Realización de las pruebas de intradermotuberculinización e interferón-gamma

Programa Nacional de Erradicación de la tuberculosis bovina 2022-2030

visavet

Manuales de Procedimiento Sanitario

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE MADRID

GOBIERNO DE ESPAÑA

MINISTERIO DE AGRICULTURA, PESCA Y ALIMENTACIÓN

Manual de procedimiento para la realización de las pruebas de intradermotuberculinización e interferón-gamma

Editado por el Centro de Vigilancia Sanitaria Veterinaria (VISAVET). UCM. y la Subdirección General de Sanidad e Higiene Animal y Trazabilidad. MAPA.
Published by the VISAVET Health Surveillance Centre. U.C.M. and the Deputy General Directorate of Animal Health and Hygiene and Traceability. MAPA.

Todos los derechos reservados. No está permitido la reproducción total o parcial de este libro, ni su tratamiento informático, ni la transmisión de ninguna forma o por cualquier medio, ya sea electrónico, mecánico, por fotocopia, por registro u otros métodos, sin el permiso previo y por escrito de los titulares del copyright.
All rights reserved. No part of this work may be reproduced or transmitted in any form or by any means, electronic or mechanical, including photocopying, recording, or by any information storage or retrieval system, without the prior written permission of the copyright owner and the publisher.

© 2026 by Centro de Vigilancia Sanitaria Veterinaria (VISAVET). Universidad Complutense de Madrid.

Avenida Puerta de Hierro, s/n. 28040 Madrid
Tel.: (+34) 913 943 975
sic@visavet.ucm.es
visavet.es

© 2026 by Laboratorio Central de Sanidad Animal. Subdirección General de Laboratorios de Sanidad Animal y Vegetal. Dirección General de Sanidad de la Producción Agroalimentaria y Bienestar Animal. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación (MAPA).

Camino del Jau, s/n. 18320 Santa Fe (Granada)
Tel.: (+34) 958 440 400
clvgr@mapa.es
mapa.gob.es

© 2026 by Subdirección General de Sanidad e Higiene Animal y Trazabilidad. Dirección General de Sanidad de la Producción Agroalimentaria y Bienestar Animal. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación (MAPA).

Calle Almagro, 33 - 2ª planta. 28071 Madrid
Tel.: (+34) 913 478 297
sganimal@mapa.es
mapa.gob.es

Segunda edición: marzo 2026
Second edition: March 2026

Autores / Authors: Bezos J., Romero B., Ortega MJ., López AP., de Juan L., González S. y/and Collado MS.

Diseño y Maquetación / Design and Layout : Servicio de Informática y Comunicación. VISAVET-UCM
Fotografía de portada/ Cover photo: Sergio González Domínguez

Impreso en España / Printed in Spain

Índice

1. Ámbito de aplicación **4**

2. Pruebas diagnósticas oficiales **6**

3. Intradermotuberculinización **7**

Introducción, justificación y objetivos 7
Técnica de administración de la tuberculina 8
Interpretación de los resultados 10

4. Prueba de detección de interferón-gamma **12**

Introducción, justificación y objetivos 12
Descripción de la técnica 13
Realización del ensayo 14

