

# 2008

*Manuales de  
procedimiento*

**MANUAL DE PROCEDIMIENTO  
PARA LA REALIZACIÓN DE LAS PRUEBAS  
DE INTRADERMOTUBERCULINIZACIÓN  
Y GAMMA-INTERFERÓN**

EN EL ÁMBITO DEL PROGRAMA NACIONAL  
DE ERRADICACIÓN DE LA TUBERCULOSIS BOVINA 2008-2010



# 2018



MINISTERIO DE  
MEDIO AMBIENTE  
Y MEDIO RURAL Y MARINO

SECRETARÍA GENERAL DE MEDIO RURAL  
DIRECCIÓN GENERAL DE RECURSOS AGRÍCOLAS Y GANADEROS  
SUBDIRECCIÓN GENERAL DE SANIDAD DE LA PRODUCCIÓN PRIMARIA



UNIVERSIDAD COMPLUTENSE  
MADRID

CENTRO DE VIGILANCIA SANITARIA VETERINARIA (VISAVET)

## Índice

|   | Pag.: |
|---|-------|
| Ámbito de aplicación                                  | 3     |
| Intradermotuberculinización de comparación            | 4     |
| Justificación y objetivos                             |       |
| Técnica de administración de las tuberculinas         |       |
| Interpretación de los resultados                      |       |
| Intradermotuberculinización simple                    | 9     |
| Utilización en paralelo del test del gamma-interferón | 10    |
| Test de gamma-interferón                              |       |
| Descripción de la técnica                             |       |
| Realización del ensayo                                |       |

## Ámbito de aplicación

La tuberculosis bovina es una enfermedad de declaración obligatoria en España que ya estaba contemplada como tal en la Ley de Epizootias de 1952, y actualmente, tomando como normativa básica la Ley 8/2003, de Sanidad Animal, por el Real Decreto 617/2007, por el que se establece la lista de enfermedades de animales de declaración obligatoria y se da la normativa para su notificación.



VISAVET

Los Programas Nacionales de Erradicación frente a esta enfermedad comenzaron a aplicarse sistemáticamente en los años 90, centrados fundamentalmente en el vacuno lechero para posteriormente extenderse al ganado de aptitud cárnica.

La normativa que regula en la actualidad este Programa tiene como base la Directiva 64/432/CEE y modificaciones, incorporada a nuestro ordenamiento jurídico interno por el Real Decreto 1716/2000, por el que se establecen las normas sanitarias para el comercio intracomunitario de animales de las especies bovina y porcina. Las normas de ejecución se establecen en el Real Decreto 2611/1996 y sus modificaciones, por el que se regulan los Programas Nacionales de Erradicación de Enfermedades de los Animales

Mediante el Real Decreto 1440/2001, por el que se establece el sistema de alerta sanitaria veterinaria, se creó el Comité Nacional del Sistema de Alerta Sanitaria Veterinaria, que asume competencias en materia de estudio y proposición de medidas para la erradicación de las enfermedades y seguimiento de la evolución de la situación epidemiológica para las enfermedades objeto de programas de erradicación. En el seno de este Comité ha sido consensuado y aprobado el Programa Nacional de Erradicación de la Tuberculosis Bovina para 2008-2010, que cuenta con co-financiación comunitaria de acuerdo con la Decisión 90/424/CEE, relativa a determinados gastos en el sector veterinario, y que ha sido aprobado para su co-financiación en 2008 mediante la Decisión 2007/782/CE.

2008  
2010MINISTERIO DE  
MEDIO AMBIENTE  
Y MEDIO RURAL Y MARINO

SECRETARÍA GENERAL DE MEDIO RURAL

DIRECCIÓN GENERAL DE RECURSOS AGRÍCOLAS Y GANADEROS

SUBDIRECCIÓN GENERAL DE SANIDAD DE LA PRODUCCIÓN PRIMARIA

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE  
MADRID

CENTRO DE VIGILANCIA SANITARIA VETERINARIA (VISAVET)

Las pruebas de diagnóstico oficial están definidas en el Anexo B de la Directiva 64/432/CEE y modificaciones, con especial relevancia a las contempladas por el Reglamento 1226/2002 en lo que se refiere a la técnica e interpretación de la intradermotuberculinización (IDTB). A nivel estatal las pruebas de diagnóstico oficial se definen en el Real Decreto 1047/2003, por el que se modifica el Real Decreto 2611/1996.

