

CAPÍTULO 3.1.13.

TUBERCULOSIS DE LOS MAMÍFEROS (INFECCIÓN POR EL COMPLEJO *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS*)

RESUMEN

La tuberculosis de los mamíferos es una enfermedad bacteriana crónica de los animales y los humanos causada por miembros del complejo *Mycobacterium tuberculosis* (MTBC). Dentro de este complejo, algunas variantes importantes son *M. bovis*, *M. caprae* y *M. tuberculosis*. Es una enfermedad de distribución mundial, y solo algunos países se consideran libres. Es una de las principales enfermedades infecciosas del ganado vacuno, de otros animales domésticos y de ciertas poblaciones de animales salvajes, y constituye un obstáculo para el comercio. La tuberculosis zoonótica resultante de la transmisión al hombre constituye un problema de salud pública.

La exposición al agente en forma de aerosol es la vía de infección más frecuente, pero también se produce la infección por ingestión de material contaminado. Las lesiones tuberculosas características se producen con mayor frecuencia en los pulmones y en los ganglios linfáticos retrofaríngeos, bronquiales y mediastínicos. La tuberculosis suele ser una enfermedad crónica, con signos clínicos que pueden aparecer después de varios meses o años. La infección suele ser subclínica; cuando los hay, los signos clínicos no son específicamente distintivos y pueden incluir debilidad, anorexia, emaciación, disnea, linfadenomegalia y tos, en particular con la tuberculosis avanzada. La tuberculosis en el ganado bovino, caprino y en los ciervos suele diagnosticarse en el animal vivo mediante pruebas de inmunidad celular (prueba cutánea o prueba del interferón gamma). El enzoinmunoanálisis (ELISA) y las pruebas de flujo lateral para detectar anticuerpos séricos pueden ser útiles en la fauna salvaje. Tras la muerte, la infección se diagnostica mediante técnicas de necropsia, histopatológicas, bacteriológicas y de detección de ácidos nucleicos.

Detección del agente: Los exámenes bacteriológicos pueden consistir en la demostración de bacilos acidorresistentes mediante el examen microscópico de tejidos o secreciones, lo que proporciona una identificación preliminar. Las pruebas de confirmación son el aislamiento de micobacterias en medios de cultivo selectivos y su posterior identificación mediante cultivos y pruebas bioquímicas o técnicas de ADN. La prueba de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) puede utilizarse para la detección de miembros del MTBC en muestras clínicas. La tipificación con oligonucleótidos espaciadores (espoligotipificación), las unidades de repetición intercalada de micobacterias – repetición en tándem de número variable (MIRU-VNTR) y la secuenciación del genoma completo se utilizan para el genotipado de los miembros del MTBC con fines de rastreo y epidemiología de las cepas.

Prueba de hipersensibilidad retardada (prueba intradérmica de la tuberculina): Esta prueba es el método estándar para la detección de la tuberculosis en bovinos, pequeños rumiantes, ciervos, cerdos y camélidos vivos, entre otras especies. La prueba cutánea única consiste en medir la respuesta cutánea tras la inyección intradérmica de tuberculina (derivado proteico purificado – PPD). La prueba cutánea comparativa con tuberculina bovina (PPD-B) y aviar (PPD-A) se utiliza principalmente para diferenciar entre los animales infectados por el complejo *M. tuberculosis* y los sensibilizados a la tuberculina debido a la exposición a otras micobacterias o géneros afines. La decisión de utilizar la prueba única o la comparativa depende generalmente de la prevalencia de la infección tuberculosa y del nivel de exposición ambiental a otros microorganismos sensibilizadores. La dosis recomendada de PPD-B bovina en el ganado es de al menos 2000 Unidades Internacionales (UI), y en la prueba comparativa de la tuberculina, las dosis no deben ser inferiores a 2000 UI cada

una. Se están evaluando pruebas cutáneas con antígenos definidos que deberían ser útiles para diferenciar los animales infectados de los vacunados.

Pruebas de laboratorio con muestras de sangre: Los análisis para el diagnóstico con muestras de sangre son el ensayo de liberación de interferón-gamma (IGRA), que mide las respuestas inmunitarias celulares a la tuberculina o a antígenos definidos, y los ELISA indirecto y de flujo lateral, que detectan las respuestas de anticuerpos. La logística y la ejecución en el laboratorio de algunos de estos ensayos pueden ser un factor limitante. El uso de ensayos con muestras de sangre puede ser ventajoso, sobre todo en el caso de animales de muy difícil manejo, como los animales de zoológico y la fauna salvaje, aunque la interpretación de la prueba puede verse dificultada por la falta de datos de validación para algunas especies.

Requisitos para las vacunas y el material biológico de diagnóstico: La única vacuna disponible actualmente contra las infecciones por *M. bovis* es el bacilo de Calmette-Guerin (BCG). Sin embargo, la BCG puede sensibilizar a los animales a la prueba cutánea de la tuberculina y a otras pruebas inmunológicas basadas en la tuberculina. Por esta razón, la vacunación del Ganado bovino está prohibida en muchos países. Las pruebas cutáneas con antígenos definidos o IGRA, una vez validadas, deberían permitir diferenciar los animales infectados de los vacunados. Las vacunas con BCG han recibido la aprobación reglamentaria para la vacunación de ciertas especies salvajes, como el tejón, y se están llevando a cabo ensayos para evaluar el uso de la BCG en el ganado vacuno en varios países.

Los métodos para la producción de tuberculinas PPD bovinas deben cumplir con los requisitos estándar para los materiales de origen, los procedimientos de producción y las precauciones, las sustancias añadidas, la ausencia de contaminación, la identidad, la inocuidad, la potencia, la especificidad y la ausencia de efecto sensibilizador. Los bioensayos de actividad biológica son de especial importancia, y la potencia debe expresarse en Unidades Internacionales (UI) calibradas con respecto al Estándar Internacional de Tuberculina Bovina (ISBT).

A. INTRODUCCIÓN

La tuberculosis de los mamíferos es una enfermedad granulomatosa crónica de los animales y los seres humanos que deriva de la infección por agentes patógenos del complejo *Mycobacterium tuberculosis* (MTBC). Los miembros del MTBC pertenecen a la familia *Mycobacteriaceae* y son bacilos grampositivos resistentes al ácido. La taxonomía de los microorganismos del MTBC es cambiante. Los análisis genómicos recientes sugieren que todos los miembros del MTBC pertenecen a una sola especie, *M. tuberculosis*, y que *M. africanum*, *M. bovis*, *M. caprae*, *M. microti* y *M. pinnipedii* se consideran sinónimos heterotípicos (variantes) de *M. tuberculosis*; y *M. canettii*, *M. mungi* y *M. orygis* se reconocen como cepas de *M. tuberculosis*. Para mantener el vínculo con la nomenclatura histórica, en este capítulo se utilizan las denominaciones más reconocidas en lugar de las infra-específicas. Por lo tanto, seguimos utilizando las designaciones *M. bovis* o *M. caprae* en lugar de *M. tuberculosis* var. *bovis* o *M. tuberculosis* var. *caprae*, respectivamente, para facilitar la asociación previa.

Aunque existen pruebas considerables de la asociación de los miembros del MTBC con sus hospedadores, en la actualidad se considera que todas las especies de mamíferos son susceptibles a la tuberculosis, y la infección por cualquier miembro del complejo puede provocar una enfermedad casi idéntica en cualquier especie hospedadora. Los principales agentes patógenos asociados a los animales domésticos y salvajes son *M. bovis*, *M. caprae*, *M. microti*, *M. orygis* y *M. pinnipedii*. La exposición humana a cualquier miembro del MTBC (aparte de la cepa de la vacuna BCG) puede dar lugar a una infección zoonótica. *Mycobacterium tuberculosis* y *M. africanum* son principalmente agentes patógenos del ser humano, pero también se sabe que infectan a los animales. Aunque *M. canettii* sólo se ha descrito en humanos en África, se considera que se trata de una transmisión indirecta a partir de un posible reservorio animal salvaje que aún está por determinar. *Mycobacterium mungi* se ha recuperado de mangostas anilladas (*Mungos mungo*), y *M. suricattae* de suricatas (*Suricata suricatta*), pero ninguno de los dos microorganismos se ha descrito aún en otras especies de hospedadores. *Mycobacterium microti* se diagnostica a menudo en gatos debido a la transmisión desde los roedores hospedadores de mantenimiento. *Mycobacterium microti* también se ha encontrado de forma generalizada en jabalíes. *Mycobacterium tuberculosis sensu stricto* (s.s.) puede encontrarse como antroponosis en elefantes y animales de compañía. Dentro del complejo, *M. bovis*, *M. caprae* y *M. tuberculosis* se consideran variantes importantes en términos de mayor rango de hospedadores, y desde el punto de vista de la salud pública.

La enfermedad tiene una distribución mundial. Para obtener información actualizada, consulte la interfaz WAHIS de la OIE¹. Algunos países se consideran libres de tuberculosis en el ganado bovino. En otros, con programas activos de vigilancia y control de la tuberculosis animal, se notifican casos con muy poca frecuencia. La enfermedad sigue siendo endémica y no está controlada en África, Asia, América Latina ni la mayoría de los países de Oriente Medio. Se han descrito reservorios de tuberculosis en la fauna salvaje en varios países, y los miembros del MTBC se recuperan con frecuencia de hospedadores salvajes en libertad y en cautividad. Se han notificado contagios de presuntos reservorios de la fauna salvaje de mantenimiento al ganado bovino y a otras especies en ciertas regiones de Canadá (a partir del alce, *Cervus canadensis*), la Península Ibérica (jabalí, *Sus scrofa*, y varias especies de cérvidos), Irlanda y el Reino Unido (tejón europeo, *Meles meles*), Nueva Zelanda (principalmente la zarigüeya de cola de cepillo, *Trichosurus vulpecula*), Sudáfrica (búfalo africano, *Syncerus caffer*), y en ciertas regiones de Estados Unidos (ciervo de cola blanca, *Odocoileus virginianus*). En las regiones en las que el MTBC circula en la fauna salvaje, pueden existir múltiples hospedadores indirectos que van desde roedores y pequeños mamíferos hasta carnívoros y ungulados. En las regiones con una alta prevalencia de tuberculosis humana y una estrecha relación con el ganado bovino, el ser humano puede representar un hospedador de mantenimiento para las infecciones del ganado bovino, y se ha descrito la propagación de *M. tuberculosis*, *M. bovis* y *M. orygis* del ser humano al animal.

Cada vez hay más pruebas de la variación regional y geográfica en la distribución de los miembros del MTBC entre las especies de ganado. Por ejemplo, mientras que *M. bovis* parece ser la causa predominante de tuberculosis en el ganado en África, gran parte de Europa occidental y América, *M. caprae* parece ser la principal causa de tuberculosis en el ganado en los países de Europa central. Asimismo, cada vez hay más pruebas de que *M. tuberculosis*, *M. orygis* y *M. caprae* son las principales causas de tuberculosis en el ganado vacuno del sur de Asia.

La tuberculosis suele ser una enfermedad crónica, con signos que pueden aparecer tras varios meses a años. Los animales infectados pueden permanecer quiescentes durante mucho tiempo y reactivar la infección tras varios años o cuando están inmunosuprimidos. En ocasiones muy infrecuentes, en los animales pueden producirse infecciones agudas o hiperagudas, y si tienen lugar, son probables en animales con una comorbilidad subyacente, como una inmunosupresión.

La infección suele transmitirse por inhalación, ingesta o contacto directo con material infectado a través de las mucosas o heridas de la piel. El riesgo de infección puede depender de la dosis, la vía de infección o ciertos agentes patógenos, o bien de variables relacionadas con el manejo de los hospedadores o los animales. Los animales más jóvenes se consideran más susceptibles a la infección, y lo mismo ocurre con los inmunosuprimidos, gestantes o malnutridos.

