

## PARATUBERCULOSIS (enfermedad de Johne)

---

### RESUMEN

**Descripción de la enfermedad:** La paratuberculosis (enfermedad de Johne) es una enteritis crónica de los rumiantes causada por *Mycobacterium avium subesp. paratuberculosis* (MAP).

El diagnóstico de la paratuberculosis se realiza en base a datos clínicos confirmados por la demostración de MAP en las heces mediante microscopía, cultivo o sondas de ADN y la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). El diagnóstico se realiza a partir de la necropsia por el hallazgo de las lesiones patognomónicas de la enfermedad en el intestino, ya sea a simple vista con la visualización de los microorganismos acidorresistentes característicos en frotis de impronta de lesiones, o histológicamente, y por aislamiento de MAP en cultivo.

**Detección del agente:** El diagnóstico de la paratuberculosis se divide en dos partes: el diagnóstico de la enfermedad clínica y la detección de la infección subclínica. Esto último es esencial para el control de la enfermedad en las explotaciones ganaderas en cualquier país.

La detección de la infección subclínica se realiza mediante la detección serológica de anticuerpos específicos, mediante cultivos de MAP procedentes de heces o tejidos recogidos en la necropsia, PCR o por la detección de una respuesta celular. La elección de la prueba depende de las circunstancias y el grado de sensibilidad y especificidad requeridos en el individuo o en el rebaño.

Los cultivos de MAP se pueden obtener a partir de las heces o tejidos, después del tratamiento descontaminante, mediante la inoculación en medios artificiales con o sin el factor de crecimiento específico – micobactina – que es esencial para el crecimiento de MAP.

**Pruebas serológicas:** El control de la paratuberculosis es difícil debido a su curso crónico, la naturaleza fundamentalmente subclínica de la enfermedad y la falta de pruebas para una detección adecuada de la infección subclínica en los animales infectados.

Las prueba serológica más habitual para la paratuberculosis en el ganado bovino es el enzimoimmunoanálisis (ELISA). La inmunodifusión en gel de agar (AGID) sigue siendo una prueba útil para la detección de la paratuberculosis en ovejas. La sensibilidad y la especificidad se determinan en función de los resultados del cultivo de las heces, que posee una sensibilidad incierta en el ganado bovino infectado subclínicamente. El ELISA es muy adecuado para confirmar el diagnóstico de la paratuberculosis en las vacas con signos clínicos característicos.

**Pruebas de inmunidad celular:** Se ha utilizado la prueba de liberación de interferón gama y métodos de hipersensibilidad retardada (prueba cutánea), pero la interpretación es difícil en ambos casos.

**Requisitos para las vacunas y el material biológico de diagnóstico:** En la fabricación de las vacunas para la paratuberculosis pueden emplearse bacterias vivas atenuadas o muertas a las que se les incorpora un adyuvante o bien se liofilizan y se les añade el adyuvante durante la reconstitución. El recuento celular es difícil y el contenido bacteriano de las vacunas se puede basar en el peso, mientras que la potencia de la vacuna puede estimarse mediante un conjunto de pruebas de desarrollo de la capacidad sensibilizante, empleando cobayas.

La seguridad de la vacuna o su anormal toxicidad también pueden analizarse en cobayas.

Para las pruebas diagnósticas cutáneas, se emplean la tuberculina johnina y aviar, que son derivados proteicos purificados (PPD) de cultivos tratados por calor de MAP o *M. avium*,

respectivamente. El contenido de PPD en la johnina está estandarizado mediante ensayos químicos, y su actividad biológica se identifica en cobayas sensibilizados con MAP. La actividad de la tuberculina aviar se determina en cobayas sensibilizados con *M. avium* mediante su comparación con una preparación de referencia calibrada en unidades internacionales.

## A. INTRODUCCIÓN

*Mycobacterium avium* subespecie *paratuberculosis* (MAP) es un microorganismo que fue observado por primera vez por Johne & Frothingham en 1895. MAP causa la paratuberculosis o enfermedad de Johne, que es una infección granulomatosa intestinal (Thorel *et al.*, 1990). La paratuberculosis se encuentra muy a menudo en los rumiantes domésticos (ganado bovino, ovejas, cabras, camélidos y búfalos) y salvajes (cérvidos) y presenta una distribución mundial. También se ha descrito la enfermedad en caballos, asnos, cerdos, conejos, armiños, zorros y comadrejas (Greig *et al.*, 1999). En condiciones naturales, la enfermedad en las vacas se transmite mediante la ingestión de MAP a partir del ambiente contaminado. La enfermedad persiste después de la introducción de los animales infectados. La infección puede transmitirse verticalmente al feto (Larson & Kopecky, 1970) y el semen puede infectarse con el microorganismo (Sweeney *et al.*, 1995). La fuente primaria de contagio en los terneros son las heces procedentes de las vacas infectadas o la leche contaminada con las heces de los bóvidos enfermos. Las cepas aisladas de ovejas tienen características distintas de las de las aisladas en ganado bovino, pero los métodos de detección y de diagnóstico en laboratorio son los mismos.

La identificación de MAP se basa en su exigencia de que el medio contenga micobactina y en su asociación a signos clínicos y a hallazgos de laboratorio definidos, como determinados resultados de cultivo y de PCR. La dependencia de micobactina se ha utilizado ampliamente como una característica taxonómica de MAP, porque la mayoría de las micobacterias son capaces de sintetizar micobactina. Sin embargo, MAP, *M. silvaticum* y algunas cepas primarias de *M. avium* carecen de esta capacidad y requieren micobactina para crecer en el laboratorio. Así, la exigencia de micobactina no es exclusiva de MAP; esta característica existe en diferentes grados dentro del grupo de *M. avium*.

Los signos clínicos de la paratuberculosis son debilitamiento lento y progresivo y trastornos diarreicos, que son intermitentes al principio y se hacen progresivamente más intensos hasta su presencia constante en los bovinos. También se ha observado como signo clínico destacado en ciervos de granja. La diarrea es menos común en los rumiantes pequeños.

En las etapas tempranas de la infección, las lesiones se encuentran restringidas a las paredes del intestino delgado y provocan el drenaje de los ganglios linfáticos mesentéricos. Cuando progresa la enfermedad, aparecen lesiones macroscópicas en el íleon, yeyuno, intestino delgado terminal, ciego y colon y en los ganglios linfáticos mesentéricos. MAP está presente en las lesiones y, finalmente, por todo el cuerpo. Las lesiones intestinales son responsables de la pérdida de proteínas y del síndrome de malabsorción proteica, lo que conduce a un desgaste muscular. Los signos clínicos habitualmente aparecen primero en la etapa adulta temprana, pero la enfermedad puede presentarse en los animales a cualquier edad por encima de 1–2 años y en el ganado bovino lechero es más habitual en el grupo de edad de entre 3 y 5 años.

Tras varias semanas de infección, comienza una fase de multiplicación de MAP en las paredes del intestino delgado. Dependiendo de la resistencia natural del individuo, se elimina esa infección o el animal permanece infectado como portador asintomático. Se desconoce la proporción de animales en esos estados. Una última fase de la multiplicación de los microorganismos en una proporción de portadores se caracteriza por la extensión de las lesiones, la interferencia con el metabolismo intestinal y los signos clínicos de la enfermedad. Los portadores subclínicos excretan un número variable de MAP en las heces. En la mayoría de los casos, se excreta un gran número de microorganismos cuando se desarrolla la enfermedad clínica.

Las respuestas inmunitarias celulares (CMI) se detectan tempranamente durante la infección y permanecen presentes en parte de los portadores asintomáticos, pero cuando la enfermedad progresa, la CMI decrece y puede estar ausente en los casos clínicos. Los anticuerpos séricos se detectan con posterioridad a la CMI. También pueden estar presentes en los animales que se han recuperado de la infección. Los anticuerpos séricos están presentes de forma más constante y son de mayor título cuando las lesiones se extienden, reflejando la cantidad de antígeno presente. En las ovejas, puede haber una respuesta serológica que es más fácilmente detectable en la forma multibacilar de la enfermedad que en la que presenta pocos bacilos.

Otras enfermedades e infecciones micobacterianas, incluida la tuberculosis de los mamíferos y las aves, estimula la CMI y la presencia de anticuerpos séricos. Por tanto, es necesario diferenciar estas enfermedades de la paratuberculosis, tanto clínicamente como mediante la utilización de pruebas diagnósticas específicas. La exposición a las micobacterias saprófitas del ambiente puede también sensibilizar al ganado, provocando CMI inespecíficas.

