

PARATUBERCULOSIS CAPRINA: UNA REVISIÓN CON ESPECIAL ÉNFASIS EN SU INTERFERENCIA CON EL DIAGNÓSTICO DE LA TUBERCULOSIS

Caprine paratuberculosis: A review with special emphasis on its interference with the diagnosis of tuberculosis

Rivera, J.^{1*}; Marín, M. C.²; Riquelme, M. F.²; Cubero, M. J.¹

¹ Departamento de Sanidad Animal. Facultad de Veterinaria de la Universidad de Murcia. ² ADS. COAG-IR Murcia, Avenida del Río Segura 7, 30002 Murcia.

***Autor de correspondencia:** Jorge Rivera. Tlf: +34 630435818. E-mail: jorge.rivera@um.es

Historial del artículo:

Recibido: 26 julio 2015

Aceptado: 17 noviembre 2015

RESUMEN

La paratuberculosis, causada por *Mycobacterium avium paratuberculosis*, afecta a los rumiantes domésticos y silvestres, está ampliamente extendida y se contagia vía fecal-oral, tiene un curso crónico y causa graves pérdidas económicas. La respuesta inmune del hospedador va cambiando durante la infección, y con ella el estadio de la enfermedad, las lesiones y la respuesta a las pruebas diagnósticas. Causa lesiones principalmente en el íleon terminal (linfangiectasia, atrofia de las vellosidades, enteritis granulomatosa) que permiten la identificación post-mortem de la enfermedad y su diferenciación de la tuberculosis. El cuadro clínico consiste en un adelgazamiento progresivo con algunos casos de diarrea, y aparece entre los 2 y 4 años de edad de forma esporádica. El diagnóstico de la paratuberculosis se realiza por detección de la respuesta inmune celular por intradermotuberculinización (con PPD aviar o johnina) y gamma-interferón (IFN- γ). No hay tratamiento efectivo, y el control se realiza con manejo y con vacunación. La interferencia de la paratuberculosis con el diagnóstico de la tuberculosis caprina consiste en una disminución de la sensibilidad de las pruebas cutáneas, que afecta más a la intradermo-tuberculinización comparada. Por esto, es aconsejable combinar como técnicas de diagnóstico de tuberculosis caprina, en rebaños infectados de paratuberculosis, la intradermotuberculinización simple y la técnica del IFN- γ , usando como prueba complementaria la técnica del ELISA basado en el antígeno MPB-70. Respecto a la interferencia de la vacunación contra la paratuberculosis en el diagnóstico de la tuberculosis caprina, debido a que las vacunas usadas actualmente (atenuadas e inactivadas) producen una respuesta inmune

similar a la infección natural, se produce una interferencia de larga duración (20 meses) en el diagnóstico de la tuberculosis. Esta interferencia se puede evitar usando vacunas con antígenos concretos del complejo *M. tuberculosis*, lo que facilitaría la erradicación de la tuberculosis.

Palabras clave: paratuberculosis, tuberculosis, caprino, diagnóstico, interferencia.

ABSTRACT

The paratuberculosis, caused by *Mycobacterium avium paratuberculosis*, affects domestic and wild ruminants, it is widely distributed, has a fecal-oral spread, a chronic development and causes serious economic losses. The immune response changes during the infection, and with it the stage of disease, the histological injury and the response to diagnostic tests. Paratuberculosis produce lesions mainly in the terminal ileum (lymphangiectasia, intestinal villi atrophy, granulomatous enteritis) that enable *post-mortem* identification of the disease and its differentiation from caprine tuberculosis. The clinical picture consists of a progressive thinning and some cases of diarrhea, and appears between 2 and 4 years old sporadically. The diagnosis of paratuberculosis is done by the detection of the cellular immune response by intradermal-reaction (with avian PPD or johnine) and gamma interferon (IFN- γ). There is no effective treatment, and control is performed by management and vaccination. The paratuberculosis interference in the diagnosis of caprine tuberculosis consists in a decreased sensitivity of cell-immunity based tests, which affects more comparative intradermal-reaction. Therefore, it is advisable to combine as diagnostic tests for tuberculosis, in paratuberculosis infected flocks, the single intradermal-reaction and the IFN- γ test, using as complementary test the ELISA based on MPB-70 antigen, in paratuberculosis infected flocks. About the interference of vaccination against paratuberculosis, in caprine tuberculosis diagnosis, the currently used vaccines (attenuated and inactivated) produce a similar immune response to the natural infection, and there is a long-term interference (20 months) with the tuberculosis diagnosis. This interference can be avoided by using DIVA vaccines, with specific antigens of *M. tuberculosis* complex, which would facilitate the eradication of tuberculosis.

Keywords: paratuberculosis, tuberculosis, goat, diagnosis, interference.

PARATUBERCULOSIS

Mycobacterium avium paratuberculosis (*Map*) es el agente causal de la paratuberculosis o enfermedad de Johne.

Map es un patógeno obligado de los rumiantes domésticos (ganado bovino, caprino y ovino) (Merkal, 1984), pero los rumiantes salvajes (Miralles y cols., 2014) y otros animales como los conejos (Greig y cols., 1999) y los zorros (Beard y cols., 1999) actúan como reservorios, hecho de gran importancia epidemiológica. Esta micobacteria se mantiene viable durante largos períodos de tiempo en el medio ambiente (Berghaus y cols., 2006).

La enfermedad pertenece a la Lista de enfermedades de notificación obligatoria a la OIE y se ha descrito en muchos países, aunque no se conoce su prevalencia real debido a sus características y a la falta de estudios (Álvarez, 2008).

En Europa, aunque no se han realizado estudios suficientes en los pequeños rumiantes, se ha detectado una elevada presencia de paratuberculosis en Grecia (Dimarelli y cols., 1991), Noruega o Suiza (Nielsen y Toft, 2007a). En España, la prevalencia de la paratuberculosis varía según la zona analizada, con una prevalencia de explotaciones variable del 3% (Canarias) (Molina y cols., 1991) al 42,2% (Madrid) (de Juan, 2005) aproximadamente.

Las pérdidas económicas debidas a esta enfermedad son elevadas y difíciles de estimar, ya que se deben tanto a causas directas, como la disminución de la producción, como a causas indirectas e inaparentes como la pérdida de potencial genético por sacrificio (Kennedy y Benedictus, 2001).