Aunque la inhalación de gotitas respiratorias infectadas se considera el principal mecanismo de transmisión de MTBC en especies de Ganado, también es posible la infección por ingesta de leche (sobre todo en neonatos), alimento o agua contaminados, así como por contacto con exudados, orina, heces o secreciones vaginales o esperma contaminados. Los bacilos inhalados son fagocitados por los macrófagos alveolares. En función de ciertos factores, como la dosis o la vía de infección, así como de covariables relacionadas con el agente patógeno o el hospedador, el agente patógeno puede no sobrevivir para iniciar una infección activa, o los macrófagos pueden eliminar la infección por completo. Cuando la infección no se elimina de inmediato, el microorganismo puede quedar quiescente o proliferar de forma activa. La proliferación activa del microorganismo y el hecho de que el hospedador no pueda contener la infección dan lugar a lesiones focales o diseminadas que consisten en macrófagos Muertos y degenerados envueltos de múltiples células de origen linfoide. Más tarde, estas se fusionan dando lugar a células gigantes multinucleadas con caseificación o calcificación del centro necrótico seguidas de la formación de un granuloma envuelto de una cápsula fibrosa – el clásico “tubérculo”.

Estas lesiones granulomatosis varían entre ellas considerablemente en cuanto al tamaño y a menudo están encapsuladas. Pueden ser caseosas, caseo-calcáreas o calcificadas en Ganado bovino y en muchas otras especies de mamíferos. En los cérvidos u otros animales con un avance más rápido de la enfermedad, en lugar de los tubérculos clásicos aparecen abscesos llenos de pus. Aunque casi todos los sistemas orgánicos pueden sufrir estas lesiones, en los animales en los que la vía de infección ha sido la inhalatoria, los tubérculos a menudo se observan en los pulmones y en los ganglios linfáticos cráneo-torácicos. Por el contrario, en los animales en los que la principal vía de infección es la ingesta, es más probable encontrar las lesiones en órganos abdominales y en los ganglios linfáticos mesentéricos. En algunos animales, incluidos los que tienen la enfermedad avanzada, pueden producirse infecciones muy diseminadas y dar lugar a tuberculosis miliar con pequeños focos distribuidos por todo un tejido.

1 <https://www.woah.org/es/que-hacemos/sanidad-y-bienestar-animal/recopilacion-de-datos-sobre-enfermedades/>

La afectación de los ganglios linfáticos regionales drenantes es habitual en los casos de TB active. En un subgrupo de animales, las lesiones permanecen localizadas, dando lugar a enfermedad crónica e infección persistente. En algunos animales inmunosuprimidos o en los que presentan infección avanzada, puede producirse diseminación linfática o hematogena. Ello da lugar a una infección generalizada, o TB miliar, con lesiones nodulares en múltiples sistemas orgánicos, como los pulmones, el hígado, el riñón, el bazo, las glándulas mamarias, el tracto gastrointestinal y el Sistema nervioso central. En estos casos avanzados, la enfermedad siempre será mortal si se deja sin tratar.

No existen signos clínicos patognomónicos o propios de la tuberculosis de los mamíferos. Esta enfermedad tiene un inicio clásicamente lento y los animales infectados pueden transmitir la infección de forma active sin presentar signos evidentes. Los signos clínicos más observados en el Ganado bovino son progresivos y consisten en una pérdida de peso, debilidad, falta de apetito, temperatura corporal un poco alta o fluctuante, tos y linfadenopatía.

Suele observarse un aumento de tamaño de los ganglios linfáticos superficiales. En los casos avanzados, pueden romperse y drenar. Los ganglios linfáticos retrofaríngeos también pueden estar afectados, y el aumento de tamaño de los ganglios linfáticos más profundos puede dar lugar a una obstrucción de los vasos sanguíneos o linfáticos en los tractos respiratorio o gastrointestinal. La afectación respiratoria suele manifestarse con una tos productiva e intermitente que empeora en climas fríos o durante el ejercicio, y en los casos más avanzados empieza una disnea o taquipnea. Pueden observarse alteraciones de la función y la motilidad gastrointestinal, como diarrea o, con menor frecuencia, constipación. El ciervo, otros cérvidos y los camélidos a menudo presentan una enfermedad acelerada (en comparación con el Ganado bovino) con afectación multiorgánica. Los camélidos y los équidos pueden iniciar la enfermedad con más signos gastrointestinales. Los elefantes no presentan los signos clásicos hasta que la enfermedad está muy avanzada.

El diagnóstico antemortem de la tuberculosis en los animales puede realizarse por detección directa del microorganismo, o bien de forma indirecta por los signos de la reacción inmunitaria a la infección empleando la prueba de la tuberculina intradérmica (TST), la prueba de liberación del interferón gamma (IGRA) o pruebas de anticuerpos. En algunas especies, como primates no humanos y animales de compañía, estas pruebas pueden complementarse con radiografía o ecografía. Dada la naturaleza crónica de la infección y la ausencia de signos clínicos definitivos, en los animales es frecuente que solo se pueda diagnosticar tuberculosis postmortem durante la vigilancia en el matadero o durante la necropsia por identificación de las lesiones características. Dado que una parte importante de los animales que se clasifican como reactivos a la prueba de la tuberculina pueden no presentar lesiones visibles en la necropsia, por rutina se toman muestras de ganglios bronquiales, mediastínicos y otros durante la vigilancia en el matadero, con el fin de confirmar la detección de la infección.

La detección microbiológica directa de la tuberculosis suele realizarse mediante cultivo de muestras tisulares, exudado y otros líquidos o secreciones en los que se sospeche la infección, o bien de lavados de la trompa en los elefantes. Pueden establecerse diagnósticos preliminares mediante identificación microscópica de bacilos ácido resistentes característicos en muestras de secreciones o tisulares o en tinciones histopatológicas de células gigantes multinucleadas con necrosis caseificada central; no obstante, la prueba microscópica a menudo puede dar falsos negativos, incluso en animales enfermos, debido a la escasa presencia de micobacterias. El cultivo de micobacterias se lleva a cabo con crecimiento en medios sólidos o líquidos selectivos, seguido de pruebas confirmativas que incluyen la identificación de ácido nucleico específico de micobacterias u otros biomarcadores microbianos. Los métodos de detección directa, como el cultivo, son las técnicas definitivas para el diagnóstico de la tuberculosis en los animales, pero son lentos y difíciles de realizar. Por este motivo, para la detección directa de ADN en muestras biológicas, cada vez se utilizan más los métodos rápidos, como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

La demostración de reacción inmunitaria de los animales frente a microorganismos del MTBC es el método indirecto más utilizado para la identificación de animales presuntamente infectados. La principal prueba de cribado de los animales, la TST, es una medición *in vivo* de la reacción de hipersensibilidad retardada a antígenos presente en los microorganismos del MTBC. Esta prueba se lleva a cabo mediante inyección intradérmica de un derivado proteico purificado (o tuberculina) procedente de una cepa conocida de *M. bovis* (PPD-B), y la medición del aumento posterior del grosor del pliegue de piel en el punto de inyección. El punto de administración de la prueba depende de la especie. En las regiones con alta exposición de los animales a micobacterias ambientales, la diferencia de grosores de la piel tras la inyección de PPD-B y tras la inyección de derivado proteico purificado de una cepa de *M. avium* (PPD-A) se utiliza para mejorar la especificidad, pero a menudo a expensas de la sensibilidad. Dado el uso histórico de la prueba y el hecho de que haya permitido eliminar programas de control, la TST es la prueba de la tuberculosis preferida para el diagnóstico y para el cribado previo al comercio de los animales.

La IGRA in vitro constituye una forma alternativa de medir la reacción inmunitaria celular a la infección. Esta prueba mide la liberación de interferón gamma de células hemáticas estimuladas con antígenos derivados de microorganismos del MTBC. Esta prueba se suele utilizar como auxiliar para retirar otros animales positivos y puede ser más cómoda que la prueba intradérmica, puesto que no requiere una manipulación reiterada del animal o intervalos largos antes de repetirla. No obstante, dado que la IGRA requiere una estimulación de células hemáticas vivas que exige un tiempo determinado, pueden resultar cara, complicada o difícil de aplicar, sobre todo en contextos remotos o de escasos recursos.

Dado que se considera que a lo largo de la infección se generan anticuerpos específicos de la infección por MTBC, las pruebas serológicas o de anticuerpos se consideran menos sensibles que las pruebas de detección de respuesta inmunitaria celular. Las pruebas serológicas más utilizadas son el ELISA o las pruebas de flujo lateral que miden anticuerpos específicos de antígenos del MTBC. Las pruebas de detección de anticuerpos pueden ser especialmente útiles para detectar indicios de respuesta inmunitaria a la tuberculosis en especies salvajes. En el Ganado, así como en ciertos cérvidos o camélidos, para asegurar la sensibilidad de la prueba, es necesaria la administración previa del antígeno de la prueba intradérmica dentro de un periodo de tiempo concreto.

se han evaluado vacunas como la del bacilo de Calmette-Guerin (BCG) para Ganado y especies salvajes. Según metaanálisis de estudios de exposición experimentales y de ensayos de campo, en el Ganado bovino, la vacuna BCG proporciona niveles modestos de eficacia directa. No obstante, si se tienen en cuenta los posibles efectos indirectos de reducción de la transmisión posterior, los modelos de simulación indican que la aplicación de programas vacunales en regiones endémicas en los que el cribado y sacrificio sanitaria no son viables, pueden acelerar considerablemente el control de la TB.

B. TÉCNICAS DE DIAGNÓSTICO

La mayoría de los miembros del MTBC son microorganismos zoonóticos. Las muestras de animales y los cultivos bacterianos que puedan contener micobacterias vivas deben manipularse a un nivel de bioseguridad y de contención que vendrá determinado por un análisis del riesgo biológico (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*). Ello debe incluir el uso de cabinas de seguridad biológica cuando sea necesario.

En el Ganado bovino, no se suelen observar signos clínicos de tuberculosis hasta que las lesiones son muy extensas. Por este motivo, no se pudo llevar a cabo un diagnóstico en animales sueltos ni el establecimiento de programas de vigilancia y erradicación hasta que Kock desarrolló la tuberculina, en 1890. La inoculación intradérmica de tuberculina, un filtrado de cultivo estéril concentrado de bacilos extraídos de los tubérculos constituye un medio indirecto de detección de una exposición previa o de infección activa en el que se mide la reacción inmunitaria de hipersensibilidad retardada. En los animales de compañía y en especies exóticas/de zoológico de gran valor, como técnica de diagnóstico preliminar a menudo se utiliza la radiografía.

La presencia de especies de MTBC en muestras clínicas y postmortem puede ponerse de manifiesto examinando frotis teñidos o cortes tisulares, con una confirmación mediante cultivo del microorganismo en medios de aislamiento primarios. Los recipientes que se usen para la toma de muestras deben ser limpios y estériles. Los recipientes de muestreo no estériles pueden dar lugar a fracasos en la identificación de miembros del MTBC debido al rápido crecimiento de micobacterias u otros microorganismos ambientales contaminantes. Los recipientes de plástico de un solo uso desechables, de 50 ml de capacidad, resultan útiles para gran variedad de muestras. Las muestras que deben enviarse al laboratorio tienen que envolverse y sellarse para que no haya fugas, y deberán empaquetarse bien para evitar roturas o aplastamiento durante el transporte. Deberán seguirse las *Dangerous Goods Regulations* (DGR) de la *International Air Transport Association* (IATA) para el envío de muestras por sospecha de enfermedades zoonóticas, tal como se resume en el Capítulo 1.1.2 *Obtención, envío y conservación de muestras para el diagnóstico*, y en el Capítulo 1.1.3 *Transporte de materiales biológicos*. La entrega de muestras al laboratorio en un periodo máximo de 48 horas mejora en gran medida la probabilidad de recuperación de miembros del MTBC mediante cultivo. Si se prevén retrasos en la entrega, las muestras deben refrigerarse o congelarse para retrasar el crecimiento de bacterias contaminantes y para preservar las micobacterias. En ambientes cálidos, o cuando la refrigeración resulte imposible, el tejido puede conservarse en una solución saturada de borato de sodio, pero solo durante periodos de tiempo cortos, de no más de 30 días.

Los principales métodos de diagnóstico y su respectiva idoneidad para cada finalidad se resumen en la Tabla 1 y se describen en los apartados siguientes. No es una lista exhaustiva, sino que indica qué pruebas son adecuadas para cada fin en las distintas especies de hospedadores.

