CAPÍTULO 3.3.6.

TUBERCULOSIS AVIAR

RESUMEN

La tuberculosis aviar, o micobacteriosis, es una enfermedad importante de las aves que afecta a aves de compañía, aves exóticas cautivas, y aves y mamíferos salvajes y domésticos. La enfermedad suele estar causada por Mycobacterium avium *subesp.* avium (M. a. avium). *No obstante, existen más de diez especies micobacterianas distintas de* M. a. avium *que se ha observado que infectan a las aves. La causa más importante de la enfermedad de las aves de corral es* M. avium.

Los signos clínicos de la enfermedad varían dependiendo de los órganos afectados. La presentación clásica se caracteriza por un deterioro y debilitamiento crónicos y progresivos. Es frecuente la diarrea. Algunas aves pueden mostrar signos respiratorios y ocasionalmente puede producirse una muerte súbita. Algunas aves pueden presentar lesiones oculares granulomatosas.

Mycobacterium tuberculosis *es menos común como causante de la infección en las aves, generalmente como resultado de la transmisión por propietarios de aves domésticas.*

Miembros del complejo Mycobacterium avium: M. avium subesp. hominissuis *(serotipos 4–6, 8–11 y 21; carecen del segmento génico IS*901 *y contienen el segmento IS*1245*) y* M. intracellulare *(serotipos 7, 12–20 y 22–28; carecen tanto de IS*901 *como de IS*1245*) pueden afectar también a una amplia variedad de mamíferos, como cerdos, ganado bovino, ciervos, ovejas, cabras, caballos, gatos, perros y especies exóticas. En los humanos, todos los miembros del complejo* M. avium *y* M. genavense *son capaces de inducir una enfermedad progresiva que es resistente al tratamiento principalmente en animales inmunocomprometidos.*

Todas las manipulaciones que impliquen el manejo de cultivos vivos abiertos, o de material de aves infectadas, deben realizarse con una gestión adecuada del riesgo biológico.

El diagnóstico de la tuberculosis aviar en aves se basa en la detección de las especies micobacterianas mencionadas anteriormente en aves vivas o muertas, o en *la detección de una respuesta inmunitaria, celular o humoral, mediante cultivo o mediante detección de los segmentos génicos IS*6110*, IS*901 *e IS*1245 *con la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en las excreciones o secreciones de aves vivas.*

Detección del agente: *Para establecer un diagnóstico positivo rápido, es suficiente la observación de signos clínicos de tuberculosis aviar en la parvada, la presencia de lesiones tuberculosas características en las necropsias de las aves o la detección de los bacilos ácido-alcohol resistentes en los frotis o cortes de órganos afectados. Si las aves presentan signos o lesiones tuberculosas típicas pero no se detectan bacilos ácido-alcohol resistentes, debe intentarse el cultivo del microorganismo. También podría llevarse a cabo la PCR directamente en muestras de tejido. Cualquier microorganismo ácido-alcohol resistente aislado debe identificarse mediante pruebas basadas en el ácido nucleico o métodos cromatográficos (por ejemplo, cromatografía líquida de alto rendimiento [HPLC]), mediante serotipado de las cepas de miembros del complejo* M. avium *o con PCR para IS*6110*, IS*901 *e IS*1245*).*

Prueba de la tuberculina y pruebas serológicas: *Normalmente estas pruebas se emplean para determinar la prevalencia de la enfermedad en una parvada o para detectar a las aves infectadas. Cuando se utilizan para detectar la presencia de tuberculosis aviar en una parvada, las pruebas deben confirmarse en la necropsia de cualquier ave que presente reacciones positivas.*

En las aves de corral, la prueba preferida es la prueba de la tuberculina en la barbilla. Esta prueba es menos útil en otras especies de aves. Una prueba mejor, especialmente para aves acuáticas, es la prueba de aglutinación de sangre íntegra con antígeno coloreado, que resulta más fiable y tiene la ventaja de dar resultados en unos minutos, mientras aún se inmoviliza al ave.

Requisitos para las vacunas y el material de diagnóstico: *No existen vacunas para la utilización en aves. En la prueba de la tuberculina en las aves de corral, la preparación estándar es un derivado proteico purificado de la tuberculina aviar (PPD). El PPD también se utiliza como componente para la prueba de la tuberculina intradérmica comparativa que se lleva a cabo en ganado vacuno* (*véase el Capítulo 3.1.13 Tuberculosis de los mamíferos* [*infección por el complejo* Mycobacterium tuberculosis]).

A. INTRODUCCIÓN

Varias especies de micobacterias pueden estar implicadas en la etiología de la tuberculosis aviar y en la micobaceriosis aviar. La tuberculosis aviar suele estar causada por el bacilo *Mycobacterium avium* subesp. *avium* (serotipos 1, 2 y 3); contienen el segmento génico específico IS*901* y el segmento inespecífico *IS1245*) y con menor frecuencia por *M. genavense* (Guerrero *et al.*, 1995; Pavlik *et al.*, 2000; Tell *et al.*, 2001). La micobacteriosis aviar está causada por otros dos miembros del complejo *M. avium*: *M. avium* subesp. *hominissuis* (serotipos 4–6, 8–11 y 21; carecen del segmento génico IS*901* y contienen el segmento IS*1245*) y *M. intracellulare* (serotipos 7, 12–20 y 22–28; carecen de los segmentos IS*901* y IS*1245*) y por *M. intracellulare, M. scrofulaceum, M. fortuitum* y otras especies micobacterianas potencialmente patógenas. En algunas circunstancias, pueden resultar infectadas gran variedad de especies de mamíferos, como cerdos, bovinos, ciervos, ovejas, cabras, caballos, gatos, perros y animales exóticos (Dvorska *et al.*, 2004; Mijs *et al.*, 2002; Shitaye *et al.*, 2009; Tell *et al.*, 2001; Thorel *et al.*, 1997; 2001). *Mycobacterium tuberculosis* y *M. bovis* son menos frecuentes como agentes causales de la tuberculosis en las aves (Tell *et al.*, 2001).

La especie *Mycobacterium avium* tiene 4 subespecies: *M. avium* subesp. *avium, M. avium* subesp. *hominissuis*, *M. avium* subesp. *silvaticum y M. avium* subesp. *paratuberculosis* (Mijs *et al.*, 2002; Thorel *et al.*, 1990). Esta última es el agente etiológico de la enfermedad de Johne, o paratuberculosis, en rumiantes y otras especies de mamíferos (véase el capítulo 3.1.16 *Paratuberculosis* [*enfermedad de Johne*]). *Mycobacterium a. silvaticum*, que al igual que *M. avium* subesp. *paratuberculosis* crece *in vitro* solo en medios con micobactina, puede causar tuberculosis aviar en la paloma torcaz.