Durante la infección en el intestino, el patógeno se localiza en los fagosomas de los macrófagos sub-epiteliales e intra-epiteliales

de la lámina propia, adyacente a las Placas de Peyer (Momotani y cols. 1998), siendo resistente a la fagocitosis (Valentin-Weigand y Goethe, 1999).

El contagio es principalmente fecal-oral, y se produce durante la lactancia, por su presencia en la leche o en ubres contaminadas (Whittington y Sergeant, 2001), o vía vertical durante la gestación (Sweeney y cols., 1992). Este contagio se da en animales menores de 6 meses (Whittington y Sergeant, 2001), con una dosis infectiva muy pequeña (Brotherston y cols., 1961), pero el curso crónico de la enfermedad hace que los signos clínicos se presenten en animales mayores de 2 años, teniendo una presentación en iceberg (Whitlock y Buergelt, 1996), pues cuando comienzan a observarse casos clínicos la enfermedad ya está muy extendida en la explotación.

RESPUESTA INMUNE DEL HOSPEDADOR

Tras la localización de *Map* en los macrófagos, se inicia una respuesta inmune mediante la producción de citoquinas. La respuesta del hospedador se relaciona con la presencia de los diferentes tipos de lesiones, con la fase de la enfermedad y con la respuesta a las diferentes pruebas diagnósticas (Burrells y cols., 1998).

Hay dos fases principales de la enfermedad, dependiendo del tipo de respuesta inmune: la fase tuberculoide y la fase lepromatosa.

Respuesta celular de tipo Th1: fase tuberculoide o paucibacilar

Al inicio de la infección, tras la presentación de antígenos por los macrófagos, los linfocitos T helper producen interleuquina 2 (IL-2), lo que da lugar a la multiplicación de los linfocitos CD4+ Th1. Éstos producen IL-2, IFN- γ , factor de necrosis tumoral (TNF- α) y factores estimuladores de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF) (Valentin-Weigand y Goethe, 1999).

Estas sustancias producen la activación y atracción de los macrófagos, lo que facilita la destrucción de los microorganismos y controla el avance de la infección (Bassey y Collins, 1997). Además, se activa la formación de granulomas alrededor de la infección, debido a sustancias como el factor de necrosis tumoral, aislando la infección y previniendo su propagación (Sanders y Cooper, 2000).

Esta fase también se puede clasificar como fase paucibacilar, por hallarse un infiltrado tisular linfocítico con escasa o nula presencia de micobacterias en el interior de los macrófagos tisulares.

Los mecanismos que dan lugar al paso de la respuesta Th1 a la respuesta Th2 son desconocidos, aunque se relacionan con factores genéticos, la exposición prolongada al antígeno, el desarrollo de poblaciones celulares concretas, la incorrecta presentación del antígeno por los macrófagos, la proliferación de linfocitos T $\gamma\delta$ inhibidores de los CD4+ Th1 o la localización del antígeno durante la infección (Coussens, 2004).

Respuesta celular de tipo Th2: fase lepromatosa o multibacilar

Tras el fallo del sistema inmune de tipo celular, se produce una proliferación bacteriana y un paso progresivo hacia la respuesta de tipo Th2. Durante esta fase, hay una producción de IL-4, IL-5, IL-6 e IL-10 por los linfocitos CD4+ Th2 que suprime la respuesta de tipo Th1 (Coussens, 2004). Esto favorece la multiplicación de linfocitos B, produciéndose anticuerpos. Durante esta fase hay una disminución de la respuesta celular y un aumento de la respuesta humoral, al mismo tiempo que hay una multiplicación de *Map* (Lepper y cols., 1989). Esta respuesta no actúa eficazmente contra los microorganismos intracelulares como *Map* (Ellner y Wallis, 1989).

Este hecho tiene como consecuencias la progresión de la infección, el desarrollo de la

patología y la proliferación bacteriana. Durante este tipo de respuesta hay un nivel de anticuerpos séricos elevado junto con una baja respuesta a las pruebas diagnósticas basadas en la inmunidad celular.

Esta fase también se denomina fase multibacilar, por la elevada presencia de bacilos en el interior de los macrófagos tisulares. Debido a la gran presencia de células inflamatorias se produce un engrosamiento de la pared intestinal, perdiendo ésta su funcionalidad, dándose un síndrome de malabsorción y una enteropatía con pérdida de proteínas (Tiwari y cols., 2006).

Durante esta fase puede haber una diseminación del microorganismo fuera del tracto gastrointestinal (Ayele y cols. 2004), dando lugar a lesiones granulomatosas en hígado, riñón, glándula mamaria y otros órganos. También comienzan a detectarse signos clínicos inespecíficos como diarrea y pérdida de peso.

CUADRO CLÍNICO

Es de vital importancia saber reconocer este cuadro clínico pues, además de ser una enfermedad que afecta gravemente la producción, y contra la que hay que instaurar medidas preventivas y de control, a la hora de realizar el diagnóstico de la tuberculosis el veterinario debe saber que influirá en el resultado de las pruebas y por lo tanto, tenerla en cuenta a la hora de su interpretación.

La paratuberculosis se caracteriza en todas las especies animales por su cronicidad y por el adelgazamiento progresivo que provoca (Thoresen y cols., 1994). Aunque otro síntoma característico es la diarrea, ésta solo se produce en un 10-20% de los casos clínicos en pequeños rumiantes (Stehman, 1996). Esta sintomatología puede ser confundida con enfermedades parasitarias y otros procesos si no se realiza un diagnóstico correcto.

Los síntomas clínicos aparecen entre los 3 y 5 años de edad (Chiodini y cols., 1984), con

presentación de los casos por goteo, debido a la cronicidad y lenta progresión de la paratuberculosis. A pesar de esto, puede haber concentraciones de casos en etapas de mayor estrés fisiológico como gestación, lactación o cambios de alimentación (Pérez y cols., 2000).

Teniendo en cuenta la intensidad de los signos clínicos observados, la respuesta de las pruebas de laboratorio para detectar la infección y la eliminación de micobacterias al medio ambiente, se pueden clasificar los rebaños afectados en diversas fases clínicas (Clarke, 1997): fase latente, fase subclínica, fase clínica y fase clínica en estado avanzado.

LESIONES

Lesiones macroscópicas

Las lesiones macroscópicas más comunes halladas durante la necropsia en caprino, además de las relacionadas con la caquexia, son específicas del intestino delgado y nódulos linfáticos mesentéricos (Clarke, 1997).