Los animales vacunados contra la paratuberculosis con vacunas preparadas con células enteras desarrollan tanto CMI como anticuerpos séricos. La vacunación ayuda a prevenir la enfermedad clínica pero no evita necesariamente la infección. También interfiere con los programas de diagnóstico y de control de la tuberculosis bovina. Así, si se necesita diagnosticar la infección en los vacunados, es aconsejable utilizar solo pruebas que detecten el antígeno MAP en muestras de heces o tejidos.

En animales individuales, especialmente en los procedentes de una explotación ganadera en la que previamente no se ha diagnosticado la enfermedad, un diagnóstico clínico presuntivo puede confirmarse mediante pruebas de laboratorio. Sin embargo, el diagnóstico definitivo puede justificarse en base a datos clínicos sólo si los signos clínicos son típicos y se reconoce que la enfermedad está presente en el rebaño. La confirmación de la paratuberculosis depende del descubrimiento de lesiones macroscópicas con la detección de los típicos microorganismos ácido-resistentes en los frotis de impronta o por la aparición de las lesiones patognomónicas microscópicas y el aislamiento en cultivo de MAP.

Tanto el microorganismo MAP como las muestras que puedan estar infectadas deben manipularse a un nivel de bioseguridad y biocontención adecuado, que vendrá determinado por un análisis del riesgo biológico según se describe en 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*.

## B. TÉCNICAS DE DIAGNÓSTICO

**Tabla 1.** Métodos analíticos disponibles para el diagnóstico de la paratuberculosis y su propósito

Método	Propósito					
	Demostrar ausencia de infección en la población	Demostrar ausencia de infección en animales individuales antes de los desplazamientos	Contribuir a las políticas de erradicación	Confirmar casos clínicos	Determinar la prevalencia de la infección – vigilancia	Determinar el estado inmunitario en animales o poblaciones tras la vacunación
<b>Detección del agente<sup>1</sup></b>						
Histopatología*	+	–	+	+++	–	–
Tinción fecal por ZN	–	–	–	+	–	–
Cultivo	–	+	+	+++	+	–
PCR	+++	+++	+	++	+	–
<b>Detección de respuesta inmunitaria<sup>2</sup></b>						
AGID**	++	+	+	++	+++	+++
ELISA	+++	+++	+++	+	+++	+++
Prueba de liberación de IFN-γ	–	–	+	–	–	+++
DTH	–	–	+	–	–	+++

Clave: +++ = método recomendado para este propósito; ++ = método recomendado pero con limitaciones; + = adecuado en muy pocas circunstancias; – = no adecuado para este propósito;

\* = solo puede utilizarse post-mortem; \*\* = apropiado para ser utilizado en ovejas y cabras. ZN = Ziehl–Neelsen; PCR = reacción en cadena de la polimerasa; AGID = inmunodifusión en gel de agar; ELISA = enzimoimmunoanálisis; IFN-γ = interferón gama; DTH = prueba de hipersensibilidad retardada.

1 Se recomienda una combinación de métodos de identificación del agente en una misma muestra clínica.

2 Se recomienda una combinación de pruebas serológicas de la lista.

Para diagnosticar la presencia de la paratuberculosis en un animal individual clínicamente sospechoso, pueden utilizarse varias pruebas de laboratorio que incluyen: frotis fecales, cultivos fecales y de tejidos, sondas de ADN que emplean materiales fecales o tejidos, pruebas serológicas y pruebas de necropsia e histológicas (Tabla 1).

En los rebaños se llevan a cabo pruebas de detección de la infección subclínica para determinar la prevalencia de la infección, normalmente con la finalidad de establecer medidas de control. Como ninguna prueba es sensible o específica al 100%, el control de la enfermedad por eliminación de animales con resultado positivo se realiza con pruebas repetidas a intervalos de 6 meses o de un año durante varios años y la eliminación de los animales con resultado positivo a las pruebas serológicas o las deposiciones fecales; también se considera prudente la separación de la descendencia de las hembras positivas. Incluso estos procedimientos no siempre tienen éxito salvo que haya cambios en los hábitos de higiene y en el manejo del ganado para reducir la transmisión de la infección en el rebaño. También pueden aplicarse estrategias analíticas similares con pruebas repetidas a nivel de rebaño en el contexto de programas de control, con el fin de estimar la probabilidad de ausencia de infección a nivel del rebaño y, por lo tanto, para identificar rebaños de bajo riesgo para un comercio más seguro.

## 1. Detección del agente

### 1.1. Necropsia

La paratuberculosis no se puede diagnosticar a través de un examen superficial de los intestinos buscando signos de engrosamiento. Los intestinos deben abrirse desde el duodeno al recto para exponer la mucosa. No siempre existe una relación estrecha entre la gravedad de los signos clínicos y la extensión de las lesiones intestinales. Se inspecciona la mucosa, especialmente la del íleon terminal, para comprobar si presenta el plegamiento y el engrosamiento patognomónicos. Las lesiones tempranas se ven manteniendo el intestino hacia la luz; entonces pueden visualizarse las placas discontinuas. En los ciervos con paratuberculosis se ha observado hiperemia, erosiones y petequias en las mucosas. Las primeras lesiones se manifiestan como el engrosamiento y el encadenamiento de los vasos linfáticos. Los ganglios linfáticos mesentéricos se encuentran habitualmente prominentes y edematosos. Es habitual ver lesiones caseosas y/o calcificadas en los ganglios linfáticos mesentéricos de cabras y, en menor medida, de ovejas (Fodstad & Gunnarsson, 1979). Los frotis de la mucosa afectada y los cortes superficiales de los ganglios linfáticos pueden teñirse por el método de Ziehl-Neelsen y examinarse microscópicamente para comprobar si hay microorganismos ácido-resistentes con la morfología característica de *MAP*. Sin embargo, los microorganismos ácido-resistentes no están presentes en todos los casos. Es, por tanto, mejor confirmar el diagnóstico recogiendo múltiples muestras de la pared intestinal y de los ganglios linfáticos mesentéricos en un fijador (solución salina con formol al 10%) para el subsiguiente examen histológico. Deben examinarse los cortes teñidos con hematoxilina-eosina y los cortes teñidos según el método de Ziehl-Neelsen. Las lesiones típicas de la paratuberculosis consisten en la infiltración de la mucosa y submucosa intestinal, las placas de Peyer y el córtex de los ganglios linfáticos mesentéricos con grandes macrófagos, también conocidos como células epiteloideas, y células multinucleadas gigantes, en las que se encuentran habitualmente, pero no invariablemente, bacilos ácido-resistentes en agregados o de forma aislada.

### 1.2. Bacteriología (microscopía)

Se examinan al microscopio frotis fecales o de mucosa intestinal teñidos según el método de Ziehl-Neelsen. Se puede diagnosticar la paratuberculosis de modo preliminar si se encuentran agregados (tres o más microorganismos) de bacilos ácido-resistentes pequeños (0,5–1,5  $\mu\text{m}$ ) y fuertemente teñidos. La presencia de bacilos ácido-resistentes aislados en ausencia de agregados es un resultado dudoso. La desventaja de esta prueba es que no permite la diferenciación con otras especies de micobacterias y sólo una pequeña proporción de casos puede confirmarse mediante el examen microscópico de una muestra fecal única.

### 1.3. Bacteriología (cultivo)

El aislamiento de *MAP* de un animal proporciona un diagnóstico definitivo de infección por el microorganismo. Aunque el cultivo es técnicamente difícil y su realización requiere tiempo, es la única prueba que no da falsos positivos en sus resultados (100% de especificidad). No obstante, debido al posible fenómeno de la contaminación, teóricamente es posible que el cultivo fecal de animales no infectados en instalaciones contaminadas dé falsos positivos (Nielsen & Toft, 2008).

El cultivo fecal está ampliamente considerado como el método de referencia para el diagnóstico de la paratuberculosis en animales vivos (animales afectados). En realidad, el cultivo fecal es capaz de detectar la mayoría de los animales en un estado avanzado de la enfermedad, pero solo unos cuantos en la fases iniciales de la infección (Nielsen & Toft, 2008). Según las condiciones, la sensibilidad del

cultivo fecal es del 70% en el ganado bovino afectado, del 74% en el ganado bovino infeccioso y del 23-29% en el ganado bovino infectado. El cultivo de muestras bovinas, ovinas y caprinas para *MAP* es más sensible que el examen histopatológico (Fodstad & Gunnarsson, 1979; Koh *et al.*, 1988; Whittington *et al.*, 1999).

Existen varios métodos de cultivo que varían respecto a los medios y a los protocolos del procesamiento de las muestras. El cultivo de *MAP* se realiza siempre empleando medios especiales suplementados con micobactina J, que se comercializa.

