

Realización de las pruebas de intradermotuberculinización e interferón-gamma

Programa Nacional de Erradicación de la tuberculosis bovina 2022-2030



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.

© 2023 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

© 2023 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

Primera edición: noviembre 2023
First edition: November 2023

Autores / Authors: Bezos J., Romero B., de Juan L., González S. y/and Sáez JL.

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. Intradertotuberculinización	7
Justificación y objetivos	7
Técnica de administración de la tuberculina	7
Interpretación de los resultados	10
4. Prueba de detección de interferón-gamma	12
Justificación y objetivos	12
Descripción de la técnica	13
Realización del ensayo	14



1. Ámbito de aplicación

La tuberculosis bovina ha sido una enfermedad de declaración obligatoria en España desde que estaba contemplada como tal 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) 2016/429¹ ("Legislación sobre sanidad animal"), incluye en su Anexo II a la infección por el complejo *Mycobacterium tuberculosis* (CMTB); tras su modificación por el Reglamento Delegado (UE) 2018/1629², y a través del Reglamento de Ejecución (UE) 2018/1882³ contempla a la Infección por el CMTB (*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 en el marco de los programas de erradicación están reguladas a nivel de la UE con el Reglamento Delegado (UE) 2020/689⁴ que en cuyo Anexo III, sección 2, establece los métodos de diagnóstico para la concesión y mantenimiento del estatus de libre de enfermedad para la infección por el CMTB (*M. bovis*, *M. caprae* y *M. tuberculosis*).

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.



VISA VET

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

Legislación

+ 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 Veterinaria (VISAVET)
Universidad Complutense Madrid

bovinetuberculosis.eu

European Union Reference Laboratory for bovine tuberculosis
European Commission



2. Pruebas diagnósticas oficiales

Las pruebas diagnósticas utilizadas establecidas en la sección 2 del Anexo III del Reglamento (UE) 2020/689 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>)

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



3. Intradermotuberculinización (IDTB)

Justificación y objetivos

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)

En la aplicación de la tuberculina o PPD bovina (derivado proteico purificado de *M. bovis*) e interpretación de las reacciones se seguirán los principios considerados en el

Realización de las pruebas de intradermotuberculinización e interferón-gamma

Programa Nacional de Erradicación de la tuberculosis bovina
2022-2030



Manuales de Procedimiento Sanitario

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE MADRID



GOBIERNO DE ESPAÑA

MINISTERIO DE AGRICULTURA, PESCA Y ALIMENTACIÓN



procedimiento SOP/001/EURL "Intradermal Tuberculin Skin Test protocol for bovine animals", del European Union Reference Laboratory for bovine tuberculosis.

Las PPDs utilizadas deben estar contrastadas por el Laboratorio Nacional de Referencia de Santa Fe, cuestión de especial importancia debido a que estudios recientes han puesto de manifiesto las posibles diferencias en cuanto a su potencia. Las PPDs deben cumplir las especificaciones que figuran en la normativa comunitaria y asegurar al menos una potencia de 20.000 UI/ml.

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

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).

► Imagen de tuberculina bovina y aviar de campaña de erradicación de la tuberculosis bovina en España junto a pistola de inyección intradérmica y cutímetro (derecha).



VISAVET

situado entre el tercio medio y anterior de las tablas del cuello, ya que, según demuestran diversos trabajos científicos^{1,2} la sensibilidad relativa de la piel a la PPD varía considerablemente según el lugar de inyección. La región cervical recomendada es más sensible y menos sucia que otras localizaciones utilizadas, lo que facilita obtener reacciones más marcadas.

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.