Tabla 1. Métodos de diagnóstico disponibles para bovino, caprino y camélidos, y sus respectivos propósitos

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
Detección del agente						
Tinción ácido resistente y microscopía	–	–	–	+	–	–
Aislamiento bacteriano	++	–	++	+++	++	–
Histopatología y detección de antígeno	+	–	+	+	–	–
PCR en tiempo real (directa de las muestras)	++	–	++	+++	++	–
Detección de respuesta inmunitaria						
Prueba intradérmica de hipersensibilidad retardada	+++ (+++ / +)	+++ (++ / +)	+++ (++ / ++)	++	+++ (++ / ++)	–
IGRA	++ (++ / +)	++ (+ / +)	+++ (++ / +)	+ (– / –)	+++ (++ / +)	–
ELISA de detección de anticuerpos	+ (– / ++)	+ (+ / ++)	+ (– / ++)	–	+ (– / ++)	–
Prueba de anticuerpos de flujo lateral	+	+	+	–	+	–

Clave: +++ = recomendada para este propósito; ++ = recomendada pero tiene limitaciones; + = adecuada en muy pocos casos; – = no adecuada para este propósito. Los métodos cuya idoneidad para el propósito indicado difiere según se trate de bovinos, caprinos o camélidos se indican en negro para bovinos, y las diferencias respecto a caprinos o camélidos se muestran entre paréntesis en rojo y azul, respectivamente.

PCR = reacción en cadena de la polimerasa; IGRA = prueba de liberación del interferón gamma; ELISA = prueba de inmunoadsorción ligada a enzimas

1. Detección e identificación del agente

1.1. Examen microscópico

Se puede sospechar de *Mycobacterium* spp. a nivel microscópico en frotis directos de muestras clínicas y en material de tejido preparado empleando la tinción de Ziehl–Neelsen ácido resistente clásica, pero también se puede utilizar una tinción ácido resistente fluorescente. Las técnicas de inmunoperoxidasa también pueden dar resultados satisfactorios. El diagnóstico preliminar de micobacteriosis puede realizarse con tinción de hematoxilina y eosina si el tejido tiene lesiones histológicas características que

indiquen una reacción inmunitaria del animal frente a la infección (necrosis caseosa, mineralización, células epitelioides, células gigantes multinucleadas y macrófagos). Dado que las lesiones suelen ser paucibacilares, es posible que en los cortes histológicos no se detecten microorganismos ácido-resistentes, aunque en el cultivo puedan aislarse microorganismos del MTBC. No obstante, en lesiones de primates, felinos, mustélidos (tejones) o marsupiales (zarigüeya australiana), se observan grandes cantidades de microorganismos ácido-resistentes.

1.2. Cultivo

La recuperación de micobacterias mediante cultivo bacteriológico depende de factores como la técnica de muestreo en el matadero, el tipo de muestras tisulares obtenidas y su conservación durante el transporte al laboratorio (refrigeración o congelación), así como del paso de descontaminación química y del tipo de medios de cultivo escogidos para cultivar las micobacterias.

Los mejores tejidos para el aislamiento de microorganismos del MTBC se obtienen principalmente durante el examen postmortem de animales que han dado positivo a las pruebas de la tuberculina o del interferón gamma. Deben tomarse muestras de los ganglios linfáticos anómalos y de los órganos parenquimatosos con lesiones compatibles con TB para su examen y cultivo. Si no se detectan lesiones anatomopatológicas, deben tomarse ganglios linfáticos específicos de la cabeza y de los tractos respiratorio y/o digestivo para el mismo fin. Los animales de compañía y los de zoológico con sospecha de tuberculosis pueden analizarse mediante biopsia de ganglios linfáticos, hisopos orales o lavado traqueobronquial.

Para procesar las muestras para el cultivo, las muestras tisulares se preparan retirando el material innecesario (como grasa), cortándolas en trozos pequeños, combinándolas todas y homogeneizándolas empleando stomacher o triturador de tejidos (por ejemplo, mortero, mezcladora, etc.) con PBS estéril, seguido de la obligatoria descontaminación. El objetivo de la descontaminación es evitar el crecimiento de otras bacterias presentes en las muestras tisulares. Debido a la pared celular propia de las micobacterias, estas pueden resistir a ciertos detergentes o cambios extremos en el pH. Se han descrito muchos protocolos, como el tratamiento con detergente de cloruro de hexadecilpiridinio (HPC) al 0,375–0,75%, hidróxido de sodio al 2–4%, ácido oxálico al 5% o ácido sulfúrico al 4%, entre otros. Es importante controlar el tiempo de exposición de los tejidos al descontaminante para evitar la muerte de las micobacterias. Dependiendo de la cantidad de tejido y de descontaminante, suele oscilar entre 10 y 20 minutos. Cuando se utilizan métodos ácidos o alcalinos, deben devolverse a un pH neutro tras la descontaminación a temperatura ambiente. La suspensión se centrifuga, el sobrenadante se desecha y el sedimento se utiliza para cultivo y examen microscópico.

Para el aislamiento primario, el sedimento se suele inocular en un conjunto de medios sólidos y/o líquidos. Se pueden emplear distintos medios sólidos con huevo, como Lowenstein–Jensen, Coletsos base o Stonebrink. Estos medios deben contener o bien piruvato o bien piruvato y glicerol. También pueden usarse medios sólidos con agar, como Middlebrook 7H10 o 7H11 o un medio con agar y sangre (Cousins *et al.*, 1989, Gormley *et al.*, 2014).

En algunos laboratorios se utilizan de forma habitual sistemas de cultivo líquidos; en estos sistemas, el crecimiento se mide por medios fluorométricos. Los medios líquidos permiten el crecimiento en menos tiempo y una detección de micobacterias más rápida. No obstante, los inconvenientes son una tasa de contaminación mayor y la imposibilidad de establecer un diagnóstico inicial en base a las características morfológicas de las colonias. La PCR es un método útil para confirmar el crecimiento bacteriano en los medios líquidos. Además, debe tenerse en cuenta que algunos descontaminantes (por ejemplo, HPC), no son compatibles con ciertos sistemas líquidos.

Los cultivos se incuban durante al menos 6 semanas, preferiblemente durante 10–12 semanas (y hasta un máximo de 16 semanas cuando hay sospecha de *M. microti*) a 37°C con o sin CO₂. El periodo de incubación también depende de si se usan medios líquidos o sólidos. Los medios deben estar en tubos bien cerrados para evitar que se sequen. Cuando los medios sólidos son tubos de medio inclinado, se examinan para comprobar si hay crecimiento macroscópico a intervalos semanales durante todo el periodo de incubación. Cuando hay crecimiento visible, se pueden preparar frotis y teñirse con la técnica de Ziehl–Neelsen. Como alternativa, se puede extraer ADN de las colonias y llevarse a cabo cualquier PCR específica de micobacterias o especies del MTBC (véase el apartado 1.3 Métodos de reconocimiento de ácidos nucleicos). El crecimiento de *M. bovis* en general tiene lugar en un periodo de

3-6 semanas de incubación en función de los medios utilizados, de la presencia de lesiones compatibles con tuberculosis y/o de la carga bacteriana inicial de la muestra tisular.

Si se produce contaminación macroscópica de los medios de cultivo, el proceso de cultivo debe repetirse empleando inóculos retenidos con un descontaminante alternativo o modificando la concentración o el tiempo de exposición al descontaminante. El factor limitante en el aislamiento es a menudo la mala calidad de las muestras enviadas, y por lo tanto debe hacerse todo lo posible para garantizar que el laboratorio reciba muestras de calidad.

Unos patrones de crecimiento y una morfología de las colonias característicos pueden facilitar un diagnóstico preliminar; no obstante, toda cepa aislada debe confirmarse. A menudo es necesario distinguir *M. bovis* de otros miembros del MTBC, como *M. tuberculosis*, *M. africanum*, *M. caprae*, *M. microti* y *M. pinnipedii*.

Mycobacterium avium u otras micobacterias ambientales también pueden aislarse de lesiones similares a las de la tuberculosis en el ganado bovino. En estos casos, puede ser necesaria una identificación definitiva del agente causal, así como excluir infecciones mixtas.

Las cepas aisladas pueden identificarse de forma preliminar a partir de sus características de crecimiento y bioquímicas, aunque ello puede ser lento debido al lento crecimiento de los miembros del MTBC. En un medio sólido de piruvato adecuado, las colonias de *M. bovis* son lisas y de un color blanquecino (beige). Este microorganismo crece lentamente a 37°C pero no a 22°C ni a 45°C. Un método para diferenciar micobacterias del MTBC de micobacterias no tuberculosas es cultivarlas en medios que contengan 500 mg/l de ácido p-nitrobenzoico. El MTBC no crecerá, mientras que la mayoría de las micobacterias no tuberculosas sí lo harán.

Mycobacterium bovis es una bacteria microaerófila y no cromógena sensible a la hidracida de ácido 2-tiofenocarboxílico (THC) y a la hidracida de ácido isonicotínico (INH). Las pruebas de sensibilidad a fármacos pueden llevarse a cabo mediante distintos protocolos, como el crecimiento en medio de agar sólido 7H10/7H11 Middlebrook, en medios con huevo o en sistemas líquidos (ECDC, 2018). El medio con huevo debe prepararse sin piruvato porque inhibe la INH, y podría tener un efecto similar en la TCH (que es un análogo de la INH) y, por lo tanto, dar falsos positivos (resistencia). Las cepas de *Mycobacterium bovis* también son sensibles al ácido paraaminosalicílico y a la estreptomina. Las concentraciones de fármaco efectivas son diferentes en función de si se trata de medios con huevo o medios con agar. Los resultados de producción de niacina y reducción de nitrato son negativos en el caso de *M. bovis*. En la prueba de la amidasa, *M. bovis* es positiva para ureasa y negativa para nicotinamidasas y pirazinamidasas.

1.3. Métodos de reconocimiento de ácidos nucleicos

1.3.1. Reacción en cadena de la polimerasa

Las cepas aisladas se pueden identificar de forma rápida a nivel de MTBC utilizando una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) que tenga por objetivo la región 16S-23S de rRNA, la inserción de secuencias como IS6110 o IS1081, o secuencias similares que representen objetivos específicos del MTBC. La identificación a nivel de especie de miembros del MTBC puede lograrse con métodos de genética molecular para la detección de presencia o ausencia de “regiones de diferencias” genómicas o de polimorfismos que definan especies (mononucleotídicos). La identificación a nivel de subespecie se puede lograr con métodos de tipificación molecular, como la espoligotipificación o, cada vez más, la secuenciación de genoma completo, para contribuir a la diferenciación de cepas, así como a los análisis epidemiológicos a nivel molecular.

La PCR se utiliza de forma habitual para la detección de miembros del MTBC en muestras clínicas (principalmente esputo) en humanos, y cada vez se aplica más para el diagnóstico de tuberculosis en animales. Se han evaluado varios ensayos comerciales y varios métodos “internos” para la detección de miembros del MTBC en muestras frescas o tejidos fijados. Es de importancia crucial que el método de extracción de ADN que se emplee incluya un paso de lisis mecánica, así como la lisis química (Lorente-Leal et al., 2019). Se han identificado varias dianas del MTBC o específicas de especie para la amplificación, como se menciona arriba. Las dianas más frecuentes para la identificación por PCR de miembros del MTBC son los elementos de inserción multicopia IS6110 o IS1081 (o ambos). Se han descrito varios ensayos para la detección

mediante PCR en tiempo real de estas dos dianas, con rendimiento entre bueno y excelente en comparación con el cultivo o la histopatología (por ejemplo, Courcoul *et al.*, 2014; Sanchez-Carvajal *et al.*, 2021). Ejemplos de secuencias de cebador y sonda validadas incluyen los que se utilizan para el programa nacional de la USDA de vigilancia de la tuberculosis animal, cuya diana es IS1081:

IS1081_F1 5'-GGC-TGC-TCT-CGA-CGT-TCA-TC;
 IS1081_R1 5'-CGC-TGA-TTG-GAC-CGC-TCA-T;
 IS1081_P1 5'-CTG-AAG-CCG-ACG-CCC-TGT-GC;

Y para IS6110:

IS6110_F1 5'-CAG-GAC-CAC-GAT-CGC-TGA-TC;
 IS6110_R1 5'-CTG-CCC-AGG-TCG-ACA-CAT-AG;
 IS6110_P1 5'-CGT-CCC-GCC-GAT-CTC-GTC-CA,
 entre otros (Dykema *et al.*, 2016).