Una lesión característica en la serosa intestinal y el mesenterio es la linfangiectasia. Se observan los conductos linfáticos como cordones blanquecinos, sinuosos y prominentes en la pared intestinal. Las lesiones se concentran en el fleon terminal, principalmente en la válvula ileocecal, pero pueden extenderse hacia yeyuno y hasta el colon. La mucosa intestinal aparece engrosada, con gruesos pliegues. Los nódulos linfáticos mesentéricos se encuentran tumefactos y aumentados de tamaño, rezumando líquido al corte (Clarke, 1997). (Figura 1)

A pesar de que en la especie caprina las lesiones macroscópicas patognomónicas son menos evidentes que en el ganado vacuno (Thoresen y cols., 1994), es frecuente la presencia de focos de necrosis similares a los producidos por la tuberculosis, con presencia de caseificaciones y calcificaciones en mucosa, submucosa y nódulos linfáticos mesentéricos (Hines II y cols., 1995).

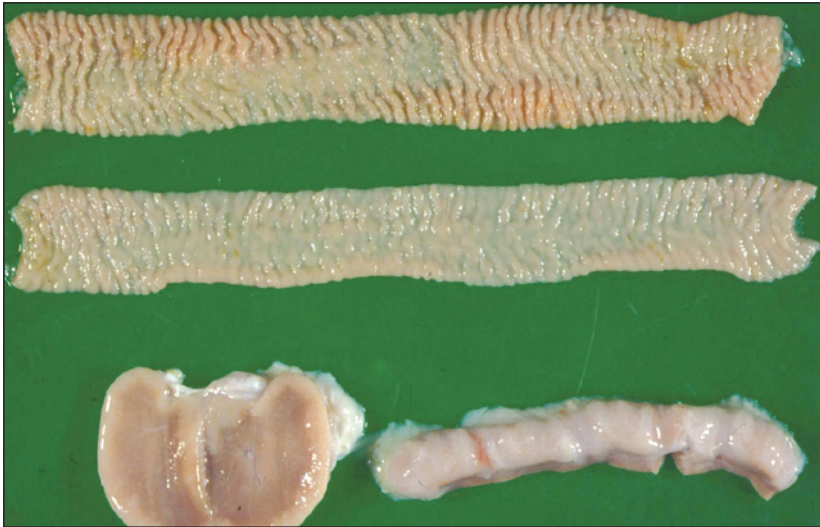


Figura 1. Lesiones macroscópicas de paratuberculosis caprina. (Imagen cedida por el Servicio de Anatomía Patológica de la Facultad de Veterinaria, Universidad de Murcia).

Lesiones microscópicas

La lesión microscópica predominante en la paratuberculosis es la enteritis granulomatosa, con presencia en la lámina propia de la mucosa de un infiltrado de macrófagos y células epiteloides, que puede llegar a afectar la submucosa o al total de las capas intestinales. Este infiltrado provoca la atrofia por fusión de las vellosidades intestinales y la oclusión de las criptas (Corpa y cols., 2000).

Existen diversas clasificaciones lesionales, destacando en la especie caprina la realizada por Corpa y cols. (2000). Los tipos de lesión se denominan: focales, difusas multibacilares, difusas linfocíticas y difusas intermedias.

- 1) Focales: pequeños granulomas en las placas de Peyer ileocecales.
- 2) Difusas multibacilares: la reacción granulomatosa afecta a distintas áreas intestinales, predominando los macrófagos repletos de micobacterias como tipo celular.

- 3) Difusas linfocíticas paucibacilares: el tipo celular mayoritario son los linfocitos, con presencia de escasos macrófagos que contienen escasas o ninguna micobacteria.
- 4) Difusas intermedias: infiltrado celular consistente en linfocitos y macrófagos con un pequeño número de micobacterias en su interior.

En la imagen (*Figura 2*) se observan las micobacterias dentro de los macrófagos en las vellosidades intestinales, mediante la tinción de Ziehl-Neelsen, tinción específica para evidenciar micobacterias, ya que son ácido-alcohol resistentes.

Por lo tanto, las lesiones y el tipo de infiltrado celular dependen de la fase de la enfermedad en la que se encuentre el animal y de la respuesta inmune que se esté desarrollando, encontrando en la mucosa intestinal un infiltrado linfocítico y con escasos macrófagos y bacterias en la fase tuberculoide o paucibacilar; y un infiltrado con abundantes macrófagos repletos de micobacterias durante la fase lepromatosa o multibacilar.

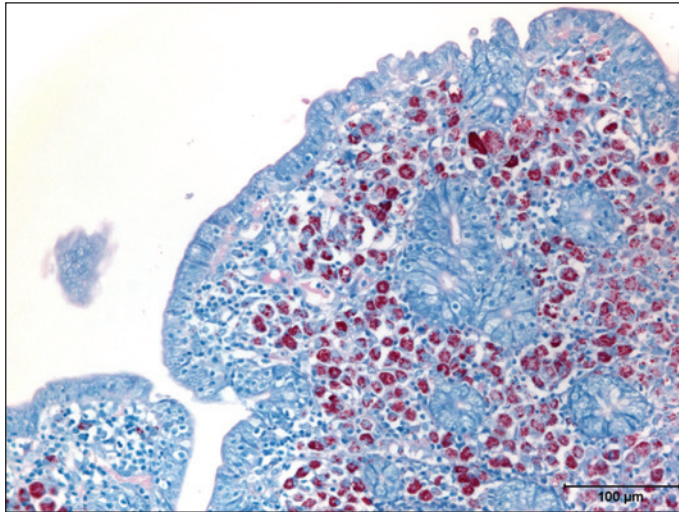


Figura 2. Fase lepromatosa o multibacilar, infiltrado con abundantes macrófagos repletos de micobacterias (Ziehl-Neelsen) (Imagen cedida por el Servicio de Anatomía Patológica, Facultad de Veterinaria, Universidad de Murcia).

DIAGNÓSTICO

El diagnóstico de la paratuberculosis puede realizarse mediante el hallazgo de *Map*, por cultivo o detección de su ADN, y por la detección de la respuesta inmune del hospedador.

El diagnóstico clínico debe basarse en la identificación del cuadro en animales de 2 a 4 años, principalmente durante períodos de estrés, aunque la sintomatología inespecífica lo complica. El diagnóstico mediante el estudio de las lesiones anatómo-patológicas permite detectar animales durante la fase subclínica de la enfermedad, aunque solamente se puede realizar post-mortem (Corpa y cols., 2000).