1. Ámbito de aplicación

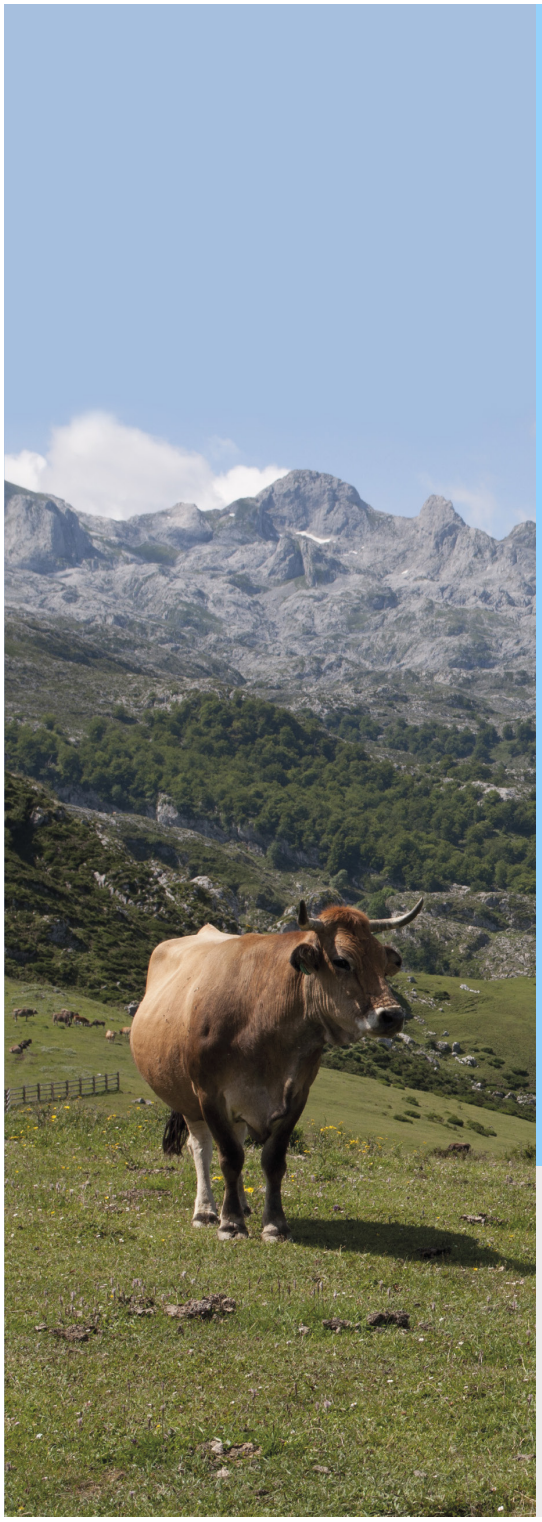
La tuberculosis bovina es una enfermedad de declaración obligatoria en España desde su inclusión en la Ley de Epizootias de 1952, sustituida como normativa básica por la Ley 8/2003, de sanidad animal. Su programa de lucha se desarrolló a nivel nacional por el Real Decreto 2611/1996, por el que se regulan los Programas Nacionales de Erradicación de Enfermedades de los Animales.

Actualmente, en el seno de la Unión Europea (UE), el Reglamento (UE) 2016/429 [1] ("Legislación sobre sanidad animal"), incluye en su Anexo II a la infección por el complejo *Mycobacterium tuberculosis* (CMT); tras su modificación por el Reglamento Delegado (UE) 2018/1629 [2], y a través del Reglamento de Ejecución (UE) 2018/1882 [3] contempla a la Infección por el CMT (*M. bovis, M. caprae* y *M. tuberculosis*) como enfermedad de categorías B+D+E en *Bison ssp., Bos ssp. y Bubalus ssp.*; como enfermedad de categorías D+E en *Artiodactyla* distintos de *Bison ssp., Bos ssp. y Bubalus ssp.*; y como enfermedad de categoría E en el resto de los mamíferos terrestres.

Las pruebas de diagnóstico oficial están reguladas a nivel de la UE por:

- el Reglamento Delegado (UE) 2020/689 [4] para la concesión y mantenimiento del estatus de libre de enfermedad para la infección por el CMT (*M. bovis*, *M. caprae* y *M. tuberculosis*),
- el Reglamento Delegado (UE) 2020/688 [5], para los movimientos intracomunitarios.

1. El Reglamento (UE) 2016/429 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 9 de marzo de 2016, relativo a las enfermedades transmisibles de los animales y por el que se modifican o derogan algunos actos en materia de sanidad animal.



VISAVET

Legislación

2. Reglamento Delegado (UE) 2018/1629 de la Comisión, de 25 de julio de 2018, que modifica la lista de enfermedades recogidas en el anexo II del Reglamento (UE) 2016/429 del Parlamento Europeo y del Consejo, relativo a las enfermedades transmisibles de los animales y por el que se modifican o derogan algunos actos en materia de sanidad animal.

3. Reglamento de Ejecución (UE) 2018/1882 de la Comisión, de 3 de diciembre de 2018, relativo a la aplicación de determinadas normas de prevención y control a categorías de enfermedades enumeradas en la lista y por el que se establece una lista de especies y grupos de especies que suponen un riesgo considerable para la propagación de dichas enfermedades de la lista.

4. Reglamento Delegado (UE) 2020/689 de la Comisión, de 17 de diciembre de 2019, por el que se completa el Reglamento (UE) 2016/429 del Parlamento Europeo y del Consejo en lo referente a las normas de vigilancia, los programas de erradicación y el estatus de libre de enfermedad con respecto a determinadas enfermedades de la lista y enfermedades emergentes.

5. Reglamento Delegado (UE) 2020/688 de la Comisión, de 17 de diciembre de 2019, por el que se completa el Reglamento (UE) 2016/429 del Parlamento Europeo y del Consejo en lo referente a los requisitos zoosanitarios para los desplazamientos dentro de la Unión de animales terrestres y de huevos para incubar.

