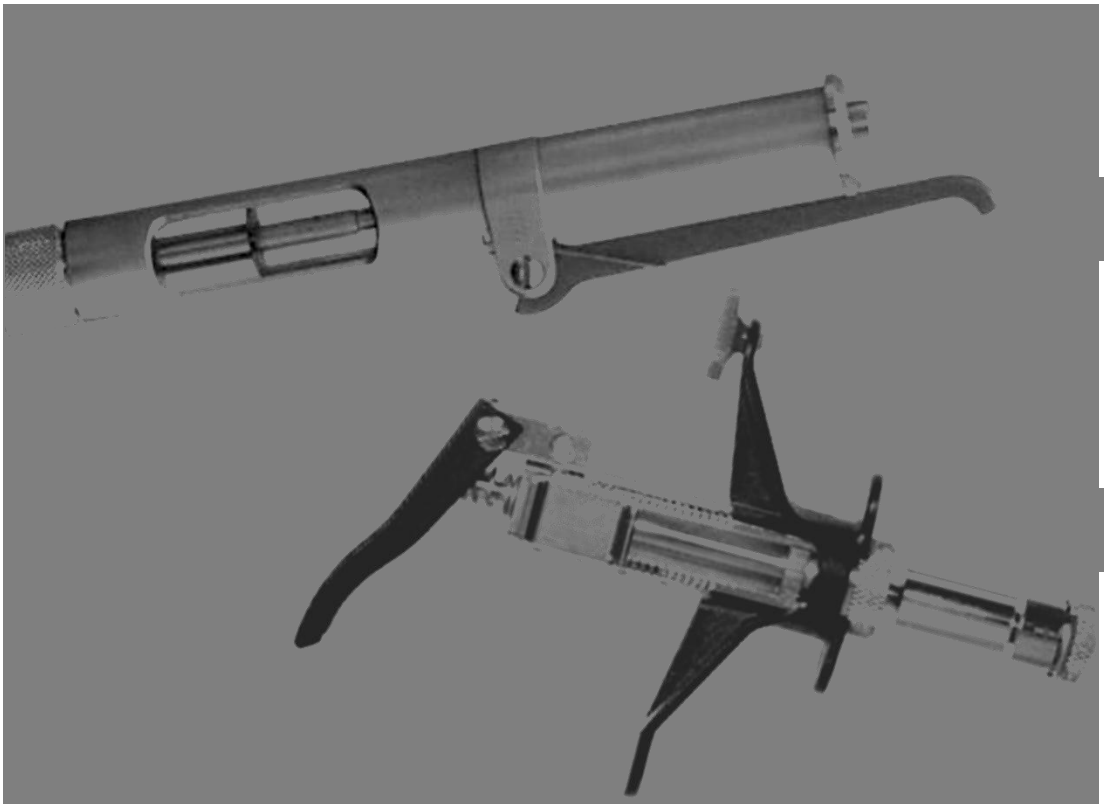

PROGRAMA NACIONAL DE ERRADICACIÓN DE LA TUBERCULOSIS BOVINA

Protocolo de utilización e informe de valoración del uso de pistolas de inoculación intradérmica

1 Precisión de la pistola de inoculación intradérmica DERMO JET en la administración de dosis de 100 µl

2 Evaluación del efecto de los desinfectantes incorporados en la pistola de inoculación intradérmica McLintock sobre la capacidad antigénica de las tuberculinas

3 Memoria justificativa para la realización de una prueba de campo para la valoración de la jeringa DERMO JET y su posible uso en la ejecución del programa nacional de erradicación de la tuberculosis bovina

GOBIERNO DE ESPAÑA
MINISTERIO DE MEDIO AMBIENTE Y MEDIO RURAL Y MARINO

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

VISAVET
CENTRO DE VIGILANCIA SANITARIA VETERINARIA
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE
MADRID

Abril de 2011

Pistolas de inoculación intradérmica DERMO JET y McLintock.
Fotografía: Javier Bezos (VISAVET-UCM)

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN 3

Precisión de la pistola de inoculación intradérmica DERMO JET en la administración de dosis de 100 µl 5

Evaluación del efecto de los desinfectantes incorporados en la pistola de inoculación intradérmica McLintock sobre la capacidad antigénica de las tuberculinas 15

Memoria justificativa para la realización de una prueba de campo para la valoración de la jeringa DERMO JET y su posible uso en la ejecución del programa nacional de erradicación de la tuberculosis bovina 20

CONCLUSIONES 28

INTRODUCCIÓN

La tuberculosis bovina, causada por la infección del ganado bovino por miembros del complejo *M. tuberculosis*, es una enfermedad de gran importancia desde el punto de la Salud Pública (ya que es una enfermedad zoonósica, es decir, transmisible al hombre) y de la Sanidad Animal (debido a las pérdidas directas e indirectas a las que da lugar). Por todo ello es una enfermedad prioritaria en la mayor parte de países desarrollados en los que todavía está presente, a la que se dedican grandes esfuerzos en forma de programas de erradicación. Estos programas están basados en la detección y eliminación de los animales infectados mediante la aplicación de pruebas diagnósticas específicas de tuberculosis. De entre las técnicas diagnósticas disponibles, la prueba de la intradermotuberculinización (IDTB) cutánea, consistente en la inoculación de un extracto elaborado a partir del agente causal de la tuberculosis bovina (tuberculinas o PPDs) y la medición de la respuesta a la que da lugar a las 72 horas en el punto de inoculación, ha sido la base de la mayor parte de los programas de erradicación y continúa siendo la prueba de elección para la detección de animales/rebaños infectados en sus distintas modalidades (IDTB simple o IDTB comparada, criterios de interpretación severos – más restrictivos – o estándares).

Si bien la prueba de la IDTB ha demostrado su utilidad y fiabilidad en una gran variedad de situaciones epidemiológicas, presenta algunos inconvenientes, entre los que cabe destacar la dificultad en su estandarización; la IDTB es una prueba muy dependiente de un gran número de factores relacionados con la propia técnica, lo que puede hacer oscilar su sensibilidad desde valores pobres (60-70%) a elevados (>90%) en función de que todos sus pasos se realicen correctamente (conservación de las tuberculinas, inoculación de las mismas, medición antes y después de la aplicación de las tuberculinas, valoración de los signos clínicos…). No obstante, la investigación realizada en los últimos años ha permitido el desarrollo de herramientas que pueden facilitar la realización de la prueba, como las pistolas automáticas de inoculación intradérmica, cuya finalidad es asegurar que la dosis adecuada de antígeno se inyecta de forma adecuada y al mismo tiempo rápida y segura para el operario (en algunos casos incorporando tecnología sin agujas – *needle-free* – que minimiza el riesgo de accidentes y la contaminación del material en el manejo de los animales).

El presente informe incluye tres experiencias realizadas con dos pistolas de inoculación intradérmica disponibles actualmente en el mercado (DERMO JET y McLintock) para determinar su fiabilidad como herramientas para la realización de la prueba de la IDTB en España. Concretamente, los estudios desarrollados persiguieron los siguientes objetivos:

- Determinación de la precisión de ambas pistolas en la administración de volúmenes de 100 microlitros en condiciones de laboratorio.