Los productos de la amplificación se detectan preferiblemente por hibridación con sondas en ensayos en tiempo real o se visualizan mediante electroforesis en gel y tinción. Los kits comerciales y los métodos "internos", en tejidos frescos, congelados o conservados en ácido bórico a menudo no rinden bien durante las comparaciones entre laboratorios, y de ahí que puedan requerir una validación adicional para asegurar la exactitud. A menudo preocupa la aparición de falsos positivos o negativos en muestras que contienen bajas cantidades de bacilos. El procesado de la muestra previo al análisis, como la descontaminación y los procedimientos de extracción de ADN, la eliminación de inhibidores de la enzima polimerasa, etc., tienen un efecto considerable en el rendimiento analítico. Los procedimientos normalizados de trabajo, los controles de la extracción y la amplificación internos y externos, los procedimientos para la prevención de la contaminación cruzada y la aplicación de PCR en tiempo real en tubo cerrado son muy recomendables para una identificación fiable de miembros del MTBC mediante genética molecular.

1.3.2. Identificación por ADN

Se han desarrollado varias técnicas de identificación por ADN para distinguir a los miembros del MTBC con fines epidemiológicos moleculares (Guimaraes y Zimpel, 2020; Merker *et al.*, 2017). Estos métodos son útiles para identificar y rastrear las fuentes de origen, así como para rastrear la transmisión y propagación de los miembros del MTBC dentro de los rebaños y a nivel mundial. La tipificación con oligonucleótidos espaciadores, o espilogotipificación, es un método basado en la PCR que se ha utilizado mucho para el genotipado de miembros del MTBC (Kamerbeek *et al.*, 1997). El método consiste en la amplificación de *loci* codificados por el cromosoma que contienen un número variable de secuencias cortas de repetición directa intercaladas con espaciadores no repetitivos. Los patrones de "espilogotipo" dependientes de la cepa del ADN amplificada *in vitro* se determinan después de la hibridación con múltiples oligonucleótidos espaciadores, y se representan como códigos digitales. La aplicación de protocolos y nomenclatura estandarizados para la identificación y designación de los espilogotipos y el establecimiento de bases de datos en línea que permiten la búsqueda para el cotejo de patrones ha permitido en gran medida la comparación entre laboratorios de los espilogotipos para el seguimiento y la epidemiología de las cepas² (véase Couvin *et al.*, 2019). La espilogotipificación se ha combinado a menudo con la tipificación de unidades repetitivas intercaladas de micobacterias (MIRU) y repeticiones variables en tándem (VNTR) para aumentar el poder discriminatorio del genotipado de MTBC. En la actualidad, se utiliza un ensayo de PCR MIRU-VNTR de 24 *loci* para *M. tuberculosis* (Supply *et al.*, 2006), pero se recomienda optimizar la combinación de *loci* para una región específica en el caso de *M. bovis* y *M. caprae* para reducir el coste y el tiempo de realización de los ensayos y maximizar el poder discriminatorio.

1.3.3. Secuenciación de genoma completo

Los genomas de todos los miembros del MTBC han sido secuenciados, y la secuenciación del genoma completo se utiliza cada vez más de forma rutinaria para genotipar y distinguir entre

2 www.mbovis.org; www.pasteur-guadeloupe.fr:8081/SITVIT2/index.jsp

cepas aisladas para estudios epidemiológicos, así como para conocer las cadenas y dinámicas de transmisión y la evolución del MTBC (Guimaraes y Zimpel, 2020).

2. Prueba de hipersensibilidad retardada

2.1. Prueba intradérmica de la tuberculina

La prueba intradérmica de la tuberculina es el método estándar para la detección de la tuberculosis en una amplia variedad de mamíferos, incluidas las especies bovina, ovina, caprina y cérvida. La prueba consiste en la administración intradérmica de un derivado proteico purificado de la tuberculina (PPD) y la medición del aumento del grosor de la piel en el punto de inyección resultante de una reacción de hipersensibilidad retardada después de un intervalo de tiempo determinado (por ejemplo, 72 horas en el ganado vacuno).

La TST no se recomienda para los animales de compañía, como los perros y los gatos, en los que el examen radiográfico ha suplantado su uso.

La TST puede realizarse mediante una prueba intradérmica única (SIT) utilizando PPD-B sola, ya sea como prueba cervical única (SCT) o prueba de pliegue caudal (CFT); o mediante la prueba cervical comparativa (CCT), que mide la diferencia en el aumento del grosor de la piel entre la PPD-B y la PPD-A. La SIT suele mostrar una mayor sensibilidad que la TCC, mientras que la TCC proporciona una mayor especificidad. Esta última se utiliza a menudo para tener en cuenta la posible sensibilización de los animales a las micobacterias ambientales o a los microorganismos antigénicamente reactivos de forma cruzada que no son miembros del MTBC (Good *et al.*, 2018).

Las pruebas cutáneas de antígenos definidos (DST) desarrolladas recientemente pueden superar algunas de las limitaciones de la SIT y la TCC con una sensibilidad mejorada en comparación con la TCC y una especificidad mejorada en comparación con la SIT. Las DST también pueden utilizarse para diferenciar los animales infectados de los vacunados con BCG (Srinivasan *et al.*, 2019).

La TSE y la TCC se realizan en la región cervical media de las especies bovina, ovina, caprina y cérvida, mientras que la TFC se realiza en el pliegue caudal de la cola (pero no es adecuada para los cérvidos). Las respuestas de hipersensibilidad a la tuberculina observadas en la región cervical son mayores que en el pliegue caudal. Sin embargo, tanto la SCT como la CFT se han aplicado con éxito para la vigilancia, el control y la eliminación de la tuberculosis en el ganado vacuno en varios países.

Las pruebas cutáneas de la tuberculina no están bien validadas en especies distintas de los bóvidos y los cérvidos. Por consiguiente, los métodos de aplicación e interpretación de la SCT, la CCT y la CFT en los bovinos se consideran a menudo como los predeterminados en otras especies. En algunas especies puede estar indicado alternar los lugares de administración del antígeno y el intervalo de medición de las respuestas de hipersensibilidad. Por ejemplo, en los cerdos, se administra en la base de la oreja, y la reacción de hipersensibilidad medida se evalúa después de 48 o 72 horas. En los primates no humanos, la "tuberculina antigua" se administra por vía intrapalpebral en el párpado superior (véase más adelante, también el capítulo 3.10.10 Enfermedades transmisibles de los primates no humanos).

Aunque los animales expuestos a los microorganismos del MTBC muestran hipersensibilidad a la tuberculina, un resultado positivo de la prueba cutánea de la tuberculina no puede distinguir a los animales infectados activamente de los que pueden haberse recuperado de la infección. Por lo tanto, la prueba debe interpretarse en su contexto.

Las reacciones de hipersensibilidad retardada pueden no desarrollarse durante un período de 3 a 6 semanas después de la infección y los animales recientemente infectados o inmunodeprimidos pueden presentar un falso negativo. Por lo tanto, para declarar un rebaño "libre de infección tuberculosa" es necesario obtener resultados negativos en varias pruebas intradérmicas secuenciales realizadas a intervalos de 6-8 semanas en todos los animales del rebaño. En algunos casos, puede producirse anergia o hipersensibilidad a la tuberculina en animales infectados crónicamente y con enfermedad grave, lo cual conduce a falsos negativos. Además, los animales pueden desensibilizarse debido a la administración repetida de la tuberculina, en particular cuando se aplica a intervalos inferiores a 6 semanas, y los verdaderos positivos pueden pasar desapercibidos. En estos casos de sospecha de falsos

negativos, pueden utilizarse pruebas serológicas o de respuesta inmunitaria mediada por células de antígenos definidos como ensayos alternativos o confirmatorios.

La decisión de utilizar la SCT, la CFT o la CCT depende de la normativa local y del contexto y los objetivos generales para la realización de la prueba. La CCT, con mayor especificidad, suele aplicarse con fines de vigilancia o al inicio de un programa de control en un país endémico. Una vez confirmada la presencia de la enfermedad, puede preferirse un método de mayor sensibilidad para evitar que animales infectados pasen desapercibidos. La TCC también es útil en regiones con alta exposición ambiental a *Mycobacterium*. Por el contrario, para confirmar la ausencia de infección en entornos de baja carga, se suelen aplicar SCT o CFT con mayor sensibilidad.

2.2. Procedimiento analítico

2.2.1. Administración intradérmica de PPD

El personal que lleve a cabo la prueba debe estar específicamente formado y certificado para realizar pruebas con animales. Antes de la administración del antígeno, los puntos de inyección deben ser rasurados y limpiados. Durante la realización de la prueba en la parte media de la cerviz, debe medirse el grosor del pliegue cutáneo en el punto de inyección previsto con calibradores, y el lugar debe marcarse adecuadamente. Todas las mediciones del grosor de la piel deben registrarse en milímetros enteros, ya que las mediciones en fracciones de milímetros pueden dar una falsa sensación de precisión. La misma persona debe medir el grosor del pliegue cutáneo antes de la inyección y después del intervalo de tiempo especificado utilizando los mismos calibradores para evitar la introducción adicional de variaciones relacionadas con el operador o el equipo.

A continuación, se inserta oblicuamente una aguja corta, con el borde biselado hacia fuera y una jeringa graduada cargada de antígeno en las capas más profundas de la piel para asegurar la administración de un volumen específico de tuberculina. Preferiblemente, esto debe realizarse utilizando una jeringa multidosis calibrada y bien mantenida o una pistola de inyección múltiple. Debido a la delgada y sensible piel de los cérvidos, ovejas, cabras y otras especies, en algunos casos puede ser preferible una aguja de calibre estrecho (por ejemplo, 25G). La potencia de los antígenos PPD-B y PPD-A debe ser estimada por métodos biológicos comparando con PPD estándar de referencia. Deben administrarse un mínimo de 2.000 unidades internacionales (UI) de PPD en un volumen no superior a 0,2 ml. Una inyección correcta se confirma visualizando y palpando una pequeña hinchazón similar a un guisante en el punto de inyección.

En el caso del CCT, la distancia entre los dos puntos de inyección debe ser de aproximadamente 15 cm: para evitar errores, por rutina se inyecta PPD-A en el punto superior y PPD-B en el inferior. En los animales jóvenes o en las razas más pequeñas que no tienen espacio suficiente para preparar los dos puntos de inyección en el mismo lado del cuello, se puede realizar una inyección en lugares idénticos en el centro del tercio medio de ambos lados del cuello.

En la CFT, se inserta una aguja corta, con el borde biselado hacia fuera, de forma oblicua en las capas más profundas de la piel en la cara lateral del pliegue caudal, a medio camino del pliegue y entre la línea del pelo y la cara ventral del pliegue. El lugar de la inyección debe inspeccionarse visualmente y palparse con cuidado para detectar cambios respecto a lo normal.

El aumento del grosor del pliegue cutáneo en cada punto de inyección se medirá después de un intervalo de 72 (\pm 4) horas o según lo prescrito en función de la especie.

2.2.2. Interpretación de los resultados de la prueba en el ganado bovino

La interpretación de los resultados de la prueba cutánea se basa en la observación de los signos clínicos en el punto de inyección y el aumento registrado en el grosor de la piel tras la administración del antígeno. Se considera que los animales son reactores cuando el aumento del grosor del pliegue cutáneo supera un umbral preestablecido. Las siguientes directrices pueden variar en función del contexto local y de la normativa vigente. Se permiten interpretaciones más estrictas de los resultados de las pruebas, por ejemplo, considerar positiva cualquier reacción palpable, y a menudo se recomiendan, por ejemplo, en el CFT, para acelerar los programas de control locales o nacionales.

2.2.2.1. Prueba cervical única (SCT)

La prueba cervical única requiere una única inyección de PPD-B y la reacción suele considerarse negativa si sólo se observa una hinchazón escasa, con un aumento de 2 mm o menos. La reacción se considera no concluyente si el aumento del grosor del pliegue cutáneo es superior a 2 mm e inferior a 4 mm y se considera positiva si hay un aumento de 4 mm o más.

ΔB	Interpretación del resultado
≤ 2 mm	Negativo
> 2 y < 4 mm	Inconcluyente
≥ 4 mm	Positivo

Los animales que no sean concluyentes en la prueba intradérmica única deberán someterse a una segunda prueba tras un intervalo de 6 semanas. Los animales que resulten repetidamente inconcluyentes deben considerarse positivos.

Se recomienda una interpretación más estricta, especialmente en una población de alto riesgo o en animales que hayan estado en contacto.