En las muestras fecales y de tejido intestinal, *MAP* está superado en cantidad por otras bacterias y hongos. El aislamiento efectivo de *MAP* a partir de tales muestras depende de la eficacia en la inactivación de estos microorganismos no deseados. Un método óptimo de descontaminación debe tener el menor efecto inhibitor posible sobre el crecimiento de *MAP*. Con los protocolos rutinarios de descontaminación se logra un descenso en el número de *MAP* aislados por muestra, cercano a 2,7 log<sub>10</sub> y 3,1 log<sub>10</sub> en las heces y los tejidos, respectivamente.

Hay dos métodos básicos de descontaminación de la muestra: el método en el que se emplea ácido oxálico y NaOH para la descontaminación y el medio Löwenstein–Jensen (LJ) para el crecimiento, y el método en el que se emplea cloruro de hexadecilpiridinio (HPC) para la descontaminación en combinación con medios sólidos como el medio de yema de huevo de Herrold (HEYM) o el medio Middlebrook 7H10 y medios líquidos como Middlebrook 7H9 o equivalentes comerciales para el crecimiento. Aunque se ha publicado que la HEYM proporciona un mejor crecimiento de las cepas bovinas de *MAP* que el medio LJ, los estudios más recientes han demostrado que algunas cepas crecen mejor en un medio LJ o Middlebrook. La ventaja del medio 7H10 es que tolera mejor el crecimiento de cepas ovinas que el medio HEYM. Se ha observado que los medios líquidos son más sensibles que los sólidos tanto para las cepas ovinas como para las bovinas.

Las colonias primarias de *MAP* en medio sólido suelen aparecer entre 5 semanas y 6 meses después de la inoculación. Las cepas derivadas de oveja, incluidos los tipos infrecuentes con pigmentación amarilla brillante, crecen peor que las del ganado bovino en medios normales como HEYM o LJ, y los cultivos primarios no deben desecharse como negativos si no es tras una incubación prolongada. El medio sólido Middlebrook 7H10 suplementado con yema de huevo y micobactina es excelente para el cultivo de las cepas ovinas de *MAP* (Whittington *et al.*, 1999).

Las colonias primarias de cepas bovinas de *MAP* en HEYM son muy pequeñas, convexas (semiesféricas), de aspecto suave y no mucoso, e inicialmente traslúcidas e incoloras. El tamaño inicial de las colonias es puntual, y pueden permanecer con un tamaño de 0,25–1 mm y tender a quedarse pequeñas cuando son numerosas en el cultivo en superficie. Los bordes son redondeados y uniformes, y su superficie es lisa y brillante. Las colonias llegan a alcanzar un tamaño mayor y se abomban, son opacas y de color blanco-parduzco a medida que la incubación se alarga. Las colonias de cepas más viejas pueden alcanzar los 2 mm. La morfología de la colonia cambia con la edad pasando de lisa a rugosa y de semiesférica a irregular.

En medio 7H10 modificado, las colonias de cepas bovinas son menos convexas que en HEYM, especialmente en los cultivos viejos. Son puntuales, con un diámetro aproximado de 1 mm, y adquieren un color parduzco ligeramente más claro que el medio. En comparación con las colonias bovinas del medio HEYM, las de las cepas bovinas en medio 7H10 son más difíciles de detectar. Las colonias de las cepas ovinas de *MAP* son convexas, suaves, húmedas, brillantes, de color blanco-parduzco muy similar al color del medio. Las colonias típicas son pequeñas, de hasta 0,5 mm, pero pueden alcanzar 1 mm y en ocasiones muy infrecuentes 1,5 mm de diámetro si se aparecen pocas colonias en el cultivo.

Las micobacterias saprofitas pueden tener un aspecto muy semejante en cada uno de los medios, pero a menudo son evidentes tras 5–7 días.

Para identificar *MAP*, se debe subcultivar un pequeño inóculo de una colonia sospechosa en el mismo medio, con y sin micobactina, para comprobar si hay dependencia de micobactina. La micobactina está presente en la pared celular del microorganismo y un inóculo muy denso puede contener la suficiente cantidad de micobactina como para permitir el crecimiento de *MAP* en un medio que no la contenga. Por otra parte, para confirmar la identificación de cepas de *MAP* debe llevarse a cabo una PCR (buscando IS900 o F57).

### 1.3.1. Medios

Ejemplos de medios adecuados son:

i) Medio de yema de huevo de Herrold con micobactina

Para 1 litro de medio: 9 g de peptona; 4,5 g de cloruro sódico; 2,7 g de extracto de buey; 27 ml de glicerol; 4,1 g de piruvato sódico; 15,3 g de agar; 2 mg de micobactina; 870 ml de agua destilada; seis yemas de huevo (120 ml); y 5,1 ml de una solución acuosa de verde de malaquita al 2%. Se miden los primeros seis ingredientes y se disuelven calentando en el agua destilada. Se ajusta el pH del medio líquido a 6,9–7,0 usando NaOH al 4%, y se prueba para asegurar que el pH de la fase sólida es de 7,2–7,3. Se añade la micobactina y se disuelve en 4 ml de alcohol etílico. Se autoclava a 121 °C durante 25 minutos. Se enfría hasta 56°C y de forma aséptica se añaden seis yemas de huevo estériles<sup>3</sup> y la solución estéril de verde de malaquita. Se mezcla suavemente y se distribuye en tubos estériles.

Se pueden añadir 50 mg de cloranfenicol, 100.000 U de penicilina y 50 mg de anfotericina B.

ii) Medio modificado de Dubos

Para 1 litro de medio: 2,5 g de casaminoácidos; 0,3 g de asparragina; 2,5 g de fosfato disódico anhidro; 1 g de fosfato monopotásico; 1,5 g de citrato sódico; 0,6 g de sulfato magnésico cristalino; 25 ml de glicerol; 50 ml de una solución al 1% de Tween 80; y 15 g de agar. Se disuelve cada sal en agua destilada con un suave calentamiento y se lleva hasta 800 ml. Se añade la micobactina en una solución alcohólica al 0,05% (2 mg disueltos en 4 ml de alcohol etílico), se calienta el medio a 100°C hasta la ebullición, y después se esteriliza en autoclave a 115°C durante 15 minutos. Se enfría hasta 56°C en un baño de agua, se añaden los antibióticos (100.000 U de penicilina; 50 mg de cloranfenicol; y 50 mg de anfotericina B) y el suero (200 ml suero bovino esterilizado por filtración a través de un equipo Seitz 'EX' e inactivado calentando a 56°C durante 1 hora). El medio se mezcla minuciosamente y entonces se distribuye en tubos estériles. Una ventaja de este medio es que es transparente, lo cual facilita la detección temprana de las colonias.

iii) Medio modificado de Middlebrook 7H10 y 7H9

Pueden utilizarse medios de Middlebrook con micobactina añadida y varios suplementos que se comercializan. Puede solicitarse a los Laboratorios de Referencia de la OIE más información sobre la formulación.

vi) Medio Löwenstein–Jensen con o sin micobactina

### 1.3.2. Preparación de la muestra

i) Procesamiento de las muestras de tejido

No se deben emplear conservantes químicos. Los tejidos pueden congelarse a –70°C.

Para evitar la contaminación, se deben eliminar las heces de las porciones del tracto intestinal antes de su envío al laboratorio.

a) Método de digestión/sedimentación para la descontaminación de los tejidos

Se introducen aproximadamente 4 g de mucosa de la válvula íleocecal o 4 g de ganglio mesentérico en una batidora estéril que contenga 50 ml de tripsina (2,5%). La mezcla se ajusta hasta neutralidad con NaOH al 4% y papel de pH, y se remueve durante 30 minutos a temperatura ambiente con un agitador magnético. La mezcla digerida se filtra a través de una gasa. El filtrado se centrifuga aproximadamente a 2.000–3.000 g durante 30 minutos. El sobrenadante se extrae y se desecha. El precipitado se resuspende en 20 ml de HPC al 0,75% y se mantiene estático durante

3 Use huevos frescos sin que hayan transcurrido más de 2 días desde su puesta y que no hayan recibido antibióticos. Con un cepillo, limpie los huevos con agua y detergente. Enjuague con agua y coloque los huevos en alcohol de 70° durante 30 minutos. Séquelos insertándolos entre dos toallas estériles. Con unas pinzas dentadas estériles, chasque un extremo de la cáscara, haciendo un agujero de aproximadamente 10 mm y elimine la clara con ayuda de las pinzas y de la gravedad. Agrande el agujero y rompa la yema. Mezcle la yema de huevo y elimine el vitelo. Vierta la yema de huevo mezclada en el medio.

18 horas a temperatura ambiente. Las partículas que se precipitan al fondo del tubo se emplearán como inóculo y serán extraídas con una pipeta sin remover el sobrenadante. Alternativamente, se pueden utilizar otros métodos de descontaminación, como por ejemplo, el tratamiento con ácido oxálico al 5%.

