

TUBERCULOSIS BOVINA

RESUMEN

La tuberculosis bovina es una enfermedad bacteriana crónica de los animales y del ser humano causada por Mycobacterium bovis. En muchos países, la tuberculosis bovina es una importante enfermedad infecciosa del ganado bovino, de otros animales domésticos y de ciertas poblaciones de animales salvajes. La transmisión al ser humano constituye un problema de salud pública.

La exposición a M. bovis por aerosol se considera la vía más frecuente de infección del ganado bovino, pero la infección por ingesta de material contaminado también es posible. Tras la infección, pueden aparecer granulomas nodulares no vasculares denominados tubérculos. Las lesiones tuberculosas características tienen lugar con mayor frecuencia en los pulmones y en los ganglios linfáticos retrofaríngeos, bronquiales y mediastínicos. También pueden hallarse lesiones en los ganglios linfáticos mesentéricos, el hígado, el bazo, las superficies de las serosas y otros órganos.

La tuberculosis bovina suele diagnosticarse en el animal vivo valorando las reacciones de hipersensibilidad retardada. La infección suele ser subclínica; cuando aparece, los signos clínicos no pueden diferenciarse específicamente y pueden consistir en debilidad, anorexia, emaciación, disnea, aumento de tamaño de los ganglios linfáticos y tos, en concreto en los casos de tuberculosis avanzada. Tras la muerte, la infección se diagnostica mediante necropsia y técnicas histopatológicas y bacteriológicas. También pueden utilizarse métodos rápidos de detección del ácido nucleico, como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), aunque son técnicas exigentes que solo deberían utilizarse cuando estén adecuadamente validadas. El cultivo micobacteriano tradicional sigue siendo el método de referencia para la confirmación sistemática de la infección.

Identificación del agente: *Los exámenes bacteriológicos podrían consistir en la observación de bacilos ácido resistentes mediante examen microscópico, lo cual proporciona una confirmación provisional. El aislamiento de micobacterias en medios de cultivo selectivos y su posterior identificación mediante cultivo y pruebas bioquímicas o técnicas de ADN, como la PCR, confirma la infección. La inoculación de animales, que se ha utilizado en el pasado para confirmar la infección por M. bovis, actualmente casi no se utiliza por consideraciones relativas al bienestar animal.*

Prueba de hipersensibilidad retardada: *Esta prueba constituye el método de referencia para la detección de la tuberculosis bovina. Consiste en medir el espesor de la piel, inyectando tuberculina bovina por vía intradérmica en la zona medida y midiendo toda posible hinchazón posterior en el punto de inyección 72 horas después.*

La prueba comparativa de la tuberculina intradérmica con tuberculina bovina y aviar se utiliza principalmente para diferenciar entre animales infectados con M. bovis y animales sensibilizados a la tuberculina debido a una exposición a otras micobacterias o géneros relacionados.

La decisión relativa a si utilizar la prueba simple o la comparativa en general se basa en la prevalencia de la infección por tuberculosis y en el nivel de exposición ambiental a otros microorganismos que causen sensibilización.

Debido a que su especificidad es mayor y a que son más fáciles de estandarizar, los productos derivados de proteína purificada (PPD) han sustituido las tuberculinas de medios sintéticos concentradas por calor. La dosis recomendada de PPD bovino en ganado bovino es de al menos 2.000 Unidades Internacionales (UI) y en la prueba comparativa de la tuberculina, las dosis no deben ser inferiores a las 2.000 UI cada vez. Las reacciones se interpretan en base al método analítico utilizado.

Pruebas de laboratorio basadas en sangre: Actualmente se dispone de análisis de sangre diagnósticos, como la prueba del interferón gamma, en la que se utiliza un enzoinmunoanálisis (ELISA) como método de detección para el interferón, la prueba de la proliferación de linfocitos, mediante la cual se detectan respuestas inmunitarias celulares, y el ELISA indirecto, que detecta respuestas de anticuerpos. La logística y la ejecución en el laboratorio de algunas de estas pruebas pueden constituir un factor limitante. La utilización de pruebas basadas en sangre puede ser ventajosa, sobre todo con ganado bovino intratable, animales de zoo y fauna salvaje, aunque la interpretación de la prueba podría resultar obstaculizada por la falta de datos relativos a ciertas especies. En una reciente revisión realizada por Cousins & Florisson (2005) se ofrece información sobre el uso de distintas pruebas diagnósticas en especies animales distintas de las bovinas.

Requisitos para las vacunas y los materiales biológicos de diagnóstico: Se están desarrollando y evaluando vacunas para el uso en especies bovinas y salvajes, pero en este momento no se administran de forma sistemática porque podrían comprometer la utilización de la prueba intradérmica de la tuberculina y de otras pruebas inmunológicas destinadas a detectar animales infectados. Existen métodos estándar para la producción de las tuberculinas PPD bovinas. Los productos PPD, que se utilizan para llevar a cabo las pruebas especificadas, deben prepararse según los requisitos de la Organización Mundial de la Salud y deben cumplir estos requisitos con respecto a los materiales de partida, los métodos y precauciones aplicados durante la producción, las sustancias añadidas, la ausencia de contaminación, la identidad, la inocuidad, la potencia, la especificidad y la ausencia de efecto sensibilizante. Los bioanálisis que se llevan a cabo para determinar la actividad biológica son especialmente importantes, y la potencia debe expresarse en UI.

A. INTRODUCCIÓN

Mycobacterium bovis es un microorganismo zoonótico y debe tratarse como perteneciente al grupo de riesgo/peligro III con las precauciones adecuadas para prevenir una infección en el ser humano.

La tuberculosis bovina es una enfermedad infecciosa causada por *M. bovis* que afecta al ganado bovino, a otros animales domésticos y a ciertas especies salvajes de vida libre o que viven en cautividad. Suele caracterizarse por la formación de granulomas nodulares denominados tubérculos. Aunque habitualmente se define como enfermedad crónica debilitante, la tuberculosis bovina en ocasiones puede presentar un curso más progresivo. Puede resultar afectado cualquier tejido del organismo, pero las se observan lesiones con mayor frecuencia en los ganglios linfáticos (en concreto en la cabeza y el tórax), los pulmones, el intestino, el hígado, el bazo, la pleura y el peritoneo.

Es importante destacar que otros miembros del complejo de *M. tuberculosis*, anteriormente considerados *M. bovis*, se han aceptado como nuevas especies a pesar de que presentan secuencias del ARN 16S idénticas y más de un 99,9% de identidad de sus secuencias genómicas. Estas son *M. caprae* (Aranaz *et al.*, 2003) (en algunos países se considera un agente patógeno importante de las cabras) y *M. pinnipedii* (Cousins *et al.*, 2003), un agente patógeno de los osos marinos y de los leones marinos. Se sabe que estas dos nuevas especies son zoonóticas. En la Europa central, *M. caprae* se ha identificado como una causa frecuente de tuberculosis bovina (Prodinger *et al.*, 2005). La enfermedad causada por *M. caprae* no se considera demasiado distinta de la causada por *M. bovis* y pueden utilizarse las mismas pruebas para su diagnóstico. En países con programas de erradicación de la tuberculosis, apenas se encuentran signos clínicos de tuberculosis en el ganado bovino porque la prueba intradérmica de la tuberculina permite un diagnóstico provisional y la eliminación de los animales infectados antes de que aparezcan los signos. Sin embargo, antes de que se llevaran a cabo las campañas nacionales de erradicación de la tuberculosis era frecuente observar signos clínicos relacionados con la tuberculosis (Cousins *et al.*, 2001).

En muchos casos, el curso de la infección es crónico y puede no haber signos clínicos, ni siquiera en casos avanzados, en los que puede haber muchos órganos afectados. Cuando los hay, los signos clínicos varían; la afectación pulmonar podría manifestarse por tos, que puede ser inducida por cambios de temperatura o ejerciendo una presión manual sobre la tráquea. La disnea y otros signos de neumonía de grado bajo también constituyen un indicio de afectación pulmonar.

En casos avanzados, los ganglios linfáticos a menudo están muy aumentados de tamaño y podrían obstruir las vías respiratorias, el tracto digestivo o vasos sanguíneos. Los ganglios linfáticos de la cabeza y el cuello podrían resultar visiblemente afectados y a veces romperse y vaciarse. La afectación del tracto digestivo se manifiesta por una diarrea intermitente y constipación en algunos casos. Puede producirse emaciación extrema y dificultad

respiratoria aguda durante las fases terminales de la tuberculosis. Pueden aparecer lesiones que afecten a los genitales en las hembras. Los genitales de los machos casi nunca resultan afectados.

A la necropsia, es más frecuente observar tubérculos en los ganglios linfáticos bronquiales, mediastínicos, retrofaríngeos y portales, y podrían ser los únicos tejidos afectados. Además, es frecuente observar afectación pulmonar, hepática, esplénica y de las superficies de las cavidades del organismo. Mediante palpación, a menudo pueden hallarse lesiones pulmonares nodulares tempranas. Las lesiones suelen ser no olorosas. Asimismo, pueden estar afectados otros puntos anatómicos, y deberán explorarse.

Macroscópicamente, un granuloma tuberculoso suele ser amarillento y de consistencia caseosa, caseosa-calcárea o calcificada. En ocasiones, puede tener aspecto purulento. El aspecto puede ser más purulento en los cérvidos y en los camélidos. Algunos granulomas no tuberculosos podrían no ser diferenciables macroscópicamente de granulomas tuberculosos.

El centro caseoso suele ser seco y duro, estar cubierto por una cápsula de tejido conjuntivo fibroso de espesor variable. El tamaño de la lesión puede ser lo bastante pequeño como para pasar desapercibida a simple vista, y hasta lo bastante grande como afectar a la mayor parte de un órgano. Puede ser necesario realizar cortes seriados de los órganos y tejidos para detectar lesiones pequeñas que se encuentren en el interior del tejido. Histológicamente, las lesiones causadas por *M. bovis* a menudo son paucibacilares (presentan pocos microorganismos) y la ausencia de microorganismos ácido resistentes no excluye la tuberculosis en la linfadenitis de etiología desconocida. En los cérvidos y algunas especies exóticas, la tuberculosis debe tenerse en cuenta al observar abscesos purulentos de pared fina en ausencia de una etiología específica.

Mycobacterium bovis se ha identificado en seres humanos en la mayoría de países donde se han caracterizado por completo cepas de micobacterias de pacientes humanos. La incidencia de tuberculosis pulmonar causada por *M. bovis* es mayor en trabajadores de explotaciones ganaderas y de mataderos que en habitantes urbanos. La transmisión de *M. bovis* al ser humano por la leche y sus productos se elimina mediante la pasteurización de la leche. Uno de los resultados de los programas de erradicación de la tuberculosis bovina ha sido una reducción de la enfermedad y las muertes causadas por la tuberculosis bovina en la población humana.