El asesoramiento técnico y científico en este Programa es realizado por el Laboratorio Nacional de Referencia de Santa Fe (Granada) en colaboración con el Servicio de Micobacterias del Centro de Vigilancia Sanitaria Veterinaria (VISAVET) de la Universidad Complutense (Madrid), establecido mediante un Convenio de Colaboración MARM – UCM. Este convenio está centrado en la actualidad en el estudio y aplicación de nuevas técnicas de diagnóstico, así como técnicas de caracterización molecular para estudios epidemiológicos.

## Intradermotuberculinización de comparación (IDTBC)

### Justificación y objetivos

La IDTBC es una prueba de diagnóstico oficial que permite el diagnóstico diferencial con otras micobacterias, principalmente en aquellas unidades epidemiológicas calificadas como oficialmente indemnes y en los cuales aparece algún animal reaccionante positivo o dudoso a la IDTB simple. Su utilización, siempre que sea posible, debe ir asociada al uso de otras técnicas de diagnóstico complementarias, si

bien las calificaciones de los rebaños deben depender del test intradérmico (recomendación Task Force 13/03/2002).

La utilización de la IDTBC está contemplada en el Programa Nacional de Erradicación de Tuberculosis Bovina presentado por España para los años 2008-2010 en ciertas situaciones (en CCAA de prevalencia inferior al 1% o en ciertas comarcas veterinarias de CCAA con prevalencias superiores) para aquellas explotaciones calificadas como T3 en que aparezca algún animal positivo y se detecten problemas de especificidad, y siempre que se haya realizado una encuesta epidemiológica rigurosa para tratar de identificar la causa de dicha positividad. Tras el sacrificio de el/los reaccionantes positivos y la toma de muestras de acuerdo con el protocolo que figura en el Anexo I del Real Decreto 2611/1996, en el resto de animales de la explotación se procederá a realizar la IDTBC, así como cualquier otra prueba complementaria que se considere necesaria para realizar un diagnóstico diferencial de la enfermedad.

## Técnica de administración de las tuberculinas

Las tuberculinas utilizadas deben estar contrastadas por el Laboratorio Nacional de Referencia, cuestión de especial importancia debido a que recientes estudios han puesto de manifiesto las diferencias en cuanto a potencia de los diferentes derivados proteicos purificados existentes. Las tuberculinas deben cumplir las especificaciones que figuran en la normativa comunitaria y asegurar al menos una potencia de 20.000 UI.



VISAVET

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

Siguiendo la normativa nacional y comunitaria, la IDTBC debe ser realizada mediante inoculación de las tuberculinas bovina y aviar en la dermis de la piel de las tablas del

2008  
2010

cuello. Esta localización es la idónea, ya que, según demuestran diversos estudios (Veterinary Medicine, M. Radostits et al. 9th Ed. 2000) la sensibilidad relativa de la piel a la tuberculina inyectada en la dermis varía considerablemente según el lugar de inyección. La región cervical es mucho más sensible y menos sucia que otras localizaciones utilizadas, lo que proporciona reacciones más marcadas:

| LOCALIZACIÓN      | SENSIBILIDAD RELATIVA |
|-------------------|-----------------------|
| dorso             | 1                     |
| flanco superior   | 1,75                  |
| flanco inferior   | 2,5                   |
| tablas del cuello | 2,75-3                |

Por tanto, desde el punto de vista científico, el tercio medio de las tablas del cuello es el lugar más adecuado para la realización de la prueba. Los puntos de inoculación se situarán por tanto en el límite entre los tercios anterior y medio del cuello, debiendo estar las zonas de inoculación con la piel íntegra y limpia. Una vez rasurada la zona elegida, se marcan en ella dos áreas según la fotografía 1. El punto de inoculación de la tuberculina



Fotografía 1

aviar debe situarse a unos 10 cm. de la línea superior del cuello y el de la tuberculina bovina unos 12,5 cm. por debajo de una línea transversal más o menos paralela a la línea de la espalda.

En animales jóvenes en que todavía no sea posible separar suficientemente los puntos de inoculación se aplicará una tuberculina en cada lado (la

bovina en el derecho y la aviar en el izquierdo), en sitios idénticos en el centro del tercio medio del cuello.

Previo a la inoculación de las tuberculinas se mide el grosor de la piel en las dos zonas elegidas para la inoculación. Para ello se coge un pliegue de piel de cada zona entre los dedos índice y pulgar, midiéndose dicho grosor con un cutímetro y anotando el resultado en milímetros. Es de especial importancia que los cutímetros mantengan una tensión uniforme para que el criterio de medida sea uniforme y fidedigno (fotografía 2).