- Valoración del efecto del desinfectante incorporado en los modelos McLintock sobre la capacidad antigénica de las tuberculinas utilizadas en la prueba de la IDTB.

- Comparación de la utilidad de las pistolas DERMO JET en condiciones de campo en comparación con el uso de otros métodos (jeringas manuales o automáticas con agujas) para la inoculación de las tuberculinas.

Cada uno de los tres estudios se presenta por separado a continuación.

Precisión de la pistola de inoculación intradérmica DERMO JET en la administración de dosis de 100 µl

El objetivo de este estudio es evaluar la precisión de la pistola DERMO JET en la inoculación de dosis de 100 µL de PPD bovina para la realización de la prueba de la intradermotuberculinización. En primer lugar se realizó un **primer estudio piloto** comparando los resultados obtenidos al trabajar con PPD bovina con los observados al utilizar agua destilada. La finalidad de esta prueba piloto fue comprobar si los valores obtenidos al utilizar agua destilada podrían ser representativos de lo observado al utilizar PPD bovina, de modo que en el resto de mediciones pudiera usarse agua destilada como único material de trabajo.

En este estudio piloto se estimó en primer lugar la densidad aproximada de cada líquido mediante el pesado en una balanza de precisión de volúmenes conocidos de ambas sustancias. Una vez determinadas las dos densidades (1,017 y 1,044 para el agua y la PPD bovina, respectivamente) se cargó una pistola DERMO JET con cada líquido, y tras realizar dos disparos al aire (para purgar el aire de la pistola) se pesó en la balanza de precisión el líquido depositado en los siguientes 48 disparos. Con ambos líquidos se observó que la cantidad de líquido administrada solo fue superior a 100 µg en los primeros 40 disparos, motivo por el cual se descartaron los valores registrados a partir del disparo 40. El peso registrado con la balanza fue consistentemente mayor en el caso de la PPD bovina que en el del agua destilada, aunque la diferencia media entre ambos líquidos fue limitada (Figura 1 y Tabla 1). A pesar del mayor volumen de PPD bovino administrado por cada disparo, los primeros 40 disparos también superaron los 100 µl, administrando más de la cantidad mínima esperada para la realización de la prueba de la tuberculina in-vivo.

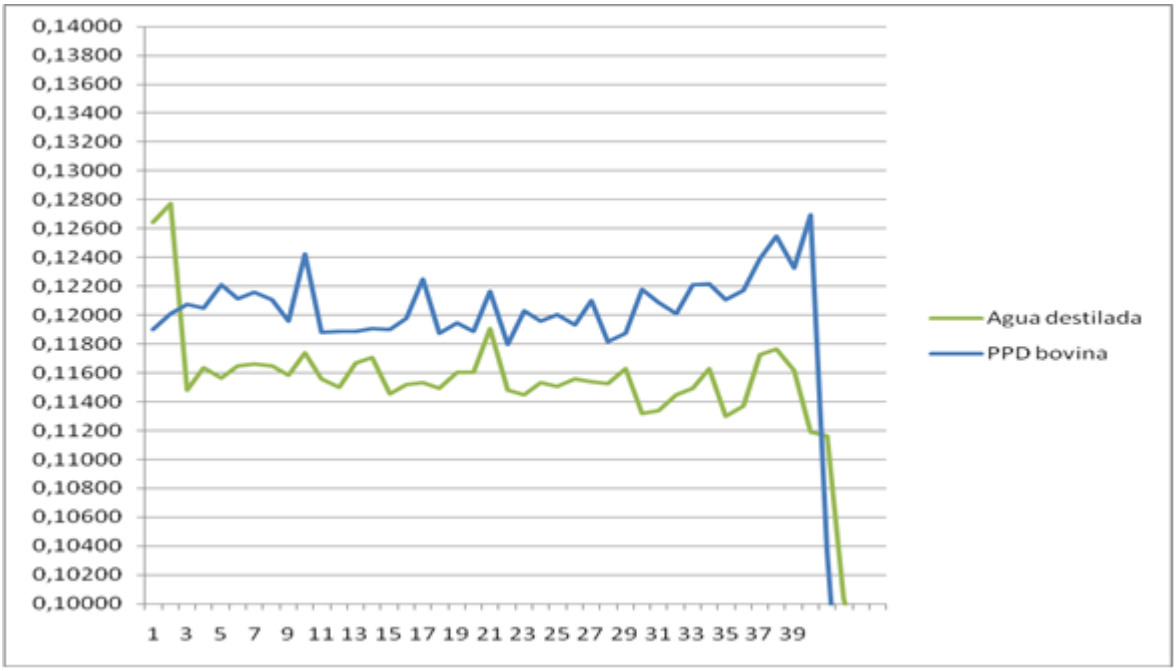

Figura 1. Pesos registrados en dos tandas completas realizadas con la misma pistola usando agua destilada y PPD bovina.

Tabla 1. Valores de pesos (µg) y volúmenes (µl) registrados en las 40 primeras pesadas realizadas con agua destilada y PPD bovina con una misma pistola.

Líquido/medida	Valor máximo	Valor Mínimo	Rango	Media	Mediana	Desviación típica
Agua (peso)	127,7	111,88	15,8	116,1	115,57	2,9
Agua (volumen)	125,55	109,99	15,56	114,1	113,61	2,8
PPD bov (peso)	126,98	117,99	8,99	120,7	120,4	2
PPD bov (vol)	121,6	112,99	8,61	115,6	115,3	1,9

Aunque el peso registrado al utilizar el agua destilada fue mayor que al usar la PPD bovina, al transformar estas medidas en volúmenes el cambio observado resultó menor (Figura 2) (debido a la densidad ligeramente superior de la PPD bovina), motivo por el cual se consideró válida la utilización de agua destilada para el resto de comparaciones. De igual forma, en el resto de experimentos se registraron únicamente las medidas de peso obtenidas con la balanza de precisión (en gramos o microgramos), ya que el objetivo de los mismos era medir las variabilidades registradas en varias series de aplicaciones con una o varias pistolas, más allá de comprobar el volumen exacto administrado en cada una de ellas.