Realización de las pruebas de intradermotuberculinización e interferón-gamma

Programa Nacional de Erradicación de la tuberculosis bovina
2022-2030



Manuales de Procedimiento Sanitario

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE MADRID



GOBIERNO DE ESPAÑA

MINISTERIO DE AGRICULTURA, PESCA Y ALIMENTACIÓN

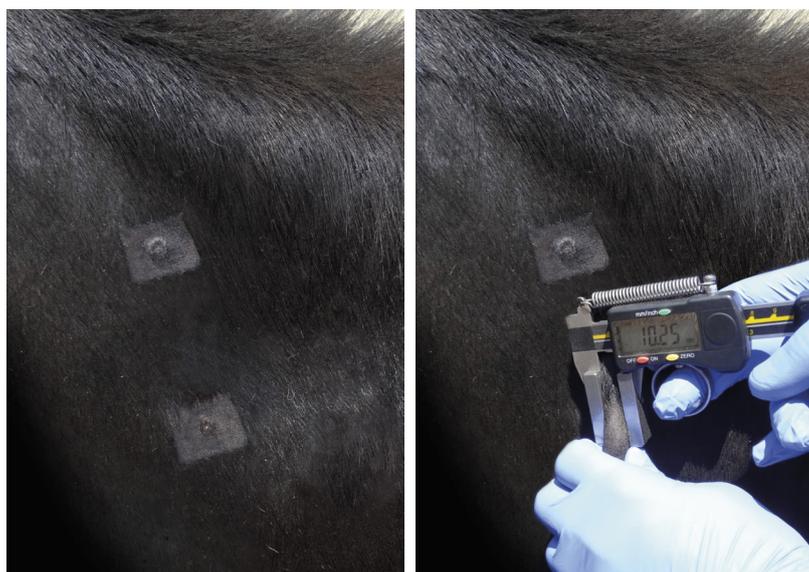
Así mismo, se prestará especial atención a las condiciones de conservación y uso de las tuberculinas, siguiendo las recomendaciones del fabricante.

En cada zona rasurada se tomará un pliegue de piel entre el índice y el pulgar, se medirá con un cúfímetro homologado y se registrará el resultado. Es de especial importancia que los cúfímetros mantengan una tensión adecuada para que el criterio de medida sea uniforme y fidedigno.

A continuación, se inyectará la dosis de PPD bovina en la región central del área rasurada siguiendo un método que garantice que aquella se administra intradérmicamente. El volumen de inoculación deberá ser de 0,1 ml (no superior a 0,2 ml). Para confirmar si una inyección se ha efectuado correctamente deberá palpase una hinchazón del tamaño de un guisante en cada punto de inyección. El grosor del pliegue de piel de cada punto de inyección se medirá de nuevo 72 horas (+/- 4 h) después de la inyección y se registrará de nuevo el resultado.

La IDTBc debe ser realizada igualmente mediante inoculación intradérmica de PPD bovina y aviar (PPD de *M. avium*) 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.

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



VISAVET

Realización de las pruebas de intradermotuberculinización e interferón-gamma

Programa Nacional de Erradicación de la tuberculosis bovina
2022-2030



Manuales de Procedimiento Sanitario

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE MADRID



GOBIERNO DE ESPAÑA

MINISTERIO DE AGRICULTURA, PESCA Y ALIMENTACIÓN

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.

Posteriormente se inocula las dosis de PPD por un método que asegure su administración por vía intradérmica. Los sistemas empleados para la inoculación intradérmica, que han de estar perfectamente identificados para minimizar errores, se destinarán exclusivamente a la realización de esta prueba. Se podrán utilizar igualmente sistemas sin aguja cuya eficacia en la administración intradérmica haya sido evaluada (consultar Protocolo de utilización e informe de valoración del uso de pistolas de inoculación intradérmica en la web del MAPA). Las jeringas utilizadas para cargar con PPD los sistemas de inyección intradérmica, en caso de reutilizarse, deberán estar correctamente identificadas para evitar errores al emplearse PPD bovina y aviar.

Si se comprueba que la inoculación no ha sido intradérmica, es decir, no se forma hinchazón visible o palpable, se deberá repetir la inoculación al menos a 5 cm de distancia de la primera.

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.



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

VISA VET

Interpretación de los resultados

IDTBs

Se prestará especial atención a que, además de la intensidad de la reacción en los puntos de inoculación, es esencial para la interpretación de los resultados 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 entre las lecturas de los dos días (0 - 72 h).

Realización de las pruebas de intradermotuberculinización e interferón-gamma

Programa Nacional de Erradicación de la tuberculosis bovina
2022-2030



Manuales de Procedimiento Sanitario

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE MADRID



GOBIERNO DE ESPAÑA

MINISTERIO DE AGRICULTURA, PESCA Y ALIMENTACIÓN

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.



IDTBc

Una vez obtenidas las lecturas a la reacción de la PPD bovina y aviarla 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.