Aunque el ganado bovino se considera el hospedador verdadero de *M. bovis*, la enfermedad se ha notificado en muchos animales domesticados y no domesticados. Se han aislado cepas de búfalos, bisontes, ovejas, cabras, equinos, camellos, cerdos, cerdos salvajes, ciervos, antílopes, perros, gatos, zorros, visones, tejones, hurones, ratas, primates, camélidos de Sudamérica, kudus, elandos, tapires, alces, elefantes, sitatungas, orixes, adaxes, rinocerontes, oposumas, ardillas de tierra, nutrias, focas, liebres, topos, mapaches y varios felinos depredadores, como leones, tigres, leopardos y lince (De Lisle *et al.*, 2001; O'Reilly & Daborn, 1995).

La tuberculosis bovina en la fauna salvaje se notificó por primera vez en 1929 en el kudú mayor (*Tragelaphus strepsiceros*) y duiker común (*Sylvicapra grimmii*) en Sudáfrica hacia los años 1940, se observó que la enfermedad era endémica en el kudú mayor. En 1982 se halló en Uganda una prevalencia del 10% en el búfalo africano y del 9% en el facocero (*Phacochoerus aethiopicus*) y en Zambia se ha observado infección por *M. bovis* en el Kafue lechwe (*Kobus lechwe kafuensis*) y en un eland (*Traurotragus oryx*). En Kenia se notificó un brote de tuberculosis en babuino anubis (*Papio cynocephalus anubis*). También se ha diagnosticado infección por *Mycobacterium bovis* en el búfalo africano en el Parque Nacional Kruger de Sudáfrica (Bengis *et al.*, 1996), y más recientemente se ha extendido a otras especies, como el chacma (*Papio ursinus*), el león (*Panthera leo*) y el guepardo (*Acynonyx jubatus*), así como en el kudú mayor.

La estricta aplicación de la prueba de la tuberculina y del desvieje de los animales que dan positivo ha eliminado la infección por *M. bovis* de las poblaciones bovinas domésticas de algunos países, pero esta estrategia no siempre ha funcionado. Estudios exhaustivos sobre la reaparición esporádica de *M. bovis* han demostrado que existen reservorios salvajes en ciertos países y que pueden actuar como fuente de infección para el ganado bovino, los ciervos y otros tipos de ganado. El riesgo que estos reservorios de infección constituye para los animales domésticos y los humanos varía bastante según la situación epidemiológica específica de cada especie y del medio (Corner, 2006; Morris *et al.*, 1994). La detección de infección en una población de fauna salvaje requiere investigación bacteriológica o la utilización de un método analítico válido para la especie en cuestión (la prueba de la tuberculina no es eficaz en todas las especies) junto con análisis de información epidemiológicos. El tejón (*Meles Meles*) en el Reino Unido (Wilesmith, 1991) y la República de Irlanda (O'Reilly & Daborn, 1995), el cerdo salvaje (*Sus scrofa*) en España (Naranjo *et al.*, 2008), el falangero zorro (*Trichosurus vulpecula*) en Nueva Zelanda (Animal Health Division, 1986), y varias especies salvajes en África han mostrado ser capaces de mantener la infección por *M. bovis*. El control de la transmisión desde las poblaciones de fauna salvaje a las especies domésticas es complejo y, hasta ahora, se ha basado en la reducción o erradicación de la población de fauna salvaje infectada. La utilización de vacunas para controlar la enfermedad en algunas especies sigue estudiándose.

Mycobacterium bovis se ha aislado de cérvidos de granja y salvajes. La enfermedad podría ser subaguda o crónica, con una velocidad de progresión variable. Un pequeño número de animales podría resultar gravemente

afectado en pocos meses tras la infección, mientras que otros podrían tardar varios años en presentar signos clínicos, que están relacionados con las lesiones del animal. Las lesiones producidas podrían parecerse a las que se encuentran en el ganado bovino (inflamación granulomatosa caseificada que a menudo está mineralizada). Las lesiones pueden adquirir forma de abscesos de pared fina con poca calcificación y contener material purulento. También se han observado abscesos de pared fina en llamas. En los cérvidos, debe considerarse la tuberculosis cuando se observan lesiones tipo absceso de etiología desconocida. Los ganglios linfáticos afectados suelen ser los de la cabeza y el tórax. Pueden estar afectados los ganglios linfáticos mesentéricos – en este punto podrían encontrarse abscesos grandes. La distribución de las lesiones dependerá de la dosis infectiva, de la vía de infección y del periodo de incubación transcurrido antes de la exploración.

En ciervos de granja puede utilizarse la prueba de la tuberculina. La prueba debe llevarse a cabo en un lado del cuello. Para obtener unos resultados válidos, debe rasurarse el pelo alrededor del punto de inyección, debe realizarse una inyección intradérmica precisa de la tuberculina y debe llevarse a cabo una cuidadosa medición pre y post-inoculación del espesor de la piel mediante un compás de espesor dérmico (Clifton-Hadley & Wilesmith, 1991).

B. TÉCNICAS DE DIAGNÓSTICO

Cuando se utilizan técnicas de diagnóstico dentro de programas oficiales de control o erradicación de la TB, se recomienda que la Administración Veterinaria autorice:

- La prueba/s de diagnóstico;
- Los laboratorios que llevarán a cabo la prueba; y
- Las personas que aplicarán las técnicas de diagnóstico a los animales, es decir, las pruebas cutáneas.

1. Identificación del agente patógeno

En el ganado bovino no suele haber signos clínicos de tuberculosis hasta que han aparecido lesiones muy extensas. Por ello, no fue posible su diagnóstico en animales particulares ni la aplicación de programas de erradicación antes del desarrollo de la tuberculina por Koch en 1890. La tuberculina, un filtrado de cultivo estéril concentrado de bacilos tuberculosos cultivados en caldo glicerinado de ternera y, más recientemente, en medios sintéticos, constituye un medio de detección de la enfermedad

Se siguen estudiando las respuestas inmunitarias a las infecciones por *M. bovis* para intentar desarrollar métodos de diagnóstico mejorados o alternativos, ya que la prueba intradérmica a veces tiene inconvenientes en la práctica. La prueba del interferón gamma cada vez se utiliza más como análisis de sangre diagnóstico para la tuberculosis en ganado bovino y en otros animales (como la cabra o el búfalo) y se comercializa. La prueba de la proliferación de linfocitos y el ensayo inmunoanalítico (ELISA) para la detección de la IgG₁ se ha observado que son útiles como pruebas seriadas auxiliares (para mejorar la especificidad) y paralelas (para mejorar la sensibilidad) en el ciervo común de granja.

La presencia de *M. bovis* en muestras clínicas y tomadas post-mortem podría demostrarse por examen de frotis teñidos o cortes de tejido y confirmarse mediante cultivo del microorganismo en medio de aislamiento primario. Los recipientes de recogida deben estar limpios y preferiblemente estériles (la utilización de recipientes para muestras que estén contaminados por micobacterias ambientales podría dar lugar a un fracaso en la identificación de infección por *M. bovis* debido al rápido crecimiento de las micobacterias ambientales); siempre que sea posible, pueden utilizarse recipientes de plástico de un solo uso y desechables de 50 ml de capacidad para distintos tipos de muestras. Las muestras que deben enviarse al laboratorio deben envolverse y precintarse para impedir fugas, y empaquetarse debidamente para prevenir la rotura o aplastamiento durante el transporte. Deben seguirse las Reglamentaciones sobre Materiales Peligrosos (DGR) de la Asociación Internacional de Transporte Aéreo (IATA) para el envío de muestras de casos sospechosos de enfermedad zoonóticas. Los requisitos se resumen en el Capítulo 1.1.2 *Recogida, presentación y almacenamiento de muestras para el diagnóstico* y el Capítulo 1.1.3 *Transporte de material biológico*. El envío rápido de muestras al laboratorio aumenta mucho la probabilidad de aislar *M. bovis* de los cultivos. Si se prevén retrasos en el envío, las muestras deben refrigerarse o congelarse para retardar el crecimiento de contaminantes y para conservar las micobacterias. En condiciones de calor, cuando no es posible refrigerar, puede añadirse ácido bórico (0,5% [p/v] de concentración final) como agente bacteriostático, pero solo durante periodos cortos de tiempo, de no más de 1 semana.

Deben tomarse precauciones para prevenir la infección del personal de laboratorio (véase el Capítulo 1.1.4 *Bioseguridad y bioprotección: norma para la gestión del riesgo biológico en el laboratorio veterinario y en las instalaciones de los animales*). Todos los procedimientos que comporten cultivo bacteriano deben llevarse a cabo en una cabina de seguridad biológica.

1.1. Examen microscópico

Mycobacterium bovis puede observarse microscópicamente en frotis directos de muestras clínicas y en muestras de tejido preparadas. La resistencia al ácido de *M. bovis* suele demostrarse mediante la tinción clásica de Ziehl-Neelsen, pero también puede utilizarse una tinción acidorresistente fluorescente. Las técnicas de inmunoperoxidasa también podrían dar resultados satisfactorios. El diagnóstico provisional de la micobacteriosis puede llevarse a cabo si el tejido tiene lesiones histológicas características (necrosis caseosa, mineralización, células epitelioides, células gigantes multinucleadas y macrófagos). Como las lesiones suelen ser paucibacilares, la presencia de microorganismos acidorresistentes en cortes histológicos podría no detectarse, aunque puede aislarse *M. bovis* en cultivo celular. No obstante, en lesiones de primates, félidos, mustélidos (tejones) y marsupiales (falangero zorro).

1.2. Cultivo

Para procesar muestras para el cultivo, en primer lugar se homogeneiza el tejido mediante un mortero, un digestor o una mezcladora, y a continuación se descontamina con detergente (como cloruro de hexadecilpiridinio [HPC] al 0,375–0,75%), un álcali (hidróxido de sodio al 2–4%) o un ácido (ácido oxálico al 5%). La mezcla de álcali o ácido se agita durante 10–15 minutos a temperatura ambiente y a continuación se neutraliza. La neutralización no es necesaria cuando se utiliza HPC. La suspensión se centrifuga, se desecha el sobrenadante y el sedimento se utiliza para el cultivo y el examen microscópico. Se recomienda que, como mínimo, se realice un cultivo de muestras compuestas de ganglios linfáticos de la cabeza y el tórax cuando no se detecten lesiones visibles en los animales positivos a la prueba de la tuberculina o del interferón en el examen post-mortem.