**b) Método de la doble incubación para la descontaminación de tejidos**

Se trocean finamente unos 2 g de muestra del tejido (después de eliminada la grasa) mediante un escalpelo estéril o mediante tijeras y se homogenizan durante 1 minuto en 25 ml de HPC al 0,75%. Las muestras se dejan reposar hasta la desaparición de la espuma y la sedimentación de los trozos más grandes del tejido. El tejido homogeneizado se vierte en un tubo de centrifuga procurando evitar la grasa o los trozos grandes del tejido. Se deja reposar durante 30 minutos y después se toman 10 ml de la suspensión que está justo encima del sedimento y se pasan a un tubo de 30 ml que se incuba durante 3 horas a 37°C. Se centrifuga durante 30 minutos a 900 **g**, se elimina el sobrenadante y el precipitado se resuspende en 1 ml de un conjunto de antibióticos que contenga 100 µg de cada uno de los siguientes antibióticos: vancomicina, anfotericina y ácido nalidíxico (VAN). Se incuba durante toda una noche a 37°C, y la suspensión se emplea para inocular los medios como se describe a continuación.

**c) Inoculación del medio de cultivo e incubación**

Se transfieren aproximadamente 0,1 ml de inóculo a cada tres tubos de agar inclinado con medio de Herrold que contenga micobactina y a un tubo sin micobactina. El inóculo se distribuye uniformemente sobre la superficie inclinada de los tubos. Estos permanecerán en posición inclinada a 37°C durante aproximadamente 1 semana con los tapones de rosca aflojados. Los tubos se pondrán en posición vertical una vez se haya evaporado la humedad libre de la superficie. Se aprietan los tapones, se colocan los tubos en cestos y se incuban a 37°C.

El huevo del medio de Herrold contribuye con suficientes fosfolípidos a neutralizar la actividad bactericida del HPC residual en el inóculo. Los otros medios (Dubos modificado y Middlebrook) no tienen esta propiedad. Se pueden utilizar otros tratamientos para la descontaminación de la muestra, por ejemplo ácido oxálico al 5%.

El HPC es relativamente ineficaz para controlar el crecimiento de hongos contaminantes. La anfotericina B (fungizona) resulta efectiva para impedir el desarrollo fúngico en los medios inoculados. La fungizona puede incorporarse en el medio de Herrold a una concentración final de 50 µg por ml de medio. Debido a la pérdida de actividad antifúngica, el almacenamiento del medio de Herrold que contenga fungizona debe limitarse a 1 mes a 4°C.

Los tubos de agar inclinado se incuban, como mínimo, durante 4 meses y se observan semanalmente a partir de la sexta semana en adelante.

**ii) Procesamiento de las muestras fecales**

No se emplean conservantes químicos. Las muestras fecales pueden congelarse a -70°C.

**a) Suspensión y descontaminación de las heces**

Se transfiere 1 g de heces a un tubo de 50 ml que contenga 20 ml de agua destilada estéril. Se agita la mezcla durante 30 minutos a temperatura ambiente. Las partículas de mayor tamaño sedimentarán a los 30 minutos. Se transfieren los 5 ml de la parte superior de la suspensión de heces a un tubo de 50 ml que contenga 20 ml de HPC al 95%. Se invierte la posición del tubo varias veces para asegurar una distribución homogénea y se mantiene estático durante 18 horas a temperatura ambiente.

**b) Inoculación del medio de cultivo**

Se transfiere 0,1 ml del sedimento que ha permanecido estático a cada uno de cuatro tubos de agar inclinado que contienen medio de Herrold, tres con micobactina

y uno sin ella. Se puede realizar un frotis del sedimento tiñendo la muestra según el método de Ziehl–Neelsen.

c) **Incubación y observación de los tubos de agar inclinado**

Lo mismo que para las muestras de tejido.

Se han descrito variaciones de los métodos anteriores (Collins *et al.*, 1990; Merkal *et al.*, 1968). La sensibilidad del cultivo puede aumentar usando medios líquidos y la centrifugación en lugar de las técnicas de sedimentación. El método de la doble incubación descrito por Whitlock *et al.* (1991) ayuda a la descontaminación del inóculo y ofrece una sensibilidad superior a la de los procedimientos de sedimentación o filtración (Eamens *et al.*, 2000). El método de la doble incubación requiere mezclar 2 g de heces con 15 ml de solución salina o agua, la sedimentación durante 30 minutos, y la transferencia de los 5 ml superiores de la suspensión (evitando material fibroso) a 25 ml de HPC al 0,9% en infusión de cerebro y corazón diluida a la mitad. Después de incubar a 37°C durante 16–24 horas, se centrifuga la mezcla a 900 **g** durante 30 minutos (a temperatura ambiente), se desecha el sobrenadante y se resuspende el sedimento en 1 ml de VAN. Se incuba la muestra durante 24–72 horas a 37°C y se emplea para inocular medios como se describió anteriormente.

#### 1.4. Sondas de ADN y reacción en cadena de la polimerasa

Se han elaborado sondas de ADN que permiten detectar *MAP* en las muestras de diagnóstico e identificar rápidamente las cepas bacterianas aisladas (Ellingson *et al.*, 1998). Se han utilizado para diferenciar *MAP* de otras micobacterias.

McFadden *et al.* han identificado una secuencia (McFadden *et al.*, 1987), denominada IS900, que es una secuencia específica de inserción de *MAP* (Vary *et al.*, 1990). Se ha descrito que un pequeño número de cepas distintas de *MAP* producen productos amplificados del mismo tamaño que el esperado en el caso de *MAP*. Puede aplicarse una enzima de restricción a los productos positivos a IS900 para confirmar que su secuencia es compatible con *MAP*.

La identificación de nuevas secuencias de ADN que se consideran exclusivas de *MAP* (secuencias ISMav2, f57 y ISMap02), ofrece posibilidades adicionales para la identificación rápida de este microorganismo utilizando la tecnología de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (Stabel & Bannantine, 2005; Strommenger *et al.*, 2001; Vansnick *et al.*, 2004). Se puede utilizar el análisis con enzimas de restricción de IS1311, una secuencia de inserción que es común a *M. avium* subsp. *avium* y *MAP*, para distinguir entre estas especies y para tipificar las cepas ovinas, bovinas y de bisonte de *MAP* (Sevilla *et al.*, 2005; Whittington *et al.*, 1998).

En los últimos años, se han desarrollado muchos métodos de PCR en tiempo real para detectar *MAP* a partir de distintas muestras (sangre, leche, heces, tejidos y muestras ambientales). Es una técnica rápida y ofrece esperanza para la detección de microorganismos exigentes y de crecimiento lento, como *MAP*. No obstante, esta herramienta molecular está influida en gran medida por la calidad de las muestras de ácido nucleico. Por lo tanto, un paso esencial en el uso de la PCR en tiempo real es aplicar un método de extracción de ADN que proporcione una muestra de ADN de calidad y una máxima recuperación del ADN bacteriano (Parka *et al.*, 2014).

Actualmente, la PCR está mejorada hasta tal punto que desempeña un papel importante en el diagnóstico de esta enfermedad (Leite *et al.*, 2013).

Se dispone de PCR comerciales de diagnóstico para la detección de *MAP* en muestras de leche y de heces, pero los usuarios deben tener en cuenta la interpretación de los datos obtenidos y la idoneidad de la prueba para el fin deseado antes de adoptar este tipo de métodos.

## 2. Pruebas serológicas

La prueba serológica utilizada habitualmente para el diagnóstico de la paratuberculosis en el ganado bovino son el enzimoimmunoanálisis (ELISA). La prueba de la fijación del complemento (CFT) y la inmunodifusión en gel de agar (AGID) tienen menor sensibilidad y especificidad y ya no se recomiendan en ganado bovino. No existe ningún suero de referencia a nivel internacional.

### 2.1. Técnica del enzimoimmunoanálisis

La técnica ELISA es, hasta el momento, la prueba más sensible y específica para la detección de anticuerpos séricos contra *MAP* en el ganado bovino. Su sensibilidad es comparable a la de la prueba



de CF en los casos clínicos, pero mayor a la de la FC en portadores asintomáticos. La especificidad de la prueba ELISA se incrementa mediante la absorción de sueros a *M. phlei*. El ELISA de absorción, ideado por Yokomizo *et al.* (1983; 1985) y modificado por Milner *et al.* (1988), fue desarrollado en forma de kit comercial por Cox *et al.* (1991).