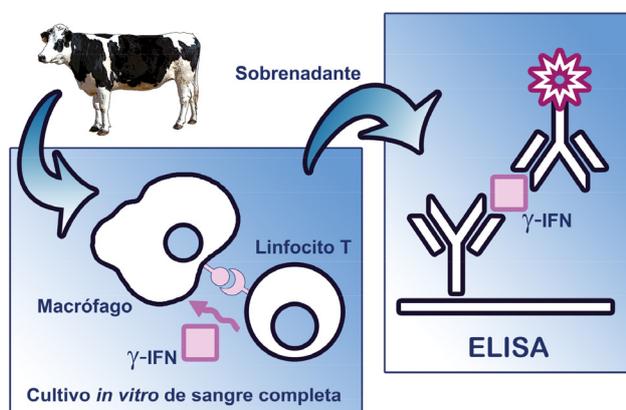
4. Prueba de detección de interferón-gamma

Justificación y objetivos

La prueba de detección de interferón-gamma (IFN-gamma) se contempla en el ámbito de la normativa comunitaria y nacional:

- Como prueba complementaria junto a la IDTB simple (protocolo de IFN-gamma a aplicar en el Programa Nacional de Erradicación) en explotaciones infectadas a las que se les ha retirado la calificación.

- Como prueba de rutina para la obtención y mantenimiento de la calificación y como prueba de movimiento, si la autoridad competente así lo autoriza (protocolo del Laboratorio de Referencia de la Unión Europea a utilizar en el contexto de la Regulation (EU) 2016/429).



VISAVET

▲ Esquema del fundamento de la prueba del IFN-gamma

Realización de las pruebas de intradermotuberculinización e interferón-gamma

Programa Nacional de Erradicación de la tuberculosis bovina
2022-2030



Manuales de Procedimiento Sanitario

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE MADRID



GOBIERNO DE ESPAÑA

MINISTERIO DE AGRICULTURA, PESCA Y ALIMENTACIÓN

La aplicación de la prueba de IFN-gamma en paralelo con la prueba cutánea (protocolo del Programa Nacional de Erradicación) posibilita la detección del máximo número de animales infectados de tuberculosis. Además, la utilización de ambas técnicas diagnósticas (IDTBs + IFN-gamma) permite detectar más animales infectados reduciendo el tiempo necesario para la eliminación de la infección.

Los animales infectados con micobacterias del MTBC poseen linfocitos circulantes de memoria sensibilizados a diferentes antígenos de dichas micobacterias. Estos linfocitos presentes en la sangre son capaces de responder in vitro frente a estos antígenos, liberando en su respuesta IFN- γ . Los linfocitos de animales no infectados no responden produciendo IFN- γ . El IFN- γ puede ser detectado mediante ELISA.

Descripción de la técnica

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 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 el anticoagulante heparina de litio, mantenida a temperatura ambiente (18-25 °C, evitando temperaturas extremas). La extracción y el manejo de la sangre deben realizarse cuidadosamente, ya que hemos de tener en cuenta que en este ensayo se valora la capacidad de respuesta de los linfocitos tras su estímulo 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 del ensayo (por ejemplo, la utilización de agujas con biselos defectuosos, presiones inadecuadas, refrigeración, etc.). El grado de hemólisis puede dar una idea del nivel de alteración ya que lo que afecta a los hematíes puede afectar al resto de las células de la sangre.

La utilización de un anticoagulante distinto a la heparina, o la refrigeración de las muestras de sangre reducen drásticamente la viabilidad de los linfocitos y afecta a los resultados de la prueba, por lo tanto, son criterios suficientes para el rechazo de las muestras por parte del laboratorio.

Las muestras han de venir identificadas individualmente.



VISAVET

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



Realización del ensayo

Distribución de las muestras

Las muestras de sangre deben mezclarse 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 de la alícuota 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 ha de llevarse a cabo en condiciones asépticas.