Para el aislamiento primario, el sedimento suele inocularse en un conjunto de medios sólidos basados en huevo, como el de Lowenstein-Jensen, Coletsos o Stonebrinks; estos medios deben contener piruvato o piruvato y glicerol. También puede utilizarse un medio basado en agar como el de Middlebrook 7H10 o 7J11 o el medio de agar basado en sangre (Cousins *et al.*, 1989).

Los cultivos se incuban durante un mínimo de 8 semanas (y preferiblemente durante 10–12 semanas) a 37°C con o sin CO₂. Los medios deben estar en tubos bien cerrados para evitar la desecación. Se comprueba si en las superficies inclinadas hay crecimiento macroscópico a intervalos periódicos durante el periodo de incubación. Cuando hay crecimiento, se preparan y tiñen frotis mediante la técnica de Ziehl-Neelsen. El crecimiento de *M. bovis* en general tiene lugar en un plazo de 3–6 semanas de incubación en función de los medios utilizados.

Se utilizan sistemáticamente sistemas de cultivo líquido en algunos laboratorios de hospitales y veterinarios; en estos sistemas el crecimiento se mide por medios radiométricos o fluorométricos.

Si se produce una contaminación macroscópica de los medios de cultivo, el proceso de cultivo deberá repetirse utilizando los inóculos retenidos con un descontaminante distinto. El factor limitante en el aislamiento suele ser la mala calidad de las muestras enviadas y deben realizarse todos los esfuerzos posibles para asegurarse de que el laboratorio recibe las muestras de calidad.

Los característicos patrones de crecimiento y la morfología de las colonias pueden servir para llegar a un diagnóstico provisional de *M. bovis*; sin embargo, todas las cepas tienen que confirmarse. Es necesario diferenciar *M. bovis* de los otros miembros del “complejo de la tuberculosis”, es decir, *M. tuberculosis* (la causa principal de la tuberculosis humana), *M. africanum* (ocupa una posición fenotípica intermedia entre *M. tuberculosis* y *M. bovis*), *M. microti* (el “bacilo vole”, un microorganismo muy infrecuente), *M. pinnipedii* y *M. caprae*.

Mycobacterium tuberculosis podría infectar el ganado bovino y sensibilizar el ganado bovino a la tuberculina bovina sin causar las lesiones típicas. A veces pueden aislarse *M. avium* u otras micobacterias ambientales de lesiones tipo tuberculosis en ganado bovino. En estos casos, es necesaria una cuidadosa identificación, y debe excluirse una infección mixta con *M. bovis*.

Pueden identificarse cepas determinando las propiedades clásicas de cultivo y bioquímicas. En un medio sólido adecuado basado en piruvato, las colonias de *M. bovis* son lisas y de color hueso. El microorganismo crece lentamente a 37°C, pero no a 22°C ni a 45°C. *Mycobacterium bovis* es sensible a la hidracida del ácido tiofeno-2-carboxílico (TCH) y a la hidracida del ácido isonicotínico (INH). Se puede comprobar si se encuentra este microorganismo llevando a cabo un crecimiento en medio de agar 7H10/7H11 Middlebrook o en medio que contenga huevo. El medio con huevo debe prepararse sin piruvato porque inhibe la INH y podría tener un efecto similar en el TCH (que es un análogo de la INH) y por tanto dar falsos positivos (resistente). Las cepas de *Mycobacterium bovis* también son

sensibles al ácido para-amino salicílico y a la estreptomina. Las concentraciones de fármacos eficaces son distintas para los medios con huevo que para los medios con agar. Los resultados de la producción de niacina y de reducción de nitratos son negativos en *M. bovis*. En la prueba de la amidasa, *M. bovis* es positivo a ureasa y negativo a la nicotinamidasas y a la pirazinamidasas. Es una bacteria microaerófila y no cromógena.

1.3. Métodos de reconocimiento del ácido nucleico

La identificación rápida de cepas a nivel de complejo de *M. tuberculosis* puede llevarse a cabo mediante el la sonda de ADN del complejo de la TB Gen Probe o mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para detectar el ARNr 16S-23S, las secuencias de inserción IS6110 y IS1081, y se han utilizado genes que codifican proteínas específicas del complejo de *M. tuberculosis*, como MPB70 y el antígeno b de 38 kDa. Puede conseguirse la identificación específica de una cepa como *M. bovis* utilizando PCR para la detección de una mutación en las posiciones nucleotídicas 285 del gen *oxyR*, 169 del gen *pncA*, 675/756/1311/1410 y 1450 del gen *gyrB* y la presencia/ausencia de RD (Regiones de Diferencia) (Espinosa de los Monteros *et al.*, 1998; Huard *et al.*, 2003; Niemann *et al.*, 2000; Parsons *et al.*, 2002). Otras técnicas de tipificación molecular, como la espoligotipificación, permiten identificar cepas de *M. bovis* y proporcionan cierta información de tipificación molecular sobre la cepa que tiene valor epidemiológico (Kamerbeek *et al.*, 1997).

Se ha evaluado exhaustivamente la PCR para la detección del complejo *M. tuberculosis* en muestras clínicas (principalmente de esputo) en pacientes humanos y recientemente se ha utilizado para el diagnóstico de al tuberculosis en seres humanos. Se han evaluado varios kits comerciales y distintos métodos “internos” para la detección del complejo *M. tuberculosis* en tejidos frescos y fijados. Se han utilizado distintos cebadores, como se describe anteriormente. Se han analizado productos de la amplificación mediante hibridación con sondas o mediante electroforesis en gel. Los kits comerciales y los métodos internos, en tejidos frescos, congelados o conservados en ácido bórico han dado resultados variables y no del todo satisfactorios en comparaciones interlaboratoriales (Noredhoek *et al.*, 1996). Los falsos positivos y los falsos negativos, sobre todo en muestras que contienen bajas cantidades de bacilos, han reducido la fiabilidad de esta prueba. La variabilidad en los resultados se ha atribuido al bajo número de copias de la secuencia diana por bacilo junto con un bajo número de bacilos. La variabilidad también se ha atribuido a métodos de descontaminación, procedimientos de extracción del ADN, técnicas de eliminación de inhibidores de la enzima polimerasa, controles internos y externos y procedimientos para la prevención de la contaminación cruzada. La mejora de la fiabilidad de la PCR como prueba práctica para la detección del complejo *M. tuberculosis* en muestras clínicas frescas requerirá el desarrollo de procedimientos estandarizados y robustos. La contaminación cruzada es el principal problema con este tipo de aplicación y este es el motivo por el que deben utilizarse controles adecuados con cada amplificación. No obstante, ahora se está utilizando la PCR de forma sistemática en algunos laboratorios para detectar el grupo de *M. tuberculosis* en tejidos incluidos en parafina (Miller *et al.*, 1997; 2002). Aunque la PCR directa puede dar resultados rápidos, se recomienda utilizar un cultivo paralelamente para confirmar una infección viable por *M. bovis*.

Se han desarrollado varias técnicas de identificación del ADN para diferenciar las cepas del complejo *M. tuberculosis* con fines epidemiológicos. Estos métodos permiten diferenciar entre distintas cepas de *M. bovis* y permitirán describir patrones de origen, transmisión y propagación (Durr *et al.*, 2000a; 2000b). El método más utilizado es la espoligotipificación (de “oligotipificación de espaciador”), que permite la diferenciación de cepas dentro de cada especie perteneciente al complejo *M. tuberculosis*, incluido *M. bovis*, y también permite diferenciar *M. bovis* de *M. tuberculosis* (Heifets & Jenkins, 1998; Kamerbeek *et al.*, 1997). Se recomienda la utilización de una nomenclatura estándar para los espoligotipos según la base de datos Mbovis.org (<http://www.mbovis.org>) para posibilitar la comparación internacional de perfiles.

Otras técnicas son el análisis mediante endonucleasa de restricción (REA) y el polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción (RALPH) utilizando la sonda IS6110 (sobre todo cuando hay más de 3–4 copias de IS6110 en la cepa), la sonda directa de la región repetida (DR), la sonda PGRS (secuencia de repetición de GC polimórfica) (Skuce *et al.*, 1996) y las sondas pUCD (O'Brian *et al.*, 2000). La tipificación mediante el método de las unidades micobacterianas repetitivas intercaladas (MIRU) – repeticiones en tándem de número variable (VNTR) también se ha desarrollado para aumentar la discriminación de las especies del complejo *M. tuberculosis* (Frothingham & Meeker-O'Connell, 1998; Supply *et al.*, 2000). A menudo puede utilizarse una combinación de técnicas para conseguir la máxima discriminación entre cepas (Cousins *et al.*, 1998).

Se ha secuenciado el genoma de *M. bovis* (Garnier *et al.*, 2003) y esta información ha contribuido a los métodos mejorados de identificación genética y al desarrollo de pruebas de PCR que definen las subespecies del complejo *M. tuberculosis*.

2. Prueba de hipersensibilidad retardada

2.1. Prueba de la tuberculina (prueba prescrita para el comercio internacional)

El método estándar para la detección de la tuberculosis bovina es la prueba de la tuberculina, que implica la inyección intradérmica de un derivado proteico purificado (PPD) de tuberculina bovina y la posterior detección de hinchazón (hipersensibilidad retardada) en el punto de inyección 72 horas después. Esto puede realizarse utilizando solo tuberculina bovina o como prueba comparativa utilizando tuberculinas aviar y bovina. La prueba de la tuberculina se suele realizar en la parte media del cuello, pero también puede llevarse a cabo en el pliegue caudal de la cola. La piel del cuello es más sensible a la tuberculina que la piel del pliegue caudal. Para compensar esta diferencia, pueden utilizarse dosis más altas de tuberculina en el pliegue caudal.

Puede no aparecer hipersensibilidad retardada durante 3 a 6 semanas tras la infección. Así, si en un rebaño o animal se sospecha que ha estado en contacto muy recientemente con animales infectados, debe plantearse la posibilidad de realizar la prueba de la hipersensibilidad retardada con el fin de reducir la probabilidad de falsos negativos. Dado que esta prueba tiene una sensibilidad inferior al 100%, es improbable que en un rebaño se logre la erradicación de la tuberculosis con una sola prueba de la tuberculina. Debe reconocerse que cuando se utiliza en animales con infección crónica con enfermedad grave, la prueba de la tuberculina podría ser insensible. La prueba de la tuberculina no se ha validado bien en la mayoría de especies, ni en bóvidos ni en no bóvidos.

La prueba intradérmica comparativa de la tuberculina se utiliza para diferenciar entre animales infectados con *M. bovis* y los que responden a la tuberculina bovina como consecuencia de una exposición a otras micobacterias. Esta sensibilización puede atribuirse a la reactividad cruzada a antígenos entre especies micobacterianas y géneros relacionados. La prueba comporta la inyección intradérmica de tuberculina bovina y tuberculina aviar en puntos distintos, normalmente en el mismo lado del cuello, y midiendo la respuesta 3 días después.