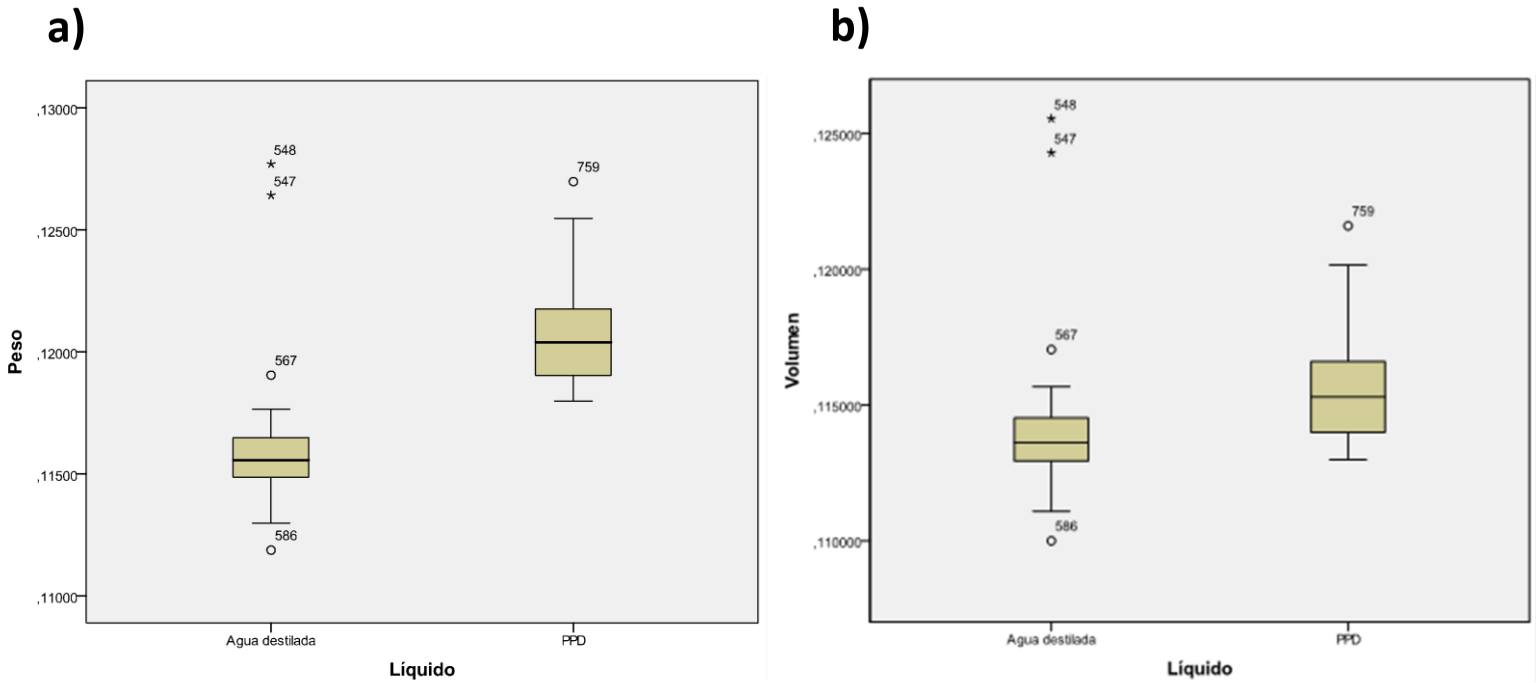

Figura 2. Diferencias observadas en los 40 primeros disparos realizados con agua destilada y PPD bovina con una misma pistola DERMO JET. a) pesos registrados en cada disparo con la balanza de precisión; b) volúmenes administrados en cada pesada (estimados a partir de la densidad calculada en cuatro pesadas de cada líquido).

Los tres estudios realizados mediante esta metodología tuvieron los siguientes objetivos:

A. Estudio de la precisión de la pistola en cada una de las 50 administraciones ("disparos") permitidas en cada carga.

B. Estudio de la variabilidad observada en los disparos registrados en varias cargas con una única pistola.

C. Análisis de la variabilidad en los registros obtenidos con 3 pistolas DERMO JET distintas.

Para llevar a cabo estos estudios se utilizaron 3 pistolas DERMO JET (1, 3 y 4). Al igual que en el caso anterior, cada vez que se cargó una pistola se realizaron dos disparos al vacío para purgar la pistola de aire (por ello el primer disparo registrado en los análisis sería en realidad el tercero tras la carga).

A) Estudio de la precisión de la pistola en cada una de las 50 administraciones ("disparos") permitidas en cada carga:

Las tres pistolas DERMO JET analizadas demostraron una limitada variabilidad en la cantidad de líquido depositado en cada uno de los primeros 40 disparos realizados tras cada carga (Tabla 2 y figura 3). No obstante, la repetitividad en la administración de líquidos en cada disparo de una misma carga fue diferente en función de la pistola empleada, con rangos de variación oscilando entre 9 y 28 µl.

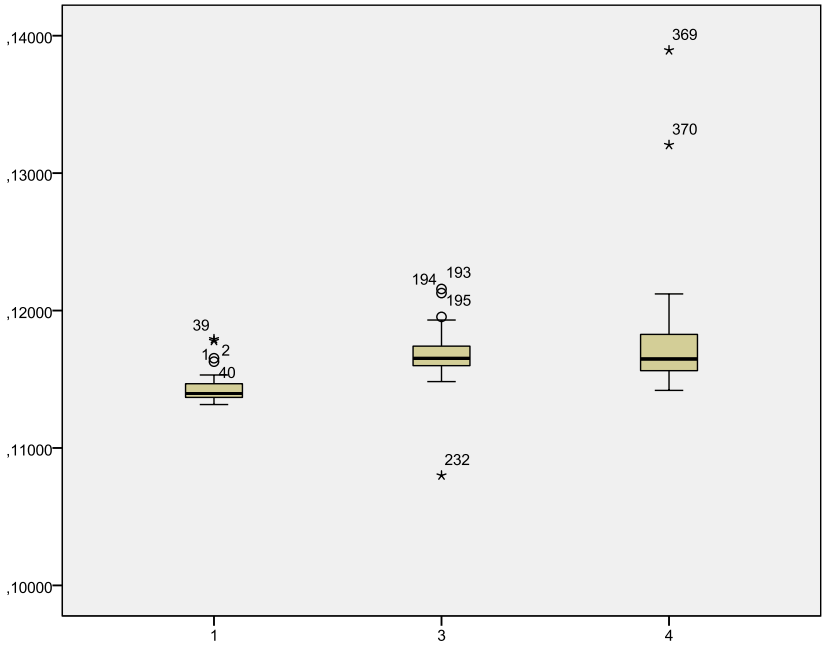

Figura 3. Cantidades administradas (en mg) por las pistolas 1, 3 y 4 en las primeras 40 pesadas de una carga.

Tabla 2. Valores máximos, mínimos, centrales y dispersión de los volúmenes administrados por las pistolas 1, 3 y 4 en las primeras 40 pesadas de una carga.

Pistola	Valor máximo	Valor Mínimo	Rango	Media	Mediana	Desviación típica
1 (Agua)	117,92	113,16	8,99	112,8	113,1	1,6
3 (Agua)	123,41	108	15,4	116,65	116,9	2,2
4 (Agua)	138,94	111,48	27,5	116,7	116	3,8

Como se observa en la figura 4, la evolución de las cantidades administradas siguió un patrón común en las tres pistolas, con unos primeros volúmenes algo mayores (hasta el disparo 8-12) y una fase de mantenimiento.