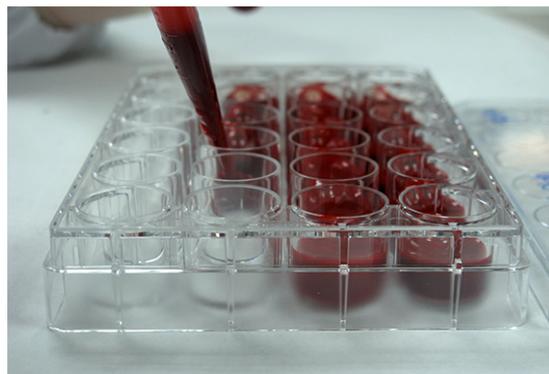
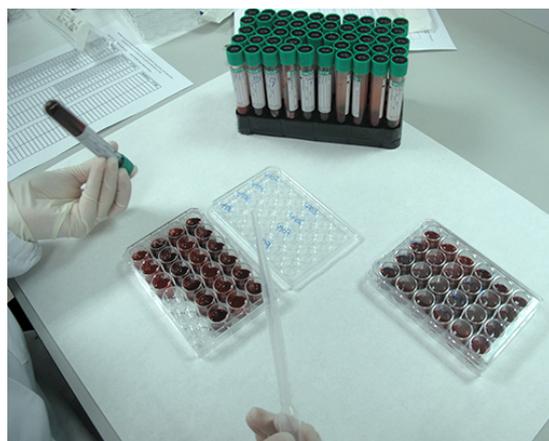
Adición del antígeno

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, habiendo preparado la PPD aviar y bovina a 220 µg/ml). Este proceso debe realizarse en condiciones asépticas.



VISA VET

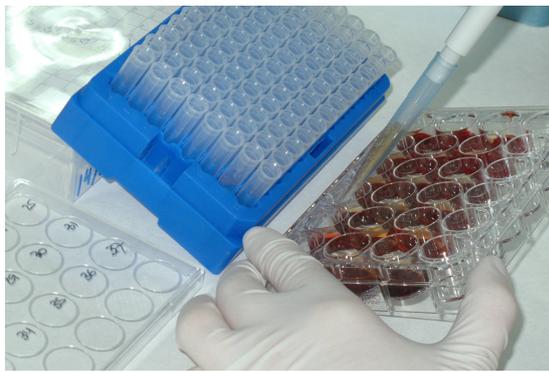
▲ Imágenes de la distribución de las muestras de sangre en placas de 24 pocillos y adición de antígenos en la realización de la prueba de INF-gamma.



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 (por ejemplo *pokeweed mitogen*) 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

Incubación de la sangre

Las muestras estimuladas se incuban durante 18-24 horas a 37±1 °C, 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 °C hasta 7 días o congelarse a <-15 °C hasta su análisis. Las muestras deben descongelarse a 5±3 °C, 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 °C.



Realización del ELISA

Cada uno de los tres sobrenadantes se ensaya mediante un kit de enzimoimmunoensayo (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.

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

VISAVET

Realización de las pruebas de intradermotuberculinización e interferón-gamma

Programa Nacional de Erradicación de la tuberculosis bovina
2022-2030



Manuales de Procedimiento Sanitario

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE MADRID



GOBIERNO DE ESPAÑA

MINISTERIO DE AGRICULTURA, PESCA Y ALIMENTACIÓN

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 (APPLIED BIOSYSTEMS™ BOVIGAM™ TB KIT o ID Screen® Ruminant IFN-g, u otros previamente registrados y autorizados por el MAPA) y acorde con el Programa Nacional de Erradicación de la Tuberculosis Bovina. Siempre es necesario tener en cuenta el historial de la explotación y la situación epidemiológica de la misma, por ejemplo, la presencia de otras infecciones por micobacterias no tuberculosas en la explotación.



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

Otras recomendaciones

1. No congelar las sangres y mantenerlas a temperatura constante entre 18 y 25 °C (las variaciones de temperatura afectan a la activación de los linfocitos).
 2. Estimular antes de las 8 horas después de la extracción de la sangre.
 3. Utilización de tuberculina de Campaña para la estimulación de las muestras. 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).
4. Si existen dudas sobre la calidad de las muestras es conveniente utilizar un mitógeno para valorar la viabilidad de los linfocitos.
 5. Incubar a 37 °C. Se recomienda hacerlo en atmósfera de CO₂.
 6. Durante la recogida del plasma, tras la estimulación antigénica de las muestras, cantidades discretas de eritrocitos 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.
 11. El control interno positivo debe ser una muestra positiva de IFN-γ y cercana al valor de corte y el control interno negativo debe proceder de establecimientos oficialmente libres de tuberculosis.



UNIVERSIDAD
COMPLUTENSE
MADRID

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

visavet.es



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