La potencia de las tuberculinas debe estimarse mediante métodos biológicos, en base a la comparación con tuberculinas estándar, y la potencia se expresa en Unidades Internacionales (UI). En varios países, la tuberculina bovina se considera de potencia aceptable si su potencia estimada garantiza por dosis bovina al menos 2.000 UI ($\pm 25\%$) en ganado bovino. En ganado bovino con disminución de la sensibilidad alérgica, se precisa una dosis de tuberculina bovina más alta, y en campañas nacionales de erradicación se recomiendan dosis de hasta 5.000 UI. El volumen de cada dosis de inyección no puede superar los 0,2 ml.

2.1.1. Procedimiento analítico

- i) Es importante utilizar una técnica de inyección correcta. Los puntos de inyección deben rasurarse y limpiarse. Con un compás de espesor cutáneo se mide un pliegue de piel situado dentro de la zona rasurada, y se marca el punto antes de la inyección. Se inserta una aguja corta con el borde del bisel hacia afuera y acoplada a una jeringa graduada cargada con tuberculina, oblicuamente hasta las capas más profundas de la piel. A continuación, se inyecta la dosis de tuberculina. Puede utilizarse una jeringa multidosis o bien una pistola de inyección múltiple siempre que se garantice la inyección del volumen adecuado de forma segura. La dosis de tuberculina inyectada no debe ser inferior a las 2.000 Unidades Internacionales (UI) de tuberculina bovina o aviar. Se confirma que la inyección se realizó de forma correcta palpando una pequeña hinchazón en forma de un pequeño guisante a cada lado de la inyección. La distancia entre las dos inyecciones debe ser de unos 12–15 cm. En animales jóvenes en los que no hay espacio para separar los puntos lo suficiente en un solo lado del cuello, debe aplicarse una inyección a cada lado del cuello en puntos idénticos en el centro del tercio central del cuello. El espesor del pliegue de piel de cada punto de inyección se vuelve a medir 72 horas después de la inyección. La medición de la piel realizada antes de la inyección y en el momento de leer la prueba deben ser llevadas a cabo por la misma persona.
- ii) Se han adoptado varios métodos alternativos de interpretación de las respuestas a las pruebas cutáneas, y es necesario tener en cuenta que los falsos positivos pueden deberse a sensibilización por otras micobacterias y por inflamación local. Es importante reconocer que existe un equilibrio entre la sensibilidad y la especificidad, y que podrían no lograrse valores altos de ambas a la vez. Deben aplicarse las políticas adecuadas en función de la prevalencia de la enfermedad y según el riesgo (por ejemplo, donde haya un reservorio de fauna salvaje). La interpretación se basa en la observación y en los aumentos del espesor del pliegue cutáneo registrados. En la prueba intradérmica simple (que requiere una sola inyección de tuberculina bovina), la reacción se suele considerar

negativa si solo se observa una pequeña hinchazón, con un aumento de no más de 2 mm y sin signos clínicos, como edema difuso o extenso, exudación, necrosis, dolor o inflamación de los conductos linfáticos en esa zona o de los ganglios linfáticos. La reacción se considera inconcluyente si no se observa ninguno de estos signos clínicos y si el aumento del grosor del pliegue cutáneo es superior a los 2 mm e inferior a los 4 mm. La reacción se considera positiva si se observa signos clínicos, como se ha mencionado anteriormente, o si hay un aumento de 4 mm o más en el espesor del pliegue cutáneo. Además, en rebaños infectados por *M. bovis*, toda hinchazón palpable o visible debe considerarse una reacción positiva. A veces, se utiliza una interpretación más estricta, en concreto en una población de alto riesgo o en animales que hayan estado en contacto. Los animales que dan resultados inconcluyentes en la prueba intradérmica simple deben someterse a otra prueba tras un intervalo de 42 días para que la desensibilización pueda disminuir (en algunas zonas, se utilizan 60 días para el ganado bovino y 120 días para los ciervos). Los animales que no son negativos a esta segunda prueba deben considerarse presuntamente positivos a la prueba. Los animales que son positivos a la prueba intradérmica simple pueden someterse a una prueba intradérmica comparativa o a un análisis de sangre. Cada vez que se realiza una nueva prueba debe llevarse a cabo cumpliendo las normas de los programas de control locales o nacionales.

- iii) En la interpretación de la prueba intradérmica comparativa, una reacción se suele considerar positiva si el aumento del espesor de la piel en el punto de inyección del ganado bovino es más de 4 mm superior a la reacción observada en el punto de inyección de las aves. La reacción se considera inconcluyente si el aumento en el espesor de la piel en el punto de inyección del ganado bovino es superior a la reacción en las aves con una diferencia de menos de 4 mm. La reacción se considera negativa si el aumento en el espesor de la piel en el punto de inyección del ganado bovino es inferior o igual al aumento en la reacción cutánea en el punto de inyección de las aves. Este esquema de interpretación se utiliza en países de la Unión Europea (UE) y se recomienda en la Directiva del Consejo 64/432/EEC (EU, 1980). A veces se utiliza una interpretación más estricta.
- iv) En la prueba del pliegue caudal, se inserta oblicuamente una aguja corta con el borde del bisel hacia afuera en las capas más profundas de la piel de la cara lateral del pliegue caudal, en un punto situado a medio camino entre el pliegue y la línea de pelo de la cara ventral del pliegue. La interpretación estándar es que todo cambio palpable o visible se considera presuntamente una reacción. También se utiliza una interpretación modificada: un resultado positivo es toda hinchazón palpable o visible en el punto de inyección con una diferencia de espesor del pliegue caudal de 4 mm respecto al espesor del pliegue caudal opuesto. Si un animal solo tiene un pliegue caudal, la prueba se considera positiva si el espesor del pliegue caudal es de 8 mm o más.

3. Pruebas de laboratorio basadas en la sangre

Además de la prueba intradérmica clásica de la tuberculina, se han utilizado varios análisis de sangre (Haagsma, 1993). Debido al coste y a la naturaleza más compleja de las pruebas de laboratorio, normalmente se utilizan como pruebas complementarias para maximizar la detección de animales infectados (prueba paralela), o para confirmar o negar los resultados de la prueba intracutánea (pruebas seriadas). También existen indicios de que cuando un animal infectado se le realiza la prueba intradérmica, durante la semana siguiente puede tener obtenerse un resultado más alto en un análisis de sangre. Esto permite contar con una mejor separación de las respuestas a las pruebas *in-vitro* para conseguir una mayor exactitud de las pruebas. La prueba del interferón gamma y la prueba de la proliferación de linfocitos miden la inmunidad celular, mientras que el ELISA mide la inmunidad humoral.

3.1. Prueba del interferón gamma

En esta prueba, la liberación de un interferón gamma (IFN- γ) de linfocina se mide en un sistema de cultivo con sangre completa. La prueba se basa en la liberación de IFN- γ desde linfocitos sensibilizados durante un periodo de incubación de 16–24 horas con antígeno específico (tuberculina PPD) (Wood *et al.*, 1990). En esta prueba se utiliza la comparación de la producción de IFN- γ tras una estimulación con PPD aviar y con PPD bovina. La detección de IFN- γ se lleva a cabo con un ELISA en sándwich que utiliza dos anticuerpos monoclonales contra interferón gamma bovino. Se recomienda que las muestras de sangre sean transportadas al laboratorio y que se lleve a cabo la prueba cuanto antes, pero no después del día de la toma de sangre (Coad *et al.*, 2007; Ryan *et al.*, 2000). En algunas zonas, sobre todo donde la “inespecificidad” es prevalente, han surgido algunas preocupaciones relativas a la exactitud. No obstante, dada la capacidad de la prueba del IFN- γ de detectar infecciones tempranas, el uso de ambas pruebas en paralelo permite la detección de un mayor número de

animales infectados antes de que se conviertan en una fuente de infección para otros animales, así como en una fuente de contaminación del medio (Gormley *et al.*, 2006). La utilización de antígenos micobacterianos definidos como ESAT 6 o CFP-10 parece un buen medio de mejora de la especificidad (Buddle *et al.*, 2001), y estos antígenos se utilizan en muchos países como el Reino Unido y Nueva Zelanda para el análisis seriado. La utilización de este tipo de antígeno también podría ofrecer la capacidad de diferenciar animales vacunados con BCG de los no vacunados. En animales que son difíciles de manipular o cuya manipulación es peligrosa, como el ganado bovino u otros bóvidos excitables, la ventaja de la prueba del IFN- γ respecto a la prueba intradérmica es que los animales tienen que ser capturados una sola vez. La prueba del IFN- γ se ha aprobado para su uso en varios programas nacionales, incluida la Unión Europea (UE), EE.UU., Nueva Zelanda y Australia. En Nueva Zelanda y en el Reino Unido, por ejemplo, la prueba del IFN- γ se utiliza para el análisis seriado (para aumentar la especificidad) y el análisis paralelo (para aumentar la sensibilidad). La prueba se comercializa en forma de kits para especies bovinas y primates; no obstante, solo se ha validado en algunas especies de estos taxones.

3.2. Prueba de la proliferación de linfocitos

Este tipo de prueba *in-vitro* compara la reactividad de los linfocitos de la sangre periférica a la tuberculina PPD (PPD-B) con la que presentan frente a una PD de *Mycobacterium avium* (PPD-A). La prueba puede llevarse a cabo con sangre completa (Buddle *et al.*, 2001) o con linfocitos purificados de muestras de sangre periférica (Griffin *et al.*, 1994). Estas pruebas intentan aumentar la especificidad de la prueba eliminando la respuesta de los linfocitos a antígenos “inespecíficos” o que presenten reactividad cruzada, asociada a especies no patógenas de micobacterias a las cuales el animal podría haber estado expuesto. Los resultados se suelen analizar como el valor obtenido en la respuesta a la PPD-B menos el valor obtenido en la respuesta a la PPD-A. El valor B-A debe ser superior a un punto de corte que puede cambiarse con el fin de maximizar o bien la especificidad o bien la sensibilidad del diagnóstico. La prueba tiene valor científico, pero no se utiliza para el diagnóstico sistemático porque es lenta y la logística y la ejecución en el laboratorio son complicadas (requiere largos tiempos de incubación y la utilización de nucleótidos radiactivos). Como ocurre con la prueba del IFN- γ , la prueba de la proliferación de linfocitos debe llevarse a cabo poco después de haber recogido la sangre. La prueba podría ser útil en animales salvajes y de zoo. Se ha observado que un análisis de sangre formado por pruebas de transformación de linfocitos y ELISA tiene una alta sensibilidad y especificidad en el diagnóstico de la infección por *M. bovis* en los ciervos (Griffin *et al.*, 1994). La prueba es relativamente cara y todavía no se ha sometido a comparaciones interlaboratoriales.