2.2.2.2. Prueba cervical comparativa (CCT)

En la interpretación de la CCT, una reacción a la PPD-B se considera habitualmente negativa si el aumento del grosor de la piel es inferior a 2 mm. Dependiendo de la legislación local, la CCT suele considerarse positiva si el aumento del grosor de la piel en el lugar de la inyección de la PPD-B es 4 mm mayor que la reacción obtenida en el lugar de la PPD-A. La reacción se considera no concluyente si la reacción a la PPD-B es de 2 mm o más, y es mayor que la reacción a la PPD-A en 4 mm o menos. Todos los reactores no concluyentes deben volver a someterse a la prueba después de 6 semanas. Si el aumento del grosor de la piel con la PPD-B es inferior o igual al aumento de la misma con la PPD-A, el animal se clasifica como negativo.

Los animales que no sean concluyentes en la CCT deberán someterse a una segunda prueba después de un intervalo de 6 semanas. Los animales que sean positivos o de nuevo no concluyentes deben ser considerados como positivos y ser retirados del rebaño. Para acelerar la eliminación de la tuberculosis de un rebaño infectado conocido, puede adoptarse una interpretación más estricta en la que los resultados no concluyentes pueden interpretarse como positivos para evitar el periodo de espera de desensibilización de 6 semanas. La presencia/ausencia de signos clínicos también debe tenerse en cuenta para determinar el estado del rebaño.

Interpretación de la prueba cervical comparativa

Primera ronda de prueba			Repetición de la prueba en los animales inconcluyentes		
ΔB (mm)	$\Delta B - \Delta A$ (mm)	Interpretación del resultado	ΔB (mm)	$\Delta B - \Delta A$ (mm)	Interpretación del resultado
< 2	-	Negativo	< 2	-	Negativo
≥ 2	< 0	Negativo	≥ 2	< 0	Negativo
	≥ 0 and < 4	Inconcluyente		≥ 0 y < 4	Positivo
	≥ 4	Positivo		≥ 4	Positivo

2.2.2.3. Prueba del pliegue caudal (CFT)

La interpretación estándar es que cualquier hinchazón, sensibilidad o aumento del grosor de la piel se considera una respuesta positiva a la tuberculina bovina. Esta interpretación puede variar en función de las normativas locales, por ejemplo, en algunos países puede

utilizarse un aumento de >3 mm como punto de corte para las reacciones positivas. El grado de las reacciones puede variar y no es indicativo del estado infeccioso. Las reacciones pueden ser pequeñas, duras, del tamaño de un guisante, difusas, circunscritas o grandes. Si hay dudas sobre si se ha producido una reacción, se puede palpar el lado opuesto de la cola para determinar si hay un cambio respecto a lo normal. Se debe registrar cualquier cambio observado. La evaluación de la prueba sin palpación es inaceptable.

Como en el caso de la SIT, el uso de la CFT como prueba de cribado puede dar lugar a falsas reacciones. La determinación de un positivo a la CFT requiere una prueba secundaria mediante el uso de la CCT, que debe realizarse dentro de los 10 días siguientes a la prueba inicial, o bien después de 60 días.

2.2.3. Interpretación de los resultados en los cérvidos

En las especies de cérvidos (alces, renos, ciervos rojos, ciervos de cola blanca, sica y otros) sólo se utiliza la prueba de la parte media de la cerviz. En los cérvidos, ambos puntos deben estar en el tercio medio de un lado del cuello, el punto anterior al menos a 100 mm detrás de la cabeza, y el punto posterior, aproximadamente a 130 mm del otro. En los ciervos más pequeños, los puntos de inoculación se sitúan a ambos lados del cuello.

Las pruebas cutáneas repetidas sólo deben realizarse con un intervalo de 120 días para minimizar la desensibilización. En la UE, en los cérvidos se utiliza la misma interpretación que para los bovinos, tanto para la SCT como para la CCT. En los Estados Unidos, en los cérvidos cautivos se recomienda la SCT como prueba primaria y la CCT como prueba complementaria. Si un animal reacciona a la SCT, se indica una nueva prueba con la CCT después de 120 días.

2.2.4. Interpretación de los resultados en ovejas y cabras

La prueba cutánea y su interpretación están menos validadas en ovinos y caprinos que en bovinos y cérvidos (véase Roy *et al.*, 2020). La prueba cutánea puede realizarse en ambas especies en la zona cervical media o en la zona escapular utilizando la SCT o la CCT, o en el pliegue caudal. Pueden utilizarse otras zonas libres de lana, como, por ejemplo, las zonas internas superiores de las patas traseras, lo que evita la pérdida de calidad de la lana. Dado el pequeño tamaño del cuello en ambas especies, la CCT suele realizarse aplicando los PPD en lados opuestos del cuello. La evaluación de la SCT y la CCT puede realizarse midiendo y aplicando la misma interpretación que en el caso de los bovinos, en función de la legislación nacional.

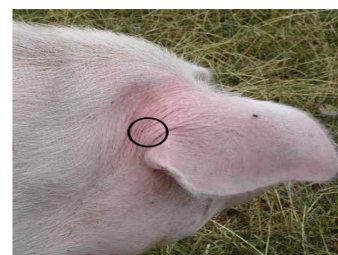
2.2.5. Interpretación de los resultados en los camélidos

La prueba cutánea puede realizarse en la región axilar, cervical o preescapular. Cuando se utilizan tanto la PPD-B como la PPD-A, deben inyectarse por vía intradérmica a cada lado en puntos idénticos (cervical, preescapular o axilar). En los puntos cervical y preescapular, puede ser posible inyectar ambas PPD en el mismo lado si están suficientemente separadas. La evaluación de la SCT y la CCT puede hacerse midiendo y aplicando la misma interpretación que para el ganado vacuno, dependiendo de la legislación nacional.

Las pruebas cutáneas para los camélidos han mostrado una sensibilidad y especificidad menores en comparación con las de los bovinos. En la UE, se recomienda utilizar como prueba complementaria al protocolo serológico.

2.2.6. Interpretación de los resultados en los cerdos

Es aconsejable utilizar la CCT con una dosis de 2000 UI de cada antígeno. Las reacciones en los cerdos pueden ser muy pronunciadas y las concentraciones más altas de PPD pueden provocar necrosis cutánea. El punto preferido es la piel suelta de la superficie dorsal de la oreja en el surco entre la cabeza y la oreja. La PPD-A y la PPD-B se inyectan en la base de la oreja izquierda y derecha, respectivamente. La reacción puede leerse después de 48 o 72 horas. La interpretación debe seguir el mismo esquema que el utilizado para la CCT en bovinos o por palpación, según la legislación local.



2.2.7. Interpretación de los resultados en animales exóticos y de zoológico

En el caso de los primates no humanos, la “tuberculina antigua de los mamíferos” se administra por vía intrapalpebral en el centro del párpado superior adyacente al borde del párpado, para detectar la tuberculosis causada por *M. tuberculosis* o *M. bovis*. Si es necesario repetir la prueba, se debe alternar el párpado entre cada prueba. Las lecturas se realizan a las 24, 48 y 72 horas después de la inyección. Las reacciones de grado 1 y 2 son negativas, las de grado 3 son no concluyentes y las de grado 4 y 5 se interpretan como positivas. Véase también el capítulo 3.10.10 Enfermedades transmisibles por primates no humanos.

Grado	Reacción
0	Sin reacción
1	Hematoma – extravasación de sangre en el párpado asociada a la inyección de la tuberculina
2	Grados variables de eritema palpebral
3	Tumefacción moderada con o sin eritema
4	Tumefacción evidente del párpado con caída y con o sin eritema
5	Necrosis palpebral con grados variables de tumefacción, incluido un cierre parcial o completo del párpado

Las pruebas intradérmicas de tuberculina no se recomiendan en elefantes debido al alto porcentaje de falsos negativos en animales que han dado positivo en el cultivo.

2.3. Pruebas intradérmicas con antígeno definido

La investigación dirigida a la identificación y caracterización de los componentes antigénicos clave de las cepas naturales aisladas de *M. bovis* y de las cepas de la vacuna BCG ha llevado al desarrollo de pruebas cutáneas y análisis de sangre que se basan en la detección de respuestas a antígenos definidos molecularmente (Middleton *et al.*, 2021). Estas pruebas de diagnóstico de antígenos definidos podrían utilizarse por sí solas o en combinación con otras pruebas, incluidas las pruebas convencionales de PPD de tuberculina, para mejorar la sensibilidad o especificidad del diagnóstico, así como para ayudar a diferenciar los animales infectados por *M. bovis* de los que han sido vacunados o expuestos a micobacterias ambientales (Srinivasan *et al.*, 2019).

3. Pruebas de laboratorio en sangre

Además de la prueba intradérmica de la tuberculina, se han desarrollado una serie de pruebas sanguíneas que miden la respuesta inmunitaria celular o humoral de los animales frente al MTBC. Debido a consideraciones de coste y/o complejidad, estos ensayos basados en el laboratorio se utilizan a menudo como pruebas auxiliares para mejorar la detección de animales infectados (pruebas paralelas), o para confirmar los resultados de una prueba cutánea intradérmica (pruebas en serie). Se sabe que la administración de pruebas cutáneas de tuberculina aumenta la sensibilidad de las pruebas basadas en anticuerpos, si el suero se toma entre 2 y 8 semanas después de la prueba cutánea, lo que conduce a una mayor precisión de la prueba. El IGRA mide la inmunidad celular, mientras que la reacción humoral se mide mediante métodos serológicos como el ELISA y las pruebas de flujo lateral.

3.1. Ensayo de liberación de interferón gamma (IGRA)

En esta prueba, se mide la liberación de una linfocina interferón gamma en un sistema de cultivo de sangre completa. La prueba se basa en la liberación de interferón-gamma de linfocitos sensibilizados durante un período de incubación de 16 a 24 horas con un antígeno específico (PPD-tuberculina) (Wood *et al.*, 1990). La prueba utiliza la comparación de la producción de interferón-gamma tras la estimulación con PPD aviar y tras la estimulación con PPD bovino. La detección del interferón-gamma se realiza con un ELISA tipo sándwich que utiliza dos anticuerpos monoclonales contra el interferón-gamma bovino. Se recomienda transportar las muestras de sangre al laboratorio evitando las temperaturas extremas (por ejemplo, entre 17 y 27°C) y preparar el ensayo tan pronto como sea posible, pero no más tarde del día siguiente a la extracción de sangre (Coad *et al.*, 2007). En algunas zonas, especialmente en las que prevalece la "inespecificidad", se han expresado algunas preocupaciones sobre la precisión cuando se realiza la estimulación de la sangre con PPD. Sin embargo, debido a la capacidad del IGRA para detectar

infecciones tempranas, el uso de ambos, IGRA y pruebas cutáneas, 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 ambiente (Gormley *et al.*, 2006). El uso de antígenos micobacterianos definidos, como el ESAT-6 y el CFP-10, puede mejorar la especificidad (Buddle *et al.*, 2001), y estos antígenos se emplean en varios países, como el Reino Unido, Nueva Zelanda y Francia, para las pruebas en serie. El uso de estos antígenos también puede ofrecer la capacidad de diferenciar los animales vacunados con BCG de los no vacunados. En los animales excitables, difíciles o peligrosos de manejar, la ventaja del IGRA sobre la prueba cutánea es que los animales sólo deben ser capturados una vez. El IGRA ha sido aprobado para su uso en varios programas nacionales, como los de la UE, el Reino Unido, Estados Unidos, Nueva Zelanda y Australia. En Nueva Zelanda y el Reino Unido, por ejemplo, el IGRA se utiliza para realizar pruebas en serie (para aumentar la especificidad) y en paralelo (para aumentar la sensibilidad). Esta prueba está disponible en forma de kits comerciales para especies bovinas y primates; sin embargo, sólo ha sido validada en unas pocas especies.

3.2. Serología para la detección de anticuerpos específicos

La aplicación de ensayos serológicos para el diagnóstico de la tuberculosis en animales ha aumentado en a lo largo del siglo XXI. ELISA es la técnica más extendida, aunque se han desarrollado plataformas serológicas alternativas (por ejemplo, pruebas de flujo lateral, un inmunoensayo de impresión multiantígeno o un ensayo quimioluminiscente múltiple) (Bezoz *et al.*, 2014). Los ensayos serológicos se han propuesto como una útil herramienta de diagnóstico auxiliar para complementar los métodos basados en células, aumentando la detección de animales infectados y ayudando a controlar la tuberculosis en animales domésticos y salvajes (Casal *et al.*, 2017; Thomas & Chambers, 2021). En los camélidos se recomienda utilizar la serología como prueba complementaria a la cutánea y entre 15 y 30 días después de la prueba cutánea. Las ventajas de estas pruebas son su simplicidad, su bajo coste y sus menores exigencias logísticas en comparación, por ejemplo, con el IGRA, ya que no requieren estimulación inmunitaria con antígenos, y las muestras pueden conservarse durante un tiempo prolongado antes de su procesamiento. Estas pruebas podrían ser especialmente útiles para detectar animales anérgicos que no responden bien a las técnicas inmunológicas basadas en células. Su sensibilidad, sin embargo, es menor que la de las pruebas basadas en células, sobre todo en los animales recientemente infectados, lo cual aumenta en las fases avanzadas de la enfermedad. Se ha demostrado que el uso de combinaciones de antígenos específicos como MPB83, MPB70, ESAT-6 y CFP-10 aumenta la sensibilidad y especificidad de las pruebas serológicas (Thomas y Chambers, 2021).