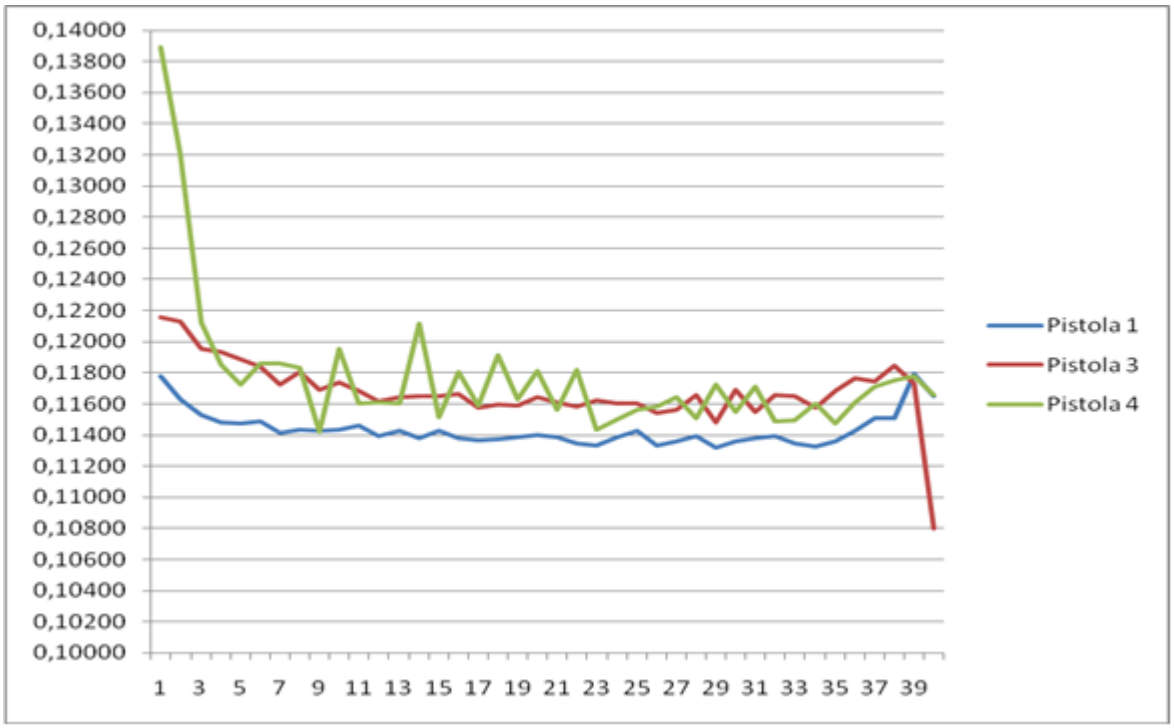

Figura 4. Evolución de las cantidades administradas por 3 pistolas en los primeros 40 disparos.

A partir del disparo 40 se produce un descenso marcado en el líquido depositado, de modo que en ningún caso se consiguen pesos superiores a 80 µg después del disparo 44 (y siendo difícil de hecho llegar a los 45 disparos) (Figura 5).

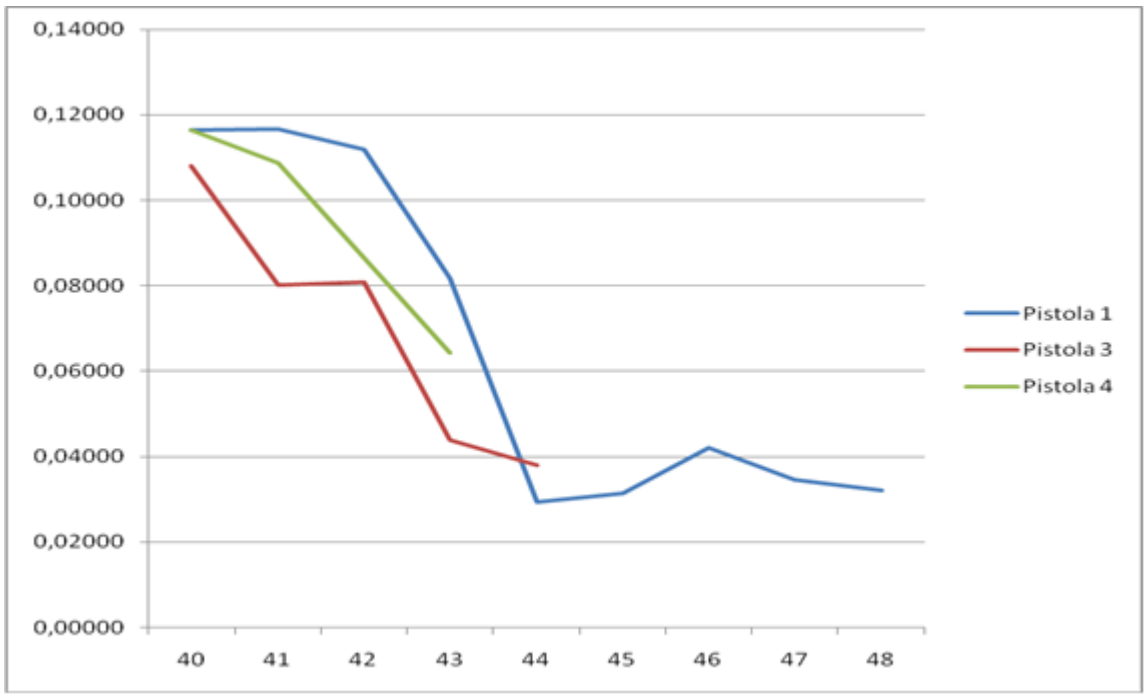

Figura 5. Cantidades administradas por las pistolas 1, 3 y 4 a partir del disparo número 40.

B) Estudio de la variabilidad observada en los disparos registrados en varias cargas con una única pistola:

A continuación se realizaron cuatro tandas con cada una de las 3 pistolas del estudio para determinar la variabilidad existente entre varias cargas con la pistola. En lo que hace referencia a los 40 primeros disparos de cada carga, mientras que en la pistola 1 se observó un cierto efecto descendente, en las pistola 3 éste fue menos evidente, y en la 4 pareció ausente (figuras 6-7).

Dado que las diferencias entre tandas parecen ser más acusadas conforme se hacen más cargas, se analizó la diferencia existente entre la primera y la última (cuarta) carga en las tres pistolas. En las 3 pistolas la diferencia existente entre las pesadas fue menor de 10 µg, siendo la media de la diferencia entre las tandas algo mayor en la primera pistola (media=3,4, IC 95% 3,01-3,79) que en las otras dos (pistola 3, media=2,16, IC 95% 1,29-3,02 y pistola 4, media=1,55, IC 95% 0,66-2,43) (figura 8 y 9).