3.3. Enzimoimmunoanálisis

Se ha intentado varias veces, aunque sin éxito, desarrollar pruebas serodiagnósticas clínicamente útiles para la detección de la tuberculosis. El ELISA parece ser la prueba más adecuada de detección de anticuerpos y puede constituir un complemento, más que una alternativa, de pruebas basadas en la inmunidad celular. Podría ser útil en ganado bovino y ciervos anérgicos. Una ventaja del ELISA es su simplicidad, pero la sensibilidad es baja principalmente debido a que la respuesta inmunitaria humoral es tardía e irregular en el ganado bovino en el curso de la enfermedad. La especificidad también es baja en el ganado bovino cuando se utilizan antígenos complejos como la tuberculina o filtrados de cultivo de *M. bovis*. No obstante, se ha observado que una comparación de los niveles de anticuerpos contra la PPD-B y la PPD-A es útil para aumentar la especificidad en el ELISA (Griffin *et al.*, 1993). Sin embargo, la respuesta de anticuerpos en ciervos parece tener lugar antes y de forma más predecible y la sensibilidad de un ELISA comparativo se ha observado que es de incluso el 85% en esta especie (Griffin *et al.*, 1993). Puede producirse una mejora utilizando una combinación de distintos antígenos, como proteínas (por ejemplo, MPB70 y MPB83, que son específicas pero carecen de sensibilidad). Además, en animales infectados por *M. bovis* se ha descrito un aumento anamnóstico, dando lugar a unos mejores resultados del ELISA 2–8 semanas después de una prueba intradérmica sistemática de tuberculina (Lyashchenko *et al.*, 2004). El ELISA también podría ser útil para detectar infecciones por *M. bovis* en fauna salvaje. En Nueva Zelanda, el ELISA está aprobado como prueba paralela auxiliar para ciervos de granja, que se lleva a cabo 13–33 días después de la prueba intradérmica que se realiza en la zona cervical media (Griffin *et al.*, 1994). También se han creado formatos de pruebas séricas alternativas. Así, por ejemplo, se ha observado que una prueba rápida basada en el flujo lateral (TB StatPak) es útil para detectar animales tuberculosos, sobre todo en algunas especies domésticas, en fauna salvaje (Lyashchenko *et al.*, 2008) y en animales de zoo, como camélidos de Sudamérica, tejones (Greenwald *et al.*, 2003), primates no humanos o elefantes (Greenwald *et al.*, 2009) para los que no se dispone de pruebas de inmunidad celular como las pruebas del interferón gamma, y en los que se ha observado que las pruebas intradérmicas no son fiables. No obstante, su sensibilidad en el ganado bovino es relativamente baja. Esta prueba ahora está autorizada en EEIUU. Por la USDA para especies como elefantes y primates no humanos y está autorizada para su uso en tejones en el Reino Unido.

C. REQUISITOS PARA LAS VACUNAS Y EL MATERIAL BIOLÓGICO DE DIAGNÓSTICO

Actualmente, la única vacuna disponible contra infecciones por *M. bovis* es la bacillus Calmette-guerin (BCG), que es una cepa viva atenuada de *M. bovis*. Se ha observado que tiene una eficacia variable en estudios con ganado bovino, lo cual podría atribuirse a distintos factores, como la formulación de la vacuna, la vía de vacunación y el grado de exposición a micobacterias ambientales (Skinner *et al.*, 2001). Se han llevado a cabo pruebas con otras vacunas, pero ninguna ha mostrado una protección superior a la de la BCG. Se ha observado que la eficacia de la BCG varía de un modo similar al observado en humanos. Actualmente se están probando otras vacunas candidatas. La conformación genética del microorganismo causante de la tuberculosis ahora se está estudiando en detalle y se han publicado las secuencias genómicas completas de *M. tuberculosis*, *M. bovis* y BCG (Pasteur) (Brosch *et al.*, 2002; Cole *et al.*, 1998; Garnier *et al.*, 2003). Esto podría ser especialmente útil para identificar genes relacionados con la virulencia y para avanzar hacia una vacuna de subunidad. En países infectados donde no se aplican pruebas ni control en los mataderos, podría utilizarse la vacuna BCG para reducir la propagación de la infección en el ganado vacuno; no obstante, no existen pruebas fehacientes de una reducción a largo plazo de la prevalencia ni de la seguridad para el ser humano y el medioambiente. Antes de emprender un programa de vacunación, debe optimizarse el programa de vacunación según las condiciones de cada lugar. La dosis normal sería de entre 10^4 y 10^6 unidades formadoras de colonia administrada por vía subcutánea. La vacuna debe basarse en la cepa estándar de referencia, BCG Pasteur o Danish (WHO/FAO/OIE, 1994). Es importante reconocer que la utilización de vacuna comprometerá las pruebas cutáneas de la tuberculina u otras pruebas inmunológicas que se basen en el uso de tuberculina como antígeno diagnóstico. Por tanto, la vacunación del ganado bovino no debe utilizarse en países donde se estén implementando medidas de control o de comercio basadas en estas pruebas. Sin embargo, se ha avanzado considerablemente en el desarrollo de los denominados antígenos DIVA, que permiten diferenciar animales vacunados con la BCG de animales infectados por *B. bovis*, sobre todo cuando se utilizan en la prueba del interferón gamma (Buddle *et al.*, 1999; Cockle *et al.*, 2006; Sidders *et al.*, 2008; Vordermeier *et al.*, 2001). Este tipo de antígenos se basan en el uso de antígenos que están codificados en regiones génicas de *M. bovis* que están borradas en la BCB (como ESAT-6 y CFP-10 [Buddle *et al.*, 1999; Vordermeier *et al.*, 2001]), que están infraexpresadas en ciertas cepas de BCG (como MPB83), o que la BCG no secreta (como Rv3615c [Sidders *et al.*, 2008]). Por tanto, se puede prever que la vacunación con BCG podría aplicarse junto con estas pruebas DIVA una vez estos reactivos se hayan validado por completo y el marco de trabajo legal se haya adaptado como corresponda. Las vacunas BCG también podrían utilizarse para reducir la propagación de *M. bovis* en reservorios de infección de fauna salvaje. Antes de utilizar la vacuna es crucial validar el sistema de administración en cada especie salvaje. El impacto ambiental de la vacuna en otras especies salvajes también debe tenerse en cuenta.

En el Capítulo 1.1.8 *Principios de producción de vacunas veterinarias*, se indican las directrices para la producción de vacunas veterinarias. Las directrices que se dan en el Capítulo 1.1.8 son de carácter general y pueden complementarse con requisitos de ámbito nacional o regional.

Las preparaciones de tuberculina originalmente se realizaron a partir de productos tratados térmicamente de crecimiento y lisis de *M. tuberculosis* o *M. bovis* (denominados tuberculinas humana y bovina, respectivamente) cultivados en caldo de glicerol. En los años 1940, las “tuberculinas de medio sintético concentradas por calor” o tuberculinas HCSM, preparadas a partir de cultivos en medio líquido sintético, sustituyeron las “antiguas” tuberculinas. Hoy en día, tanto las tuberculinas antiguas como las HSCM se han sustituido, en casi todo el mundo, por derivados proteicos purificados o PPD. Los PPD bovinos preparados con la cepa de producción de *M. bovis* AN5 son más específicos para la detección de la tuberculosis bovina que los PPD preparados con *M. tuberculosis*.

C1. Producción de tuberculina

1. Manejo del inóculo

1.1. Características del inóculo

Las cepas de *M. bovis* que se utilizan para preparar cultivos de inóculo deben identificarse hasta el nivel de especie mediante las pruebas adecuadas. Debe mantenerse un registro de sus orígenes y del historial posterior. Los cultivos de inóculo no deben pasarse más de cinco veces. Las cepas de producción *M. bovis* AN5 o Vallee son las más utilizadas.

1.2. Método de cultivo

Si el cultivo original se ha realizado en medio sólido, es necesario adaptar el microorganismo a crecer como cultivo flotante (por ejemplo, añadiendo un trozo estéril de patata en los frascos de cultivo de medios líquidos, como el medio de Watson Reid). Cuando el cultivo se ha adaptado a un medio

líquido, puede utilizarse para producir el lote de inóculo primario, que se conserva en forma liofilizada. Este se utiliza para inocular medios para la producción de lotes de inóculo secundarios, que no deben someterse a más de cuatro pases desde el inóculo primario. El inóculo secundario se utiliza para inocular cultivos de producción (Angus, 1978; Haagsma & Angus, 1994).

Es necesario demostrar que el sustrato del cultivo de producción es capaz de producir un producto que cumpla los estándares internacionales reconocidos (Organización Mundial de la Salud [OMS], Farmacopea Europea u otras autoridades de control reconocidas). Debe estar libre de ingredientes que se sepa que causan reacciones tóxicas o alérgicas.

1.3. Validación

Debe demostrarse que las cepas de *M. bovis* que se utilizan como cultivos de inóculo están libres de microorganismos contaminantes.

Debe demostrarse que los lotes de inóculo son eficaces produciendo tuberculina con la suficiente potencia. Las pruebas necesarias se describen en el apartado C.4, abajo.

2. Método de fabricación

El microorganismo se cultiva en un medio sintético, la proteína del filtrado se precipita químicamente (se utiliza sulfato de amonio o ácido tricloroacético [TCA]), a continuación se lava y se resuspende. La tuberculina PPD se recomienda porque puede estandarizarse con mayor precisión.

Podría añadirse un conservante antimicrobiano que no dé lugar a falsos negativos, como el fenol (no más del 0,5% [p/v]). Puede añadirse glicerol (no más de un 10% [p/v]) o glucosa (2,2% [p/v]) como estabilizadores. No deben utilizarse derivados mercuriales. El producto también se distribuye de forma aséptica en recipientes estériles de cristal neutro, que se tapan de forma que se impida la contaminación. El producto puede liofilizarse.

3. Control durante el proceso

Los frascos de producción, inoculados con cultivos de inóculo adecuados, se incuban durante el tiempo correspondiente. Todo frasco que presente contaminación o crecimiento macroscópico anómalo deberá desecharse tras la esterilización en autoclave.

A medida que avanza la incubación, el crecimiento en la superficie de muchos cultivos se humedece y puede hundirse adentrándose en el medio y llegando al fondo del frasco.

En las tuberculinas PPD, el pH del precipitado disuelto (la denominada tuberculina concentrada) debe ser de entre 6,6 y 6,7.

El nivel de proteína del concentrado PPD se determina mediante el método Kjeldahl u otro método adecuado. Suelen compararse el nitrógeno total y el nitrógeno precipitable por TCA.