Mediante el ELISA se detecta aproximadamente el 30–40% del ganado bovino identificado como infectado por el cultivo de heces en medios sólidos (Whitlock *et al.*, 2000). De modo similar a los métodos de cultivo, la sensibilidad del ELISA depende del nivel de liberación de *MAP* en las heces y de la edad del animal. Un amplio estudio realizado en Australia demostró que la sensibilidad real del ELISA en el ganado bovino de 2-, 3- y 4- años de edad fue del 1,2%, 8,9% y 11,6%, respectivamente, pero permaneció entre el 20 y 30% en los grupos de más edad (Jubb *et al.*, 2004). Se ha calculado que, globalmente, la sensibilidad real para todos los grupos de edad es de aproximadamente el 15% (Jubb *et al.*, 2004; Whitlock *et al.*, 2000). En el ganado bovino, las sensibilidades del ELISA se sitúan entre el 7 y el 94%, y las especificidades, entre el 40 y el 100% (Nielsen & Toft, 2008).

En los pequeños rumiantes, el ELISA comercializado presentó una especificidad del 98,2–99,5% (intervalos de confianza [IC] del 95%) y detectó el 35–54% (IC del 95%) de animales con evidencia histológica de infección (Hope *et al.*, 2000). En otro estudio, la especificidad estimada de un ELISA interno fue del 99% y su sensibilidad, respecto a los resultados histológicos, fue del 21,9% (Sergeant *et al.*, 2003). En pequeños rumiantes, las sensibilidades del ELISA son del 16-100%, y las especificidades, del 79-100% (Nielsen & Toft, 2008).

El ELISA de absorción combina la sensibilidad del ELISA con la especificidad añadida de una etapa de absorción. Los sueros a analizar se diluyen en un tampón que contenga un antígeno soluble de *M. phlei* antes de analizarse mediante un ELISA indirecto. El procedimiento elimina los anticuerpos que provocan reacciones cruzadas inespecíficas. En versiones anteriores, los sueros se absorbían con *M. phlei* completo, que se eliminaba por centrifugación antes de la prueba.

Se ha desarrollado un formato de placa de microtitulación en el que el antígeno *MAP* recubre los 96 pocillos de las placas. Las muestras se diluyen en un diluyente de muestra que contenga *M. phlei* para eliminar los anticuerpos que provocan reacción cruzada. Durante la incubación en los pocillos de la muestra diluida, el anticuerpo específico contra *MAP* forma un complejo con los antígenos ligados a los pocillos. Después de lavar para eliminar los materiales no unidos en los pocillos, se añade anticuerpo anti Ig bovina marcado con peroxidasa de rábano (HPR0). Esto reacciona con las inmunoglobulinas unidas al antígeno de la fase sólida. La tasa de conversión del sustrato es proporcional a la cantidad de inmunoglobulina unida. El color desarrollado, medido espectrofotométricamente (a una longitud de onda adecuada para el cromógeno utilizado) es proporcional a la cantidad de anticuerpo presente en la muestra problema.

Se dispone comercialmente de varios kits ELISA de absorción. En las instrucciones que acompañan al kit comercial se describe detalladamente el método y el material necesario para realizar la prueba, la interpretación de los resultados y los cálculos. Se ha descrito que varios ELISA que están disponibles comercialmente poseen sensibilidades y especificidades parecidas. Algunos kits comercializados ofrecen la opción de analizar muestras de leche. Se ha demostrado que el ELISA para la leche bovina y caprina tiene una especificidad similar al ELISA para el suero, pero menos sensibilidad que la prueba para sangre (Hendrick *et al.*, 2005; Salgado *et al.*, 2005). En el ganado bovino, las sensibilidades del ELISA para leche se sitúan en el 21–61%, y las especificidades en el 83-100% (Nielsen & Toft, 2008).

## 2.2. Prueba de la fijación del complemento

La CFT ha sido la prueba estándar utilizada para el ganado bovino durante muchos años. La CFT funciona bien en animales clínicamente sospechosos, pero no tiene suficiente especificidad para su la población general con fines de control. Por lo tanto, no se recomienda para fines de control ni para pruebas en animales individuales antes de los desplazamientos internacionales. Se utilizan unvarios procedimientos de CFT a nivel internacional. No existen sueros patrón internacionales con unidades de fijación del complemento estandarizadas para usar como referencia. A continuación, se describe un ejemplo de un método de microtitulación para realizar la CFT.

### 2.1.1. Procedimiento analítico

- i) El antígeno es un extracto acuoso de bacterias del que se han eliminado los lípidos (cepa *M. paratuberculosis* 316F). También se puede utilizar *Mycobacterium avium* D9.
- ii) Todos los sueros se inactivan en el baño de agua a 60°C durante 30 minutos y se diluyen a 1/4, 1/8 y 1/16. En cada placa se debe incluir un suero control positivo y un suero control

negativo. También se preparan los siguientes controles: control de antígenos, control del complemento y control del sistema hemolítico.

- iii) El complemento liofilizado reconstituido se diluye para contener seis veces H50 (dosis hemolizante al 50%) calculado por titulación frente al antígeno.
- iv) Se sensibilizan eritrocitos de oveja, al 2,5%, con 2 unidades de hemolisina H100.
- v) Todas las diluciones y reactivos se preparan en tampón veronal de calcio/magnesio; Se utilizan volúmenes de 25 µl de cada reactivo en placas de microtitulación de fondo redondo de 96 pocillos.
- vi) La incubación primaria se realiza a 4°C durante la noche y la incubación secundaria a 37°C durante 30 minutos.
- vii) Lectura e interpretación de los resultados: Las placas se pueden dejar reposar o centrifugar y se leen de la siguiente manera: 4+ = 100% de fijación, 3+ = 75% de fijación, 2+ = 50% de fijación, 1+ = 25% de fijación y 0 = hemólisis completa. El título de los sueros problema es el recíproco de la dilución más alta de suero que da una fijación del 50%. Una reacción de 2+ a 1/8 se considera positiva. Los resultados deben interpretarse en relación con los signos clínicos y otros hallazgos de laboratorio.

### 2.3. Prueba de inmunodifusión en gel de agar

La AGID es muy útil para confirmar la enfermedad en ganado bovino, ovino o caprino con enfermedad clínica. Se ha descrito que en pequeños rumiantes de Nueva Zelanda y de Australia la AGID ofrece una sensibilidad y una especificidad ligeramente más altas que las obtenidas con los ELISA (Gwozdz *et al.*, 2000; Hope *et al.*, 2000; Sergeant *et al.*, 2003). La especificidad y la sensibilidad observadas con la AGID medidas respecto a los resultados de la histología fueron del 99–100% (IC del 95%) y del 38–56% (IC del 95%), respectivamente (Hope *et al.*, 2000).

El antígeno utilizado es un extracto crudo de protoplasma de la cepa de laboratorio *M. avium* 18 (anteriormente *M. paratuberculosis* 18) preparado por rotura de células en un fraccionador celular con presión hidráulica. Las células rotas se centrifugan a 40 000 *g* durante 2 horas para eliminar los detritos de pared celular, y la fracción sobrenadante se conserva y liofiliza. Este antígeno se vuelve a suspender en agua a una concentración de 10 mg/ml.

Se disuelve agarosa en tampón barbitúrico, a pH 8,6, que contenga azida sódica, para obtener una concentración final de agarosa del 0,75%. Se puede verter agarosa en placas de Petri o en portaobjetos. Se recortan pocillos con forma hexagonal. Los pocillos tendrán un diámetro de 4 mm y estarán separados entre ellos 4 mm, y el agar debe tener un grosor de 3-4 mm. se añade el antígeno a los pocillos centrales. Se añaden los sueros problema y control positivo y negativo a los pocillos periféricos, de forma alterna.

Las placas se incuban en una cámara húmeda a temperatura ambiente. Los geles se examinan para comprobar si hay líneas de precipitación pasadas 24 y 48 horas desde el inicio de la incubación. La aparición de una o más líneas de precipitación claramente definidas, iguales a las de un suero control positivo, en un plazo máximo de 48 horas, constituye un resultado positivo. La ausencia de líneas de precipitación se considerará un resultado negativo. Pueden aparecer líneas inespecíficas.

Se utilizan distintas variaciones del método.

## 3. Pruebas de inmunidad celular

La detección de una respuesta sistémica mediada por células precede a la producción de anticuerpos detectables. Los animales que están infectados a un nivel muy bajo, con frecuencia no dan reacciones en las pruebas serológicas que miden la CMI. En poblaciones infectadas, es esperable que reaccione a las pruebas de CMI un número muy superior de animales, en comparación con lo que ocurre al utilizar pruebas de anticuerpos, puesto que la CMI es indicativa de exposición, mientras que los anticuerpos indican el avance de la infección.