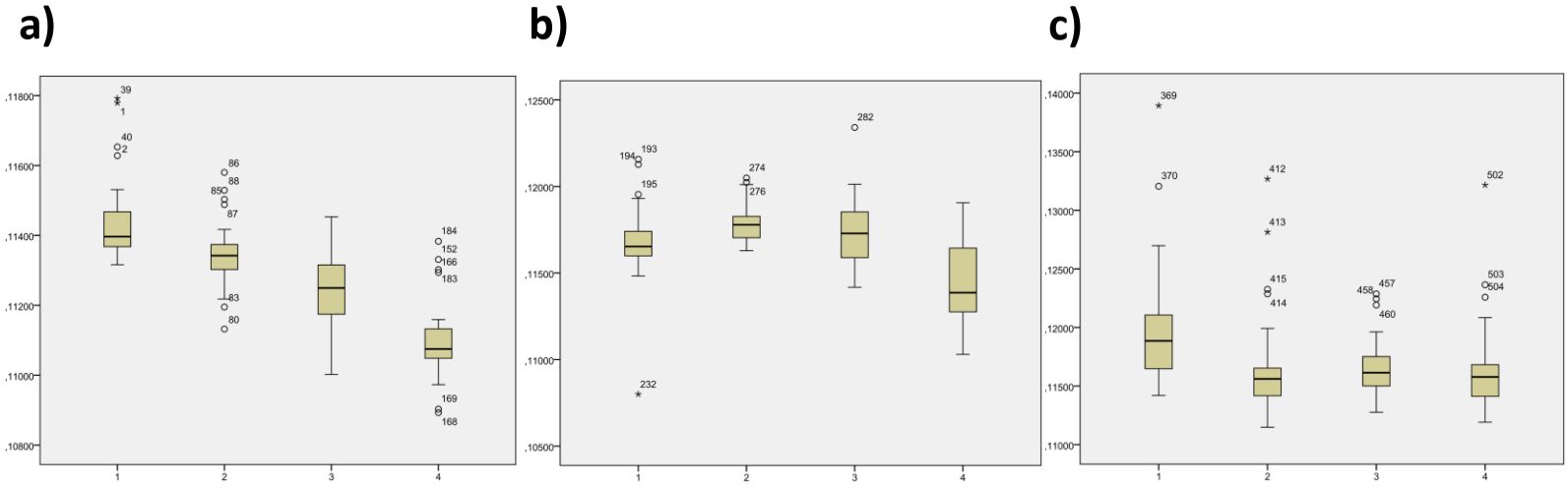

Figura 6. Cantidades administradas (en mg) por las pistolas 1 (a), 3 (b) y 4 (c) en cuatro cargas sucesivas.

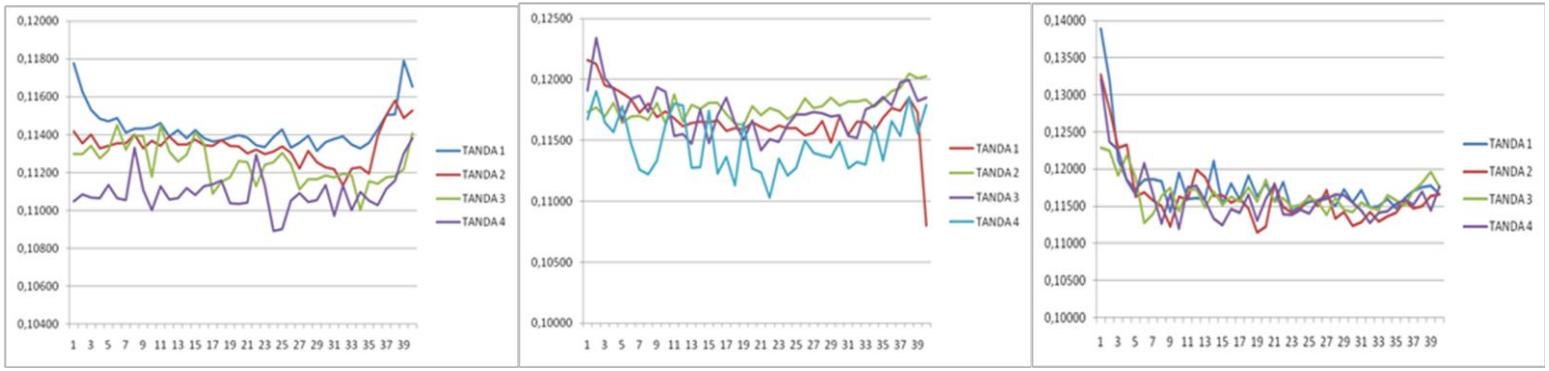

Figura 7. Evolución de las cantidades administradas (en mg) por las pistola 1 (a), 3 (b) y 4 (c) en los primeros 40 disparos de cuatro cargas sucesivas.

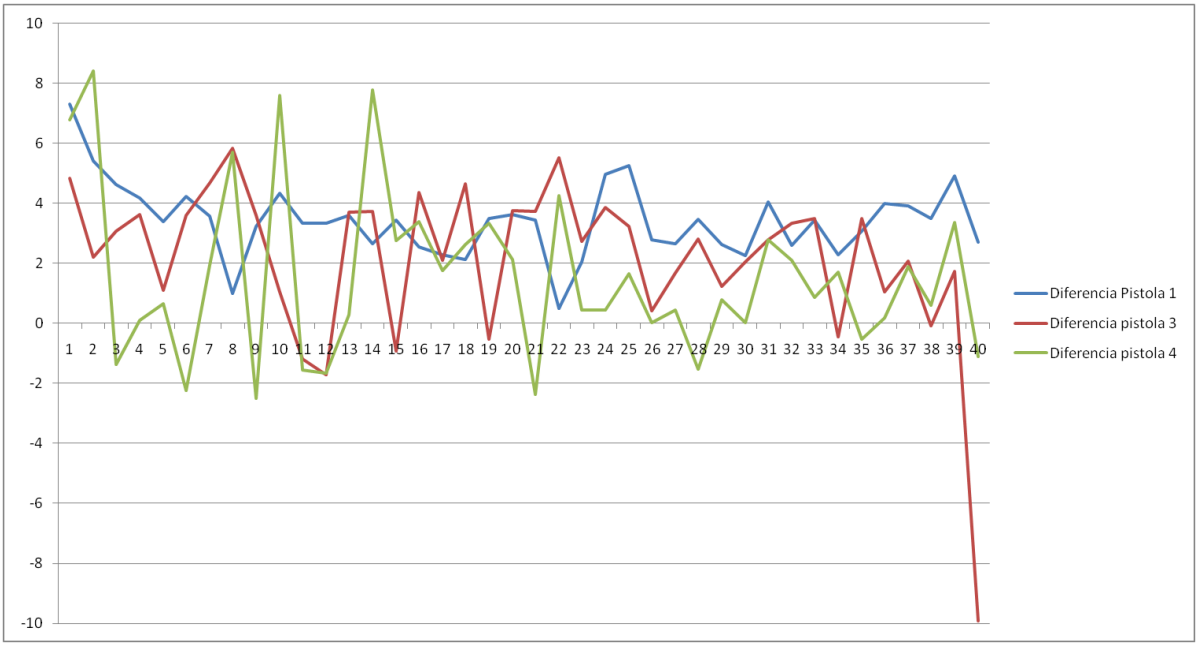

Figura 8. Diferencia (µg) entre la primera y la cuarta tanda en los 40 primeros disparos de cada una (realizado con las tres pistolas).