Todas las cepas de *M. a. avium* aisladas a partir de aves y mamíferos, incluido el ser humano, tienen una secuencia repetitiva múltiple IS*901* en su genoma y producen un patrón de 3 bandas característico en el polimorfismo de longitud de los fragmentos de restricción (RFLP) de la IS1245, como se ha descrito y estandarizado anteriormente (Dvorska *et al.*, 2003; Ritacco *et al.*, 1998). Esta secuencia repetitiva también está presente en *M. a. silvaticum* y el análisis de RFLP puede ayudar a su identificación. La IS901 sólo se ha detectado en cepas de *M. avium* con los serotipos 1, 2 y 3 (Pavlik *et al.*, 2000; Ritacco *et al.*, 1998), que son aparentemente más patógenos para las aves que otros serotipos (Tell *et al.*, 2001). En base a las diferencias genéticas y fenotípicas, recientemente se ha propuesto diferenciar *M. a.* en dos subespecies en función del animal al que infecten: *M. a. hominissuis* para las cepas aisladas en humanos y en porcinos y *M. a. avium* para las cepas aisladas en aves (Mijs *et al.*, 2002). *M. a. hominissuis* tiene patrones polimórficos de RFLP con múltiples bandas en la IS1245 y puede crecer a 24 y 45°C (Mijs *et al.*, 2002; Van Soolingen *et al.*, 1998). Es importante tener en cuenta que las características típicas de las cepas aisladas en las aves, el patrón de múltiples bandas en la IS1245 y la presencia de la IS901, se han encontrado también en cepas de *M. a. avium* aisladas de cérvidos y bovinos (O'Grady *et al.*, 2000).

La tuberculosis aviar en las aves es más frecuente en aves de corral gallináceas y en aves salvajes criadas en cautividad. Los pavos son bastante susceptibles, pero los patos, los gansos y otras aves acuáticas son comparativamente resistentes. La diseminación del agente causal de la tuberculosis aviar se favorece con la práctica de permitir a las aves estar sueltas en las granjas y de mantener las reproductoras durante varios años. La principal fuente de infección son los individuos infectados y el medio ambiente contaminado (el agua y la tierra). Las especies de micobacterias mencionadas arriba causantes de tuberculosis pueden sobrevivir varios meses en el medio ambiente *Mycobacteria* (Dvorska *et al.*, 2007; Kazda *et al.*, 2009; Shitaye *et al.*, 2008; Tell *et al.*, 2001).

En la mayoría de los casos, las aves infectadas no presentan signos clínicos pero terminan quedándose letárgicas y escuálidas. Muchas aves afectadas presentan diarrea y tanto la cresta como las barbillas pueden volverse flácidas y pálidas. Las aves afectadas, sobre todo las aves de corral gallináceas, tienen generalmente más de un año. Algunas presentan signos respiratorios y pueden morir súbitamente. La disnea es menos común, y se han descrito lesiones oculares granulomatosas (Pocknell *et al.*, 1996) y lesiones de la piel. Bajo condiciones de

producción intensiva pueden ocurrir muertes súbitas asociadas con frecuencia a lesiones hepáticas graves; tales lesiones se observan con facilidad en un examen post mórtem (Tell *et al.*, 2001).

En las aves, las lesiones primarias de tuberculosis aviar casi siempre se presentan en el tracto intestinal. Toman la forma de úlceras profundas, llenas de material caseoso que contiene micobacterias, que pasan al lumen y aparecen en las heces. Antes de abrir el tracto intestinal, las áreas ulceradas se asemejan a masas tumorales adheridas a la pared intestinal, pero cuando se abre el intestino se hace evidente su verdadera naturaleza. Frecuentemente las lesiones caseosas típicas se encuentran en el hígado y en el bazo, y estos órganos suelen presentar un gran aumento de tamaño debido a la formación de un nuevo tejido tuberculoso. Incluso en casos avanzados, los pulmones y otros tejidos suelen estar libres de lesiones (Tell *et al.*, 2001; Thorel *et al.*, 1997).

De entre los animales domésticos (mamíferos), los cerdos domésticos (*Sus scrofa* f. *domesticus*) son los más susceptibles a la tuberculosis aviar. Normalmente, en estos animales no se observan signos clínicos. La tuberculosis aviar se sospecha cuando se hallan lesiones tuberculosas en la cabeza y en los ganglios linfáticos mesentéricos al inspeccionar la carne tras el sacrificio. El hallazgo de lesiones tuberculosas en otros órganos (hígado, bazo, pulmones, etc.) es muy infrecuente, y normalmente tiene lugar en una fase avanzada de la enfermedad. *Mycobacterium a. avium* supuso hasta un 35% de las micobacterias aisladas de estas lesiones tuberculosas (Dvorska *et al.,* 1999; Pavlik *et al.,* 2003, 2005; Shitaye *et al.,* 2006). A diferencia de otras especies mencionadas anteriormente, el ganado vacuno es muy resistente al agente causal de la tuberculosis aviar, y en esta especie las lesiones tuberculosas, que tienen lugar en los ganglios linfáticos de la cabeza u ocasionalmente en los hepáticos, solo se encuentran al inspeccionar la carne. *Mycobacterium a. avium* se puede aislar con éxito de las lesiones tuberculosas en los ganglios linfáticos mesentéricos de ganado vacuno juvenil: la tasa de aislamiento a partir de ganado vacuno de menos de 2 años de edad fue del 34,4%, en comparación con el 13,0% obtenido con ganado vacuno de más de 2 años (Dvorska *et al.,* 2004).

Es importante tener en cuenta que todos los miembros del complejo *M. avium* y *M. genavense* son capaces de causar una enfermedad progresiva en el hombre que es resistente al tratamiento, especialmente en individuos inmunocomprometidos (Pavlik *et al.*, 2000; Tell *et al.*, 2001). Los miembros del complejo *Mycobacterium avium* están clasificados en el Grupo 2 de Riesgo para la infección humana y deben manipularse aplicando las correspondientes medidas, que se describen en el Capítulo 1.1.4 *Bioseguridad y bioprotección: norma para la gestión del riesgo biológico en el laboratorio veterinario y en las instalaciones de los animales.* Las medidas de biocontención vendrán determinadas por un análisis del riesgo, según se describe en el Capítulo 1.1.4.