### 3.1. Prueba de liberación de interferón gama

Esta técnica se basa en la liberación de interferón gama (IFN- $\gamma$ ) a partir de linfocitos sensibilizados durante un periodo de incubación de 18–36-horas con antígeno específico (tuberculina del tipo derivado proteico purificado [PPD] aviar, tuberculina PPD bovina o johnina<sup>4</sup>). La detección cuantitativa

4 La johnina puede obtenerse en ID-Lelystad, Países Bajos

del IFN- $\gamma$  bovino se lleva a cabo mediante un ELISA de tipo sándwich en el que se utilizan dos anticuerpos monoclonales para el IFN- $\gamma$  bovino. Se ha desarrollado una prueba diagnóstica comercial basada en la detección de interferón gama para el diagnóstico de la tuberculosis bovina. En las instrucciones que acompañan al kit comercial se describe detalladamente el método y los materiales necesarios para realizar la prueba. Esta prueba no ha sido validada por el fabricante (Prionics, Suiza) para el diagnóstico de la paratuberculosis. Por tanto, los resultados derivados de este ensayo son frecuentemente difíciles de interpretar porque no existe acuerdo sobre los criterios de interpretación y los tipos y cantidades de antígeno utilizados para estimular los linfocitos sanguíneos. En los bóvidos, la especificidad descrita para la prueba varió del 94% al 67% y la sensibilidad varió del 13% al 85%, dependiendo de los criterios de interpretación (Kalis *et al.*, 2003; Nielsen & Toft, 2008).

Se están comercializando varios kits de ELISA para la detección cuantitativa del IFN- $\gamma$  en plasmas bovinos, ovinos y caprinos.

### 3.2. Hipersensibilidad retardada

La prueba de hipersensibilidad cutánea de tipo retardado (DTH) es una medida de la inmunidad mediada por células, pero tiene un valor limitado. La prueba se realiza mediante la inoculación intradérmica de 0,1 ml de antígeno en una zona esquilada o rasurada, normalmente en lateral del tercio medio del cuello. En el pasado se usaba para este fin tuberculina PPD aviar o johnina porque se pensaba que la tuberculina aviar y la johnina tenían una sensibilidad y especificidad comparable. El grosor de la piel se mide con un calibrador antes de la inoculación y 72 horas después de la misma. Los aumentos del grosor de la piel superiores a 2 mm se considerarán indicativos de la presencia de DTH. Debe destacarse que las reacciones positivas en los ciervos pueden tener la apariencia de placas difusas más que de inflamaciones localizadas discretas, lo que dificulta la interpretación de los resultados. La presencia de cualquier inflamación en estas especies debe considerarse como positiva. Sin embargo, la sensibilización hacia el complejo *M. avium* está muy extendida en los animales, y ni la tuberculina aviar ni la johnina son muy específicas. Además, la interpretación de los resultados de la prueba cutánea resulta complicada por la falta de acuerdo sobre los criterios de interpretación. En un estudio, en el que se usó johnina en las pruebas con ganado bovino, la especificidad de la prueba cutánea fue del 88,8% a un valor de corte de  $\geq 2$  mm, 91,3% a un valor de corte de  $\geq 3$  mm y 93,5% a un valor de corte de  $\geq 4$  mm (Kalis *et al.*, 2003). No se ha determinado el efecto de estos valores de corte sobre la sensibilidad. El rendimiento de esta prueba también puede estar afectado de modo significativo por pequeñas diferencias antigénicas en los diferentes lotes de antígeno (Kalis *et al.*, 2003). Se requiere más investigación para aumentar el valor de la prueba cutánea.

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

### C1. Vacunas

#### 1. Antecedentes

La vacunación puede causar una reacción en el punto de la inyección. La vacunación también puede interferir con los programas de erradicación basados en las pruebas inmunológicas y en la eliminación de los animales identificados como infectados y puede interferir con la interpretación de las pruebas cutáneas de DTH de la tuberculosis bovina. Todas las vacunas comerciales de las que se dispone actualmente están preparadas con células enteras. La vacunación de ganado bovino o pequeños rumiantes no está permitida en muchos países principalmente debido al temor de que dé lugar a falsos positivos en la prueba cutánea de la tuberculosis bovina.

Las directrices que se han de seguir para la producción de las vacunas de interés veterinario se indican en el capítulo 1.1.8. *Principios de producción de vacunas veterinarias*. Las directrices dadas aquí y en el capítulo 1.1.8 son de carácter general y pueden ser complementadas con los requerimientos regionales y nacionales.

#### 2. Descripción de la producción y requisitos mínimos para las vacunas

##### 2.1. Características del inóculo

###### 2.1.1. Criterios de calidad

Deben llevarse a cabo pruebas de pureza en los cultivos del inóculo y la masa microbiana final mediante frotis teñidos.

### 2.1.2. Validación como cepa vacunal

Las cepas del inóculo debe ser de un tipo prevalente, que pueda comprobarse mediante biotipificación o análisis genético. Debe haberse comprobado que son inocuas por administración de la vacuna a las especies de destino por la vía recomendada.

## 2.2. Método de producción

### 2.2.1. Procedimiento

Para los lotes de vacunas, los microorganismos pueden cultivarse en un medio sintético líquido como el de Reid. Los microorganismos crecen formando una película en la superficie del líquido. Para asegurar un área de superficie correcta, conviene usar recipientes tales como frascos cónicos que contengan un tercio de su volumen nominal de medio líquido. Estos frascos pueden inocularse directamente a partir de cultivos en cortes de patata, pero, con algunas cepas, pueden necesitarse uno o más pases en medio líquido para asegurar el crecimiento adecuado formando una película hasta el pase final del lote de vacuna. Tales resiembras se deberían realizar a intervalos de 2 semanas, puesto que periodos más largos pueden derivar en un envejecimiento y hundimiento de la película. La incubación se realiza a 37°C.

Para preparar la vacuna, la película procedente de los cultivos de cada cepa a analizar cultivados durante 2 semanas puede separarse del medio líquido por decantación, filtración y presión entre bloques de papel de filtro. El cultivo húmedo de *MAP* se mezcla con un adyuvante, como parafina líquida, aceite de oliva y piedra pómez.

### 2.2.2. Controles durante el proceso

Debe comprobarse si los cultivos crecen lo suficiente y si presentan pureza. Se puede detectar la presencia de microorganismos contaminantes mediante pruebas de esterilidad de muestras recogidas. Las pruebas de micobacterias patógenas se realizan mediante la inyección de cultivo húmedo, previamente mezclado con adyuvante y diluido diez veces en solución salina, en dos cobayas, recibiendo cada uno 1 ml. Se observan durante 8 semanas, se sacrifican de forma indolora, y se examinan para comprobar si presentan lesiones anormales.

### 2.2.3. Pruebas en lotes de producto final

#### i) Esterilidad

En el capítulo 1.1.9. se pueden encontrar pruebas de control de esterilidad y de ausencia de contaminación. El microorganismo de la vacuna normalmente no crecerá a un nivel apreciable en las pruebas convencionales de esterilidad.

#### ii) Identidad

La identidad del cultivo se determina mediante tinción de Ziehl–Neelsen y PCR (véase el apartado B.1.4).

#### iii) Inocuidad

Estas pruebas se realizan normalmente con animales de laboratorio, aunque también resultan satisfactorias las pruebas de multidosis en los animales diana a los que va dirigida la vacuna. A continuación se explica una prueba clásica con animales de laboratorio. Se inoculan subcutáneamente dos cobayas con un lote aceptable de vacuna a una fracción de la dosis previamente determinada que, empleada en las vacas, produce un nódulo pero no una necrosis manifiesta en la zona de la inyección. Se observan los animales durante 8 semanas, se sacrifican de forma indolora y se examinan para comprobar si presentan lesiones anormales.

#### iv) Potencia del lote

Como las pruebas de protección parecen ser impracticables, se puede emplear una prueba de la capacidad sensibilizadora. A continuación, el resultado podría relacionarse con el contenido bacteriano basado en el peso. Una prueba típica podría ser la siguiente: los cobayas se sensibilizan mediante una inyección intramuscular de 0,5 ml de la vacuna a analizar diluida 100 veces en parafina líquida. Las pruebas cutáneas se realizan seis semanas después de la sensibilización usando inoculaciones intradérmicas de 0,2 ml de al menos tres diluciones seriadas de un antígeno de *MAP*, tal como la PPD johnina. Las diluciones se elegirán en función de que produzcan reacciones cutáneas esperadas de

8 mm a 25 mm de diámetro. Cada cobaya recibe varias diluciones por cada costado, eligiéndose un diseño en cuadrado latino para su distribución. Después de 24–48 horas, se miden las reacciones cutáneas. Todavía no se ha establecido totalmente una preparación de referencia para las pruebas de este tipo. La tuberculina PPD aviar, calibrada en unidades internacionales, puede usarse como antígeno de la prueba cutánea en las pruebas de este tipo para asegurar que la vacuna es capaz de producir una sensibilización suficiente (correspondiente a la vacunación).