El producto final debe someterse a bioanálisis en cobayas. Se llevan a cabo pruebas de potencia y de especificidad en comparación con una tuberculina de referencia (PPD). Se realizan posteriores diluciones con un tampón según el contenido en proteína y la concentración final necesaria, normalmente de 1,0 mg/ml (Angus, 1978; Haagsma & Angus, 1994).

4. Control del lote

Las muestras deben cumplir los estándares oficialmente reconocidos de producción de tuberculina, como los indicados por la Farmacopea Europea o estándares reguladores equivalentes.

4.1. Esterilidad

Las pruebas de esterilidad en general se llevan a cabo según directrices internacionales (véase también el Capítulo 1.1.9 *Pruebas de esterilidad y ausencia de contaminación en los materiales biológicos de uso veterinario*).

4.2. Inocuidad

Se inyectó a dos cobayas, cada uno de los cuales pesaba no menos de 250 g y no había sido tratado previamente con ningún producto que pudiera interferir con la prueba, 0,5 ml de la tuberculina en estudio por vía subcutánea. En un plazo de 7 días no se observó ningún efecto anómalo.

Pueden llevarse a cabo pruebas sobre la tuberculina para micobacterias vivas, o bien con la tuberculina inmediatamente antes de ser distribuida en los recipientes finales, o bien con muestras tomadas de los recipientes finales propiamente dichos. Debe tomarse una muestra de un mínimo de 10 ml, que deberá inyectarse por vía intraperitoneal a, como mínimo, dos cobayas, dividiendo la dosis entre ellos. Es deseable tomar una muestra más grande, como de 50 ml, y concentrar toda posible micobacteria residual mediante centrifugación o filtración con membrana. Los cobayas se observan durante al menos 42 días y a continuación se examinan macroscópicamente post-mortem. Toda lesión hallada se examina microscópicamente y mediante cultivo.

4.3. Efecto sensibilizante

Para comprobar el efecto sensibilizante, a tres cobayas que no hayan sido tratados previamente con ningún producto que pudiera interferir con la prueba se les inyecta por vía intradérmica en tres ocasiones el equivalente de 500 UI de la preparación en estudio, en un volumen de 0,1 ml. A cada cobaya, junto con tres cobayas control que no hayan sido inyectados previamente, se le inyecta la misma dosis de tuberculina por vía intradérmica 15 a 21 días después de la tercera inyección. Las reacciones de los dos grupos de cobayas no deben ser significativamente diferentes al medirlas 24 a 48 horas después.

4.4. Potencia

La potencia se determina por comparación con una preparación de referencia de tuberculina bovina en cobayas sensibilizados con *M. bovis*.

Ya en los años 1960, la Comunidad Económica Europea (CEE, ahora denominada UE) reconoció un estándar de la CEE para la PPD bovina, que se administró a una potencia de 50.000 unidades provisionales de tuberculina de la Comunidad por mg de PPD, y se distribuyó en estado liofilizado. Desafortunadamente, el número de ampollas liofilizadas no fue suficiente para los requisitos de la OMS y, por ello, se decidió producir una nueva preparación de PPD bovina que pudiera ser designada por la OMS como el nuevo estándar internacional de las tuberculinas PPD bovinas.

Este nuevo estándar de PPD bovina tuvo que ser calibrado contra el estándar existente de la CEE. En estudios de colaboración internacionales, tanto con cobayas como con ganado bovino, se halló que el nuevo estándar bovino tenía una potencia relativa del 65% respecto al estándar de la CEE. Por tanto, en 1986, la OMS asignó oficialmente al estándar internacional para las tuberculinas PPD bovinas una concentración de 32.500 UI/mg. Esto significa que las unidades provisionales de tuberculina de la Comunidad son igual de potentes que las UI. La Farmacopea Europea también ha reconocido el estándar internacional de la OMS para la PPD.

Con el fin de guardar las existencias del verdadero estándar internacional, es deseable que los países en los que se produce tuberculina PPD establezcan sus propias preparaciones de referencia a nivel nacional de la PPD bovina como estándares de trabajo. Estas preparaciones de referencia a nivel nacional deben haberse calibrado contra el estándar internacional oficial de la PPD, tanto en cobayas como en ganado bovino (Maxlid *et al.*, 1976; Schneider *et al.*, 1979; WHO, 1987).

4.4.1. Estandarización en cobayas

Las cobayas se sensibilizan con una dosis baja (por ejemplo, de 0,001 o 0,0001 mg en peso húmedo) de bacilos vivos de una cepa virulenta de *M. bovis* 5–7 semanas antes de la prueba. Los bacilos se suspenden en solución salina fisiológica, y se lleva a cabo una inyección intramuscular profunda de 1 ml en la cara medial del muslo. En el momento de la prueba, los cobayas infectados con la dosis baja de *M. bovis* deben seguir con buena salud y los resultados de varias exploraciones post-mortem realizadas poco después de las pruebas de estandarización deben mostrar que los cobayas no sufren tuberculosis clínica y, por tanto, que no están excretando bacilos tuberculosos.

Puede utilizarse otra prueba de potencia que no utiliza micobacterias patógenas vivas y es más adecuada para los laboratorios que no tienen zonas de aislamiento para alojar de forma segura cobayas infectados. Además, esta opción es más cómoda en cuanto al bienestar de los

animales de experimentación. Esta prueba de potencia de la tuberculina se lleva a cabo del siguiente modo: la tuberculina PPD se bioanaliza en cobayas sensibilizados de forma homóloga contra el estándar de la tuberculina PPD bovina mediante una prueba de ocho puntos que comprende cuatro diluciones correspondientes a aproximadamente 20, 10, 5 o 2,5 UI. El volumen de inyección es de 0,1 ml. En esta prueba, se comparan dos tuberculinas con la tuberculina estándar en ocho cobayas, aplicando ocho inyecciones intradérmicas por animal y utilizando un diseño en cuadrado latino. Los cobayas se sensibilizan con bacilos inactivados de *M. bovis*, 5 a 7 semanas antes de la prueba. Los bacilos se suspenden en tampón y se introducen en una emulsión con adyuvante incompleto de Freund. Se lleva a cabo una inyección intramuscular profunda en la cara medial del muslo, con una dosis de 0,5 ml.

Una prueba de potencia adecuada sería la siguiente: Las tuberculinas PPD producidas se bioanalizan en cobayas sensibilizados de manera homóloga contra la tuberculina PPD estándar bovina mediante una prueba de seis puntos de inyección formada por tres diluciones cada una de las cuales es cinco veces más concentrada que la anterior. Las diluciones de las preparaciones de tuberculina se llevan a cabo en solución de tampón isotónico con un 0,0005% (p/v) de polisorbato 80 (Tween 80). Se escogen volúmenes de 0,001, 0,0002 y 0,00004 mg de tuberculoproteína correspondientes a los estándares internacionales del PPD de 32, 6,4 y 1,28 UI, respectivamente, porque estas cantidades dan buenas reacciones cutáneas leíbles con límites aceptables. El volumen de inyección es de 0,2 ml. En una prueba, se comparan dos tuberculinas problema con la tuberculina estándar en nueve cobayas, aplicando ocho inyecciones intradérmicas por animal y utilizando un diseño en cuadrado latino con bloques incompletos equilibrados (Finney, 1964).

Normalmente, la lectura de las pruebas se lleva a cabo 24 horas después de la inyección de las tuberculinas, pero puede realizarse una segunda lectura pasadas 48 horas. Se miden los distintos diámetros de eritema con compases de espesor cutáneo en milímetros y se anotan en hojas de prueba. Se lleva a cabo un análisis estadístico de los resultados mediante métodos estadísticos estándar para pruebas de líneas paralelas según Finney (1964). Las potencias relativas de las dos tuberculinas problema se calculan con sus límites de confianza del 95%, las pendientes de las curvas del logaritmo de dosis–respuesta para cada preparación (aumento en la reacción media por cada unidad de aumento en el log de la dosis) y los ratios F para las desviaciones respecto al paralelismo.

Según la Farmacopea Europea, la potencia estimada para las tuberculinas bovinas no debe ser inferior a un 66% ni superior a un 150% de la potencia indicada en la etiqueta.

4.4.2. Estandarización de tuberculina bovina en ganado bovino

Según la Serie de Informes Técnicos de la OMS N° 384, debe llevarse a cabo un análisis de la potencia en la especie animal y en las condiciones en las que las tuberculinas se utilizarán en la práctica (59). Esto implica que las tuberculinas bovinas deben analizarse en ganado bovino tuberculoso infectado de forma natural. Dado que este requisito es difícil de cumplir, las pruebas de potencia se llevan a cabo sistemáticamente en cobayas. No obstante, es necesario un análisis periódico en ganado bovino tuberculoso y las preparaciones estándar siempre requieren una calibración en ganado bovino. La frecuencia de análisis en ganado bovino puede reducirse si es seguro que las preparaciones estándar son representativas de las tuberculinas que se generan de forma habitual y que los procedimientos de producción garantizan una constancia.

Una prueba de potencia adecuada para las tuberculinas bovinas en ganado bovino sería la siguiente: Las tuberculinas problema se analizan contra un estándar de tuberculina PPD bovina mediante una prueba de cuatro puntos de inyección utilizando dos diluciones, una de las cuales es cinco veces más concentrada que la otra. En el caso del estándar, se inyectan 0,1 y 0,02 mg de tuberculoproteína, ya que estos volúmenes corresponden a unas 3.250 y 650 UI si se utiliza el estándar internacional de la tuberculina PPD bovina. Las tuberculinas problema se diluyen de tal forma que se apliquen los mismos pesos de proteína. El volumen de inyección es de 0,1 ml, y la distancia entre los puntos de inyección en la zona cervical media es de 15-20 cm. En una prueba, se comparan tres tuberculinas problema con la tuberculina estándar en ocho cabezas de ganado bovino tuberculoso, aplicando ocho inyecciones intradérmicas por animal a ambos lados del cuello, y utilizando un diseño en cuadrados latinos completo equilibrado. El espesor de la piel en cada punto de inyección se mide con compás de espesor cutáneo en décimas de milímetro, con la mayor exactitud posible, antes de la inyección y 72 horas después de esta (Haagsma *et al.*, 1984).

Se lleva a cabo un análisis estadístico de los resultados utilizando los mismo métodos estándar que para las pruebas de líneas paralelas aplicados en las pruebas de potencia realizadas en cobayas.