Los métodos de diagnóstico basados en la respuesta inmune del hospedador son los usados con mayor frecuencia y a nivel de explotación, principalmente la intradermorreacción, que es la técnica utilizada en las campañas de saneamiento de la tuberculosis.

Al inicio de la respuesta inmune contra *Map*, hay un componente celular detectable mediante las pruebas de campo, mientras que

en fases más avanzadas se produce principalmente una respuesta humoral, disminuyendo el componente celular.

Las pruebas para detección de la respuesta inmune celular son fundamentalmente dos: la técnica del IFN- γ y la intradermorreacción.

- **Técnica del IFN- γ :** se basa en la medida de la producción por los linfocitos de IFN- γ tras su estimulación con johnina (DPP, derivado proteico purificado de *Map*) (Billman-Jacobe y cols., 1992). Tiene una sensibilidad mayor a la de las pruebas serológicas durante la fase subclínica (Gwozdz y cols., 2000), pero ésta disminuye durante la fase clínica. Esta técnica no suele realizarse en caprino, pero sí en bovino, con el objetivo de diagnosticar la tuberculosis.
- **Intradermorreacción:** mide la hipersensibilidad retardada tras inyectar un extracto de *Map* (Johnina) o *M. avium* (DPP aviar, usado en la intradermotuberculinización comparada) y medir

a las 72 horas el aumento del grosor de la piel (Harris y Barletta, 2001). Tiene una baja sensibilidad y especificidad debido a las reacciones cruzadas con otras micobacterias ambientales.

La prueba basada en la detección de la respuesta inmune humoral por excelencia es la técnica inmuno enzimática (ELISA).

- **ELISA:** se basa en la detección de anticuerpos, producidos en fases avanzadas de la enfermedad, teniendo una sensibilidad baja durante las primeras fases (por debajo del 50%) (Harris y Barletta, 2001). Aún así, es la prueba de mayor sensibilidad durante las fases avanzadas de la enfermedad (Collins y cols., 2005), cuando aumenta la excreción al medio ambiente de *Map*, y su automatización y bajo coste favorecen su aplicación (Gumber y cols., 2006).

TRATAMIENTO Y CONTROL

Tratamiento

En la actualidad, no existen tratamientos viables en animales de producción debido a su elevado coste y pauta de administración diaria y muy prolongada (Emmery y Whittington, 2004).

Se ha demostrado la sensibilidad de *Map* a diversos antibióticos, pero a pesar de ello no se elimina la infección. Solo se consigue atenuar el cuadro clínico y las lesiones, pero los infectados permanecen como posibles fuentes de *Map* (Brumbaugh y cols., 2000). Esto se debe a la localización intracelular del patógeno, lo que lo protege de la acción de los antibióticos.

Por lo tanto, el tratamiento antibiótico sólo es posible con fines reproductivos en animales de alto valor genético, y teniendo en cuenta que se mantiene con ello un foco de infección (Harris y Barletta, 2001).

Control con medidas de manejo

Al no existir medidas terapéuticas adecuadas contra la paratuberculosis, tiene aún mayor importancia el control de la enfermedad, que debe orientarse hacia la erradicación. A la hora de este control, se intenta eliminar las posibles fuentes de infección de la explotación, reduciendo el número de nuevos casos y eliminando los animales infectados y excretores de *Map* (McKenna y cols., 2006).

Debido a la prolongada incubación de la paratuberculosis y al gran número de animales en fase subclínica en las explotaciones afectadas, la detección de los animales infectados, fuente de infección, es complicada. Dado que estos individuos excretan elevadas dosis de microorganismos al medio ambiente (Kennedy y Benedictus, 2001), las medidas de manejo para evitar la infección de nuevos animales susceptibles son críticas (McKenna y cols., 2006). Estas medidas se basan en evitar el contagio de la reposición en la explotación:

- Optimizar la limpieza y desinfección, especialmente en las naves de maternidad.
- Separación de las crías de sus madres inmediatamente después del parto.
- Uso de calostro de cabras negativas o artificial; cuidando la limpieza de las ubres durante su recolección.
- Uso de leche tratada térmicamente.
- Separación de las crías de los adultos durante su primer año de vida.
- Uso de diferentes equipamientos para el manejo de residuos y de la alimentación.
- No abonar campos con estiércol procedente de animales adultos cuya producción se utilice en animales jóvenes.

Otros factores de riesgo son la deficiente limpieza en la zona de alimentación, la escasa cantidad de paja en las camas, el tipo de alojamiento y la elevada densidad animal (Nielsen y Toft, 2007b).

Respecto a la eliminación de animales infectados, es recomendable realizar en los animales adultos pruebas diagnósticas (intradermorreacción, IFN- γ , ELISA o cultivo de muestras de heces), medida que, a pesar de la falta de sensibilidad a nivel individual de algunas técnicas (Harris y Barletta, 2001), facilita enormemente el control. Al mismo tiempo se debe sacrificar a los animales que presenten un cuadro clínico sospechoso (McKenna y cols., 2006). Las pruebas pueden realizarse a partir de una muestra representativa de animales para reducir costes, y es recomendable determinar la contaminación ambiental mediante muestreos ambientales (Raizman y cols., 2004).

También son de vital importancia el control de las nuevas incorporaciones de ganado, la separación con otras explotaciones y evitar el uso de pastos comunes (Kennedy y Benedictus, 2001).

Control mediante la vacunación

Otro método de control de gran importancia es la vacunación mediante vacunas vivas atenuadas o inactivadas. Una vacuna ampliamente utilizada es Gudair®, vacuna subcutánea inactivada para el ganado ovino y caprino (Chartier y cols., 2011).

La vacunación tiene como efectos la reducción de la excreción de la micobacteria y de la sintomatología, y por lo tanto minimiza las pérdidas económicas debidas a la paratuberculosis (Garrido y cols., 2007).

A pesar de sus efectos beneficiosos, plantea numerosos inconvenientes. No impide la infección de los animales vacunados, por lo que se mantiene la enfermedad en la explotación, y tampoco impide la excreción de *Map* al ambiente por los animales vacunados (Kalis y cols., 2001). Además, provoca interferencias a la hora de las pruebas diagnósticas de tuberculosis (Muskens y cols., 2002) y paratuberculosis (Kohler y cols., 2001), hecho que se analiza más adelante.