### 2.3. Requisitos para aprobación para el registro

#### 2.3.1. Proceso de fabricación

En las vacunas que se presentan en recipientes multidosis se suele incluir un conservante.

#### 2.3.2. Requisitos de seguridad

- i) Seguridad en especies de destino y no de destino

Véase el apartado C1.2.2.3.

- ii) Reversión a la virulencia en vacunas atenuadas/vivas y consideraciones medioambientales

No se dispone de vacunas vivas.

- iii) Precauciones (riesgos)

La vacuna causa algunos efectos colaterales, la formación de nódulos y la sensibilización de los animales a la prueba de la tuberculina (Gwozdz *et al.*, 2000). En los humanos, la inyección accidental de la vacuna provoca reacciones inflamatorias crónicas que requieren un tratamiento quirúrgico.

#### 2.3.3. Requisitos de eficacia

La vacuna debe utilizarse como parte de un programa de control, ya que por sí sola no conferirá una protección completa contra la enfermedad causada por MAP.

#### 2.3.4. Vacunas que permiten una estrategia DIVA (detección de infección en animales vacunados)

Todavía no se dispone de vacunas DIVA

#### 2.3.5. Duración de la inmunidad

Tras la vacunación a la edad de 14–30 días, el efecto de la vacunación se expresa como la reducción en el porcentaje de animales que excretan el agente infeccioso de entre los vacunados, respecto de los bóvidos no vacunados.

## C2. Johnina

### 1. Antecedentes

La PPD johnina es una preparación de productos tratados térmicamente derivados del crecimiento y lisis de MAP. La PPD tuberculina aviar es una preparación de productos tratados térmicamente derivados del crecimiento y lisis de *M. avium* subsp *avium* D4ER o TB 56. Los detalles de la PPD tuberculina aviar se encuentran en el Capítulo 3.3.6. *Tuberculosis aviar*. Estas dos preparaciones se utilizan, mediante inyección intradérmica, para revelar DTH como medio de identificación de animales infectados o sensibilizados con MAP.

Las directrices que se han de seguir para la producción de productos biológico de interés veterinario se indican en el capítulo 1.1.8. *Principios de producción de vacunas veterinarias*. Las directrices dadas aquí y en el capítulo 1.1.8 son de carácter general y pueden ser complementadas con los requerimientos regionales y nacionales.

## 2. Descripción de la producción y requisitos mínimos para la johnina

### 2.1. Características del inóculo

#### 2.1.1. Criterios de calidad

Con frotis teñidos debe comprobarse si los cultivos presentan microorganismos contaminantes.

Para comprobar la ausencia de efecto sensibilizante, se inyecta por vía intradérmica en tres ocasiones a intervalos de 5 días 0,01 mg de la preparación en cuestión en un volumen de 0,1 ml a tres cobayas que no hayan sido tratados previamente con ningún material que pudiera interferir con la prueba. A cada uno de estos cobayas, junto con cada uno de los cobayas control que no han sido inyectados previamente, se inyecta por vía intradérmica 15–21 días después la tercera inyección con la misma dosis de la misma johnina. Las reacciones de ambos grupos de cobayas observadas 24–48 horas después no deben ser significativamente distintas.

#### 2.1.2. Validación como cepa

Las cepas de MAP que se utilizarán para preparar cultivos de inóculo deben identificarse mediante biotipificación o pruebas genéticas. Es necesario comprobar que no contienen microorganismos contaminantes.

### 2.2. Método de fabricación

#### 2.2.1. Procedimiento

La johnina para el diagnóstico mediante prueba cutánea es una PPD que se prepara a partir de una o más cepas de MAP. Puede prepararse mediante el siguiente método.

Se cultivan cepas de MAP a modo de película sobre medio líquido de Reid. Los cultivos de producción suelen inocularse a partir de cultivos líquidos y no directamente a partir de la siembra en medio sólido (medio sintético de Reid). Los cultivos de producción se incuban a 37°C durante 10 semanas.

Al final del periodo de incubación, el medio de cultivo tiene un pH de alrededor de 5 y se obtendrá muy poca johnina o nada en absoluto a no ser que se incremente el pH con hidróxido de sodio hasta 7,3 antes de la exposición al vapor. Tras un vigoroso mezclado, los cultivos se exponen al vapor durante 3 horas. La masa de microorganismos muertos se retira mediante filtración y el filtrado se clarifica mediante una segunda filtración. La proteína del filtrado se precipita químicamente con ácido tricloroacético al 40%, se lava y se vuelve a disolver (disolvente alcalino). El producto se esteriliza mediante filtración. Puede añadirse un conservante antimicrobiano que no dé lugar a falsos positivos, como el fenol (no más de un 0,5% [p/vol]). Puede añadirse glicerol (no más de un 10% [p/vol]) como estabilizante. El producto se distribuye de forma aséptica en recipientes de vidrio estériles, que a continuación se sellan.

#### 2.2.2. Controles durante el proceso

Tras la filtración final debe comprobarse la esterilidad de cada filtrado de la solución de PPD.

Los filtrados estériles se analizan para comprobar su contenido en proteína mediante el método de Kjeldahl (Farmacopea Británica [Veterinaria], 1985). El contenido en proteína se ajusta hasta que se obtienen entre 0,475 y 0,525 mg/ml de proteína en el producto final. El pH se ajusta al intervalo 6,5–7,5

#### 2.2.3. Pruebas en lotes de producto final

i) Esterilidad

Las pruebas de esterilidad y de ausencia de contaminación se hallan en el Capítulo 1.1.9. *Pruebas de esterilidad y ausencia de contaminación en los materiales biológicos de uso veterinario*. En las pruebas de esterilidad convencionales, el microorganismo no suele crecer hasta un nivel detectable.

ii) Identidad

La identidad del cultivo se determina mediante tinción de Ziehl–Neelsen y PCR (véase el apartado B.1.4).

iii) Inocuidad

A dos cobayas se inyecta por vía subcutánea 0,5 ml de la johnina en cuestión. En un plazo de 7 días no deben aparecer lesiones locales ni sistémicas destacadas (Farmacopea Británica [Veterinaria], 1985).

Pueden realizarse pruebas de johnina para micobacterias vivas tomando muestra del material inmediatamente antes de que se distribuya en los recipientes finales o bien con muestras tomadas de los propios recipientes finales. Debe tomarse una muestra de al menos 10 ml, que deberá inyectarse por vía intraperitoneal o subcutánea a al menos dos cobayas, dividiendo el volumen a analizar en partes iguales, una para cada animal. Es deseable tomar una muestra más grande, de unos 50 ml, y concentrar las posibles micobacterias residuales mediante centrifugación o filtración por membrana. Las cobayas se observan durante al menos 42 días y se realizan exámenes post-mortem. Las posibles lesiones macroscópicas se examinan al microscopio y mediante cultivo.

iv) Potencia del lote

La potencia de la johnina actualmente se determina mediante una prueba química para proteína empleando el método Kjeldahl. Se recomienda un contenido en PPD de  $0,5 \pm 0,025$  mg/ml de producto final (Farmacopea Británica [Veterinaria], 1985).

### 2.3. Requisitos para la aprobación para el registro

En el caso de la johnina, no debe utilizarse más de un 0,5% (p/vol) de fenol. Deben comprobarse la concentración del conservante en el producto final y su persistencia a lo largo del periodo de validez.

## BIBLIOGRAFÍA

BRITISH PHARMACOPOEIA (VETERINARY) (1985). Johnin purified protein derivative. British Pharmacopoeia (Veterinary), 184–185.

COLLINS M.T., KENEFICK K.B., SOCKETT D.C., LAMBRECHT R.S., McDONALD J. & JORGENSEN J.B. (1990). Enhanced radiometric detection of *Mycobacterium paratuberculosis* by using filter-concentrated bovine fecal specimens. *J. Clin. Microbiol.*, **28**, 2514–2519.

COX J.C., DRANE D.P., JONES S.L., RIDGE R. & MILNER A.R. (1991). Development and evaluation of a rapid absorbed enzyme immunoassay test for the diagnosis of Johnne's disease in cattle. *Aust. Vet. J.*, **68**, 157–160.

EAMENS G.J., WHITTINGTON R.J., MARSH I.B., TURNER M.J., SAUNDERS V., KEMSLEY P.D. & RAYWARD D. (2000). Comparative sensitivity of various faecal culture methods and ELISA in dairy cattle herds with endemic Johnne's disease. *Vet. Microbiol.*, **77**, 357–367.

ELLINGSON J.L.E., BOLIN C.A. & STABEL J.R. (1998). Identification of a gene unique to *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* and application to diagnosis of paratuberculosis. *Mol. Cell. Probes*, **12**, 133–142.

FODSTAD F.H. & GUNNARSSON E. (1979). Post-mortem examination in the diagnosis of Johnne's disease in goats. *Acta Vet. Scand.*, **20**, 157–167.