B. TÉCNICAS DE DIAGNÓSTICO

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

Método	Propósito					
	Demostrar ausencia de infección en la población	Demostrar ausencia de infección en animales individuales antes de los desplazamientos	Contribuir a las políticas de erradicación	Confirmar casos clínicos	Determinar la prevalencia de la infección – vigilancia	Determinar el estado inmunitario en animales o poblaciones tras la vacunación
Detección del agente[(a)]						
Tinción por el método de Ziehl–Neelsen	–	–	–	++	–	–
Cultivo	–	–	–	++	–	–
Prueba de la tuberculina	++	+++	+	–	++	–
Hemaglutinación (antígeno coloreado)	+	+++	+	–	++	–

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
PCR	++	+	–	+++	–	–

Clave: +++ = método recomendado para este propósito; ++ = método recomendado pero tiene limitaciones;
+ = método adecuado en muy pocas situaciones; – = no adecuado para este propósito.
PCR = reacción en cadena de la polimerasa.
(a)Se recomienda aplicar una combinación de los métodos de identificación del agente a la misma muestra clínica.

1. Detección del agente

Para establecer un diagnóstico, normalmente es suficiente que se presente en la parvada un historial característico de tuberculosis aviar y que en las aves aparezcan las lesiones típicas post mórtem, así como que se detecten bacilos ácido-alcohol resistentes (AFB) en los frotis o los cortes de órganos afectados teñidos por el método de Ziehl–Neelsen. En ocasiones se puede presentar algún caso en el que los órganos afectados, en particular el hígado, tengan aspecto de "cuero marroquí" con pequeñas manchas grisáceas o amarillentas, que es el resultado de una gran dosis infectante que ocasiona un cuadro clínico apabullante. En tales casos pueden no detectarse los AFB, pero un análisis cuidadoso revelará la existencia de cúmulos paralelos de bacilos refringentes de color pardo. En la tinción de Ziehl–Neelsen, una prolongación a 10 minutos de la fase de tinción con fucsina fenicada suele ser suficiente para revelar que aquellos son, de hecho, AFB que muestran una elevada resistencia a la penetración del colorante. Recientemente, se han utilizado las técnicas con sondas de ADN y la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para la identificación del agente de forma específica. Tradicionalmente, *M. a. avium* se distingue de otros microorganismos no cromógenos de crecimiento lento por su capacidad para crecer a 42°C (*M. a. avium*). El bacilo *Mycobacterium genavense* es particularmente exigente y requiere condiciones especiales para su crecimiento e identificación (Shitaye *et al.,* 2010).

1.1. Cultivo

Si existe un historial característico en la parvada y se encuentran lesiones llamativas en las necropsias, pero no se observan AFB en los frotis o en los cortes, debe intentarse el aislamiento del microorganismo causal a partir del material de las necropsias. Los mejores órganos son el hígado o el bazo, pero si las canales están descompuestas, la médula ósea puede resultar más adecuada por estar menos contaminada. Al igual que con el cultivo de *M. bovis,* se necesitan muestras sin esterilizar para ser procesadas con detergentes, álcalis o ácidos para eliminar los microorganismos de crecimiento rápido antes del cultivo (véase el capítulo 3.1.13 *Tuberculosis de los mamíferos* [*infección por el complejo* Mycobacterium tuberculosis]). *Mycobacterium a. avium* crece bien en medios del tipo de Lowenstein–Jensen, Herrold, Middlebrook 7H10 y 7H11 o Coletsos, con adición de piruvato sódico al 1%. A veces puede ser necesario añadir micobactina, como se usa para aislar *M. a. paratuberculosis* y *M. a. silvaticum.* El crecimiento puede limitarse al borde del agua de condensación. Los cultivos deben incubarse durante al menos 8 semanas. Lo habitual es que *M. a. avium* produzca colonias "lisas" en 2 a 4 semanas, aunque también aparecen variantes rugosas. Se pueden conseguir tiempos de incubación más cortos utilizando el sistema BACTEC de cultivo líquido o el sistema de cultivo MGIT 960 automático basado en la fluorescencia. *Mycobacterium a. avium* también puede detectarse en tejido infectado masivamente mediante una PCR convencional, que también permite acelerar la identificación del agente patógeno (Moravkova *et al.,* 2008). Actualmente, la detección directa y la cuantificación de *M. a. avium* empleando la PCR cuantitativa en tiempo real para IS*901* puede considerarse el método de referencia (a pesar de que el coste por prueba es bastante alto) (Kaevska *et al.,* 2010; Slana *et al.,* 2010).

En el caso del bacilo *M. genavense,* el mejor medio sólido es el medio Middlebrook 7H11 acidificado hasta pH 6 y suplementado con sangre y carbón ((Realini *et al.*, 1999). El periodo de incubación a 37°C debe prolongarse por lo menos 6 meses (Shitaye *et al.*, 2010).

La tipificación de las micobacterias a nivel de especie y subespecie requiere un laboratorio especializado. Las pruebas bioquímicas convencionales para la identificación de especies son lentas y no distinguen entre *M. avium* y *M. intracellulare*. Por ello, se suele clasificar a un variado grupo de bacterias que incluye ambas especies bajo la denominación de complejo *M. avium* (MAC). La seroaglutinación, que se basa en la especificidad de los residuos de azúcares de los glicopeptidolípidos superficiales, permite clasificar a los microorganismos del complejo *M. avium* (MAC) en 28 serotipos (Wolinsky & Schaefer, 1973). En la actualidad se dispone de métodos más sofisticados para la tipificación dirigidos a dianas específicas de la pared celular, como el enzimoinmunoanálisis con anticuerpos monoclonales contra los principales serotipos, y la cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC). Los serotipos 1 a 6, 8 a 11, y 21, se consideran actualmente como *M. a. avium* y *M. a. hominissuis*, y los serotipos 7, 12 a 20, y 25, como *M. intracellulare*. Sin embargo, no existe acuerdo respecto a otros serotipos, y algunas cepas aisladas no pueden tipificarse (Inderlied *et al.*, 1993). La tuberculosis aviar en aves está causada por *M. a. avium* de los tipos 1, 2 o 3. Si la cepa no pertenece a ninguno de estos tres serotipos, deben realizarse pruebas adicionales de identificación (PCR para IS*901*). No obstante, debe considerarse que las lesiones tuberculosas superficiales en aves enjauladas, sobre todo en aves psitácidas, pueden estar causadas por *M. tuberculosis* y debe utilizarse una PCR para IS*901* para que la identificación sea exacta.