4.5. Especificidad

Una prueba de especificidad adecuada sería la siguiente: se analizan tres tuberculinas bovinas problema contra el estándar de la tuberculina PPD aviar (o tres tuberculinas aviares problema contra el estándar de la tuberculina PPD bovina) mediante una prueba de cuatro puntos de inyección en cobayas sensibilizados de manera heteróloga, utilizando dos diluciones de cada tuberculina, una de las cuales es 25 veces más concentrada que la otra. Se escogen las cantidades de 0,03 mg y de 0,0012 mg de tuberculoproteína problema, que corresponden a unas 1.500 y 60 UI, porque estas dosis dan buenas reacciones cutáneas leíbles. Las dosis de inyección del estándar son más bajas, de 0,001 mg y de 0,0004 mg. En una prueba, se comparan tres tuberculinas problema con la tuberculina estándar en ocho cobayas aplicando ocho inyecciones intradérmicas por animal y utilizando un diseño en cuadrados latinos completo equilibrado. La lectura de los resultados y la evaluación estadística son idénticos a los de la prueba de potencia.

4.6. Estabilidad

Siempre que las tuberculinas cumplan las normas legales exigidas para la producción y se guarden a una temperatura de entre 2°C y 8°C y protegidas de la luz, pueden utilizarse hasta la fecha de caducidad como se especifica en la autorización para a producción de tuberculina. Para un almacenaje a largo plazo, se recomienda mantener el PPD en una forma concentrada en lugar de diluida, y el concentrado también debe almacenarse en la oscuridad.

4.7. Control del pH

El pH debe ser de entre 6,5 y 7,5.

4.8. Contenido proteico

El contenido en proteína se determina como se indica en el apartado C.3 Control durante el proceso.

4.9. Almacenaje

Durante el almacenaje, la tuberculina bovina líquida debe protegerse de la luz y mantenerse a una temperatura de $5\pm 3^{\circ}\text{C}$. La congelación del producto líquido puede comprometer la calidad. No obstante, pueden prepararse preparaciones liofilizadas y almacenarse a temperaturas más altas (pero no a más de 25°C); deben estar protegidas de la luz. Los periodos de exposición a temperaturas superiores o a la luz solar directa deben ser lo más cortos posible.

4.10 Conservantes

Debe demostrarse que los conservantes antimicrobianos u otras sustancias que puedan añadirse a una tuberculina no afectan a la seguridad ni a la eficacia del producto.

La concentración máxima permitida para el fenol es del 0,5% (p/v), y para el glicerol, del 10% (v/v).

4.11 Precauciones (peligros)

Los estudios realizados tanto en seres humanos como en animales han permitido observar que la tuberculina adecuadamente diluida, inyectada por vía intradérmica, da lugar a una reacción localizada en el punto de inyección sin signos generalizados. Incluso en individuos muy sensibles, es muy infrecuente que aparezcan reacciones graves generalizadas, y estas son muy pequeñas. Pero la experiencia ha mostrado que un técnico hipersensible puede desarrollar signos graves generalizados tras un contacto intradérmico accidental (herida por pinchazo con una aguja) con tuberculina bovina. A estas personas se les debe aconsejar no llevar a cabo la prueba intradérmica de la tuberculina con la dosis alta de 2.000-5.000 UI de tuberculina, que es unas 1.000 veces la dosis humana normal de 5 UI.

5. Pruebas con el producto final

5.1. Inocuidad

Debe llevarse a cabo una prueba de ausencia de propiedades tóxicas o irritantes (véase el apartado C.4.2).

5.2. Potencia

La potencia de las tuberculinas debe estimarse mediante métodos biológicos. Estos métodos deben utilizarse para las tuberculinas HC5M y PPD; se basan en la comparación de las tuberculinas problema con una preparación estándar de referencia de tuberculina del mismo tipo (véase también el apartado C.4.4).

BIBLIOGRAFÍA

- ANGUS R.D. (1978). Production of reference PPD tuberculins for veterinary use in the United States. *J. Biol. Stand.*, **6**, 221.
- ANIMAL HEALTH DIVISION (NEW ZEALAND) (1986). Possum research and cattle tuberculosis. *Surveillance*, **13**, 18–38.
- ARANAZ A., COUSINS D., MATEOS A. & DOMINIGUEZ L. (2003). Elevation of *Mycobacterium tuberculosis* subsp. *caprae* Aranaz *et al.* 1999 to species rank as *Mycobacterium caprae* comb. nov., sp. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, **53**, 1785–1789.
- BENGIS R.G., KRIEK N.P.J., KEET D.F., RAATH J.P., DE VOS V. & HUCHZERMAYER H.F.A.K. (1996). An outbreak of tuberculosis in a free-living African buffalo (*Syncerus caffer*, Sparrman) population in the Kruger National Park: A preliminary report. *Onderstepoort J. Vet. Res.*, **63**, 15.
- BROSCH R., GODON S.V., MARMESSE M., BRODIN P., BUCHRIESER C., EIGLMEIER K., GARNIER T., GUTIERREZ C., HEWINSON G., KREMER K., PARSONS L.M., PYM A.S., SAMPER S., VAN SOOLINGEN D. & COLE S.T. (2002). A new evolutionary scenario for the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **99**, 3684–3689.
- BUDDLE B.M., PARLANE N.A., KEEN D.L., ALDWELL F.E., POLLOCK J.M., LIGHTBODY K. & ANDERSEN P. (1999). Differentiation between *Mycobacterium bovis* BCG-vaccinated and *M. bovis*-infected cattle by using recombinant mycobacterial antigens. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.*, **6**, 1–5.
- BUDDLE B.M., RYAN T.J., POLLOCK J.M., ANDERSON P. & DE LISLE G.W. (2001). Use of ESAT-6 in the interferon-gamma test for diagnosis of bovine tuberculosis following skin testing. *Vet. Microbiol.*, **80**, 37–46.
- CLIFTON-HADLEY R.S. & WILESMITH J.W. (1991). Tuberculosis in deer: a review. *Vet. Rec.*, **129**, 5–12.
- COAD M., HEWINSON R.G., CLIFFORD D., VORDERMEIER H.M. & WHELAN A.O. (2007). Influence of skin testing and blood storage on interferon-gamma production in cattle affected naturally with *Mycobacterium bovis*. *Vet. Rec.*, **160**, 660–662.
- COCKLE P.J., GORDON S.V., HEWINSON R.G. & VORDERMEIER H.M. (2006). Field evaluation of a novel differential diagnostic reagent for detection of *Mycobacterium bovis* in cattle. *Clin. Vaccine Immunol.*, **13**, 1119–1124.
- COLE S.T., BROSCH R., PARKHILL J., GARNIER T., CHURCHER C., HARRIS D., GORDON S.V., EIGLMEIER K., GAS S., BARRY C.E. 3RD, TEKAIA F., BADCOCK K., BASHAM D., BROWN D., CHILLINGWORTH T., CONNOR R., DAVIES R., DEVLIN K., FELTWELL T., GENTLES S., HAMLIN N., HOLROYD S., HORNSBY T., JAGELS K., KROGH A., MCLEAN J., MOULE S., MURPHY L., OLIVER K., OSBORNE J., QUAIL M.A., RAJANDREAM M.A., ROGERS J., RUTTER S., SEEGER K., SKELTON J., SQUARES R., SQUARES S., SULSTON J.E., TAYLOR K., WHITEHEAD S. & BARRELL B.G. (1998). Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. *Nature*, **393**, 537–544.
- CORNER L.A.L. (2006). The role of wild animal populations in the epidemiology of tuberculosis in domestic animals: how to assess the risk. *Vet. Microbiol.*, **112**, 303–312.
- COUSINS D.V. (2001). *Mycobacterium bovis* infection and control in domestic livestock. *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.*, **20**, 71–85.

- COUSINS D.V., BASTIDA R., CATALDI A., QUSE V., REDROBE S., DOW S., DUIGNAN P., MURRAY A., DUPONT C., AHMED A., COLLINS D.M., BUTLER W.R., DAWSON D., RODRIGUEZ D., LOUREIRO J., ROMANO M.I., ALITO A., ZUMARRAGA M. & BERNARDELLI A. (2003). Tuberculosis in seals caused by a novel member of the *Mycobacterium tuberculosis* complex: *Mycobacterium pinnipedii* sp. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, **53**, 1305–1314.
- COUSINS D.V. & FLORISSON N. (2005). A review of tests available for use in the diagnosis of tuberculosis in non-bovine species. *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.*, **24**, 1039–1059.
- COUSINS D.V., FRANCIS B.R. & GOW B.L. (1989). Advantages of a new agar medium in the primary isolation of *Mycobacterium bovis*. *Vet. Microbiol.*, **20**, 89–95.
- COUSINS D.V., SKUCE R.A., KAZWALA R.R. & VAN EMBDEN J.D.A. (1998). Towards a standardized approach to DNA fingerprinting of *Mycobacterium bovis*. *Int. J. Tuberc. Lung Dis.*, **2**, 471–478.
- DE LISLE G.W., MACKINTOSH C.G. & BENGIS R.G. (2001). *Mycobacterium bovis* in free-living and captive wildlife, including farmed deer. *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.*, **20**, 86–111.
- DURR P.A., CLIFTON-HADLEY R.S. & HEWINSON R.G. (2000a). Molecular epidemiology of bovine tuberculosis. II. Applications of genotyping. *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.*, **19**, 689–701.
- DURR P.A., HEWINSON R.G. & CLIFTON-HADLEY R.S. (2000b). Molecular epidemiology of bovine tuberculosis. I. *Mycobacterium bovis* genotyping. *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.*, **19**, 675–688.
- ESPINOSA DE LOS MONTEROS L.E., GALAN J.C., GUTIERREZ M., SAMPER S., GARCIA MARIN J.F., MARTIN C., DOMINGUEZ L., DE RAFAEL L., BAQUERO F., GOMEZ-MAMPASO E. & BLAZQUEZ J. (1998). Allele-specific PCR method based on *pncA* and *oxyR* sequences for distinguishing *Mycobacterium bovis* from *M. tuberculosis*: intraspecific *M. bovis pncA* sequence polymorphism. *J. Clin. Microbiol.*, **36**, 239–242.
- EUROPEAN UNION (1980). Council Directive 80/219, amending Directive 64/432, Annex B.
- FINNEY D.J. (1964). *Statistical Methods in Biological Assays*, Second Edition. Charles Griffin, London, UK.
- FROTHINGHAM R. & MEEKER-O'CONNELL W.A. (1998). Genetic diversity in the *Mycobacterium tuberculosis* complex based on variable numbers of tandem. *Microbiology*, **144**, 1189–1196.
- GARNIER T., EIGLMEIER K., CAMUS J.C., MEDINA N., MANSOOR H., PRYOR M., DUTHOY S., GRONDIN S., LACROIX C., MONSEMPE C., SIMON S., HARRIS B., ATKIN R., DOGGETT J., MAYES R., KEATING L., WHEELER P.R., PARKHILL J., BARRELL B.G., COLE S.T., GORDON S.V., HEWINSON R.G. (2003). The complete genome sequence of *Mycobacterium bovis*. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **100**, 7877–7882.
- GORMLEY E., DOYLE M.B., FITZSIMONS T., MCGILL K. & COLLINS J.D. (2006). Diagnosis of *Mycobacterium bovis* infection in cattle by use of the gamma-interferon (Bovigam) assay. *Vet. Microbiol.*, **112**, 171–179.
- GREENWALD R., ESFANDIARI J., LESELLIER S., HOUGHTON R., POLLOCK J., AAGAARD C., ANDERSEN P., HEWINSON R.G., CHAMBERS M. & LYASHCHENKO K. (2003). Improved serodetection of *Mycobacterium bovis* infection in badgers (*Meles meles*) using multiantigen test formats. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.*, **46**, 197–203.
- GREENWALD R., LYASHCHENKO O., ESFANDIARI J., MILLER M., MIKOTA S., OLSEN J.H., BALL R., DUMONCEAUX G., SCHMITT D., MOLLER T., PAYEUR J.B., HARRIS B., SOFRANKO D., WATERS W.R. & LYASHCHENKO K.P. (2009). Highly accurate antibody assays for early and rapid detection of tuberculosis in African and Asian elephants. *Clin. Vaccine Immunol.*, **16**, 605–612.
- GRIFFIN J.F.T., CROSS J.P., CHINN D.N., ROGERS C.R. & BUCHAN G.S. (1994). Diagnosis of tuberculosis due to *M. bovis* in New Zealand red deer (*Cervus elaphus*) using a composite blood test (BTB) and antibody (ELISA) assays. *N.Z. Vet. J.*, **42**, 173–179.
- GRIFFIN J.F.T., HESKETH J.B., MACKINTOSH C.G., SHI Y.E. & BUCHAN G.S. (1993). BCG vaccination in deer: distinctions between delayed type hypersensitivity and laboratory parameters of immunity. *Immunol. Cell Biol.*, **71**, 559–570.
- HAAGSMA J. (1993). Working Paper on Recent Advances in the Field of Tuberculosis Control and Research. World Health Organization Meeting on Zoonotic Tuberculosis with Particular Reference to *Mycobacterium bovis*, 15 November 1993, Geneva, Switzerland.