+ info

mapa.gob.es
Laboratorio Central de Sanidad Animal (LCSA) Santa Fe (Granada)
Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación

visavet.es
Centro de Vigilancia Sanitaria Vererinaria (VISAVET)
Universidad Complutense Madrid

bovinetuberculosis.eu
European Union Reference Laboratory for bovine tuberculosis
European Commission

2. Pruebas diagnósticas oficiales

Tal y como se establece en la sección 2 del Anexo III del Reglamento Delegado (UE) 2020/689 para la concesión y mantenimiento del estatus de libre de enfermedad para la infección por el CMT, así como en la parte 2 del anexo I del Reglamento Delegado 2020/688, las pruebas permitidas a nivel europeo y aplicadas en España a través del Programa Nacional de Erradicación de la tuberculosis (PNETB), son las siguientes:

1. Intradermotuberculinización (IDTB):

a) IDTB simple
b) IDTB comparada

2. Prueba de detección de interferón-gamma (IFN-gamma).

Dichas pruebas, en cumplimiento del artículo 6 del Reglamento Delegado (UE) 2020/689, deben ser realizadas según las orientaciones (Procedimientos Normalizados de Trabajo) publicadas en la página web del Laboratorio de Referencia de la Unión Europea. (http://www.bovinetuberculosis.eu/databases/protocols.php).

3. Intradermotuberculinización (IDTB)

Introducción, justificación y objetivos

La intradermotuberculinización (IDTB) o prueba intradérmica de la tuberculina es una de las pruebas oficiales para la detección de la tuberculosis en bovinos. Consiste en medir la respuesta cutánea (aumento del grosor de piel resultante de una reacción de hipersensibilidad retardada) que aparece tras la inyección intradérmica de tuberculina (derivado proteico purificado – PPD). Puede realizarse de forma única, utilizando PPD bovina (IDTB simple), o de forma comparada, midiendo la diferencia en el aumento de grosor de piel entre la PPD bovina y la PPD aviar (IDTB comparada).

IDTB simple (IDTBs)

La IDTBs es la prueba a utilizar en el marco del Programa Nacional de Erradicación de la Tuberculosis Bovina 2022-2030, como técnica de rutina para la obtención y el mantenimiento posterior de la calificación de oficialmente libre (T3), salvo las excepciones contempladas en dicho programa.

IDTB comparada (IDTBc)

La IDTBc se utiliza excepcionalmente, salvo en zonas de baja prevalencia y oficialmente indemnes, pero siempre a criterio de la autoridad competente, como técnica para la obtención y el mantenimiento de la calificación de oficialmente libre (T3).

Técnica de administración de la tuberculina (PPD)

La IDTB se debe realizar en animales a partir de 6 semanas de edad. En cada actuación sanitaria se utilizará siempre el mismo tipo de IDTB (simple o comparada), como prueba de rebaño, en todos los animales de un mismo establecimiento.

En la aplicación de la prueba IDTB (material necesario, preparación del lugar de inoculación, mediciones de piel, inoculación de la PPD bovina o aviar e interpretación de las reacciones), además de lo indicado en este manual de procedimiento, se seguirán los principios considerados en el procedimiento SOP/001/EURL "*Intradermal Tuberculin Skin Test protocol for bovine animals*", del Laboratorio Europeo de Referencia para la Tuberculosis Bovina (*European Union Reference Laboratory for bovine tuberculosis*).

VISAVET

▲ Imagen del punto de inoculación de la PPD en la región cervical previamente rasurado para la realización de la prueba de intertuberculinización simple (arriba).

VISAVET

► Imagen de tuberculina bovina y aviar de campaña de erradicación de la tuberculosis bovina en España junto al sistema de inoculación intradérmica y cutímetro (derecha).

En base al RD 2611/1996 y la Ley 8/2003, las PPDs utilizadas deben ser contrastadas por el Laboratorio Nacional de Referencia de Santa Fe. Las PPDs deben cumplir las especificaciones que figuran en la normativa comunitaria y asegurar al menos una potencia de 2.000 UI/dosis.

La IDTBs/IDTBc se realizará inyectando PPD de forma intradérmica en la región cervical. Los puntos de inyección se situarán siempre en zonas con la piel íntegra, limpia y previamente rasurada.

El punto de inoculación estará situado entre el tercio medio y anterior de las tablas del cuello, ya que, según demuestran diversos trabajos científicos[1,2], la sensibilidad puede reducirse de forma significativa cuando no se realiza en dicha localización. La región cervical recomendada es más sensible y menos expuesta a suciedad que otras localizaciones, lo que facilita la lectura e interpretación.