1.2. Métodos de reconocimiento de los ácidos nucleicos

Actualmente se dispone de pruebas genéticas específicas y fiables para la identificación a nivel de especie (Saito *et al.*, 1990). Las sondas de hibridación de ácido nucleico comerciales se han convertido en el método de referencia para distinguir entre cultivos de *M. avium* y de *M. intracellulare*. *M. genavense* también se puede distinguir con estas pruebas. También se ha desarrollado otra sonda que cubre la totalidad de las cepas del MAC y que no reaccionan cuando se utilizan sondas específicas para *M. avium* y *M. intracellulare* (Soini *et al.*, 1996). No obstante, se han detectado errores de identificación debido a la reactividad cruzada, que pueden tener graves consecuencias (van Ingen *et al.,* 2009). Se han descrito varios métodos moleculares internos para la identificación de cultivos micobacterianos, incluido el MAC. Existe un método de PCR múltiple para distinguir entre *M. avium, M. intracellulare* y complejo de *M. tuberculosis* que tiene algunas ventajas (Cousins *et al.*, 1996). También puede utilizarse la secuenciación del ARNr de la subunidad 16S (Kirschner *et al.*, 1993). A lo largo de los últimos años se han desarrollado métodos moleculares internos independientes del cultivo para la detección e identificación de especies pertenecientes al complejo *M. avium* directamente a partir de muestras (Keavska *et al.,* 2010).

Mycobacterium a. avium, el agente causal de la tuberculosis aviar (Thorel *et al.,* 1990), anteriormente denominado *M. avium*, cuenta con los serotipos 1 a 3 del complejo *M. avium*, que en total incluye 28 serotipos (Wolinsky & Schaefer, 1973). Como se ha observado mediante pruebas de biología molecular, la secuencia de IS*901* de inserción que se ha detectado (Kunze *et al.,* 1992) la poseen no solo las cepas de los serotipos arriba mencionados, sino también cepas, virulentas para las aves, que podrían no ser tipificadas debido a que se produjera una aglutinación (Pavlik *et al.,* 2000). En estudios epidemiológicos, un método de RFLP de IS*901* estandarizado sustituyó a la serotipificación (Dvorska *et al.,* 2003).

2. Métodos inmunológicos

Las pruebas utilizadas en la exportación dependen de los requisitos de importación de cada país. En general, la prueba de la tuberculina o la prueba de la hemoaglutinación (antígeno coloreado) se utilizan en la mayoría de las ocasiones para analizar aves de corral sujetas a exportación.

2.1. Prueba de la tuberculina

La prueba de la tuberculina es la de uso más extendido en las aves de corral y la única prueba para la que existe un reactivo estándar internacional. La tuberculina es un derivado de la proteína estándar aviar purificada (PPD). Las aves se analizan mediante inoculación intradérmica en la barbilla de 0,05 ml o 0,1 ml de tuberculina (que contiene unas 2.000 Unidades Internacionales [UI]), utilizando para ello una aguja muy fina de aproximadamente 10 mm × 0,5 mm. El resultado se comprueba a las 48 horas, siendo la reacción positiva cuando se produce una hinchazón local, que puede variar desde un pequeño nódulo duro de unos 5 mm de diámetro a un edema macroscópico que se extiende a la otra barbilla y hacia abajo por el cuello. Con práctica, se pueden inocular incluso las pequeñas barbillas de

aves inmaduras. Sin embargo, en aves inmaduras se pueden usar las crestas, aunque los resultados no son tan fiables. La prueba de la tuberculina en el moco (barbilla) de los pavos es mucho menos fiable que en las gallinas domésticas. Se ha recomendado como más eficaz la inoculación en la membrana del ala, pero no es una zona tan buena como en las gallinas domésticas. También se ha probado la membrana del ala en otras aves, pero en general los resultados no son satisfactorios. Se pueden usar las áreas ornamentales desnudas de la piel en los patos Muscovy y de algunas especies de faisanes, pero la fiabilidad es dudosa y la interpretación difícil. También se ha descrito la prueba en la membrana interdigital de las aves acuáticas, pero no resulta muy sensible y a menudo se complica con las infecciones en el punto de la inoculación.

En los faisanes la prueba de la tuberculina se puede realizar de dos maneras. En la primera, se inyectan 0,05 ml o 0,1 ml de la tuberculina en la piel del párpado inferior. Un resultado positivo es una hinchazón marcada en el sitio de la inyección a las 48 horas. Alternativamente, se inyectan 0,25 ml de tuberculina en los músculos torácicos y se observan las aves durante 6–10 horas. Las aves infectadas muestran signos de depresión y se mantienen apartadas, y pueden aparecer casos de muerte súbita. En aves no infectadas, no se provocan signos clínicos.

2.2. Prueba del antígeno coloreado

2.2.1. Preparación del antígeno

Para la prueba rápida de aglutinación de sangre total se utiliza un antígeno coloreado con 1% de verde malaquita (Rozanska, 1965). La cepa utilizada en la preparación del antígeno coloreado debe ser lisa y no auto-aglutinable en suspensión salina. Debe presentar las características de *M. a. avium*.

En vez de emplear el serotipo más probable encontrado (en Europa, el serotipo 2 para aves de corral, y el serotipo 1 para aves acuáticas, y aves y cerdos en EE.UU.), se recomienda utilizar una cepa que detecte la infección por cualquier serotipo. Puede ser preferible utilizar una cepa muy específica para el serotipo que detecta. La especificidad de las cepas solo se puede determinar analizándolas como antígeno, aunque en general un antígeno del serotipo 2 siempre detectará la infección por el serotipo 3 y viceversa. Las cepas del serotipo 1 parecen detectar un amplio espectro de infección más a menudo, y con frecuencia detectarán también las infecciones por micobacterias dependientes de micobactina o infecciones por *M. a. silvaticum*. No hay motivo para no utilizar un cultivo que contenga más de una cepa de *M. a. avium*, con tal de que muestre las propiedades deseadas de sensibilidad y especificidad. La repetición de los resultados entre diferentes lotes será más fácil utilizando cultivos puros.

El microorganismo debe crecer en un medio líquido apropiado, como el Middlebrook 7H9 que contenga 1% de piruvato sódico para un mejor crecimiento. En aproximadamente 7 días debe obtenerse un buen crecimiento. El cultivo líquido se utiliza como inóculo para la preparación de antígeno a granel.

El antígeno para las pruebas de aglutinación crece mejor en medio sólido, como el de Lowenstein–Jensen o 7H11, con 1% de piruvato sódico en vez de glicerol, empleando frascos Roux o botellas grandes. El empleo de medios sólidos maximiza la detección de cualquier posible contaminación, y además los antígenos obtenidos de algunos medios líquidos no son aglutinados por el anticuerpo específico. Los cultivos líquidos de siembra deben diluirse (según la experiencia) para dar colonias aisladas en medio sólido. Esto proporcionará un mayor rendimiento y, de nuevo, facilitará la detección de contaminantes. Normalmente, son suficientes unos 10 ml de inóculo para cubrir toda la superficie y suministrar la humedad suficiente para mantener el aire del frasco con una humedad próxima al 100%.