Fotografía 2

(Cedidas por A. Águeda Martín, D. Águeda Pascual y A. las Heras del Río)



Fotografía 3

Posteriormente se inocular las dosis de tuberculinas por un método que asegure su administración por vía intradérmica (fotografía 3). Para ello se utilizará una pequeña aguja estéril y una jeringa graduada. La aguja será introducida oblicuamente en las capas más profundas de la piel, con el borde biselado hacia el exterior. Las jeringas se destinarán exclusivamente a la realización de esta prueba, esterilizadas para cada una de las tuberculinas, debiendo asegurarse de que no haya cambios de las tuberculinas en el momento de la inoculación. Una inoculación correctamente aplicada provocará, a la palpación, una ligera hinchazón en cada punto de inoculación (fotografía 1).

Se podrán utilizar igualmente sistemas sin aguja cuya eficacia en la administración intradérmica haya sido evaluada (en la actualidad, ya ha sido evaluada y aceptada la jeringa Dermo Jet).

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

2018

MINISTERIO DE  
MEDIO AMBIENTE  
Y MEDIO RURAL Y MARINO

SECRETARÍA GENERAL DE MEDIO RURAL

DIRECCIÓN GENERAL DE RECURSOS AGRÍCOLAS Y GANADEROS

SUBDIRECCIÓN GENERAL DE SANIDAD DE LA PRODUCCIÓN PRIMARIA

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE  
MADRID

CENTRO DE VIGILANCIA SANITARIA VETERINARIA (VISAVET)

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.

## Interpretación de los resultados

La interpretación de las reacciones a las tuberculinas está basada tanto en la observación de signos clínicos y en las diferencias de mediciones para ambas tuberculinas por separado:



• **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.



• **Reacción dudosa:** aumento del espesor del pliegue de piel superior a 2 mm. e inferior a 4 mm. junto con ausencia de signos clínicos.






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

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.

Una vez obtenidas las lecturas a la reacción de ambas tuberculinas la interpretación de la IDTBC será la siguiente:

IDTBC

-  a) **prueba negativa:** reacción negativa a la tuberculina bovina o reacción positiva o dudosa a la tuberculina bovina pero igual o inferior a una reacción positiva o dudosa a la tuberculina aviar, con ausencia de signos clínicos.
-  b) **prueba dudosa:** reacción a la tuberculina bovina positiva o dudosa y superior en 1 a 4 mm. a la reacción a la tuberculina aviar, con ausencia de signos clínicos.
-  c) **prueba positiva:** reacción a la tuberculina bovina superior en más de 4 mm. a la reacción a la tuberculina aviar o presencia de signos clínicos.

Los animales cuyo resultado sea dudoso 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.

## Intradermotuberculinización simple (IDTBS)

La IDTBS es la prueba de rutina a utilizar en el marco del Programa Nacional de Erradicación de la tuberculosis bovina 2008-2010, especialmente en las unidades epidemiológicas de “alta prevalencia” (CCAA o UVLs con prevalencia de rebaño > 1%) y siempre en rebaños no libres de la enfermedad.

En UVLs con prevalencia de rebaño > 1%, se aplicará una interpretación severa del test en los rebaños T3, de forma que cualquier resultado no negativo será considerado positivo si en la realización de la prueba existe además al menos un reactor positivo o al menos otro animal cuyo resultado no sea negativo. En los rebaños T2 se aplicará una interpretación estricta del test, de forma que cualquier resultado no negativo será considerado positivo desde el primer momento.

2018

MINISTERIO DE  
MEDIO AMBIENTE  
Y MEDIO RURAL Y MARINO

SECRETARÍA GENERAL DE MEDIO RURAL

DIRECCIÓN GENERAL DE RECURSOS AGRÍCOLAS Y GANADEROS

SUBDIRECCIÓN GENERAL DE SANIDAD DE LA PRODUCCIÓN PRIMARIA

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE  
MADRID

CENTRO DE VIGILANCIA SANITARIA VETERINARIA (VISAVET)

## Técnica de administración de la tuberculina bovina e interpretación de los resultados

En la aplicación de la PPD bovina e interpretación de las reacciones se seguirán los principios generales considerados en el apartado de la IDTBC y en el anexo B de la Directiva 64/432/CEE.

### Utilización en paralelo del test del gamma-interferón

El test de gamma-interferón ( $\gamma$ -IFN) se contempla como una prueba complementaria en el ámbito de la normativa comunitaria y nacional, por lo que el estatus del rebaño siempre será otorgado en base a los resultados obtenidos de la prueba cutánea, si bien cualquier rebaño con resultados positivos a la prueba del  $\gamma$ -IFN debe ser considerado como positivo.