HAAGSMA J. & ANGUS R.D. (1994). Tuberculin production. In: *Mycobacterium bovis* Infections in Humans and Animals, Steele J.H. & Thoen C.O., eds. Iowa State University Press, Ames, Iowa, USA.

HAAGSMA J., O'REILLY L.M., DOBBELAAR R. & MURPHY T.M. (1984). A comparison of the relative potencies of various bovine PPD tuberculins in naturally infected tuberculous cattle. *J. Biol. Stand.*, **10**, 273.

HEIFETS L.B. & JENKINS P.A. (1998). Speciation of *Mycobacterium* in clinical laboratories. In: *Mycobacteria I. Basic Aspects*, Gangadharam P.R. & Jenkins P.A., eds. Chapman and Hall, New York, USA, 308–350.

HUARD R.C., DE OLIVEIRA LAZZARINI L.C., BUTLER W.R., VAN SOOLINGEN D. & HO J.L. (2003). PCR-based method to differentiate the subspecies of the *Mycobacterium tuberculosis* complex on the basis of genomic deletions. *J. Clin. Microbiol.*, **41**, 1637–1650.

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.

LYASHCHENKO K.P., GREENWALD R., ESFANDIARI J., CHAMBERS M.A., VICENTE J., GORTAZAR C., SANTOS N., CORREIA-NEVES M., BUDDLE B.M., JACKSON R., O'BRIEN D.J., SCHMITT S., PALMER M.V., DELAHAY R.J. & WATERS W.R. (2008). Animal-side serologic assay for rapid detection of *Mycobacterium bovis* infection in multiple species of free-ranging wildlife. *Vet. Microbiol.*, **132**, 283–292.

LYASHCHENKO K., WHELAN A.O., GREENWALD R., POLLOCK J.M., ANDERSEN P., HEWINSON R.G. & VORDERMEIER H.M. (2004). Association of tuberculin-boosted antibody responses with pathology and cell-mediated immunity in cattle vaccinated with *Mycobacterium bovis* BCG and infected with *M. bovis*. *Infect. Immun.*, **72**, 2462–2467.

MAXILD J., BENTZON M.W., MOLLER S. & ZACHARIASSEN P. (1976). Assays of different tuberculin products performed in guinea pigs. *J. Biol. Stand.*, **4**, 171.

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 organisms. *Vet. Microbiol.*, **87**, 15–23.

MILLER J., JENNY A., RHGYAN J., SAARI D. & SAUREZ D. (1997). Detection of *Mycobacterium bovis* in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues of cattle and elk by PCR amplification of an IS6110 sequence specific for *M. tuberculosis* complex organisms. *J. Vet. Diagn. Invest.*, **9**, 244–249.

MORRIS R.S., PFEIFFER D.U. & JACKSON R. (1994). The epidemiology of *Mycobacterium bovis* infections. *Vet. Microbiol.*, **40**, 153–157.

NARANJO V., GORTAZAR C., VICENTE J. & DE LA FUENTE J. (2008). Evidence of the role of European wild boar as a reservoir of *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Vet. Microbiol.*, **127**, 1–9.

NIEMANN S., HARMSSEN D., RUSCH-GERDES S. & RICHTER E. (2000). Differentiation of clinical *Mycobacterium tuberculosis* complex isolates by *gyrB* DNA sequence polymorphism analysis. *J. Clin. Microbiol.*, **38**, 3231–3234.

NOREDHOEK G.T., VAN EMBDEN J.D.A. & KOLK A.H.J. (1996). Reliability of nucleic acid amplification for detection of *Mycobacterium tuberculosis*: an international collaborative quality control study among 30 laboratories. *J. Clin. Microbiol.*, **34**, 2522–2525.

O'BRIAN R., DANILOWICZ B.S., BAILEY L., FLYNN O., COSTELLO E., O'GRADY D. & RODGERS M. (2000). Characterisation of the *Mycobacterium bovis* restriction fragment length polymorphism DNA probe pUCD and performance comparison with standard methods. *J. Clin. Microbiol.*, **38**, 3362–3369.

O'REILLY L.M. & DABORN C.J. (1995). The epidemiology of *Mycobacterium bovis* infections in animals and man: a review. *Tubercle Lung Dis.* (Supple. 1), **76**, 1–46.

PARSONS L.M., BROSCHE R., COLE S.T., SOMOSKOVI A., LODER A., BRETZEL G., VAN SOOLINGEN D., HALE Y.M. & SALFINGER M. (2002). Rapid and simple approach for identification of *Mycobacterium tuberculosis* complex isolates by PCR-based genomic deletion analysis. *J. Clin. Microbiol.*, **40**, 2339–2345.

PRODINGER W.M., BRANDSTATTER A., NAUMANN L., PACCIARINI M., KUBICA T., BOSCHIROLI M.L., ARANAZ A., NAGY G., CVETNIC Z., OCEPEK M., SKRYPNYK A., ERLER W., NIEMANN S., PAVLIK I. & MOSER I. (2005). Characterization of

Mycobacterium caprae isolates from Europe by mycobacterial interspersed repetitive unit genotyping. *J. Clin. Microbiol.*, **43**, 4984–4992.

RYAN T.J., BUDDLE B.M. & DE LISLE G.W. (2000). An evaluation of the gamma interferon test for detecting bovine tuberculosis in cattle 8 to 28 days after tuberculin skin testing. *Res. Vet. Sci.*, **69**, 57–61.

SCHNEIDER W., DOBBELAER R., DAM A., JORGENSEN J.B., GAYOT G., AUGIER J., HAAGSMA J., REES W.H.G., LESSLIE I.W. & HEBERT C.N. (1979). Collaborative assay of EEC standards for bovine tuberculins. *J. Biol. Stand.*, **7**, 53.

SIDDERS B., PIRSON C., HOGARTH P.J., HEWINSON R.G., STOKER N.G., VORDERMEIER H.M. & EWER K. (2008). Screening of highly expressed mycobacterial genes identifies Rv3615c as a useful differential diagnostic antigen for the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Infect. Immun.*, **76**, 3932–3939.

SKINNER M.A., WEDLOCK D.N. & BUDDLE B.M. (2001). Vaccination of animals against *Mycobacterium bovis*. *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.*, **20**, 112–132.

SKUCE R.A., BRITAIN D, HUGHES M.S. & NEILL S.D. (1996). Differentiation of *Mycobacterium bovis* isolates from animals by DNA typing. *J. Clin. Microbiol.*, **38**, 2469–2474.

SUPPLY P., MAZARS E., LESJEAN S., VINCENT V., GICQUEL B. & LOCHT C. (2000). Variable human minisatellite-like regions in the *Mycobacterium tuberculosis* genome. *Mol. Microbiol.*, **36**, 762–771.

VORDERMEIER H.M., WHELAN A., COCKLE P.J., FARRANT L., PALMER N. & HEWINSON R.G. (2001). Use of synthetic peptides derived from the antigens ESAT-6 and CFP-10 for differential diagnosis of bovine tuberculosis in cattle. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.*, **8**, 571–578.

WILESMITH J.W. (1991). Epidemiological methods for investigating wild animal reservoirs of animal disease. *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.*, **10**, 205–214.

WOOD P.R., CORNER L.A. & PLACKETT P. (1990). Development of a simple, rapid in vitro cellular assay for bovine tuberculosis based on the production of gamma interferon. *Res. Vet. Sci.*, **49**, 46–49.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO) (1987). Requirements for Biological Substances No. 16, Annex 1: Requirements for Tuberculins. Technical Report Series No. 745, WHO, Geneva, Switzerland, 31–59.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO)/FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS (FAO)/OFFICE INTERNATIONAL DES EPIZOOTIES (OIE) (1994). Report on Consultation on Animal Tuberculosis Vaccines. WHO, Veterinary Public Health Unit, Geneva. WHO/CDS/VPH/94.138.

*
* *

NB: Existen Laboratorios de Referencia de la OIE para la tuberculosis bovina (consúltese la lista más actualizada en la tabla de la Parte 4 de este *Manual Terrestre* o la página web de la OIE: <http://www.oie.int/es/nuestra-experiencia-cientifica/laboratorios-de-referencia/lista-des-laboratorios/>).

Para más información sobre las pruebas de diagnóstico, los reactivos y las vacunas para la tuberculosis bovina, por favor contacte con los Laboratorios de Referencia de la OIE.

NB: ADOPTADO POR PRIMERA VEZ EN 1989; ÚLTIMAS ACTUALIZACIONES ADOPTADAS EN 2009.