Los frascos se incuban a 37°C y en la mayoría de las cepas se obtiene buen crecimiento después de 14–21 días. El antígeno se recoge añadiendo perlas de vidrio estériles y el doble del volumen de solución salina normal (con 0,3% de formalina) que se utilizó para inocular el frasco. A continuación se agita cuidadosamente el frasco para arrastrar todo el crecimiento, y el lavado se recoge en otra botella estéril que se vuelve a incubar a 37°C durante 7 días. Los bacilos muertos se lavan dos veces en solución salina normal estéril con 0,2% de formalina mediante centrifugación y resuspensión. Esta secuencia es más segura que el método original en el que el lavado se realizaba antes de la incubación que inactiva los microorganismos. Finalmente, los

bacilos se centrifugan de nuevo y se resuspenden en solución salina normal estéril que contiene 0,2% de formalina y 0,4% de citrato sódico, hasta una concentración de 10^{10} bacterias por ml. Esto corresponde a una concentración equivalente a diez veces la del tubo número 4 de la escala de McFarland.

Los cultivos para el antígeno deben examinarse diariamente durante los 5 primeros días de incubación a fin de detectar una posible contaminación. La suspensión hecha con los lavados del cultivo se reexamina también microscópicamente (para detectar posibles contaminantes, como levaduras) y se vuelve a comprobar mediante cultivo para confirmar que la formalina ha provocado la muerte de las micobacterias.

2.2.2. Validación del antígeno

Los cultivos se deben someter a una tinción de Gram para determinar la presencia de microorganismos distintos a las micobacterias.

Se debe comprobar la eficacia de uno o más lotes de antígeno aglutinante en aves con infección tuberculosa natural o provocada, mediante la comparación con una preparación estándar de potencia conocida. La potencia relativa respecto a la preparación estándar no debe diferir significativamente de la declarada en la ficha técnica. Cada frasco de antígeno debe analizarse con un suero normal de pollo (para detectar autoaglutinación) y con un suero de pollo positivo frente a *M. a. avium* de alto y bajo contenido en anticuerpos. Esto debe realizarse cuando sea posible, en paralelo con un lote previo de antígeno coloreado. Los frascos que den reacciones de aglutinación satisfactorias con los antisueros se juntan, y se tiñe el antígeno añadiendo 3 ml de una solución de verde malaquita al 1% por cada 100 ml de suspensión. Si es posible, el antígeno coloreado debería ser comprobado de nuevo con sangre íntegra como se comprobó con suero el antígeno sin colorear. El antígeno aglutinante puede mantenerse por lo menos 6 meses a 4°C en el refrigerador y mucho más tiempo si se congela a –20°C o a una temperatura inferior. Si un lote no se utiliza durante mucho tiempo, ha de ser comprobado de nuevo, especialmente para la autoaglutinación.

La única prueba de seguridad necesaria es la prueba de cultivo del antígeno sin lavar tras 7 días de incubación, para confirmar que todos los bacilos están muertos.

2.2.3. Procedimiento analítico

La prueba de aglutinación con antígeno coloreado se ha utilizado con muy buenos resultados, especialmente en aves acuáticas domésticas y ornamentales. Se mezcla una gota del antígeno (0,05–0,1 ml) con el mismo volumen de sangre total fresca, obtenida por punción de una vena. La mezcla se agita suavemente durante 2 minutos en una placa de porcelana o con esmalte blanco y se observa la aglutinación. La aglutinación puede ser gruesa, en cuyo caso es evidente, o bastante fina, en cuyo caso puede verse más claramente como una acumulación de antígeno teñido con verde malaquita en el borde de la gota, dejando el centro del color rojo normal de la sangre. Esta prueba es especialmente útil para analizar grandes parvadas inmediatamente antes de su sacrificio, y por tanto tiene ventajas sobre la prueba de la tuberculina para el control de la enfermedad, incluso en aves domésticas. También se ha descrito que en las aves domésticas es más fiable que la prueba de la tuberculina.

Nota sobre limitaciones de uso

Ni la prueba de la tuberculina con la tuberculina aviar ni la prueba de la aglutinación con antígeno coloreado tienen valor en los casos de infección por *M. tuberculosis* de animales enjaulados.

C. REQUISITOS PARA LAS VACUNAS

1. Antecedentes

No hay vacunas disponibles.

La tuberculina aviar es una preparación de derivados proteicos purificados (PPC) con productos del crecimiento de *M. a. avium* desnaturalizados por el calor. Se utiliza mediante una inyección intradérmica para revelar la hipersensibilidad retardada como medio para identificar aves infectadas por la misma especie de bacilo tuberculoso, o sensibilizadas con él. También se ha utilizado como ayuda al diagnóstico diferencial en la prueba de la tuberculina intradérmica comparativa para la tuberculosis bovina (véase el Capítulo 3.1.13).

Los principios generales indicados en el Capítulo 1.1.8 *Principios de producción de vacunas veterinarias* son los que deben seguirse para los materiales biológicos de diagnóstico inyectables, como la tuberculina. Las normas aquí dadas aquí y en el capítulo 1.1.8 son de carácter general y pueden suplementarse con requisitos nacionales y regionales.

2. Descripción de la producción y requisitos mínimos para la producción de tuberculina

2.1. Características del inóculo

2.1.1. Características biológicas del inóculo primario

Se deben identificar las cepas de *M. a. avium* que se utilizan para preparar los cultivos de inóculo mediante las pruebas adecuadas. Las cepas recomendadas por la Unión Europea (UE) son, por ejemplo, la D4ER y la TB56. También se puede tener como referencia la Organización Mundial de la Salud (1987).

2.1.2. Criterios de calidad (esterilidad, pureza, ausencia de agentes extraños)

Debe comprobarse que los cultivos de inóculo están libres de microorganismos contaminantes y que son capaces de producir tuberculina con la suficiente potencia. Las pruebas necesarias son las descritas a continuación.