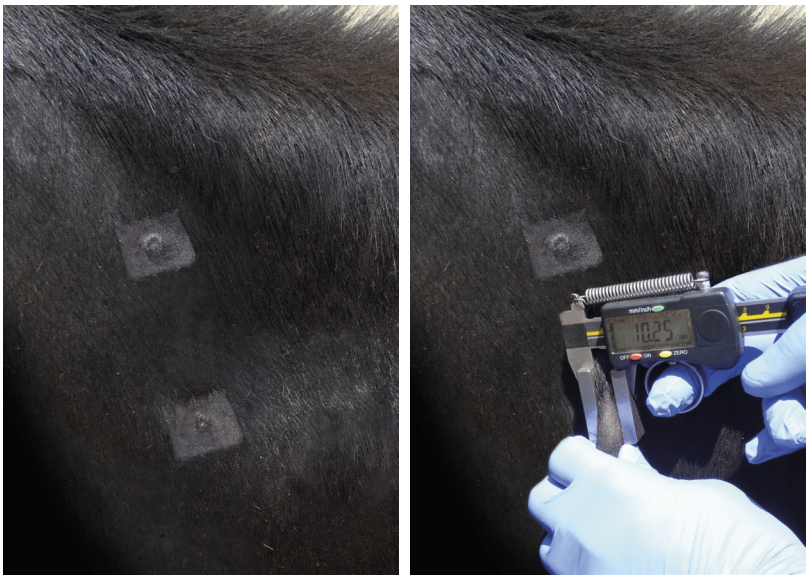
Así mismo, se prestará especial atención a las condiciones de conservación y uso de las tuberculinas, siguiendo las recomendaciones del fabricante, y descartando la utilización de cualquier vial de tuberculina que no haya sido manipulado o conservado correctamente.

En cada zona limpia y rasurada se tomará un pliegue de piel entre el índice y el pulgar, se medirá con un cutímetro homologado con muelle y se registrará el resultado. Es de especial importancia que los cutímetros mantengan una tensión adecuada para que el criterio de medida sea uniforme y fidedigno, por lo que se recomienda realizar un mantenimiento y verificación periódica del mismo.

A continuación, en el caso de la IDTB simple, se inyectará la dosis de PPD bovina en la región central del área rasurada siguiendo un método que garantice que aquella se administra intradérmicamente (consultar Protocolo de utilización e informe de valoración del uso de pistolas de inoculación intradérmica. MAPA). El volumen de inoculación deberá ser de 0,1 ml (no superior a 0,2 ml). Para confirmar si la inyección se ha efectuado correctamente, deberá palparse una hinchazón del tamaño de una lenteja. El grosor del pliegue de piel de cada punto de inyección se medirá de nuevo 72 horas (+/- 4 h) después de la inyección por el mismo veterinario y con el mismo cutímetro, registrando de nuevo el resultado.

La **IDTB comparada** debe ser realizada igualmente mediante inoculación intradérmica de PPD bovina y PPD aviar en las tablas del cuello. La parte anterior-media es, como se ha comentado, la localización más adecuada para la realización de la prueba, por lo tanto, los puntos de inoculación se situarán en una línea imaginaria entre ambas, siempre en zonas con la piel íntegra, limpia y rasurada. En caso de inocularse en la misma tabla del cuello que la PPD bovina, el punto de inoculación de la PPD aviar debe situarse a unos 10 cm por debajo de la línea superior del cuello y el de la PPD bovina a unos 12 cm de la anterior, en una línea más o menos paralela a la línea del hombro, o en diferentes lados del cuello.

1. *Veterinary Medicine*, M. Radostits *et al.* 9th Ed. 2000.
2. *Effect of the inoculation site of bovine purified protein derivative (PPD) on the skin fold thickness increase in cattle from officially tuberculosis free and tuberculosis- infected herds*, C. Casal *et al. Preventive Veterinary Medicine*, 2015.



► Imágenes de las zonas de inoculación intradérmica en la prueba de intradermotuberculinización de comparación y medida del espesor del pliegue de la piel.

VISAVET

En animales jóvenes (mayores de 6 semanas) en los que todavía no sea posible separar suficientemente los puntos de inoculación se aplicará obligatoriamente cada PPD en lados diferentes de las tablas del cuello (la PPD bovina en el derecho y la aviar en el izquierdo), y en sitios idénticos entre el tercio anterior y medio del cuello.

Los sistemas empleados para la inoculación intradérmica de cada PPD (bovina o aviar) han de estar perfectamente identificados para evitar la contaminación de ambos antígenos entre sí.

En cualquiera de los casos (IDTBs o IDTBc), si se comprueba que la inoculación no ha sido intradérmica (no hay "lenteja" palpable), se podrá repetir la inoculación en la misma región una segunda vez. En caso de fallar esta segunda, habrá que hacer un nuevo pelado e inoculación en otra zona distante pero dentro del área recomendada.

El espesor del pliegue de piel en cada punto de inoculación volverá a ser medido y anotado a las 72 horas (+/- 4 h) de la inoculación, por el mismo técnico y con el mismo cutímetro utilizado el primer día.