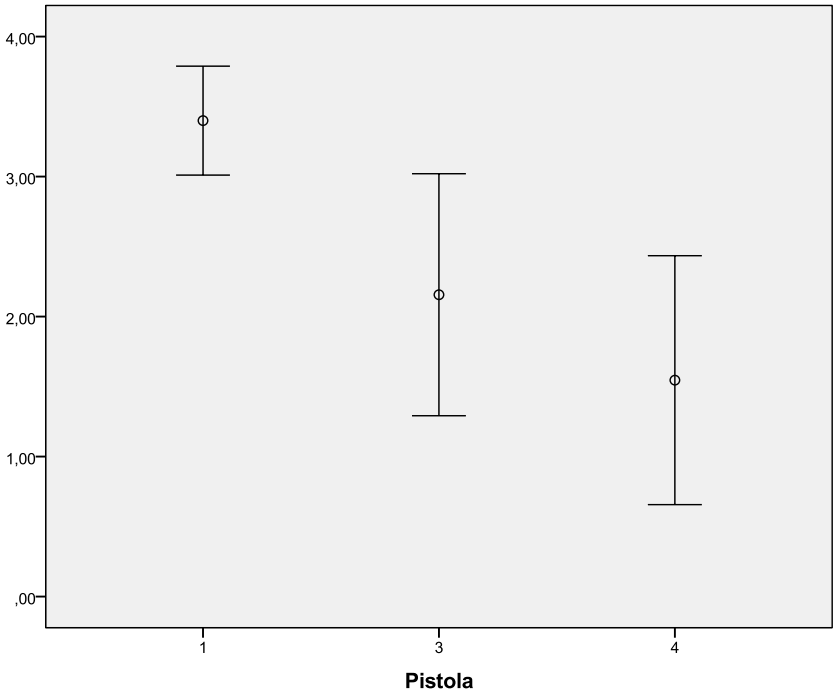

Figura 9. Media e intervalo de confianza al 95% de las diferencias obtenidas entre la primera y la cuarta tanda para cada una de las tres pistolas analizadas (µg).

C) Análisis de la variabilidad en los registros obtenidos con 3 pistolas DERMO JET distintas:

Los valores obtenidos con cada una de las 3 pistolas fueron comparados entre sí con el fin de determinar si se encontraban diferencias importantes entre ellos. Como ya se puede esperar, viendo los rangos de resultados obtenidos en las pruebas anteriores, las diferencias fueron reducidas, con valores máximos de 30 µg y una diferencia media entre pistolas de 1-2 µg. Las diferencias fueron mayores cuando se utilizó la pistola 4 en la comparación (figura 10).

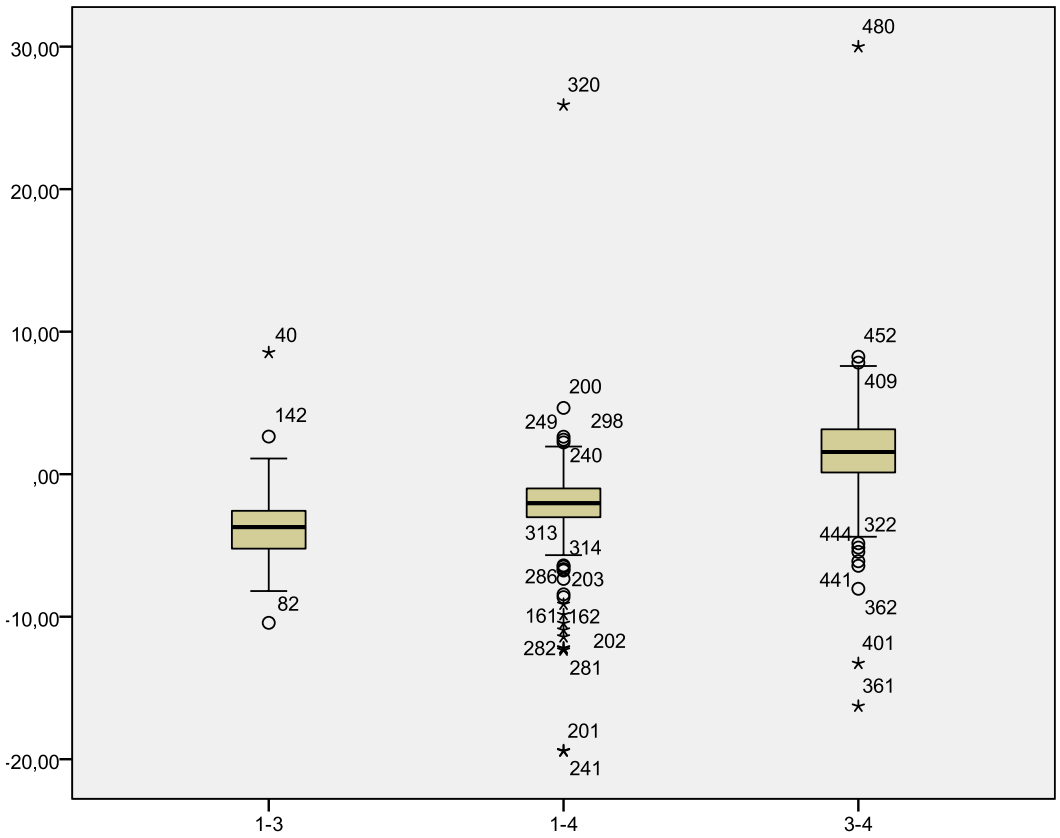

Figura 10. Diferencias entre las distintas pistolas (1, 3 y 4).

Conclusiones

Los resultados obtenidos en este ensayo descriptivo demuestran que:

- La pistola DERMO JET ofrece una buena precisión en los primeros 40 disparos tras cada carga, y después de haber sido purgada dos veces.
- Los volúmenes administrados en cada disparo parecen ser ligeramente superiores a los esperados (10-20 µl más de los 100 µl teóricos), si bien esta diferencia no parece suficiente para originar cambios significativos en el resultado de la prueba de la tuberculina.

- Al ir repitiendo tandas las cantidades administradas se mantienen en márgenes parecidos, si bien en algunos casos puede observarse un cierto descenso en el líquido depositado en cada disparo. No obstante, en cuatro tandas consecutivas (suficientes para 160 animales en condiciones de campo) la diferencia media observada entre la primera y la cuarta tanda medida se mantuvo por debajo de los 4 µg.
- Los resultados utilizando PPD bovina son similares que los observados con agua destilada aunque los pesos registrados fueron algo superiores. No obstante, la mayor densidad de aquella compensa en parte esta diferencia.

Hay que tener en cuenta que todos estos ensayos han sido realizados en condiciones de laboratorio con pistolas que han tenido un uso poco frecuente, por lo que sería necesario determinar el tiempo que esta herramienta mantiene la precisión tras un uso mantenido durante varios meses. Dada la importancia de una correcta inoculación de la PPD bovina para garantizar la máxima fiabilidad de la prueba de la tuberculina, se recomienda seguir las instrucciones de mantenimiento del fabricante (revisión de la junta teórica R3 cada 3.000 disparos).

Servicio de Micobacterias

Centro de Vigilancia Sanitaria Veterinaria (VISAVET)
Universidad Complutense Madrid

Evaluación del efecto de los desinfectantes incorporados en la pistola de inoculación intradérmica McLintock sobre la capacidad antigénica de las tuberculinas

Las pistolas de inoculación McLintock incorporan unos tapones con un desinfectante para asegurar que durante el proceso de inoculación de varios animales con el mismo aparato no se produce ninguna contaminación de unos animales a otros. No obstante, para asegurar que esos desinfectantes no afectaban a la capacidad antigénica de las tuberculinas bovina y aviar inoculadas con la pistola, se realizó la siguiente prueba: la sangre de 30 animales, recogida dentro del contexto del programa de erradicación de la tuberculosis bovina, se analizó mediante la prueba de detección de interferón-gamma (IFNγ) siguiendo dos protocolos paralelos:

- Una parte de la sangre se analizó en el laboratorio siguiendo el protocolo estándar: tres alícuotas de 1.5 ml cada una fueron repartidas en sendos pocillos y estimuladas respectivamente con 100 µl de PPD bovina, 100 µl de PPD aviar y 100 µl de PBS (como control de estimulación) administradas utilizando una micropipeta de laboratorio previamente calibrada.
- Otra parte de la muestra de cada animal fue alicuotada y estimulada de idéntica forma, pero en este caso las PPDs bovina y aviar y el PBS se depositó en los pocillos utilizando la pistola de inoculación intradérmica McLintock, dotada del sistema de desinfección mencionado anteriormente.