2.2. Método de fabricación

2.2.1. Procedimiento

El material del inóculo se mantiene como reserva de cultivos liofilizados. Si los cultivos han crecido en medios sólidos, será necesario adaptar el microorganismo para que crezca en cultivos líquidos. Esto se realiza más fácilmente incorporando un trozo de patata a los frascos de medio líquido (por ejemplo, medio de Watson Reid). Cuando el cultivo se ha adaptado al medio líquido, puede mantenerse mediante pases cada 2–4 semanas (Angus, 1978; Haagsma & Angus, 1995). El microrganismo se cultiva en medio sintético de Dorset-Henley modificado, y a continuación se mata por tratamiento térmico en chorro continuo y se filtra para retirar las células. La proteína del filtrado se precipita químicamente (se utiliza sulfato de amonio o ácido tricloroacético [TCA]), se lava y se vuelve a suspender. Puede añadirse un conservante antimicrobiano que no dé lugar a falsos positivos, como el fenol (no más del 0,5% [p/v]). No pueden utilizarse derivados del mercurio. Puede añadirse glicerol (no más del 10% [p/v]) o glucosa (2,2% [p/v]) como estabilizadores. El producto se distribuye de forma aséptica en recipientes de vidrio neutros estériles, que a continuación se sellan para impedir la contaminación. El producto puede liofilizarse.

2.2.2. Requisitos para los ingredientes

Debe comprobarse que el substrato para el cultivo de producción origina un producto adaptado a los estándares de la Farmacopea Europea (2000) u otros estándares internacionales. Debe de estar libre de ingredientes que causen reacciones tóxicas o alérgicas.

2.2.3. Controles durante el proceso

Los frascos de producción, inoculados con cultivos de siembra adecuados, se incuban durante el tiempo apropiado. Cualquier recipiente con contaminación o con crecimiento macroscópico anormal debe desecharse tras su tratamiento en autoclave. A medida que progresa la incubación, la superficie de crecimiento de muchos cultivos puede humedecerse y hundirse en el medio o al fondo del frasco. En las tuberculinas PPD, el pH del precipitado disuelto (la llamada tuberculina concentrada) debe ser 6,6–6,7. El nivel de proteína del concentrado de PPD se determina por el método de Kjeldahl. Normalmente se compara el nitrógeno total y el nitrógeno precipitable por el ácido tricloroacético.

2.2.4. Pruebas en lotes de producto final

i) Esterilidad

Por lo general, las pruebas de esterilidad se llevan a cabo siguiendo la Farmacopea Europea u otras normas (véase también el capítulo 1.1.9 *Pruebas de esterilidad y ausencia de contaminación en los materiales biológicos de uso veterinario.*

ii) Identidad

Utilizando un procedimiento similar al descrito en el apartado C.2.2.4.iv., se pueden probar uno o más lotes para determinar la especificidad junto con una preparación estándar de tuberculina bovina, a efectos de comparar las reacciones producidas en cobayas sensibilizados frente a *M. bovis.* En cobayas sensibilizados frente a *M. bovis*, la potencia de la preparación de la tuberculina aviar no debe superar el 10% de la potencia de la preparación estándar de tuberculina bovina empleada en la prueba de potencia.

iii) Seguridad

Puede examinarse la tuberculina PPD para comprobar que está libre de micobacterias vivas utilizando el método de cultivo descrito previamente. Este método de cultivo, que no requiere el uso de animales, se utiliza en muchos laboratorios y se recomienda su uso en lugar de utilizar animales para este propósito. El siguiente es el método descrito anteriormente en el que se utilizan animales experimentales, para evaluar la seguridad de PPD. Se inyectan subcutáneamente con 0,5 ml de la tuberculina problema dos cobayas, de peso no menor a 250 g cada uno y que no hayan sido tratados previamente con ningún material que interfiera con la prueba. No deben presentarse efectos anormales en 7 días.

La prueba para detectar micobacterias vivas en la tuberculina puede realizarse con la tuberculina antes de su distribución en los recipientes finales o en las muestras tomadas de los mismos recipientes finales. Debe tomarse una muestra de por lo menos 10 ml e inyectarse intraperitoneal o subcutáneamente en un mínimo de dos cobayas, dividiendo el volumen probado por igual entre los cobayas. Es preferible tomar una muestra mayor, 50 ml, y concentrar cualquier bacteria residual por centrifugación o por filtración en membrana. Los cobayas se observan durante un mínimo de 42 días y se examinan macroscópicamente post mórtem. Cualquier lesión que se encuentre se analiza microscópicamente y por cultivo.

Debe llevarse a cabo una prueba de ausencia de propiedades tóxicas o irritantes según las especificaciones de la Farmacopea Europea (2000).

Para probar este efecto, se inyectan intradérmicamente en tres ocasiones distintas cada uno de tres cobayas no tratados previamente con ninguna sustancia que pueda interferir con la prueba, con el equivalente a 500 UI de la preparación problema en un volumen de 0,1 ml. Cada cobaya, junto con los tres cobayas de control que no se han inyectado con anterioridad, se inoculan intradérmicamente con la misma dosis de la misma tuberculina 21 días después de la tercera inyección. Cuando se comprueban 24–28 horas más tarde, las reacciones de los dos grupos de cobayas no deben ser diferentes.

iv) Potencia del lote

La potencia de la tuberculina aviar se determina en cobayas sensibilizados con *M. avium*, mediante comparación con una preparación estándar calibrada en UI.

Se requieren por lo menos nueve cobayas albinos, de 400–600 g cada uno. Los cobayas se sensibilizan administrando a cada uno una dosis adecuada de *M. avium* inactivado o vivo por inyección intramuscular profunda. La prueba se realiza 4–6 semanas más tarde del siguiente modo: Se afeitan los costados de los cobayas para disponer de espacio para 3–4 inyecciones a cada costado. Se preparan por lo menos tres diluciones de la tuberculina problema y otras tres diluciones de la preparación estándar en tampón isotónico que contenga 0,0005% (p/v) de polisorbato 80 (Tween 80). Las diluciones se escogen de tal modo que las reacciones producidas muestren diámetros superiores a 8 mm e inferiores a 25 mm. Se distribuyen las diluciones al azar en los sitios de inoculación, siguiendo el diseño del cuadrado latino. Las diluciones se inyectan intradérmicamente en volúmenes de 0,1 o 0,2 ml.

Entre 24–28 horas más tarde, se miden los diámetros de las reacciones y se calculan los resultados por métodos estadísticos estándar, considerando que los diámetros son directamente proporcionales a los logaritmos de las concentraciones de las tuberculinas. La potencia estimada no debe ser inferior al 75% ni superior al 133% de la indicada en la etiqueta. La prueba no resulta válida a menos que los límites de error (p = 0,95) sean superiores al 50% e inferiores al 200% de la potencia estimada. Si un lote no supera una prueba de potencia, puede repetirse la prueba una o más veces con tal de que la estimación final de la potencia y los límites de error se basen en los resultados combinados de todas las pruebas.