Otros inconvenientes son la posible reducción de las medidas de control en las explotaciones, debido a una excesiva confianza en la acción de la vacuna (Kalis y cols., 2001), y la aparición de lesiones en el punto de inoculación (Windsor y Eppleston, 2006) (en forma de un nódulo fibroso, frío y persistente de 4-6 centímetros de diámetro).

Por lo tanto, la vacunación no es una herramienta que permita la erradicación de esta enfermedad (Emmery y Whittington, 2004), a pesar de disminuir las manifestaciones clínicas y las pérdidas económicas debidas a la paratuberculosis.

El Protocolo de Procedimiento Normalizado de Trabajo para la Ejecución de los Controles del Programa de Erradicación de Tuberculosis Caprina en las Explotaciones Caprinas de Aptitud Láctea de la Región de Murcia del año 2015 (Consejería de Agricultura y Agua, Dirección General de Ganadería y Pesca, Región de Murcia), detalla el procedimiento para la administración de la vacuna de paratuberculosis, permitiendo aplicarla solo en las explotaciones exentas de tuberculosis, debido a la interferencia con la prueba de intradermo-tuberculinización. Se debe vacunar entre los 15 días y los seis meses de vida del animal, recomendándose lo antes posible e identificando a los animales vacunados. También, se debe dejar un grupo de animales sin vacunar, como control en caso de reaparición de la enfermedad. A los animales vacunados se les puede realizar la prueba de intradermo-tuberculinización a partir de los dos años de la aplicación de la vacuna, debido a las interferencias.

INTERFERENCIA EN EL DIAGNÓSTICO DE TUBERCULOSIS

Interferencia de la paratuberculosis

La prioridad a la hora de los saneamientos de tuberculosis es la detección y eliminación de los animales infectados. Por lo tanto, se busca la mayor sensibilidad posible de los métodos diagnósticos (Álvarez, 2008).

Debido a la similitud antigénica de *Map* con el complejo *M. tuberculosis*, se produce una interferencia en el diagnóstico de la tuberculosis en los rebaños afectados por ambas enfermedades (Álvarez, 2008), que varía según la prueba utilizada.

Álvarez y col. (2008) evaluaron la sensibilidad de la intradermo-tuberculinización simple, de la intradermo-tuberculinización comparada y de la prueba del IFN- γ en un rebaño de cabras de Guadarrama con infecciones mixtas de paratuberculosis y tuberculosis, tomando como referencia el resultado del cultivo microbiológico de *M. caprae* y *Map*, que se realizó en todos los animales para determinar el tipo de infección individualmente. Se concluyó que la prueba más afectada por la coexistencia de la paratuberculosis con la tuberculosis fue la intradermo-tuberculinización comparada (con una sensibilidad del 42,7%). Las pruebas de la intradermo-tuberculinización simple y la técnica del IFN- γ tuvieron ambas una sensibilidad del 71%, pero identificando subpoblaciones diferentes de positivos, quedando patente su complementariedad. Por lo tanto, las técnicas cutáneas detectaron un menor número de animales con infección mixta, debido al descenso en la sensibilidad causado por la paratuberculosis. Por el contrario, la técnica del IFN- γ se vio levemente afectada.

En otro estudio realizado por Buendía y col. (2013), se evaluó la capacidad de la intradermo-reacción comparada, del test del IFN- γ y del ELISA basado en el antígeno MPB-70, para diagnosticar la tuberculosis en cabras de raza Murciano-Granadina. Se detectó durante el estudio en un 27,7% de las cabras infectadas por *M. caprae* una doble infección con *Map*, al ser positivas al test diagnóstico de paratuberculosis (Parachek®2, Prionics), basado en la detección de anticuerpos contra *Map*). El análisis de los resultados de las pruebas diagnósticas en este grupo de animales con infección mixta, mostró un aumento significativo de los falsos negativos a la prueba del IFN- γ , ya que el 40%

de los falsos negativos correspondían a este grupo, en contraste con el porcentaje total de paratuberculosis en animales con tuberculosis (27,7%). Por lo tanto, este estudio demostró una asociación significativa entre la presencia de falsos negativos en la prueba del IFN- γ y el diagnóstico serológico de la infección por *Map*. Esta interferencia podría estar relacionada con la producción de citoquinas antiinflamatorias inducida por la infección de *Map* (Lybeck y cols., 2013). Además, debido a la alta especificidad pero baja sensibilidad de la detección serológica de la paratuberculosis (Collins y cols., 2005), es probable que el número de animales infectados por *Map* haya sido subestimado, y que la influencia de las infecciones mixtas sobre el diagnóstico de la tuberculosis sea mayor de la detectada. Por último, se demostró que el ELISA basado en el antígeno MPB-70 combinado con la técnica cutánea, tenía mayor sensibilidad que la técnica del IFN- γ combinada con la misma técnica cutánea (un 11% más), teniendo el ELISA una mayor sensibilidad en animales con lesiones múltiples (89,4% de sensibilidad) y una menor sensibilidad en casos con lesiones primarias (50,8%). Además, esta prueba evita la interferencia de *Map* en el diagnóstico de la tuberculosis, ya que se basa en antígenos concretos, evitando reacciones cruzadas. El uso del ELISA se ve también favorecido por su bajo coste y simplicidad, factores de gran importancia para su aplicación en el campo de la sanidad caprina.

Por todo ello, y debido al efecto de la paratuberculosis sobre la sensibilidad de las técnicas diagnósticas, es de vital importancia tener en consideración el estado sanitario del rebaño frente a la paratuberculosis, de cara a la aplicación e interpretación de las pruebas durante los saneamientos de tuberculosis (Álvarez, 2008).

Teniendo en cuenta los estudios anteriores, se puede concluir que sería recomendable para la realización de los saneamientos de tuberculosis, en zonas con presencia de paratuberculosis, evitar la prueba de la intradermo-tuberculiniza-

ción comparada, cuya sensibilidad se ve significativamente afectada por la paratuberculosis. Ésta se sustituiría por la intradermo-tuberculinización simple combinada con el IFN- γ , utilizando la prueba del ELISA basado en el antígeno MPB-70 como complementaria, realizándola en los casos de positividad a la intradermorreacción simple y negatividad al IFN- γ , evitando así los falsos negativos al IFN- γ debidos a la paratuberculosis (Buendía y cols., 2013), mejorando de forma importante la sensibilidad en el diagnóstico de la tuberculosis y favoreciendo su erradicación.