GREIG A., STEVENSON K., HENDERSON D., PEREZ V., HUGUES V., PAVLIK I., HINES M.E. 2ND, MCKENDRICK I. & SHARP J.M. (1999). Epidemiological study of paratuberculosis in wild rabbits in Scotland. *J. Clin. Microbiol.*, **37**, 1746–1751.

GWOZDZ J.M., THOMPSON K.G., MURRAY A., REICHEL M.P., MANKTELOW B.W. & WEST D.M. (2000). Comparison of three serological tests and an interferon-gamma assay for the diagnosis of paratuberculosis in experimentally infected sheep. *Aust. Vet. J.*, **78**, 779–783.

- HENDRICK S., DUFFIELD T., LESLIE K., LISSEMORE K., ARCHAMBAULT M. & KELTON D. (2005) The prevalence of milk and serum antibodies to *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis in dairy herds in Ontario. *Can. Vet. J.*, **46**, 1126–1129.
- HOPE A.F., KLUVER P.F., JONES S.L. & CONDRON R.J. (2000). Sensitivity and specificity of two serological tests for the detection of ovine paratuberculosis. *Aust. Vet. J.*, **78**, 850–856.
- JUBB T.F., SERGEANT E.S., CALLINAN A.P. & GALVIN J. (2004). Estimate of the sensitivity of an ELISA used to detect Johne's disease in Victorian dairy cattle herds. *Aust. Vet. J.*, **82**, 569–573.
- KALIS C.H., COLLINS M.T., HESSELINK J.W. & BARKEMA HW. (2003). Specificity of two tests for the early diagnosis of bovine paratuberculosis based on cell-mediated immunity: the Johnin skin test and the gamma interferon assay. *Vet. Microbiol.*, **97**, 73–86.
- KOH S.H., DOBSON K.Y. & TOMASOVIC A. (1988). A Johne's disease survey and comparison of diagnostic tests. *Austr. Vet. J.*, **65**, 160–161.
- LARSON A.B. & KOPECKY K.E. (1970). *Mycobacterium paratuberculosis* in reproductive organs and semen of bulls. *Am. J. Vet. Res.*, **31**, 255–258.
- LEITE F.L., STOKES K.D., ROBBE-AUSTERMAN S. & STABEL J.R. (2013). Comparison of fecal DNA extraction kits for the detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* by polymerase chain reaction. *J. Vet. Diagn. Invest.*, **25**, 27–34.
- MCFADDEN J.J., BUTCHER P.D., CHIODINI R. & HERMON-TAYLOR J. (1987). Crohn's disease – isolated mycobacteria are identical to *Mycobacterium paratuberculosis*, as determined by DNA probes that distinguish between mycobacterial species. *J. Clin. Microbiol.*, **25**, 796–801.
- MERKAL R.S., LARSEN A.B., KOPECKY K.E. & NESS R.D. (1968). Comparison of examination and test methods for early detection of paratuberculosis in cattle. *Am. J. Vet. Res.*, **29**, 1533–1538.
- MILNER A.R., MACK W.N., COATES K., WOOD P.R., SHELDRIK P., HILL J. & GILL I. (1988). The absorbed ELISA for the diagnosis of Johne's disease in cattle. In: Johne's Disease, Milner A. & Wood P., eds. CSIRO Publications, Melbourne, Australia, 158–163.
- NIELSEN S.S. & TOFT N. (2008). Ante mortem diagnosis of paratuberculosis: a review of accuracies of ELISA, interferon-gamma assay and faecal culture techniques. *Vet. Microbiol.*, **129**, 217–235.
- PARKA K.T., ALLENB A.J. & DAVIS W.C. (2014). Development of a novel DNA extraction method for identification and quantification of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* from tissue samples by real-time PCR. *J. Microbiol. Methods*, **99**, 58–65.
- SALGADO M., MANNING E.J. & COLLINS M.T. (2005). Performance of a Johne's disease enzyme-linked immunosorbent assay adapted for milk samples from goats. *J. Vet. Diagn. Invest.*, **17**, 350–354.
- SERGEANT E.S., MARSHALL D.J., EAMENS G.J., KEARNS C. & WHITTINGTON R.J. (2003). Evaluation of an absorbed ELISA and an agar-gel immuno-diffusion test for ovine paratuberculosis in sheep in Australia. *Prev. Vet. Med.*, **61**, 235–248.
- SEVILLA I., SINGH S.V., GARRIDO J.M., ADURIZ G., RODRIGUEZ S., GEIJO M.V., WHITTINGTON R.J., SAUNDERS V., WHITLOCK R.H. & JUSTE R.A. (2005). Molecular typing of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* strains from different hosts and regions. *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.*, **24**, 1061–1066.
- STABEL J.R. & BANNANTINE J.P. (2005). Development of a nested PCR method targeting a unique multicopy element, ISMap02, for detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in fecal samples. *J. Clin. Microbiol.*, **43**, 4744–4750.
- STROMMINGER B., STEVENSON K. & GERLACH G.F. (2001). Isolation and diagnostic potential of ISMap2, a novel insertion sequence-like element from *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*. *FEMS Microbiol. Lett.*, **196**, 31–37.
- SWEENEY R.W., WHITLOCK R.H., BUCKLEY C.L & SPENCER P.A. (1995). Evaluation of a commercial enzyme-linked immunosorbent assay for the diagnosis of paratuberculosis in dairy cattle. *J. Vet. Diagn. Invest.*, **7**, 488–493.



THOREL M.F, KRICHEVSKY M. & VINCENT LEVY-FREBAULT V. (1990). Numerical taxonomy of mycobactin-dependent mycobacteria, emended description of *Mycobacterium avium* subsp. *avium* subsp. nov., *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* subsp. nov., and *Mycobacterium avium* subsp. *silvaticum* subsp. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **40**, 254–260.

VANSNICK E., DE RIJK P., VERCAMMEN F., GEYSEN D., RIGOUTS L. & PORTAELS F. (2004). Newly developed primers for the detection of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*. *Vet. Microbiol.*, **100**, 197–204.

VARY P.H., ANDERSEN P.R., GREEN E., HERMON-TAYLOR J. & MCFADDEN J.J. (1990). Use of highly specific DNA probes and the polymerase chain reaction to detect *Mycobacterium paratuberculosis* in Johne's disease. *J. Clin. Microbiol.*, **28**, 933–937.

WHITLOCK R.H., ROSENBERGER A.E., SWEENEY R.W., HUTCHINSON L.J. (1991). Culture techniques and media constituents for the isolation of *Mycobacterium paratuberculosis* from bovine fecal samples. Proceedings of the Third International Colloquium on Paratuberculosis. International Association for Paratuberculosis, Providence, USA, 94–111.

WHITLOCK R.H., WELLS S.J., SWEENEY R.W. & TIEM J. VAN (2000). ELISA and fecal culture for paratuberculosis (Johne's disease): sensitivity and specificity of each method. *Vet. Microbiol.*, **77**, 387–398.

WHITTINGTON R., MARSH I., CHOY E., COUSINS D. (1998). Polymorphisms in IS1311, an insertion sequence common to *Mycobacterium avium* and *M. avium* subsp. *paratuberculosis*, can be used to distinguish between and within these species. *Mol. Cell Probes.*, **12**, 349–358.

WHITTINGTON R.J., MARSH I., MCALLISTER S., TURNER M.J., MARSHALL D.J. & FRASER C.A. (1999). Evaluation of modified BACTEC 12B radiometric medium and solid media for culture of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* from sheep. *J. Clin. Microbiol.*, **37**, 1077–1083.

YOKOMIZO Y., MERKAL R.S. & LYLE P.A.S. (1983). Enzyme-linked immunosorbent assay for detection of bovine immunoglobulin G antibody to a protoplasmic antigen of *Mycobacterium paratuberculosis*. *Am. J. Vet. Res.*, **44**, 2205–2207.

YOKOMIZO Y., YUGI H. & MERKAL R.S. (1985). A method for avoiding false-positive reactions in an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the diagnosis of bovine paratuberculosis. *Jpn J. Vet. Sci.*, **47**, 111–119.

\*  
\* \*

**NB:** Existen Laboratorios de Referencia de la OIE para la Paratuberculosis (puede consultarse la página web de la OIE: <https://www.oie.int/es/que-ofrecemos/red-de-expertos/laboratorios-de-referencia/#ui-id-3>). Por favor, contacte con los Laboratorios de Referencia de la OIE para cualquier otro dato sobre las pruebas de diagnóstico, los reactivos y las vacunas para la paratuberculosis.

**NB:** ADOPTADO POR PRIMERA VEZ EN 1991; ÚLTIMAS ACTUALIZACIONES ADOPTADAS EN 2021.