Se recomienda que la tuberculina aviar contenga el equivalente a 25.000 UI/ml como mínimo, lo que para uso práctico supone una dosis de 2.500 UI/ 0,1 ml.

3. Requisitos para la autorización/registro/licencia

3.1. Proceso de fabricación

El proceso de fabricación debe llevarse a cabo con arreglo a la Farmacopea Europea (2000) o a otras normas internacionales.

3.2. Requisitos de seguridad

3.2.1. Seguridad en especies de destino y no de destino

Los conservantes antimicrobianos u otras sustancias que se puedan añadir a una tuberculina no deben afectar la seguridad y eficacia del producto. La concentración máxima permitida de fenol es 0,5% (p/v) y de glicerol es 10% (v/v). El pH debe estar entre 6,5 y 7,5.

3.2.2. Precauciones (peligros)

En experiencias en humanos y en animales se ha observado que la tuberculina convenientemente diluida e inyectada intradérmicamente origina una reacción localizada en el sitio de la inyección sin manifestaciones generalizadas. Incluso en personas muy sensibles, las reacciones generalizadas graves son extremadamente raras y limitadas.

3.3. Estabilidad

Durante el almacenaje, la tuberculina aviar líquida debe protegerse de la luz y mantenerse a una temperatura de 5°C (±3°C). Las preparaciones liofilizadas pueden almacenarse a temperaturas más altas (pero que no superen los 25ºC) protegidas de la luz. Durante el uso, deben evitarse al máximo las exposiciones a temperaturas más altas o a la luz solar directa.

Siempre que las tuberculinas se almacenen a una temperatura de entre 2 y 8°C y se protejan de la luz, pueden utilizarse hasta el fin de los siguientes periodos tras la última prueba de potencia que haya

dado resultados satisfactorios: en el caso de las tuberculinas PPD líquidas: 2 años; las tuberculinas PPD liofilizadas: 8 años; las tuberculinas HCSM (medio sintético concentrado por calor) diluidas: 2 años.

BIBLIOGRAFÍA

ANGUS R.D. (1978). Production of Reference PPD tuberculins for Veterinary use in the United States. *J. Biol. Stand.*, **6**, 221.

COUSINS D., FRANCIS B. & DAWSON D. (1996). Multiplex PCR provides a low-cost alternative to DNA probe methods for rapid identification of *Mycobacterium avium* and *Mycobacterium intracellulare. J. Clin. Microbiol.,* **34**, 2331–2333.

DVORSKA L., BULL T.J., BARTOS M., MATLOVA L., SVASTOVA P., WESTON R.T., KINTR J., PARMOVA I., VAN SOOLINGEN D. & PAVLIK I. (2003). A standardised restriction fragment length polymorphism (RFLP) method for typing *Mycobacterium avium* isolates links IS*901* with virulence for birds. *J. Microbiol. Methods,* **55**, 11–27.

DVORSKA L., MATLOVA L., AYELE W. Y., FISCHER O. A., AMEMORI T., WESTON R. T., ALVAREZ J., BERAN V., MORAVKOVA M. & PAVLIK I. (2007). Avian tuberculosis in naturally infected captive water birds of the Ardeidae and Threskiornithidae families studied by serotyping, IS*901* RFLP typing and virulence for poultry. *Vet. Microbiol.,* **119**, 366–374.

DVORSKA L., MATLOVA L., BARTOS M., PARMOVA I., BARTL J., SVASTOVA P., BULL T. J. & PAVLIK I. (2004). Study of *Mycobacterium avium* complex strains isolated from cattle in the Czech Republic between 1996 and 2000. *Vet. Microbiol.,* **99**, 239–250.

DVORSKA L., PARMOVA I., LAVICKOVA M., BARTL J., VRBAS V. & PAVLIK I. (1999). Isolation of *Rhodococcus equi* and atypical mycobacteria from lymph nodes of pigs and cattle in herds with the occurrence of tuberculoid gross changes in the Czech Republic over the period of 1996-1998. *Veterinarni Medicina,* **44**, 321–330.

EUROPEAN PHARMACOPOEIA (2000). Purified protein derivative (avian). *In:* European Pharmacopoeia, Fourth Edition. Editions of the Council of Europe, Strasbourg, France, 1694.

GUERRERO C., BERNASCONI C., BURKI D., BODMER T. & TELENTI A. (1995). A novel insertion element from *Mycobacterium avium,* IS*1245,* is a specific target for analysis of strain relatedness. *J. Clin. Microbiol.,* **33**, 304–307.

HAAGSMA J. & ANGUS R.D. (1995). Tuberculin production. *In: Mycobacterium bovis* Infections in Humans and Animals, Steele J.H. & Thoen C.O., eds. Iowa State University Press, Ames, USA, 73–84.

INDERLIED C.B., KEMPER C.A. & BERMUDEZ L.E.M. (1993). The *Mycobacterium avium* complex. *Clin. Microbiol. Rev.,* **6**, 266–310.

KAEVSKA M., SLANA I., KRALIK P. & PAVLIK I. (2010). Examination *of Mycobacterium avium* subsp. *avium* distribution in naturally infected hens by culture and triplex quantitative real time PCR. *Veterinarni Medicina,* **55**, 325–330.

KAZDA J., PAVLIK I., FALKINHAM J. & HRUSKA K. (2009). The Ecology of *Mycobacteria*: Impact on Animal's and Human's Health, First Edition, Springer Science+Business Media BV, 520 pp. ISBN 978-1-4020-9412-5,

KUNZE Z.M., PORTAELS F. & MCFADDEN J.J. (1992). Biologically distinct subtypes of *Mycobacterium avium* differ in possession of insertion sequence IS901. *J. Clin. Microbiol.,* **30**, 2366–2372.

KIRSCHNER P., MEIER P.A. & BOTTGER E.C. (1993). Genotypic identification and detection of mycobacteria. *In:* Diagnostic Molecular Microbiology, Persing D.H., Smith T.F., Tenover F.C. & White T.C., eds. American Society for Microbiology, Washington DC, USA, 173–190.

MIJS W., DE HAAS P., ROSSAU R., VAN DER LAAN T., RIGOUTS L., PORTAELS F. & VAN SOOLINGEN D. (2002). Molecular evidence to support a proposal to reserve the designation *Mycobacterium avium* subsp. *avium* to bird-type isolates and *M. avium* subsp. *hominissuis* for the human/porcine type of *M. avium. Int. J. Syst. Evol. Microbiol.,* **52**, 1505–1518.

MORAVKOVA M., HLOZEK P., BERAN V., PAVLIK I., PREZIUSO S., CUTERI V. & BARTOS M. (2008). Strategy for the detection and differentiation of *Mycobacterium avium* species in isolates and heavily infected tissues. *Res. Vet. Sci.,* **85**, 257–264.