Además de todas estas técnicas, no puede ser olvidada la importancia del diagnóstico postmortem en el matadero, donde es vital una exhaustiva vigilancia por el veterinario inspector, para así detectar posibles casos no diagnosticados y notificar su hallazgo a la administración, lo que permitirá tomar las medidas oportunas en la explotación de origen.

Interferencia de la vacuna contra la paratuberculosis

Se han realizado diversos estudios sobre las interferencias de la vacunación de paratuberculosis con el diagnóstico de tuberculosis. Tanto las vacunas vivas atenuadas como las inactivadas inducen respuestas inmunes similares a la producida por la infección natural, lo que dificulta su diferenciación (Chartier y cols., 2011).

Storset y col. (2005) comprobaron que los animales de rebaños con paratuberculosis mostraban respuestas mayores al IFN- γ que los animales de rebaños vacunados sin paratuberculosis. En ambos grupos, la respuesta estaba correlacionada con la edad, detectando mayor respuesta en los animales jóvenes. Algunos de los animales vacunados en los rebaños sin paratuberculosis mostraban respuesta al IFN- γ durante varios años, lo que demostró una interferencia de larga duración con las técnicas diagnósticas en cabras vacunadas. La baja respuesta de cabras no vacunadas podría hacer útil la prueba

del IFN- γ para monitorizar el estatus respecto a la paratuberculosis en los rebaños no vacunados.

Chartier y col. (2011) concluyeron que el uso de las vacunas inactivadas de paratuberculosis, en las cabras menores de un mes, en un rebaño libre de tuberculosis, no provocaba falsos positivos en la técnica de intradermo-tuberculinización comparada cuando se realizaba en los animales mayores de 20 meses de edad.

Por último, Pérez de Val y col. (2012) comprobaron que al utilizar vacuna con complejos específicos de antígenos de *M. tuberculosis* DIVA (permite la diferenciación de animales infectados y vacunados) se elimina la interferencia de la vacunación contra la paratuberculosis con el diagnóstico de la tuberculosis. Además, se observó un efecto protector parcial, asociado a la vacunación de paratuberculosis en algunos animales, que consistía en la limitación de la extensión de las lesiones tuberculosas al complejo primario, al dificultar la diseminación extra-pulmonar de la infección.

CONCLUSIONES

En el diagnóstico de la tuberculosis en el ganado caprino, es fundamental tener en cuenta el estado sanitario del rebaño respecto a la paratuberculosis, ya que condiciona la correcta interpretación de las pruebas diagnósticas.

Es recomendable, en las zonas con presencia de paratuberculosis, realizar el diagnóstico de la tuberculosis mediante la combinación de la técnica de la intradermo-tuberculinización simple y el IFN- γ , utilizando como prueba complementaria el ELISA basado en el antígeno MPB-70 en casos de positividad a la prueba cutánea y negatividad al IFN- γ , ya que mejoraría considerablemente el porcentaje de casos diagnosticados. Su implantación en el ganado caprino es necesaria para la erradicación de la tuberculosis caprina, en sustitución de la intradermo-tuberculinización comparada, ya que ésta se ve afectada enormemente por la presencia de paratuberculosis en la explotación.

La interferencia de las vacunas actuales de paratuberculosis con la intradermo-tuberculinización y el período de espera al que obligan, hacen recomendable el uso de vacunas compuestas de antígenos concretos del complejo *M. tuberculosis* (DIVA), ya que éstas no interfieren con el diagnóstico de la tuberculosis.

AGRADECIMIENTOS

Quisiera expresar mi sincero agradecimiento al profesor Dr. José Antonio Navarro Cámara, por la cesión de las imágenes presentadas, y por sus inestimables consejos en la redacción del manuscrito.

BIBLIOGRAFÍA

- ÁLVAREZ SÁNCHEZ, J. 2008. Complejo *Mycobacterium avium*: Diagnóstico, caracterización molecular e interferencia con el diagnóstico de la tuberculosis. Tesis doctoral. Universidad Complutense de Madrid.
- ÁLVAREZ J., DE JUAN, L., BEZOS, J., ROMERO, B., SÁEZ, J. L., REVIRIEGO-GORDEJO, F. J., BRIONES, V., MORENO, M.A., MATEOS, A., DOMÍNGUEZ, L., ARANAZ, A. 2008. Interference of paratuberculosis with the diagnosis of tuberculosis in a goat flock with a natural mixed infection. *Vet. Microbiol.* 128: 72-80.
- AYELE, W. Y., BARTOS, M., SVASTOVA, P., PAVLIK, I. (2004). Distribution of *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis* in organs of naturally infected bull calves and breeding bulls. *Vet. Microbiol.* 103: 209-217.
- BASSEY, E.O., COLLINS, M.T. 1997. Study of T-lymphocyte subsets of healthy and *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis* infected cattle. *Infect. Immun.* 65: 4869-4872.
- BEARD, P.M., HENDERSON, D., DANIELS, M.J., PIRIE, A., BUXTON, D., GREIG, A., HUTCHINGS, M.R., MCHENDRICK, I., RHIND, S., STEVENSON, K., SHARP, J.M. 1999. Evidence of paratuberculosis in fox (*Vulpes vulpes*) and stoat (*Mustela erminea*). *Vet. Rec.* 145: 612-613.
- BERGHAUS, R. D., FARVER, T. B., ANDERSON, R. J., JARAVATA, C. C., GARDNER, I. A. 2006. Environmental sampling for detection of *Mycobacterium avium ssp. paratuberculosis* on large California dairies. *J.Dairy Sci.* 89: 963-970.
- BEZOS J., DE JUAN L., ROMERO B., ALVAREZ J., MAZZUCHELLI F., MATEOS A., DOMÍNGUEZ L., ARANAZ A. 2010. Experimental infection with *Mycobacterium caprae* in goats and evaluation of immunological status in tuberculosis and paratuberculosis co-infected animals. *Vet. Immunol. and Immunopathol.* 133(2-4): 269-75.
- BEZOS, J., ÁLVAREZ, J., ROMERO, B., ARANAZ, A., DE JUAN, L. 2012. Tuberculosis in goats: assessment of current *in vivo* cell-mediated and antibody-based diagnostic assays. *Vet. J.* 191(2): 161-5.
- BILLMAN-JACOB, H., CARRIGAN, M., COCKRAM, F., CORNER, L. A., GILL, I. J., HILL, J. F., JESSEP, T., MILNER, A. R., WOOD, P. R. 1992. A comparison of the interferon gamma assay with the absorbed ELISA for the diagnosis of Johne's disease in cattle. *Aust.Vet.J.* 69: 25-28.
- BROTHERSTON, J.B., GILMOUR, N.J.L., MC SAMUEL, J. 1961. Quantitative studies of *Mycobacterium johnei* in the tissues of sheep. *J. Comp. Pathol.* 71: 286-299.
- BRUMBAUGH, G. W., EDWARDS, J. F., ROUSSEL, A. J., JR., THOMSON, T. D. 2000. Effect of monensin sodium on histological lesions of naturally occurring bovine paratuberculosis. *J.Comp Pathol.* 123: 22-28.
- BUENDÍA, A., NAVARRO, J. A., SALINAS, J., MCNAIR, J., DE JUAN, L., ORTEGA, N., CÁMARA, P., TORREBLANCA, P., SÁNCHEZ, J. 2013. Ante-mortem diagnosis of caprine tuberculosis in persistently