VISAVET

◄ Sistema de inoculación intradérmica sin aguja, evaluado y aceptado para su utilización en la administración de tuberculinas.

Interpretación de los resultados

En base a lo establecido en el Programa Nacional de Erradicación de la Tuberculosis bovina, se establecen tres protocolos de interpretación de los resultados:

- Interpretación estándar.
- Interpretación severa.
- Interpretación extra-severa.

Interpretación estándar de la IDTBs

Se prestará especial atención a que, además de la intensidad de la reacción en los puntos de inoculación, para la interpretación de los resultados es esencial tener en cuenta las características de la reacción local (signos clínicos) y el estado sanitario del rebaño.

La interpretación de las reacciones a la PPD bovina está basada tanto en la observación de signos clínicos como en las diferencias de mediciones de grosor de piel registradas entre las lecturas de los dos días (0 - 72 h).

IDTBs

• **Reacción negativa:** aumento máximo de 2 mm en el espesor del pliegue de piel y ausencia de signos clínicos tales como edema difuso, exudado, necrosis, dolor o reacción inflamatoria de los ganglios o canales linfáticos regionales.

IDTBs ?

• **Reacción dudosa:** aumento del espesor del pliegue de piel superior a 2 mm e inferior a 4 mm junto con ausencia de signos clínicos. Los animales cuyo resultado sea dudoso en esta interpretación estándar (no severa o extra-severa) serán debidamente aislados y se someterán a una nueva IDTB pasado un plazo mínimo de 42 días. Los animales que en esta segunda prueba no obtengan resultados negativos serán considerados positivos.

IDTBs +

• **Reacción positiva:** aumento en el espesor del pliegue de piel de 4 o más mm y/o presencia de signos clínicos.

► Imágenes de inoculación intradérmica, reacción posterior en el punto de inyección y medida del espesor del pliegue de la piel.

VISAVET

Interpretación estándar de la IDTBc

Una vez obtenidas las lecturas a la reacción de la PPD bovina y aviar la interpretación de la IDTBc será la siguiente:

IDTBc −

• **Prueba negativa:** reacción negativa a la PPD bovina o reacción positiva o dudosa a la PPD bovina pero igual o inferior a una reacción positiva o dudosa a la PPD aviar, con ausencia de signos clínicos locales en el lugar de inoculación de la PPD bovina.

IDTBc ?

• **Prueba dudosa:** reacción a la PPD bovina positiva o dudosa y superior en hasta 4 mm a la reacción a la PPD aviar, con ausencia de signos clínicos a la PPD bovina. Los animales que obtengan un resultado dudoso en la IDTBc se someterán a otra prueba trascurridos un mínimo de 42 días. Los animales que no sean negativos a esta segunda prueba se considerarán positivos.

IDTBc +

• **Prueba positiva:** reacción a la PPD bovina superior en más de 4 mm a la reacción a la PPD aviar y/o presencia de signos clínicos a la tuberculina bovina.

En el caso de aplicarse la interpretación **severa**, cualquier resultado no negativo será considerado positivo si existe al menos un positivo en la explotación (con la excepción de las T3H que será a criterio de la autoridad competente).

En el caso de la interpretación **extra-severa**, cualquier resultado no negativo será considerado positivo independientemente del resto de resultados en la explotación.

4. Prueba de detección de interferón-gamma

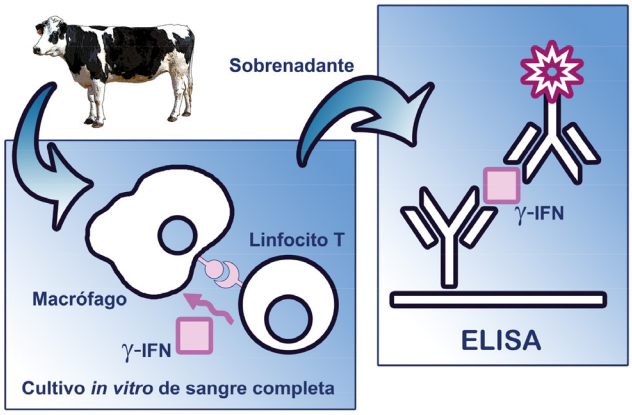
Introducción, justificación y objetivos

La prueba de detección del interferón-gamma (IFN-gamma) mide la respuesta inmunitaria de los linfocitos de animales infectados por micobacterias del CMT, cuando dichas células son sensibilizadas pora la tuberculina PPD o antígenos específicos de las micobacterias, produciendo la citoquina IFN-gamma.