PAVLIK I., MATLOVA L., DVORSKA L., BARTL J., OKTABCOVA L., DOCEKAL J. & PARMOVA I. (2003). Tuberculous lesions in pigs in the Czech Republic during 1990-1999: occurrence, causal factors and economic loses. *Veterinarni Medicina,* **48**, 113–125.

PAVLIK I., MATLOVA L., DVORSKA L., SHITAYE J. E. & PARMOVA I. (2005). Mycobacterial infections in cattle and pigs caused by *Mycobacterium avium* complex members and atypical mycobacteria in the Czech Republic during 2000–2004. *Veterinarni Medicina*, **50**, 281–290.

PAVLIK I., SVASTOVA P., BARTL J., DVORSKA L. & RYCHLIK I. (2000). Relationship between IS*901* in the *Mycobacterium avium* complex strains isolated from birds, animals, humans, and the environment and virulence for poultry. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.,* **7**, 212–217.

POCKNELL A.M., MILLER B.J., NEUFELD J.L. & GRAHN B.H. (1996). Conjunctival mycobacteriosis in two emus (*Dromaius novaehollandiae*). *Vet. Pathol.*, **33** (3), 346–348.

REALINI L., DE RIDDER K., HIRSCHEL B. & PORTAELS F. (1999). Blood and charcoal added to acidified agar media promote the growth of *Mycobacterium genavense. Diagn. Microbiol. Infect. Dis.,* **34**, 45–50.

RITACCO V., KREMER K., VAN DER LAAN T., PIJNENBURG J.E.M., DE HAAS P.E.W. & VAN SOOLINGEN D. (1998). Use of IS*901* and IS*1245* in RFLP typing of *Mycobacterium avium* complex: relatedness among serovar reference strains, human and animal isolates. *Int. J. Tuberculosis Lung Dis.*, **2**, 242–251.

ROZANSKA M. (1965). Preparation of antigen for whole blood rapid agglutination test and its specificity for diagnosis of avian tuberculosis. *Bull. Vet. Inst. Pulawy,* **9**, 20–25.

SAITO H., TOMIOKA H., SATO K., TASAKA H. & DAWSON D.J. (1990). Identification of various serovar strains of Mycobacterium avium complex by using DNA probes specific for *Mycobacterium avium* and *Mycobacterium intracellulare. J. Clin. Microbiol.,* **28**, 1694–1697.

SHITAYE J.E., GRYMOVA V., GRYM M., HALOUZKA R., HORVATHOVA A., MORAVKOVA M., BERAN V., SVOBODOVA J., DVORSKA-BARTOSOVA L. & PAVLIK I. (2009). *Mycobacterium avium* subsp. *hominissuis* infection in a pet parrot. *Emerg. Inf. Dis.,* **15**, 617–619.

SHITAYE J.E., HALOUZKA R., SVOBODOVA J., GRYMOVA V., GRYM M., SKORIC M., FICTUM P., BERAN V., SLANY M. & PAVLIK I. (2010). First isolation of *Mycobacterium genavense* in blue headed parrot (*Pionus menstruus*) imported from Surinam (South America) to the Czech Republic: a case report. *Veterinarni Medicina,* **55**, 339–347.

SHITAYE J.E., MATLOVA L., HORVATHOVA A., MORAVKOVA M., DVORSKA-BARTOSOVA L., TREML F., LAMKA J. & PAVLIK I. (2008). *Mycobacterium avium* subsp. *avium* distribution studied in a naturally infected hen flock and in the environment by culture, serotyping and IS901 RFLP methods. *Vet. Microbiol.*, **127**, 155–164.

SHITAYE J.E., PARMOVA I., MATLOVA L., DVORSKA L., HORVATHOVA A., VRBAS V. & PAVLIK, I. (2006). Mycobacterial and *Rhodococcus equi* infections in pigs in the Czech Republic between the years 1996 and 2004: the causal factors and distribution of infections in the tissues. *Veterinarni Medicina,* **51**, 497–511.

SLANA I., KAEVSKA M., KRALIK P., HORVATHOVA A. & PAVLIK, I. (2010). Distribution of *Mycobacterium avium* subsp. *avium* and *M. a. hominissuis* in artificially infected pigs studied by culture and IS901 and IS1245 quantitative real time PCR. *Vet. Microbiol.*, **144**, 437–443.

SOINI H., EEROLA E. & VILJANEN M.K. (1996). Genetic diversity among *Mycobacterium avium* complex Accu-Probe-positive isolates. *J. Clin. Microbiol.,* **34**, 55–57.

TELL L.A., WOODS L. & CROMIE R.L. (2001). Tuberculosis in birds. *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.*, **20**, 180–203.

THOREL M.F., HUCHZERMEYER H. & MICHEL A.L. (2001). *Mycobacterium avium* and *M. intracellulare* infection in mammals. *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.*, **20**, 204–218.

THOREL M.F., HUCHZERMEYER H., WEISS R. & FONTAINE J.J. (1997). *Mycobacterium avium* infections in animals. Literature review. *Vet. Res.*, **28**, 439–447.

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

VAN INGEN J,, AL HAJOJ SAM., BOERE M., AL RABIAH F., ENAIMI M., DE ZWAAN R., TORTOLI E., DEKHUIJZEN R. & VAN SOOLINGEN D. (2009). *Mycobacterium riyadhense* sp. nov.; a non-tuberculous species identified as *Mycobacterium tuberculosis* by a commercial line-probe assay. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, **59**, 1049–1053.

VAN SOOLINGEN D., BAUER J., RITACCO V., CARDOSO LEAO S., PAVLI I., VINCENT V., RASTOGI N., GORI A., BODMER T., GARZELLI C. & GARCIA M.J. (1998). IS*1245* restriction fragment length polymorphism typing of *Mycobacterium avium* isolates: proposal for standardization. *J. Clin. Microbiol.*, **36**, 3051–3054.

WOLINSKY E. & SCHAEFER W.B. (1973). Proposed numbering scheme for mycobacterial serotypes by agglutination. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **23**, 182–183.

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

*
* *

NB: En el momento (2022) no existían Laboratorios de Referencia de la OIE para la tuberculosis aviar (puede consultarse la página web de la OIE: https://www.woah.org/es/que-ofrecemos/red-de-expertos/laboratorios-de-referencia/#ui-id-3)

NB: ADOPTADO POR PRIMERA VEZ EN 1989 COMO TUBERCULOSIS EN LAS AVES.
ÚLTIMAS ACTUALIZACIONES ADOPTADAS EN 2014.