- infected herds: Influence of lesion type on the sensitivity of diagnostic tests. *Res. in Vet. Sci.* 95: 1107-1113.
- BURRELLS, C., CLARKE, C.J., COLSTON, A., KAY, J.M., PORTER, J., LITTLE, D., SHARP, J.M. 1998. A study of immunological responses of sheep clinically-affected with paratuberculosis (Johne's disease). The relationship of blood, mesenteric lymph node and intestinal lymphocyte responses to gross and microscopic pathology. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 66: 343-358.
- CHARTIER, C., MERCIER, P., PELLET, M. P., VIALARD, J. 2011. Effect of an inactivated paratuberculosis vaccine on the intradermal testing of goats for tuberculosis. *Vet. J.* 10: 1016.
- CHIODINI, R.J., VAN KRUININGEN, H.J., MERKAL, R.S. 1984. Ruminant paratuberculosis (Johne's disease): the current status and future prospects. *Cornell Vet.* 74: 218-262.
- CLARKE, C.J. 1997. The pathology and pathogenesis of paratuberculosis in ruminants and other species. *J. Comp. Pathol.* 116: 217-261.
- COLLINS, M.T., WELLS, S. J., PETRINI, K.R., COLLINS, J.E., SCHULTZ, R.D., WHITLOCK, R. H. 2005. Evaluation of five antibody detection tests for diagnosis of bovine paratuberculosis. *Clin. and Diagn. Lab. Immunol.* 12: 685-692.
- CORPA, J.M., GARRIDO, J., GARCÍA MARRÍN, J.F., PÉREZ, V. 2000. Classification of lesions observed in natural cases of paratuberculosis in goats. *J. Comp. Pathol* 122: 255-265.
- COUSSENS, P. M. 2004. Model for immune responses to *Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis* in cattle. *Infect. Immun.* 72: 3089-3096.
- DE JUAN FERRÉ, L. 2005. Paratuberculosis caprina: aportaciones a su diagnóstico, epidemiología molecular y control. Tesis doctoral. Universidad Complutense de Madrid.
- DIMARELLI, Z., XENOS, G., ARGYROUDIS, S., PAPAPOPOULOS, O. 1991. A survey of ovine and caprine paratuberculosis in the Thessaloniki area, Greece. *Paratuberculosis Newsletter* 3: 8-9.
- ELLNER, J.J., WALLIS, R.S. 1989. Immunologic aspects of mycobacterial infections. *Rev. Infect. Dis.* 11: 455-459.
- EMERY, D. L., WHITTINGTON, R. J. 2004. An evaluation of mycophagy therapy, chemotherapy and vaccination for control of *Mycobacterium avium subsp. Paratuberculosis* infection. *Vet. Microbiol.* 104: 143-155.
- GARRIDO, J. M., MOLINA, E., GEIJO, M. V., PLAZAOLA, J. M., SEVILLA, I., JUSTE, R. A. 2007. Preliminary evaluation of a field trial on the use of vaccination in dairy cattle farms with paratuberculosis. *Proc. 9th. Int. Coll. Paratub.* 9.
- GILMOUR, N.J. 1976. The pathogenesis, diagnosis and control of Johne's disease. *Vet. Rec.* 99: 433-434.
- GREIG, A., STEVENSON, K., HENDERSON, D., PEREZ, V., HUGHES, V., PAVLIK, I., HINES II, M.E., MCKENDRICK, I., SHARP, J.M. 1999. Epidemiological study of paratuberculosis in wild rabbits in Scotland. *J. Clin. Microbiol.* 37: 1746-1751.
- GUMBER, S., EAMENS, G., WHITTINGTON, R. J. (2006). Evaluation of a Pourquier ELISA kit in relation to agar gel immunodiffusion (AGID) test for assessment of the humoral immune response in sheep and goats with and without *Mycobacterium paratuberculosis* infection. *Vet. Microbiol.* 115: 91-101.
- GWOZDZ, J. M., THOMPSON, K. G., MURRAY, A., REICHEL, M. P., MANKTELOW, B. W., WEST, D. M. 2000. Comparison of three serological tests and an interferon-gamma assay for the diagnosis of paratuberculosis in experimentally infected sheep. *Aust.Vet. J.* 78: 779-783.
- HARRIS, N. B., BARLETTA, R. G. 2001. *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis*