Posteriormente, el plasma de cada una de las muestras estimuladas se recogió siguiendo el protocolo habitual (centrifugación 15 minutos a 2500 rpm) y fue analizado mediante el ELISA específico para la detección de IFNγ de rumiantes Bovigam (Prionics, Suiza). Las medidas obtenidas en los 30 animales mediante los dos protocolos se presentan en la tabla 1. Como se puede observar, en términos cualitativos la utilización de la pistola en lugar de la micropipeta dio lugar al mismo número total de animales detectados, si bien uno de éstos (número 12) fue positivo al utilizar la pistola únicamente, y de forma análoga un animal

(número 25) solo ofreció un resultado positivo cuando el protocolo se realizó con la micropipeta. En ambos casos esta diferencia puede explicarse debido a lo próximo que estaban los valores de ambos animales a los respectivos puntos de corte (0.05 en un caso, y mayor o menor que el valor aviar, en el otro), por lo que pequeñas variaciones mínimas hicieron que el resultado de la prueba cambiara. A pesar del bajo número de muestras analizadas, y a esta discordancia, la concordancia obtenida mediante la aplicación de ambos protocolos en el ELISA de detección de IFNγ fue elevada (kappa=0.712).

Tabla 1. Valores obtenidos en el test de detección de IFNγ mediante la estimulación de las sangres utilizando una micropipeta y la pistola de inoculación intradérmica McLintock

Animal	Micropipeta			Pistola		
	IFN av	IFN bov	IFNresult	IFN av	IFN bov	IFNresult
1	0,1659	0,0290	0	0,3068	0,0672	0
2	0,0438	0,0682	1	0,0703	0,1284	1
3	-0,0028	-0,0053	0	0,0133	0,0042	0
4	0,1757	0,0136	0	0,3520	0,1122	0
5	0,0407	0,0128	0	0,0520	0,0170	0
6	0,4061	0,0784	0	0,5004	0,1553	0
7	0,0277	0,0080	0	0,0267	0,0044	0
8	0,0058	0,0022	0	0,0075	0,0020	0
9	0,2072	0,0573	0	0,2717	0,1045	0
10	0,0429	0,0471	0	0,0888	-0,0166	0
11	0,1556	0,1025	0	0,1978	0,1058	0
12	0,0247	0,0191	0	0,0519	0,0522	1
13	0,0303	0,0082	0	0,0346	0,0122	0
14	0,0896	0,0338	0	0,1277	0,0553	0
15	0,1271	0,0102	0	0,1274	0,0322	0
16	0,0405	0,0450	0	0,0595	0,0431	0
17	0,1656	0,0699	0	0,4636	0,1871	0
18	0,0501	0,0253	0	0,0589	0,0215	0
19	0,0067	0,0028	0	0,0077	0,0007	0
20	0,0422	0,0322	0	0,0924	0,0287	0
21	0,0896	0,0446	0	0,1948	0,0675	0
22	0,0198	0,0110	0	0,0255	0,0105	0
23	0,2477	0,2426	0	0,4452	0,2265	0
24	0,0010	0,0072	0	0,0063	0,0058	0
25	0,5548	0,6200	1	0,7733	0,6841	0
26	0,2417	1,1063	1	0,2598	0,9668	1
27	0,6557	1,0405	1	0,9226	1,2587	1
28	0,1031	0,0549	0	0,1241	0,0631	0
29	0,1141	0,0459	0	0,1443	0,0577	0
30	0,1562	0,0692	0	0,2274	0,0708	0

En lo que hace referencia al valor cuantitativo obtenido en los análisis, se observa que al utilizar la pistola los valores son ligeramente superiores en el caso del IFNbov, y marcadamente superiores en el caso del IFNav (figuras 1 y 2). Para ambos antígenos, en todo caso, queda demostrado que su inoculación mediante la pistola automática a través de los sistemas desinfectantes no disminuyen su capacidad antigénica, sino que en todo caso los valores obtenidos son más altos (posiblemente debido a una mejor estimulación de la sangre al utilizar la pistola debido a una mezcla más efectiva de las PPDs con las muestras. La comparación de los resultados obtenidos utilizando ambos antígenos revela, en efecto, que tanto en el caso de la estimulación con PPD bovina (test de Wilcoxon=-2.458, p=0.014) como en el de la PPD aviar (prueba T para muestras pareadas, t=-4.357, p<0.001) los valores obtenidos al estimular las muestras utilizando la pistola McLintock fueron mayores que cuando se empleó la micropipeta.

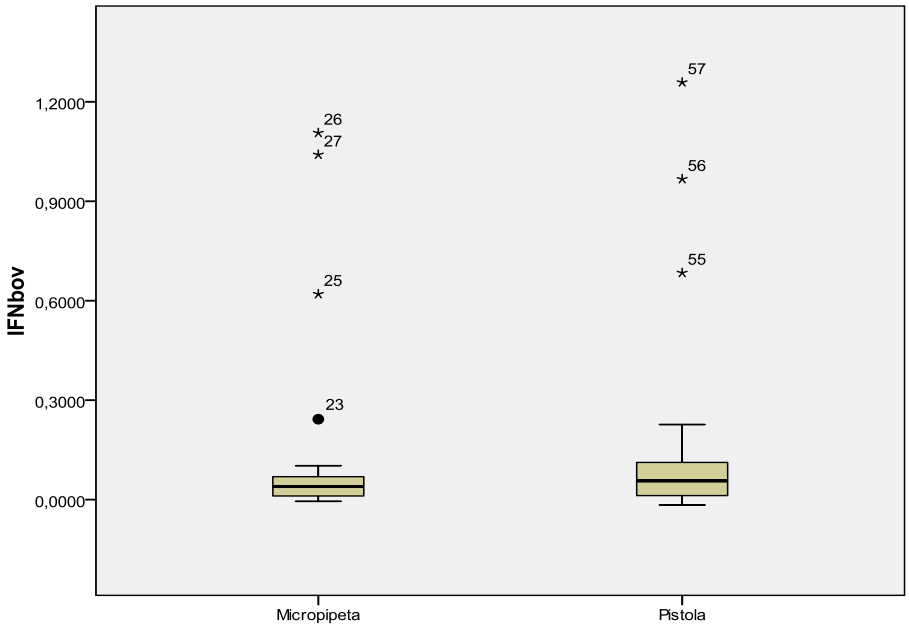

Figura 1. Distribución de los valores obtenidos tras la estimulación con PPD bovina utilizando una micropipeta o la pistola de inoculación intradérmica (DO, resultado de la resta del valor obtenido tras la estimulación con PBS del obtenido en el pocillo estimulado con PPD bovina)

Por último, para valorar el grado de precisión para inocular la cantidad de 100 µl de la pistola de inoculación intradérmica McLintock se realizaron 100 medidas utilizando este aparato, que fueron pesadas en una báscula de precisión, y se compararon con otras 100 realizadas con una micropipeta de laboratorio calibrada.