La aplicación de la técnica de  $\gamma$ -IFN en la UE y en España se permite para la detección del máximo número de animales infectados por *Mycobacterium bovis* y *Mycobacterium caprae*, en paralelo con la prueba cutánea. Además, la utilización de ambas técnicas diagnósticas en un rebaño (IDTBS +  $\gamma$ -IFN) permite detectar más animales infectados reduciendo el tiempo necesario para la eliminación de la infección.

### Test de gamma-interferón

Los animales infectados con bacterias del complejo *Mycobacterium tuberculosis* poseen linfocitos circulantes sensibilizados a antígenos de dichas micobacterias. Estos linfocitos presentes en la sangre son

TEST DEL GAMMA-INTERFERÓN

capaces de responder *in vitro* frente a estos antígenos, liberando en su respuesta  $\gamma$ -IFN. Los linfocitos de animales no infectados no responden produciendo  $\gamma$ -IFN. El  $\gamma$ -IFN puede ser detectado mediante ELISA.

## Descripción de la técnica

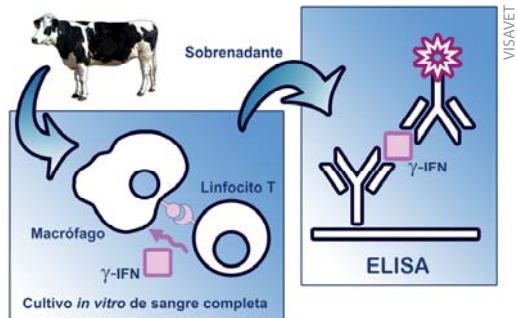
Esta técnica puede realizarse en animales en los que no se haya aplicado la IDTB en los últimos 60 días. Se aconseja en animales a partir de los 6 meses de edad.

Las muestras de sangre se tomarán antes de inocular las tuberculinas, y deben llegar al laboratorio encargado de realizar el análisis dentro de las 8 horas posteriores a la recolección de la muestra.

La muestra consiste en sangre recogida con el anticoagulante heparina de litio, mantenida a temperatura ambiente (no refrigerada). 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 bisel 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.

Entre la extracción de sangre y el procesamiento no deben transcurrir más de ocho horas. Para el estudio normal se debe recoger un volumen mínimo de 5 ml de sangre, por lo que es recomendable realizar la extracción de sangre en tubos de 10 ml. Es necesario mezclar la sangre suavemente por inversión del tubo varias veces para disolver la heparina.

Esquema del fundamento



VISAVET

2008  
2010

MINISTERIO DE  
MEDIO AMBIENTE  
Y MEDIO RURAL Y MARINO

SECRETARÍA GENERAL DE MEDIO RURAL  
DIRECCIÓN GENERAL DE RECURSOS AGRÍCOLAS Y GANADEROS  
SUBDIRECCIÓN GENERAL DE SANIDAD DE LA PRODUCCIÓN PRIMARIA



UNIVERSIDAD COMPLUTENSE  
MADRID

CENTRO DE VIGILANCIA SANITARIA VETERINARIA (VISAVET)

La utilización de un anticoagulante distinto a la heparina, o la refrigeración de las muestras reducen drásticamente la viabilidad de los linfocitos y por lo tanto son criterios suficientes para su rechazo.

Las muestras han de venir identificadas individualmente.

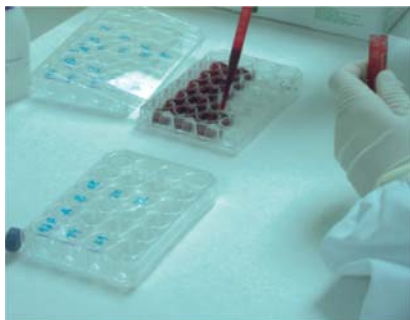


VISAVET

## Realización del ensayo

### Distribución de las muestras

Las muestras de sangre deben mezclarse invirtiendo suavemente los tubos varias veces, antes de su distribución.



VISAVET

Una muestra de cada animal se distribuye en tres alícuotas en placas de cultivo celular, utilizando preferiblemente pipetas Pasteur de 2-3 ml estériles. El volumen de sangre de la alícuota recomendado es 1,5 ml, solamente en condiciones excepcionales podría ser inferior (1 ml), siempre y cuando se mantuviera la relación con la concentración de PPD

que ha de añadirse. Este proceso ha de llevarse a cabo en condiciones asépticas.