- in Veterinary Medicine. Clin. Microbiol. Rev. 14: 489-512.
- HINES II, M.E., KREEGER, J.M., HERRON, A.J. 1995. Mycobacterial infections of animals: pathology and pathogenesis. Lab. Anim. Sci. 45: 334-351.
- JUSTE, R.A., PÉREZ, V. 2011. Control of paratuberculosis in sheep and goats. Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract. 27 (1): 127-38.
- KALIS, C. H., HESSELINK, J. W., BARKE-MA, H. W., COLLINS, M. T. 2001. Use of long-term vaccination with a killed vaccine to prevent fecal shedding of *Mycobacterium avium subsp paratuberculosis* in dairy herds. Am. J. Vet. Res. 62: 270-274.
- KENNEDY, D. J., BENEDICTUS, G. 2001. Control of *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis* infection in agricultural species. Rev. Sci. Tech. 20: 151-179.
- KOHLER, H., GYRA, H., ZIMMER, K., DRAGER, K.G., BURKERT, B., LEMSER, B., HAUSLEITHNER, D., CUBLER, K., KLA-WONN, W., HESS, R.G. 2001. Immune reactions in cattle after immunization with a *Mycobacterium paratuberculosis* vaccine and implications for the diagnosis of *M. paratuberculosis* and *M. bovis* infections. J. Vet. Med. Ser. B 48: 185-195.
- LEPPER, A.W., WILKS, C.R., KOTIW, M., WHITEHEAD, J.T., SWART, K.S. 1989. Sequential bacteriological observations in relation to cell-mediated and humoral antibody responses of cattle infected with *Mycobacterium paratuberculosis* and maintained on normal or high iron intake. Aust. Vet. J. 66: 50-55.
- LYBECK, K. R., LOVOLL, M., JOHANSEN, T.B., OLSE, L., STORSET, A. K., VALHEIM, M. 2013. Intestinal structures, fibrous adhesion and high local interleukin-10 levels in goats infected naturally with *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis*. J. Comp. Pathol 148: 157-172.
- MCKENNA, S. L., KEEFE, G. P., TIWARI, A., VANLEEUEWEN, J., BARKEMA, H. W. 2006. Johne's disease in Canada part II: disease impacts, risk factors, and control programs for dairy producers. Can. Vet. J. 47: 1089-1099.
- MERKAL, R.S. 1984. Paratuberculosis. En: The Mycobacteria. A Sourcebook. Part B. Kubica, G.P., Wayne, L.G. Ed. Marcel Dekker, Inc. 1237-1249.
- MIRALLES, A., PRIETO, P., OTAL, J., LEÓN-VIZCAINO, L., CUBERO, M.J. 2014. Emergencia de un brote de paratuberculosis (*Mycobacterium avium subespecie paratuberculosis*) en cabra montesa (*Capra pyrenaica hispánica*) del Parque Natural Sierra de Cazorla, Segura y Las Villas. Proc. 21th. Int. Congress of Mediterranean Federation of Health and Ruminant Production. Cartagena (Murcia).
- MOLINA, A., MORERA, L., LLANES, D. 1991. Enzyme-linked immunosorbent assay for detection of antibodies against *Mycobacterium paratuberculosis* in goats. Am. J. Vet. Res. 52: 863-868.
- MOMOTANI, E., WHIPPLE, D.L., THIERMANN, A.B., CHEVILLE, N.F. 1988. Role of M cells and macrophages in the entrance of *Mycobacterium paratuberculosis* into domes of ileal Peyer's patches in calves. Vet. Pathol. 25: 131-137.
- MUSKENS, J., VAN ZIJDERVELD, F., EGER, A., BAKKER, D. 2002. Evaluation of the long-term immune response in cattle after vaccination against paratuberculosis in two Dutch dairy herds. Vet. Microbiol. 86: 269-278.
- NIELSEN, S. S., TOFT, N. 2007a. Review of prevalences of paratuberculosis in farmed animals in Europe. Proc. 9th. Int. Coll. Paratub. 9.
- NIELSEN, S. S., TOFT, N. 2007b. Assessment of management related risk factors for paratuberculosis in Danish dairy herds using Bayesian mixture models. Prev. Vet. Med. 81: 306-317.

- PÉREZ, V., CORPA, J.M., GARCÍA MARÍN, J.F. 2000. El cuadro clínico y lesional de la paratuberculosis bovina. *Bovis* 93: 39-47.
- PÉREZ DE VAL, B., NOFRARÍAS, M., LÓPEZ-SORIA, S., GARRIDO, J. M., VORDERMEIER, H. M., VILLARREAL-RAMOS, B. MARTÍN, M., PUENTES, E., JUSTE, R. A., DOMINGO, M. 2012. Effects of vaccination against paratuberculosis on tuberculosis in goats: diagnostic interferences and cross-protection. *BMC Vet. Res.* 8: 191.
- RAIZMAN, E. A., WELLS, S. J., GODDEN, S. M., BEY, R. F., OAKES, M. J., BENTLEY, D. C., OLSEN, K. E. 2004. The distribution of *Mycobacterium avium ssp. Paratuberculosis* in the environment surrounding Minnesota dairy farms. *J. Dairy Sci.* 87: 2959-2966.
- SAUNDERS, B.M., COOPER, A.M. 2000. Restraining mycobacteria: role of granulomas in mycobacterial infections. *Immunol. Cell Biol.* 78: 334-341.
- STABEL, J. R. 1996. Production of gamma-interferon by peripheral blood mononuclear cells: an important diagnostic tool for detection of subclinical paratuberculosis. *J. Vet. Diagn. Invest* 8: 345-350.
- STEHMAN, S.M. 1996. Paratuberculosis in small ruminants, deer, and South American camelids. *Vet. Clin.North Am. Food Anim. Pract.* 12: 441-455.
- STORSET, A. K., BERG, I., DJONNE, B. 2005. Evaluation of the gamma interferon test for diagnosis of paratuberculosis in goats. *Vet. Immunol. and Immunopathol.* 107 (1-2): 87-94.
- SWEENEY, R. W., WHITLOCK, R. H., ROSENBERGER, A. E. 1992. *Mycobacterium paratuberculosis* isolated from fetuses of infected cows not manifesting signs of the disease. *Am. J. Vet. Res.* 53: 477-480.
- THORESEN, O.F., FALK, K., EVENSEN, O. 1994. Comparison of immunohistochemistry, acid-fast staining, and cultivation for detection of *Mycobacterium paratuberculosis* in goats. *J. Vet. Diagn. Invest.* 6: 195-199.
- TIWARI, A., VANLEEUEWEN, J. A., MCKENNA, S. L., KEEFE, G. P., BARKEMA, H. W. 2006. Johne's disease in Canada Part I: clinical symptoms, pathophysiology, diagnosis, and prevalence in dairy herds. *Can. Vet. J.* 47: 874-882.
- VALENTIN-WEIGAND, P., GOETHE, R. 1999. Pathogenesis of *Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis* infections in ruminants: still more questions than answers. *Microbes Infect.* 1: 1121-1127.
- WHITLOCK, R. H., BUERGELT, C. 1996. Preclinical and clinical manifestations of paratuberculosis (including pathology). *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.* 12: 345-356.
- WHITTINGTON, R. J., SERGEANT, E. S. 2001. Progress towards understanding the spread, detection and control of *Mycobacterium avium subsp paratuberculosis* in animal populations. *Aust. Vet. J.* 79: 267-278.
- WINDSOR, P. A. Y EPPLESTON, J. 2006. Lesions in sheep following administration of a vaccine of a Freund's complete adjuvant nature used in the control of ovine paratuberculosis. *N. Z. Vet. J.* 54: 237-241.