En los últimos años, las nuevas pruebas de detección de anticuerpos que utilizan diferentes metodologías también han demostrado un mejor rendimiento que las pruebas cutáneas en la fauna salvaje (jabalíes, ciervos, tejones) y en los animales domésticos (bovinos, ovejas, cabras, alpacas, cerdos). Algunos ejemplos son el ELISA P22 basado en un complejo multiproteico denominado P22 obtenido por cromatografía de afinidad a partir de PPD-B, o un ELISA de doble reconocimiento que detecta anticuerpos específicos contra MPB83, en el que se utiliza la proteína MPB83 como antígeno que recubre la placa y como conjugado (Cardoso-Toset *et al.*, 2017; Casal *et al.*, 2017; Infantes-Lorenzo *et al.*, 2019). Además, el efecto de refuerzo observado en los títulos de anticuerpos causados por una prueba intradérmica de tuberculina reciente en animales infectados por MTBC puede utilizarse como una útil estrategia de diagnóstico para aumentar la sensibilidad de las pruebas serológicas a los 15–30 días de la inyección de PPD (Casal *et al.*, 2014).

Las pruebas serológicas son útiles para detectar las infecciones por MTBC en la fauna salvaje. Una prueba de flujo lateral basada en la proteína MPB83 y la proteína de fusión CFP10/ESAT-6, ha demostrado ser útil para detectar la infección en los animales domésticos, pero sobre todo en los animales salvajes y de zoológico porque es fácil de realizar y da resultados inmediatos. Aunque su sensibilidad es limitada, estos métodos son útiles cuando no se dispone de pruebas celulares y cuando las pruebas cutáneas han demostrado ser poco fiables, (Greenwald *et al.*, 2009; Lyashchenko *et al.*, 2008; Thomas y Chambers, 2021).

La OIE ha evaluado una serie de pruebas para su uso en suero y plasma bovino como herramientas complementarias, junto con otros métodos, para el diagnóstico y la gestión de la infección tuberculosa. Consúltense el Registro de kits de diagnóstico de la OIE para obtener más información³.

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

C1. Vacunas

Las directrices para la producción de vacunas veterinarias proporcionadas aquí y en el Capítulo 1.1.8, *Principios de la producción de las vacunas de uso veterinario*, pretenden ser de carácter general y pueden complementarse con los requisitos nacionales y regionales.

La única vacuna disponible actualmente contra las infecciones por *M. bovis* es el bacilo de Calmette-Guerin (BCG), una cepa viva atenuada de *M. bovis*. Se han realizado ensayos con otras vacunas, pero ninguna ha demostrado inducir una protección superior a la BCG (Vordermeier *et al.*, 2016).

La BCG ha demostrado ser segura en el ganado vacuno y en algunos otros animales, así como en la fauna salvaje en libertad o en cautividad. Los estudios han observado niveles variables de eficacia en ensayos experimentales y de campo en el ganado bovino. Esta variabilidad se ha atribuido a factores como la formulación de la vacuna, la edad del animal, la vía de vacunación y la exposición a micobacterias ambientales. La protección proporcionada por la BCG se debe a la reducción de la susceptibilidad a la infección por parte de los animales vacunados, así como a la reducción de la transmisión ulterior de los animales vacunados como resultado de la disminución de las lesiones anatomopatológicas y la infecciosidad.

De forma similar a lo que se observa en los seres humanos, una revisión sistemática y un meta-análisis mostraron sólo una modesta (~25%) eficacia directa de la BCG ante la exposición a la tuberculosis bovina en el ganado (Srinivasan *et al.*, 2021). Sin embargo, los análisis de escenarios que consideran tanto los efectos directos como los indirectos sugieren que la prevalencia de la enfermedad podría reducirse sustancialmente hasta ser oficialmente libre de TB, dependiendo de los niveles iniciales de infección, y que se evitaría el 50-95% de los casos acumulados durante 50 años con la vacunación con BCG. Por estas razones, la vacunación con BCG puede ayudar a acelerar el control de la TB bovina en entornos endémicos, especialmente con una implementación temprana ante la intensificación de la producción lechera en regiones que actualmente carecen de programas efectivos de control de la TB bovina.

Los ensayos experimentales han establecido que la protección disminuye entre uno y dos años después de la vacunación, pero la revacunación, cuando la inmunidad ha disminuido, después de dos años, aumentó la protección. La vacunación con BCG del ganado infectado no da lugar a una exacerbación de la infección (Buddle *et al.*, 2016).

Las cepas de la vacuna BCG, incluida la danesa 1331, la Pasteur 1173P2 y la rusa, se han utilizado a dosis que van de 104 a 106 unidades formadoras de colonias (UFC) administradas por vía subcutánea. Dado que el uso de vacunas puede comprometer las pruebas cutáneas de la tuberculina u otras pruebas inmunológicas, es necesario el uso de tuberculina definida molecularmente como antígeno de diagnóstico. Se han realizado avances significativos en el desarrollo de los denominados antígenos DIVA, que permiten diferenciar a los animales vacunados con BCG de los infectados por *M. bovis*, en particular cuando se utilizan en la prueba del interferón gamma (Vordermeier *et al.*, 2016) o como reactivos para las pruebas cutáneas (Srinivasan *et al.*, 2019) y se basan en el uso de productos genéticos codificados en regiones genéticas de *M. bovis* que están eliminadas o no se expresan en algunas cepas de BCG. Por lo tanto, la viabilidad de la implementación de la vacunación con BCG en el ganado bovino y otras especies ganaderas quizás sea posible cuando se disponga de pruebas DIVA una vez que estén completamente validadas y los marcos regulatorios estén establecidos.

Las vacunas BCG también pueden utilizarse para reducir la propagación de *M. bovis* en los reservorios de infección de la fauna salvaje. En el Reino Unido, se han concedido a la BCG unas pocas autorizaciones de registro para la vacunación intramuscular de tejonos a una dosis de 2-8 × 10⁶ UFC. Los ensayos de campo han encontrado que la BCG reduce significativamente la infección por la exposición natural a *M. bovis* en los tejonos, reduce el riesgo de

3 <https://www.woah.org/es/que-ofrecemos/productos-veterinarios/kits-de-diagnostico/registro-de-kits-de-diagnostico/>

infección en los cachorros no vacunados en los grupos sociales vacunados (Carter *et al.*, 2012) y en algunos casos puede dar lugar a una disminución de la incidencia de la tuberculosis en el ganado bovino (Martin *et al.*, 2020). La dosificación oral de BCG a zarigüeyas de cola de cepillo y tejones europeos en ensayos de campo ha demostrado conferir una protección significativa contra la exposición natural a *M. bovis* (Gormley *et al.*, 2017; Tompkins *et al.*, 2009). La dosificación oral de zarigüeyas y tejones con la vacuna BCG ha demostrado ser segura, aunque se ha observado la excreción transitoria de BCG en las heces (Perrett *et al.*, 2018)

C2. Producción de tuberculina

Las tuberculinas se preparan a partir de cultivos líquidos inactivados por el calor de MTBC que crecen en forma de pellets en el caldo. Estos PPD, precipitados mediante ácido tricloroacético (TCA) o sulfato de amonio, sustituyen a las antiguas tuberculinas concentradas por calor y tienen una mayor potencia específica. Los pasos adicionales de filtración para eliminar el material no específico de la pared celular aumentaron aún más la especificidad. Además, se seleccionó una cepa mutante de *M. bovis*, denominada AN5, que mostraba un crecimiento "lujoso" en forma de película en caldo de glicerina, para facilitar la producción económica a gran escala de PPD-B.

La PPD-B producida a partir de cultivos de *M. bovis* AN5 demostró posteriormente ser más específica en el ensayo intradérmico en el ganado bovino que la PPD "humana" preparada a partir de cultivos de *M. tuberculosis* que se habían utilizado anteriormente en las campañas de erradicación.

En aras de la estandarización, el Manual Terrestre seguirá recomendando el uso de la PPD-B en la SCT, o en combinación con la PPD-A en la CCT, como reactivo preferido para la prueba cutánea intradérmica y/o el IGRA en las regiones donde no se considere la vacunación con BCG. Véanse las secciones B.2 *Prueba de hipersensibilidad retardada* y B.3.1 *Ensayo de interferón gamma* para conocer los detalles de los procedimientos analíticos. Todas las PPD utilizadas para los programas de vigilancia nacionales o locales deben ser validadas y calibradas en comparación con estándares de referencia establecidos.

2.1. Manejo del inóculo

Dado que la calidad de la PPD-B depende en gran medida de la capacidad de la cepa de producir antígenos de células T dominantes, como ESAT-6, CFP-10 y Rv3615c, así como de la capacidad de crecer en caldo de glicerina, otras cepas de *M. bovis* virulentas y bien caracterizadas podrían ser adecuadas para la producción de PPD-B. Sin embargo, en aras de la normalización internacional y la armonización de la producción y las pruebas de potencia, se recomienda utilizar cepas aisladas definidas de *M. bovis* AN5 o *M. bovis* Vallee para la producción de PPD-B. Estas se han utilizado durante más de 70 años y están bien caracterizadas. Debe mantenerse un registro de sus orígenes y de su historia posterior, incluyendo el número de pases desde la recepción original de un Laboratorio de Referencia (por ejemplo, en el caso de AN5, desde que fue suministrada por "Weybridge"), un patrón de espigotipo y (cuando sea posible) los datos de la secuencia del genoma completo. Se deberá demostrar que las cepas de *M. bovis* utilizadas como cultivos de inóculo están libres de microorganismos contaminantes.

2.2. Método de cultivo

Si el cultivo de origen para la producción era una cepa primaria cultivada en medio sólido, es necesario adaptar el microorganismo para que crezca como cultivo flotante o película (por ejemplo, incorporando un trozo de patata estéril en los frascos de cultivo de medios líquidos, como el medio de Watson Reid). Cuando el cultivo se ha adaptado al crecimiento de la película en el medio líquido, puede utilizarse para producir el lote de Inóculo Primario, que se conserva en forma liofilizada. Todos los lotes de inóculo deben ser verificados en un estudio piloto para comprobar su capacidad de soportar la producción de una PPD-B de calidad suficiente.

De acuerdo con las directrices GMP y para garantizar una calidad constante de PPD-B, deberá establecerse un sistema de lotes de inóculo primario y de trabajo para la cepa de producción bien caracterizada, que se conservará a -70°C o menos. Los Inóculos de Trabajo utilizados para inocular los medios de producción no deben tener más de cuatro pases de cultivo desde el Inóculo Primario. Como los Inóculos de Trabajo pierden la capacidad de producir una PPD-B adecuada, deberán ser sustituidos a intervalos frecuentes por nuevos Inóculos de Trabajo.

2.3. Método de fabricación y control durante el proceso

Para la producción de PPD-B, los inóculos de trabajo se inoculan en caldo de glicerina (elaborado con carne de vacuno garantizado como libre de EET) en frascos de cultivo Roux y, cuando se haya formado una película en la parte superior del medio líquido, esta película se dividirá y se utilizará para inocular un mayor número de frascos de penicilina que contengan un medio de producción sintético, como por ejemplo, Dorset-Henley, para evitar que las proteínas que no son de *M.bovis* contaminen el producto final.

Durante el crecimiento, que durará aproximadamente 60 días, se debe comprobar diariamente el crecimiento y, cuando se detecten cultivos "anormales", por ejemplo, que muestren cambios de color, signos de contaminación o cuyas películas se hundan, se deben eliminar, ya que afectarán negativamente a la calidad del producto final. Estos cultivos anormales deben ser desechados después del autoclave.