La prueba de detección de interferón-gamma (IFN-gamma) se contempla en el ámbito de la normativa comunitaria y nacional. En el PNETB se establecen dos protocolos:

- **IFN-gamma NRL**, (según la nomenclatura del PNETB 2022-30): como prueba complementaria junto a la IDTB simple (uso en paralelo) en establecimientos infectados a los que se les ha retirado la calificación de estatus libre de infección por CMT.

- **IFN-gamma EURLAB**, (según la nomenclatura del PNETB 2022-30) como prueba de rutina



VISAVET

▲ Esquema del fundamento de la prueba del IFN-gamma

para la obtención y mantenimiento de la calificación (estatus libre de infección por CMT) de los establecimientos y como prueba de movimiento, si la autoridad competente así lo autoriza. 2016/429).

Estrictamente ambos protocolos, el IFN-gamma NRL y el EURLAB, son idénticos, diferenciándose únicamente en el punto de corte/criterio de interpretación de la prueba empleado para determinar si un animal es positivo, ya que este viene determinado por el contexto de uso.

El IFN-gamma NRL pretende maximizar la detección del número de animales infectados incrementando la sensibilidad diagnóstica.

El protocolo de IFN-gamma EURLAB se contempla para su uso en explotaciones libres de tuberculosis estableciéndose un criterio diferente que priorice una mayor especificidad de la técnica.

Para la realización de la prueba, además de lo indicado en este manual de procedimiento, se seguirán los principios considerados en el procedimiento SOP/004/EURL o SOP/006/EURL, "*Diagnosis of Tuberculosis infection in bovine animals using the in vitro gamma-interferon detection assay*", del Laboratorio Europeo de Referencia para la Tuberculosis Bovina (*European Union Reference Laboratory for bovine tuberculosis*).

Descripción de la técnica

Los animales infectados con micobacterias del CMT poseen linfocitos circulantes sensibilizados a diferentes antígenos de dichas micobacterias. Estos linfocitos presentes en la sangre son capaces de responder in vitro cuando se estimulan frente a estos antígenos, liberando en su respuesta IFN-gamma que puede ser detectado mediante ELISA. Los linfocitos de animales no infectados no producirán IFN-gamma específico.

Esta técnica debe utilizarse en animales a partir de los 6 meses de edad en los que no se haya aplicado la IDTB en los últimos 60 días.

Las muestras de sangre se tomarán antes de inocular las PPDs para la IDTB, (en el caso de emplear ambas pruebas en paralelo según el Programa Nacional de Erradicación) y han de venir identificadas individualmente. Las muestras, además, deben procesarse en el laboratorio encargado de realizar el análisis **dentro de las 8 horas posteriores** a la recolección de la muestra.

Como muestra se requiere normalmente un volumen mínimo de 5 ml de sangre recogida en tubos con anticoagulante **heparina de litio**, mantenida **a temperatura ambiente** (18-25 ºC, evitando temperaturas extremas). La extracción y el manejo de la sangre deben realizarse cuidadosamente, ya que en este ensayo se valora la capacidad de respuesta de los linfocitos tras su estimulación con PPD, por lo que estas células deben estar perfectamente viables durante el ensayo. Cualquier circunstancia que afecte a su viabilidad (recogida, transporte o conservación inadecuada) afectarán al resultado

VISAVET

▲ Muestra de sangre en tubo de 10 ml. con heparina para la realización de la prueba de IFN-gamma.

del ensayo (por ejemplo, la utilización de tubos de recolección caducados, utilización de anticoagulantes distintos a la heparina de litio, la utilización de agujas con biseles defectuosos, refrigeración, tiempo entre la recogida y el análisis etc.). El grado de hemólisis puede ser representativo de una alteración de los linfocitos, pues los factores anteriormente mencionados afectan a la viabilidad de todas las células de la sangre.

Realización del ensayo

Distribución de las muestras

Las muestras de sangre deben homogeneizarse invirtiendo suavemente los tubos varias veces, antes de su distribución. Una muestra de cada animal se distribuye en tres alícuotas en placas de 24 ó 96 pocillos, utilizando preferiblemente material estéril. El volumen de sangre recomendado para las placas de 24 pocillos es 1,5 ml (mínimo 1 ml) y de 250 µl para las placas de 96 pocillos. En el caso de usar placas de 96 se recomienda hacer las muestras por duplicado debido al bajo volumen de plasma que se recupera posteriormente.

Este proceso debe realizarse en condiciones asépticas.

