tissues by polymerase chain reaction. *Vet Microbiol*, 43, 227-240, 1995.
23. **Liebana E, Aranaz A, Mateos A, Vilafranca M, Gomez-Mampaso E, Tercero JC, Alemany J, Suarez G, Dominguez M, Dominguez L:** Simple and rapid detection of *M. tuberculosis* complex organisms in bovine tissue samples by PCR. *J Clin Microbiol*, 33, 33-36, 1995.
24. **Herrera EA, Perez O, Segovia M:** Differentiation between *M. tuberculosis* and *M. bovis* by a multiplex-PCR. *J Appl Bacteriol*, 80, 596-604, 1996.
25. **Mishra A, Singhal A, Chauhan DS, Katoch VM, Srivastava K, Thakral SS, Bhargava SS, Sreenivas V, Prasad HK:** Direct detection and identification of *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium bovis* in bovine samples by a novel nested PCR assay: Correlation with conventional techniques. *J Clin Microbiol*, 43, 5670-5678, 2005.