Posteriormente, los cultivos se inactivan por calor a 98-100 °C durante 2-3 horas y los restos celulares se eliminan en una serie de pasos de filtración, comenzando con filtros gruesos para eliminar las partículas más grandes y, finalmente, se clarifican utilizando, por ejemplo, una serie de filtros Seitz con EK1 como filtro final de esterilización. La combinación de diferentes filtros y sus respectivos cortes, así como el número de cada filtro utilizado, depende en gran medida del volumen que se vaya a procesar, pero la eliminación de la mayor cantidad de material insoluble es un paso esencial para maximizar la especificidad del producto final.

Las proteínas del filtrado se precipitan con TCA (o sulfato de amonio, según el productor). A la precipitación le sigue una serie de lavados y centrifugados y, a continuación, un tratamiento alcalino para llevar las proteínas solubles en agua a un pH neutro (6,5-7,0) en un tampón isotónico de glucosa-fosfato que contiene 0,04% p/v de fenol.

La concentración de proteínas del producto final o "concentrado" se determinará por el método Kjeldahl y se presenta por rutina como nitrógeno total y nitrógeno precipitable TCA.

La potencia y la especificidad del producto final se determinan en el ensayo con cobayas utilizando los estándares internacionales para PPD-B y PPD-A, respectivamente.

Dependiendo del resultado del ensayo de potencia, se realizan diluciones finales para el producto comercial con el mismo tampón isotónico de glucosa-fosfato de pH 6,5-7,0 que contiene 0,04% p/v de fenol, para obtener una dosis mínima de 2000 UI en la prueba intradérmica. Actualmente, muchas PPD-B comercializadas contienen una potencia estimada de 2500 o 3000 UI por dosis para optimizar la sensibilidad de la prueba intradérmica.

Para la especificidad de la PPD-B es esencial que la concentración final de proteína se mantenga lo más cerca posible de 1,0 mg/ml; se sabe que los productos con una concentración de proteína más alta son menos específicos, de ahí que muchos países exijan una concentración máxima de proteína como parte de sus requisitos reglamentarios.

2.4. Control por lotes

Las muestras deben cumplir con las normas de producción de tuberculina reconocidas oficialmente y establecidas por la *Farmacopea Europea* o normas de registro equivalentes.

2.4.1. Esterilidad

Las pruebas de esterilidad por lo general se llevan a cabo según las directrices internacionales (véase también el Capítulo 1.1.9 *Pruebas de esterilidad y ausencia de contaminación en material biológico destinado a uso veterinario*).

2.4.2. Inocuidad

Se inyectan por vía subcutánea 0,5 ml de la tuberculina en cuestión a dos cobayas de un peso no inferior a 250 g cada una y que no hayan sido tratadas previamente con ningún material que pueda interferir con la prueba. No deben producirse efectos anormales en un plazo de 7 días.

Las pruebas de detección de micobacterias vivas en la tuberculina pueden realizarse bien en la tuberculina inmediatamente antes de su distribución en los recipientes finales, bien en muestras tomadas de los propios recipientes finales. Debe tomarse una muestra de al menos 10 ml y ésta debe inyectarse por vía intraperitoneal en al menos dos cobayas, dividiendo la dosis entre ellas. Es conveniente tomar una muestra mayor, por ejemplo, de 50 ml, y concentrar las micobacterias residuales mediante centrifugación o filtración por membrana. Los cobayas se observan durante al menos 42 días y luego se examinan macroscópicamente en la necropsia. Las lesiones encontradas se examinan al microscopio y por cultivo.

2.4.3. Efecto sensibilizante

Para comprobar el efecto sensibilizador, se inyectan por vía intradérmica, en cada una de las tres ocasiones, tres cobayas que no han sido tratadas previamente con ningún material que pudiera interferir con la prueba, con el equivalente a 500 UI de la muestra de PPD-B a un volumen de 0,1 ml. Cada cobaya, junto con cada una de las tres cobayas de control que no han sido inyectadas previamente, se inyecta por vía intradérmica 15-21 días después de la tercera inyección con la misma dosis de la misma muestra de PPD-B. Las reacciones de los dos grupos de cobayas no deben ser significativamente diferentes cuando se miden 24-28 horas después.

2.4.4. Potencia

En la década de 1980, la Organización Mundial de la Salud (OMS) elaboró y diseñó un nuevo estándar internacional al que asignó una unidad de 32.500 UI/mg, lo que le dio equivalencia con los estándares locales anteriores. Este estándar se denominó tuberculina internacional bovina (BIS). Está disponible en el *National Institute for Biological Standards and Control*, para que lo utilicen los Servicios Veterinarios y los fabricantes comerciales para calibrar los estándares de referencia nacionales y corporativos y garantizar que los lotes de producción se ajusten a las normas internacionales. Como los suministros de BIS son ahora limitados, la OIE ha iniciado un estudio de colaboración internacional para producir y calibrar un nuevo reactivo de referencia, que se conocerá como el Estándar Internacional de Tuberculina Bovina-2 (ISBT-2). La OIE lo anunciará cuando se haya completado su validación.

Los países en los que se produce tuberculina PPD bovina deben establecer sus propias preparaciones nacionales de referencia para la PPD bovina como estándares de trabajo. Estas preparaciones nacionales de referencia deberán calibrarse en cobayas con respecto a la norma internacional oficial (BIS/ISBT-2) para la PPD bovina.

2.4.4.1. Estandarización del PPD bovino

a) Cobayas sensibilizadas con *M. bovis* vivo

La potencia de una muestra de PPD-B se determina por comparación con una preparación de referencia de PPD-B, ya sea el estándar internacional o un estándar de referencia nacional derivado, en cobayas infectadas con la cepa de producción utilizada, por ejemplo, *M. bovis* AN5.

El modelo, que incluye variables como la raza y el proveedor de los animales, la dosis de infección y la duración de la infección, debe validarse antes de realizar la prueba: la combinación de estas variables y la potencia esperada de las diluciones en serie de las muestras de PPD-B debe dar lugar a lesiones con un diámetro no inferior a 8 mm ni superior a 25 mm para que la prueba sea válida. Las dosis de infección pueden diferir considerablemente entre lotes con respecto a su virulencia y cada nuevo lote tendrá que ser comprobado cuidadosamente para evitar problemas de bienestar animal, así como una tuberculosis abierta, que daría lugar a la excreción de bacilos y por lo tanto un mayor riesgo para la salud de los operadores.

Al menos 8 cobayas albinas, cada una de las cuales con un peso de entre 400 y 600 g, se infectan con una dosis baja, por ejemplo, de 0,0001 mg de masa húmeda de bacilos vivos de la cepa de producción homóloga, por ejemplo *M. bovis* AN5, no menos de 4 semanas antes del ensayo. Los bacilos se suspenden en 0,5 ml de una solución de 9 g/l de cloruro de sodio y se realiza una inyección intramuscular profunda en la cara medial del muslo.

Un diseño adecuado para un ensayo de potencia es el siguiente: La potencia de dos muestras de PPD-B se estima en el modelo de infección anterior de 8 o 9 cobayas frente al estándar de PPD-B, con tres diluciones a intervalos de cinco veces de cada PPD-B, las 2 muestras y el estándar. Las diluciones de las preparaciones de tuberculina se realizan en una solución salina isotónica tamponada con fosfato (pH 6,5-7,5) que contenga 0,005 g/l de polisorbato 80. Las concentraciones óptimas se eligen de manera que se obtengan buenas reacciones cutáneas legibles con límites aceptables (8-25 mm). A modo de ejemplo: se pueden utilizar cantidades de 0,001, 0,0002 y 0,00004 mg de PPD correspondientes al estándar internacional de PPD de 32, 6,4 y 1,28 UI, respectivamente. El volumen de inyección es de 0,2 ml.

En un solo ensayo, se comparan dos PPD de prueba con el PPD estándar en nueve cobayas, aplicando ocho inyecciones intradérmicas por animal y empleando un diseño de cuadrado latino incompleto equilibrado.

Normalmente, la lectura de los ensayos se realiza 24 horas después de la inyección de las tuberculinas, pero puede realizarse una segunda lectura adicional a las 48 horas. Los diferentes diámetros del eritema se miden con calibradores en décimas de milímetro y se registran en hojas de ensayo. Los resultados se evalúan estadísticamente utilizando métodos estadísticos estándar para ensayos de líneas paralelas según Finney (1978). Se puede obtener un programa estadístico para el análisis de líneas paralelas, Combistats, en la Farmacopea Europea o EDQM.

Se calculan las potencias relativas de las dos tuberculinas de prueba con sus límites de confianza del 95%, las pendientes de las curvas logarítmicas dosis-respuesta de cada preparado (aumento de la reacción media por unidad de aumento de la dosis logarítmica) y los cocientes F para las desviaciones del paralelismo.

Según la Farmacopea Europea, la prueba no es válida a menos que los límites de confianza ($p = 0,95$) no sean inferiores al 50 por ciento ni superiores al 200 por ciento de la potencia estimada. La potencia estimada no es inferior al 66% ni superior al 150% de la potencia declarada. La potencia declarada no es inferior a 20.000 UI/ml.

b) Cobayas sensibilizadas con *M. bovis* inactivado

En el caso de los laboratorios que no disponen de instalaciones bioseguras para albergar cobayas infectadas con *M. bovis*, se suele utilizar un ensayo de potencia alternativo, en el que se utiliza antígeno inactivado por calor para sensibilizar a las cobayas. Debido a las diferencias en los antígenos de sensibilización, los resultados no son directamente convertibles entre los dos modelos. Se aconseja realizar comparaciones entre laboratorios para evaluar la potencia de las tuberculinas utilizadas por los dos métodos.

Al igual que con la prueba de AN5 vivo, la prueba de potencia de la tuberculina "inactivada por el calor" debe validarse para optimizar la combinación de la dosis de sensibilización y la potencia de las diluciones de PPD-B ensayadas en el modelo.

La prueba se realiza de la siguiente manera: la tuberculina PPD se somete a bioensayo en cobayas sensibilizadas con *M. bovis* inactivado por calor, de la misma cepa utilizada para la producción de PPD, frente al estándar de tuberculina PPD bovina mediante una prueba de ocho puntos que comprende cuatro diluciones, correspondientes a unas 20, 10, 5 o 2,5 UI. El volumen de inyección es de 0,1 ml. En esta prueba, se comparan dos PPD-B de prueba con la PPD-B estándar internacional/nacional en ocho cobayas, aplicando ocho inyecciones intradérmicas por animal y empleando un diseño de cuadrado latino. Las cobayas se sensibilizan con bacilos inactivados de *M. bovis*, entre 5 y 7 semanas antes del ensayo. Los bacilos inactivados por calor se suspenden en un tampón y se convierten en una emulsión con adyuvante de aceite mineral. Se realiza una inyección intramuscular profunda en la cara medial de ambos muslos, utilizando una dosis de 0,5 ml.

2.4.5. Especificidad

Una prueba adecuada para determinar la especificidad es la siguiente: se analizan tres tuberculinas de prueba bovinas frente al estándar de la tuberculina PPD aviar (o tres tuberculinas de prueba aviar frente al estándar de la tuberculina PPD bovina) mediante una prueba de cuatro puntos en cobayas heterológicamente sensibilizadas, que comprende dos diluciones a intervalos de 25 veces de cada tuberculina. Se eligen cantidades de 0,03 mg y 0,0012 mg de tuberculoproteína de prueba, que corresponden aproximadamente a 975 y 39 UI, porque estas dosis dan buenas reacciones cutáneas legibles. Las dosis de inyección del estándar son más bajas, concretamente 0,001 mg y 0,00004 mg. En un ensayo, se comparan tres tuberculinas de prueba con la tuberculina estándar en ocho cobayas, aplicando ocho inyecciones intradérmicas por animal y empleando un diseño de cuadrado latino completo equilibrado. La lectura de los resultados y la evaluación estadística son las mismas que en la prueba de potencia, pero la interpretación debe tener en cuenta que una PPD satisfactoria debe tener una actividad biológica que no supere el 10% de un estándar con sensibilización homóloga.

2.4.6. Estabilidad

Siempre que las tuberculinas cumplan las normas legislativas requeridas para su producción y se conserven a una temperatura de entre 2°C y 8°C y protegidas de la luz, pueden utilizarse hasta la fecha de caducidad especificada en la licencia de producción de tuberculina. Para la conservación a largo plazo, se recomienda conservar la PPD en forma concentrada en lugar de la forma diluida y el concentrado también debe conservarse en la oscuridad.