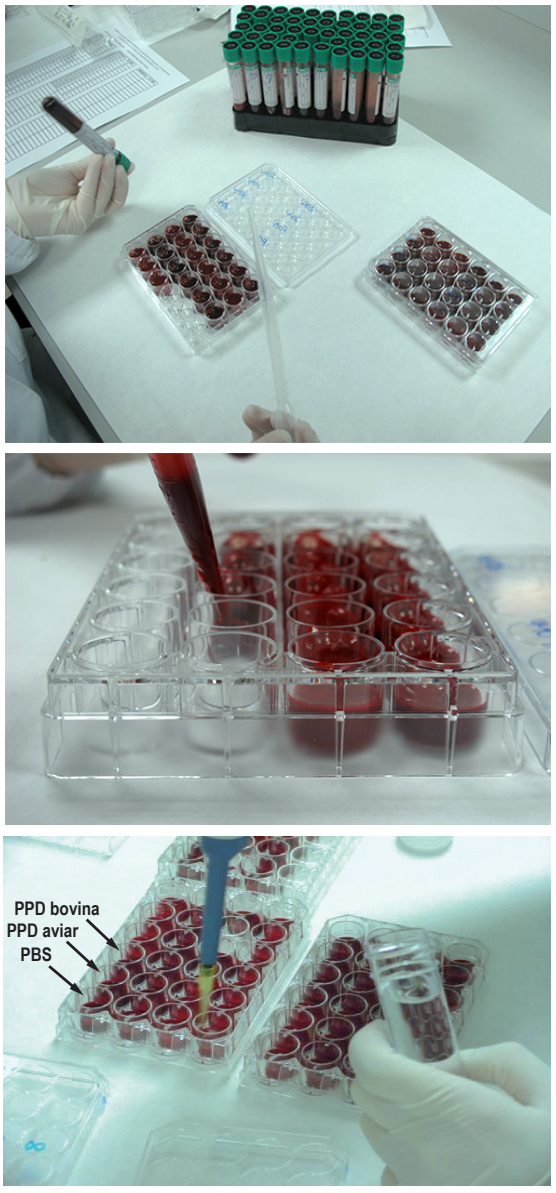
Adición del antígeno

Las muestras se estimulan con PBS, y con PPD aviar y bovina fabricadas por el mismo laboratorio que las utilizadas en Programa Nacional de Erradicación. La concentración de estas tuberculinas es de 1 mg/ml - PPD bovina y de 0,5 mg/ml –PPD aviar, siendo la concentración óptima para la estimulación sanguínea 20 µg PPD/ml de la muestra.

Por ejemplo, para una alícuota de 1,5 ml se añaden 100 µl de PBS (control sin antígeno) al primer pocillo de cada una de las muestras, 100 µl de PPD aviar (300 µg/ml) al segundo pocillo de cada una de las muestras y 100 µl de PPD bovina (300 µg/ml) al tercer pocillo de cada una de las muestras.

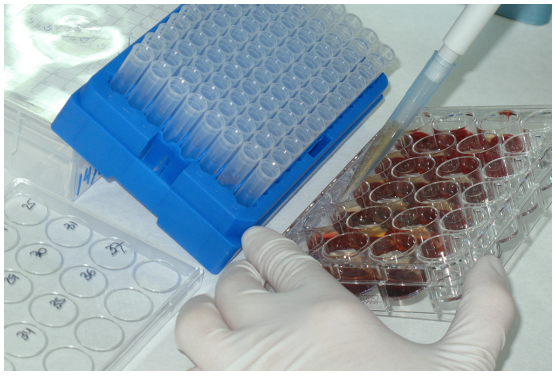
Para una alícuota de 250 µl se añaden 25 µl de PBS, PPD aviar (220 µg/ml) y PPD bovina (220 µg/ ml) a cada una de las muestras.

Este proceso debe realizarse en condiciones asépticas.



VISAVET

▲ Imágenes de la distribución de las muestras de sangre en placas de 24 pocillos y adicción de antígenos en la realización de la prueba de INF-gamma.



VISAVET

▲ Imágenes de la incubación, recogida de sobrenadante y kits ELISA en la realización de la prueba de INF-gamma.

Para comprobar la viabilidad de los linfocitos y la ausencia de tratamientos que puedan interferir con los resultados de la prueba se aconseja incluir una alícuota de sangre estimulada con un mitógeno (*pokeweed mitogen* o similar) ya que estimulan la producción inespecífica de IFN- gamma. La concentración óptima del mitógeno para la estimulación es de 2 µg mitógeno/ml de muestra. Los resultados deberán de informarse como no concluyentes cuando el resultado de IFN-gamma y el del mitógeno (cuando se use) sean ambos negativos.

Incubación de la sangre

Las muestras estimuladas se incuban durante 16-24 horas a 37±1 ºC, manteniendo la atmósfera húmeda para evitar su desecación.