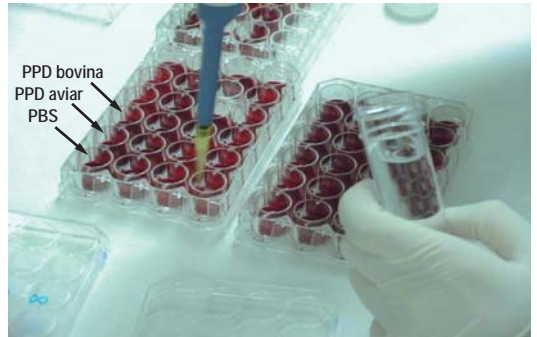
### Adición del antígeno

Las muestras se estimulan con PBS, y con PPD aviar y bovina utilizadas en las Campañas de Saneamiento. Las PPDs son contrastadas por el

# TEST DEL GAMMA-INTERFERÓN

Laboratorio Nacional de Referencia, permitiendo la comparación de los resultados de la intradermotuberculinización.

Por ejemplo, para una alícuota de 1,5 ml se añade 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. Este proceso debe realizarse también en condiciones asépticas.



VISAVET

En ocasiones especiales, para comprobar la viabilidad de los linfocitos y la ausencia de tratamientos que puedan interferir con los resultados de la prueba se aconseja incluir algunos pocillos estimulados con mitógenos (por ejemplo pokeweed mitógeno o enterotoxina de *Staphylococcus aureus*).

### Incubación de la sangre

Las muestras estimuladas se incuban durante 18-24 horas a  $37 \pm 1^\circ\text{C}$ .

### Recogida de las muestras de plasma

Tras la incubación, las muestras se centrifugan a 770 g durante 15 minutos, para poder recoger el sobrenadante; es suficiente recoger 300 o 400 µl de cada pocillo.

El sobrenadante puede recogerse con pipeta y punta de pipeta de plástico esterilizada, con cuidado de no recoger células.



VISAVET

2008  
2010
 MINISTERIO DE  
MEDIO AMBIENTE  
Y MEDIO RURAL Y MARINO

 SECRETARÍA GENERAL DE MEDIO RURAL  
DIRECCIÓN GENERAL DE RECURSOS AGRÍCOLAS Y GANADEROS  
SUBDIRECCIÓN GENERAL DE SANIDAD DE LA PRODUCCIÓN PRIMARIA


UNIVERSIDAD COMPLUTENSE

CENTRO DE VIGILANCIA SANITARIA VETERINARIA (VISAVET)

Los sobrenadantes pueden ensayarse directamente, conservarse a 4°C durante 12 horas, o mantenerse congelados (temperatura mínima de -20°C). Las muestras deben descongelarse a 4°C, equilibrarse a temperatura ambiente y homogeneizarse antes de valorarlas en el ensayo EIA para  $\gamma$ -IFN. No deben calentarse a 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  $\gamma$ -IFN, por ejemplo el kit Bovigam® (Prionics AG). Este kit es un ELISA

de tipo sándwich (doble anticuerpo monoclonal) diseñado para detectar  $\gamma$ -IFN biológicamente activo de vacuno, ovino y caprino. Para la realización del ELISA y la validación de las placas se seguirán las recomendaciones del fabricante.



VISAVET

### 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 PPD aviar, considerándose la **prueba positiva** cuando:



DO PPD bovina – DO PBS  $\geq$  0,05 y DO PPD bovina  $>$  DO PPD aviar

La interpretación debe ser realizada por laboratorios autorizados. 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 en la explotación.

### 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 la tuberculina de campaña en el kit Bovigam®:

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

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

1,2 ml de PPDaviar + 0,8 ml de PBS  
0,6 ml de PPDbovina + 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 CO<sub>2</sub>.

**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 -20°C, pero se recomienda llegar a los -40°C e incluso a los -80°C.

**8** Descongelar a 4°C.

**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 de las muestras.



SECRETARÍA GENERAL DE MEDIO RURAL  
DIRECCIÓN GENERAL DE RECURSOS AGRÍCOLAS Y GANADEROS  
SUBDIRECCIÓN GENERAL DE SANIDAD DE LA PRODUCCIÓN PRIMARIA

[www.marm.es](http://www.marm.es)



UNIVERSIDAD COMPLUTENSE  
MADRID

CENTRO DE VIGILANCIA SANITARIA VETERINARIA  
(VISAVET)

[www.vigilanciasanitaria.es](http://www.vigilanciasanitaria.es)