2.4.7. Control del pH

El pH debe ser de 6.5–7.5.

2.4.8. Contenido proteico

El contenido proteico se determina como se indica en el apartado C.2.3. *Control durante el proceso*.

2.4.9. Conservación

Durante la conservación, la tuberculina bovina líquida debe protegerse de la luz y mantenerse a una temperatura de 5±3 °C. La congelación del producto líquido puede comprometer la calidad. Sin embargo, se pueden preparar preparaciones liofilizadas que pueden conservarse a temperaturas más altas (pero sin superar los 25 °C); deben estar protegidas de la luz. Los períodos de exposición a temperaturas más elevadas o a la luz solar directa deben reducirse al mínimo.

2.4.10. Conservantes

Los conservantes antimicrobianos u otras sustancias que puedan añadirse a una tuberculina deben haber demostrado que no perjudican la inocuidad y la eficacia del producto.

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

2.4.11. Precauciones (peligros)

La tuberculina adecuadamente diluida e inyectada por vía intradérmica en humanos o animales puede dar lugar a una reacción localizada en el punto de inyección. Pero incluso en individuos muy sensibles, las reacciones graves y generalizadas son extremadamente raras y limitadas. Los operarios con sensibilidad conocida a la tuberculina deben realizar una evaluación de riesgos antes de manipular el material.

BIBLIOGRAFÍA

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.

BIDDLE B.M., SHU D., PARLANE N.A., SUBHARAT S., HEISER A., HEWINSON R.G., VORDERMEIER H.M. & WEDLOCK D.N. (2016). Vaccination of cattle with a high dose of BCG vaccine 3 weeks after experimental infection with *Mycobacterium bovis* increased the inflammatory response, but not tuberculous pathology. *Tuberculosis*, **99**, 120–127.

CARDOSO-TOSET F., LUQUE I., CARRASCO L., JURADO-MARTOS F., RISALDE M.A., VENTEO A., INFANTES-LORENZO J.A., BEZOS J., RUEDA P., TAPIA I., GORTÁZAR C., DOMÍNGUEZ L., DOMÍNGUEZ M. & GOMEZ-LAGUNA J. (2017). Evaluation of five serologic assays for bovine tuberculosis surveillance in domestic free-range pigs from southern Spain. *Prev. Vet. Med.*, **137** (Pt A), 101–104.

CARTER S.P., CHAMBERS M.A., RUSHTON S.P., SHIRLEY M.D., SCHUCHERT P., PIETRAVALLE S., MURRAY A., ROGERS F., GETTINBY G., SMITH G.C., DELAHAY R.J., HEWINSON R.G. & McDONALD R.A. (2012). BCG vaccination reduces risk of tuberculosis infection in vaccinated badgers and unvaccinated badger cubs. *PLoS One*, **7**:e49833. doi: 10.1371/journal.pone.0049833.

CASAL C., INFANTES J.A., RISALDE M.A., DÍEZ-GUERRIER A., Domínguez M., Moreno I., Romero B., de Juan L., Sáez J.L., Juste R., Gortázar C., Domínguez L. & Bezos J. (2017). Antibody detection tests improve the sensitivity of tuberculosis diagnosis in cattle. *Res. Vet. Sci.*, **112**, 214–221.

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.

COURCOUL A., MOYEN J.-L., BRUGERE L., FAYE S., HENAULT S., GARES H. & BOSCHIROLI M.-L. (2014) Estimation of sensitivity and specificity of bacteriology, histopathology and PCR for the confirmatory diagnosis of bovine tuberculosis using latent class analysis. *PLoS One*, **9**(3): e90334. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0090334>.

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.

COUVIN D., DAVID A., ZOZIO T. & RASTOGI N. (2019). Macro-geographical specificities of the prevailing tuberculosis epidemic as seen through SITVIT2, an updated version of the *Mycobacterium tuberculosis* genotyping database. *Infect. Genet. Evol.*, **72**, 31–43. doi: 10.1016/j.meegid.2018.12.030.

DYKEMA P.E., STOKES K.D., BECKWITH N.R., MUNGIN J.W., XU L., VICKERS D.J., REISING M.M., BRAVO D.M., THOMSEN B.V. & ROBBE-AUSTERMAN S. (2016). Development and validation of a direct real-time PCR assay for *Mycobacterium bovis* and implementation into the United States national surveillance program. *PeerJ PrePrints*, **4**:e1703v1 <https://doi.org/10.7287/peerj.preprints.1703v1>

ECDC (2018). European Centre for Disease Prevention and Control. Handbook on tuberculosis laboratory diagnostic methods in the European Union – Updated 2018. Stockholm: ECDC; 2018.

FINNEY D.J. (1978). *Statistical Methods in Biological Assay*, Third Edition. Charles Griffin, London, UK.

GORMLEY E., CORNER L.A.L., COSTELLO E. & RODRIGUEZ-CAMPOS S. (2014). Bacteriological diagnosis and molecular strain typing of *Mycobacterium bovis* and *Mycobacterium caprae*. *Res. Vet. Sci.*, **97** Suppl:S30-43. doi: 10.1016/j.rvsc.2014.04.010.

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.

GORMLEY E., NÍ BHUACHALLA D., O'KEEFFE J, MURPHY D. & ALDWELL F.E. (2017). Oral vaccination of free-living badgers (*Meles meles*) with Bacille Calmette Guérin (BCG) vaccine confers protection against tuberculosis. *PLoS One*, **12**, e0168851.

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.

GUIMARAES A.M.S. & ZIMPEL C.K. (2020). *Mycobacterium bovis*: From Genotyping to Genome Sequencing. *Microorganisms*, **8**, 667. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8050667>

INFANTES-LORENZO J.A., MORENO I., ROY A., RISALDE M.A., BALSEIRO A., DE JUAN L., ROMERO B., BEZOS J., PUENTES E., AKERSTEDT J., TESSEMA G.T., GORTÁZAR C., DOMÍNGUEZ L. & DOMÍNGUEZ M. (2019). Specificity of serological test for detection of tuberculosis in cattle, goats, sheep and pigs under different epidemiological situations. *BMC Vet. Res.*, **15**, 70.

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.

LORENTE-LEAL V., LIANDRIS E., CASTELLANOS E., BEZOS J., DOMÍNGUEZ L., DE JUAN L. & ROMERO B. (2019). Validation of a Real-Time PCR for the Detection of *Mycobacterium tuberculosis* Complex Members in Bovine Tissue Samples. *Front. Vet. Sci.*, **6**, 61. <https://doi.org/10.3389/fvets.2019.00061>.

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.

MARTIN S.W., O'KEEFFE J., BYRNE A.W., ROSEN L.E., WHITE P.W. & McGRATH G. (2020). Is moving from targeted culling to BCG-vaccination of badgers (*Meles meles*) associated with an unacceptable increased incidence of cattle herd tuberculosis in the Republic of Ireland? A practical non-inferiority wildlife intervention study in the Republic of Ireland (2011–2017). *Prev. Vet. Med.*, **179**, 105004.

MERKER M., KOHL T.A., NIEMANN S. & SUPPLY P. (2017). The Evolution of Strain Typing in the *Mycobacterium tuberculosis* Complex. In: *Strain Variation in the Mycobacterium tuberculosis Complex: Its Role in Biology, Epidemiology and Control*. Advances in Experimental Medicine and Biology, vol. 1019. Springer, Cham. https://doi.org/10.1007/978-3-319-64371-7_3

MIDDLETON S., STEINBACH S., COAD M., MCGILL K., BRADY C., DUIGNAN A., WISEMAN J., GORMLEY E., JONES G.J. & VORDERMEIER H.M. (2021). A molecularly defined skin test reagent for the diagnosis of bovine tuberculosis compatible with vaccination against Johne's Disease. *Sci. Rep.*, **11**, 2929. doi: 10.1038/s41598-021-82434-7. PMID: 33536465; PMCID: PMC7859399.

PERRETT S., LESELLIER S., ROGERS F., WILLIAMS G.A., GOWTAGE S., PALMER S., DAILEY D., DAVÉ D., WEYER U, WOOD E., SAIGUERO F.J., NUNEZ A., REEN N., CHAMBERS M.A. (2018). Assessment of the safety of Bacillus Calmette-Guérin vaccine administered orally to badgers (*Meles meles*). *Vaccine*, **36**, 1990–1995.

ROY A., INFANTES-LORENZO J.A., DE LA CRUZ M.L., DOMÍNGUEZ L., ÁLVAREZ J. & BEZOS J. (2020). Accuracy of tuberculosis diagnostic tests in small ruminants: A systematic review and meta-analysis. *Prev. Vet. Med.*, **182**, 105102.

SANCHEZ-CARVAJAL J.M., GALÁN-RELAÑO Á., RUEDAS-TORRES I., JURADO-MARTOS F., LARENAS-MUÑOZ F., VERA E., GÓMEZ-GASCÓN L., CARDOSO-TOSET F., RODRÍGUEZ-GÓMEZ I.M., MALDONADO A., CARRASCO L., TARRADAS C., GÓMEZ-LAGUNA J. & LUQUE I. (2021). Real-Time PCR Validation for *Mycobacterium tuberculosis* Complex Detection Targeting IS6110 Directly From Bovine Lymph Nodes. *Front. Vet. Sci.*, **8**, 643111. doi: 10.3389/fvets.2021.643111.

SRINIVASAN S., CONLAN A.J.K., EASTERLING L.A., HERRERA C., DANDAPAT P., VEERASAMI M., AMENI G., JINDAL N., RAJ G.D., WOOD J., JULEFF N., BAKKER D., VORDERMEIER M. & KAPUR V. (2021). A Meta-Analysis of the Effect of Bacillus Calmette-Guérin Vaccination Against Bovine Tuberculosis: Is Perfect the Enemy of Good? *Front. Vet. Sci.*, **8**, 637580. doi: 10.3389/fvets.2021.637580.

SRINIVASAN S., JONES G.J., VEERASANE M., STEINBACH S., HOLDER T., ZEWUDE A., FROMSA A., AMENI G., EASTERLING L., BAKKER D., JULEFF N., GIFFORD G., HEWINSON R.G., VORDERMEIER H.M. & KAPUR V. (2019). A defined antigen skin test for the diagnosis of bovine tuberculosis. *Sci. Adv.*, **5**, eaax4899.

SUPPLY P., ALLIX C., LESJEAN S., CARDOSO-OELEMANN M., RÜSCH-GERDES S., WILLERY E., SAVINE E., DE HAAS P., VAN DEUTEKOM H., RORING S., BIFANI P., KUREPINA N., KREISWIRTH B., SOLA C., RASTOGI N., VATIN V., GUTIERREZ M.C., FAUVILLE M., NIEMANN S., SKUCE R., KREMER K., LOCHT C. & VAN SOOLINGEN D. (2006). Proposal for standardization of optimized mycobacterial

interspersed repetitive unit-variable-number tandem repeat typing of *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Clin. Microbiol.*, **44**, 4498–4510.

THOMAS R. & CHAMBERS M. (2021). Review of Methods Used for Diagnosing Tuberculosis in Captive and Free-Ranging Non-Bovine Species (2012–2020). *Pathogens*, **10**, 584.

TOMPKINS D.M., RAMSEY D.S.L., CROSS M.L., ALDWELL F.E., DE LISLE G.W. & BUDDLE B.M. (2009). Oral vaccination reduces the incidence of bovine tuberculosis in a free-living wildlife species. *Proc. Royal Soc. B: Biol. Sci.*, **276**, 2987–2995.

VORDERMEIER H.M., JONES G.J., BUDDLE B.M., HEWINSON R.G. & VILLARREAL-RAMOS B. (2016). Bovine Tuberculosis in Cattle: Vaccines, DIVA Tests, and Host Biomarker Discovery. *Annu. Rev. Anim. Biosci.*, **4**, 87–109. doi: 10.1146/annurev-animal-021815-111311.

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.

*
* *

NB: Existen Laboratorios de Referencia de la OIE para la tuberculosis bovina
(se puede consultar la web de la OIE:

<https://www.woah.org/es/que-ofrecemos/red-de-expertos/laboratorios-de-referencia/#ui-id-3>).

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

NB: ADOPTADO POR PRIMERA VEZ EN 1989 COMO TUBERCULOSIS BOVINA.
CAPÍTULO ADOPTADO POR PRIMERA VEZ CON EL TÍTULO ACTUAL EN 2022.