Recogida y almacenamiento de plasma

Tras la incubación, las muestras se centrifugan a 500-770 g durante 10-15 minutos, para poder recoger el sobrenadante (plasma); es suficiente recoger 300 o 400 µl de cada pocillo.
El plasma puede recogerse con pipeta de plástico o puntas de pipeta de plástico esterilizada, con cuidado de no arrastrar la fracción celular.
Los plasmas pueden ensayarse directamente, conservarse a 5±3 ºC hasta 7 días o congelarse a <-15 ºC hasta su análisis. Las muestras deben descongelarse a 5±3 ºC, equilibrarse a temperatura ambiente y homogeneizarse antes de valorarlas en el ensayo ELISA para IFN-gamma. No deben calentarse a una temperatura superior a 37 ºC.

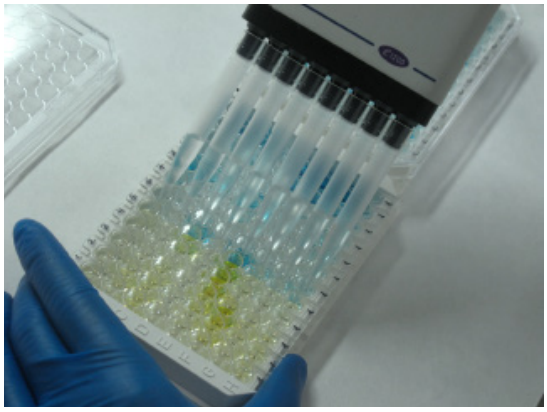
Realización del ELISA

Cada uno de los tres sobrenadantes se analiza mediante un kit de enzimoinmunoensayo (ELISA) para la detección in vitro de IFN-gamma. El kit es un ELISA de tipo sándwich (doble anticuerpo monoclonal) diseñado para detectar IFN-gamma biológicamente activo. Para la realización del ELISA y la validación de las placas se seguirán las recomendaciones del fabricante.

Resultados

Los resultados se obtienen según la respuesta de la muestra a la estimulación con PPD bovina teniendo en cuenta los valores de PBS y/o PPD aviar.

La interpretación de los resultados debe ser realizada por laboratorios autorizados siguiendo las instrucciones del fabricante (previamente registrados y autorizados por el MAPA) y acorde con los usos previstos en el Programa Nacional de Erradicación de la Tuberculosis Bovina (IFN-gamma NRL o IFN-gamma EURLAB). Siempre es necesario tener en cuenta el historial del establecimiento y la situación epidemiológica del mismo, por ejemplo, la presencia de otras infecciones por micobacterias no tuberculosas en la explotación.



VISAVET

▲ Imagen de la parada del ELISA en la realización de la prueba de INF-gamma.

Otros aspectos importantes

1. No congelar las sangres y mantenerlas a temperatura constante entre 18 y 25 °C (las variaciones de temperatura afectan a la viabilidad de los linfocitos).

2. Estimular en un plazo máximo de 8 horas tras la extracción de la sangre.

3. Utilización de tuberculina autorizada por el MAPA para el diagnóstico oficial mediante IDTB para la estimulación de las muestras.

4. Recomendaciones para el uso de las tuberculinas:

- Concentración tuberculina aviar: 0,5 mg/ml
- Concentración tuberculina bovina: 1 mg/ml
- Concentración de trabajo: 0,3 mg/ml.

Ejemplo: Para estimular 20 sangres se preparan 2 ml de cada PPD de la siguiente forma:

- 1,2 ml de PPD aviar + 0,8 ml de PBS
- 0,6 ml de PPD bovina + 1,4 ml de PBS
- Posteriormente se estimula 1,5 ml de sangre con 100 microlitros de cada PPD y PBS (la concentración final de PPD es 0,02 mg/ml).

5. Incubar a 37 °C. Se recomienda hacerlo en atmósfera de CO_2.

6. Cantidades discretas de eritrocitos tras la recogida del plasma no afectan al ensayo.

7. Las muestras estimuladas se podrán congelar a <-15 °C, pero se recomienda llegar a los -40 °C e incluso a los -80 °C.

8. Descongelar los plasmas a 4 °C y atemperar antes de su uso.

9. A la hora de procesar las muestras con el ensayo (ELISA), es muy recomendable emplear agitación.

10. Se recomienda un exhaustivo proceso de lavado en la realización del ELISA.

Centro de Vigilancia Sanitaria Veterinaria (VISAVET)
Universidad Complutense de Madrid

visavet.es

Laboratorio Central de Sanidad Animal
Subdirección General de Laboratorios de Sanidad Animal y Vegetal
Dirección General de Sanidad de la Producción Agroalimentaria y Bienestar Animal
Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación

Subdirección General de Sanidad e Higiene Animal y Trazabilidad
Dirección General de Sanidad de la Producción Agroalimentaria y Bienestar Animal
Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación

mapa.gob.es

Madrid 2026