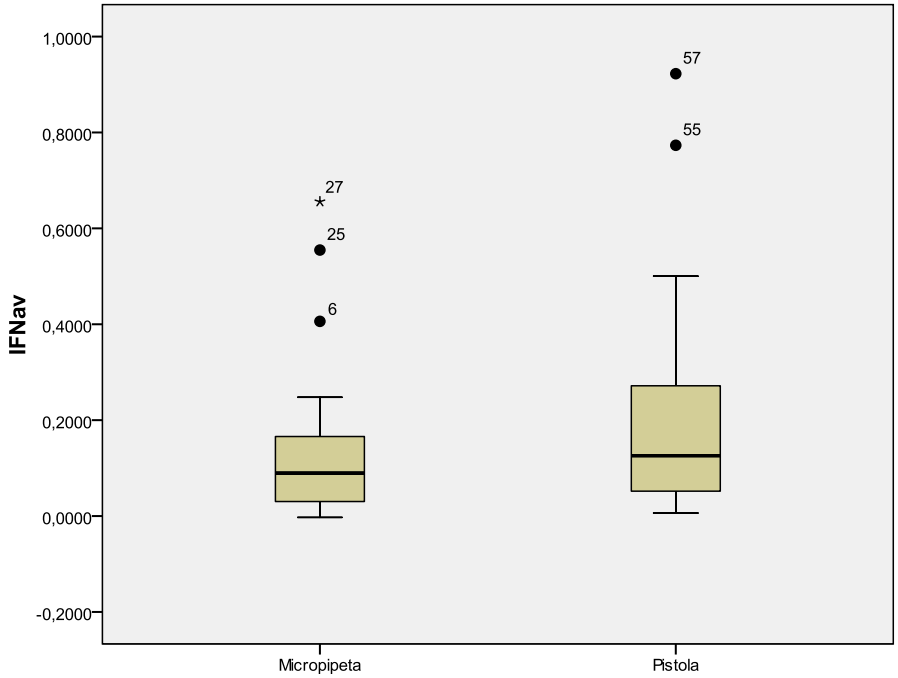

Figura 2. Distribución de los valores obtenidos tras la estimulación con PPD aviar utilizando una micropipeta o la pistola de inoculación intradérmica (DO, resultado de la resta del valor obtenido tras la estimulación con PBS del obtenido en el pocillo estimulado con PPD aviar)

En el caso de la micropipeta, se obtuvo una gran precisión en el conjunto de las 100 medidas, con valores muy próximos a 100 en todos los casos (figura 3) y oscilando entre un mínimo de 98.2 y un máximo de 107.46.

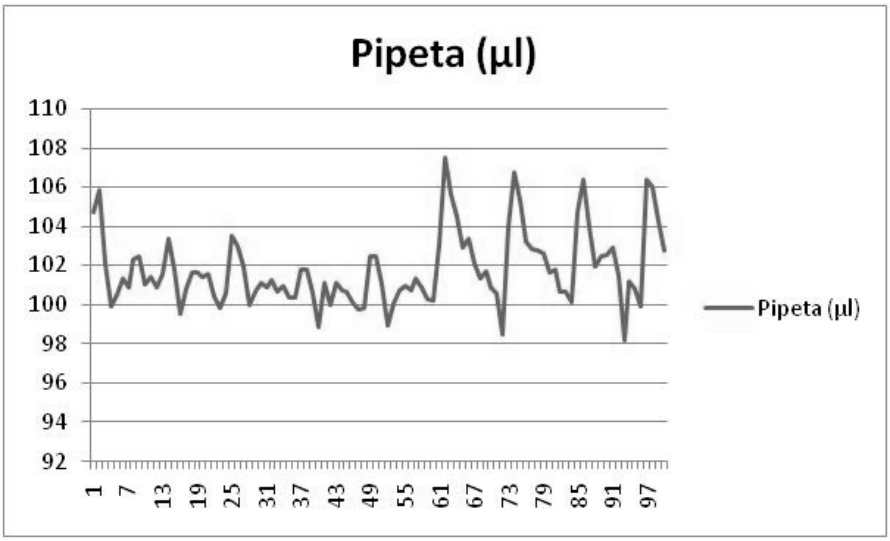

Figura 3. Volumen inoculado en 100 pesadas al alicuotar 100 µl utilizando una micropipeta

En el caso de la pistola McLintock, la variabilidad observada fue mayor, atendiendo a dos factores fundamentalmente: dado que una vez que la pistola se carga se pueden efectuar un total de 20 disparos, el primero y el último de cada serie tenían valores más altos y más bajos que el resto, respectivamente (figura 4); la segunda fuente de variabilidad fue la persona encargada de realizar la inoculación, ya que en función de cómo se utilizara la pesada podía modificarse sensiblemente. Por ello solo se incluyen en la figura 4 las pesadas realizadas por un mismo operario.

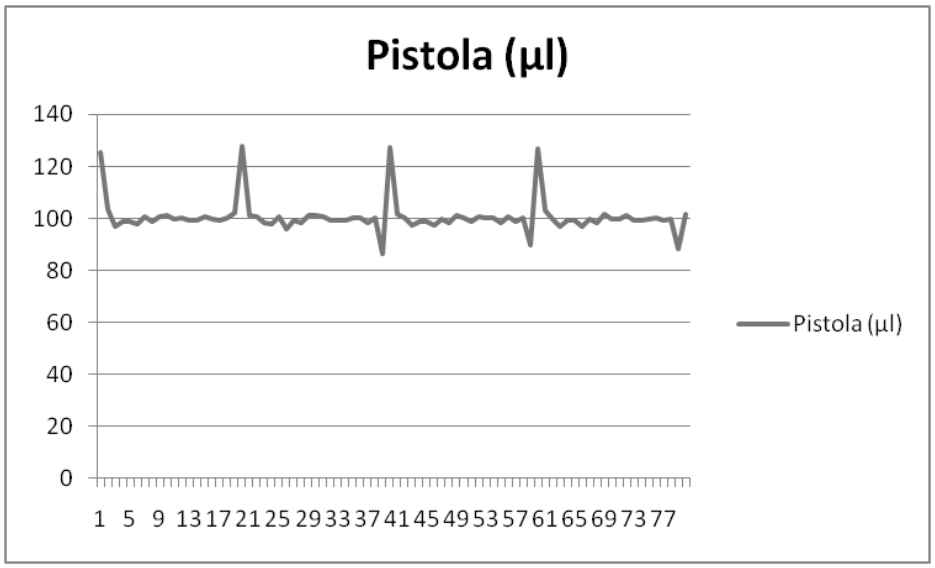

Figura 4. Volumen inoculado en 100 pesadas al alicuotar 100 µl utilizando la pistola McLintock

En conjunto utilizando la micropipeta el volumen inoculado fue ligeramente superior que al emplear la pistola automática (101,61, 95% IC 101,24-101,98 frente a 99,43, 95% 97,73-101,13), lo que descarta que los mayores valores obtenidos al analizar los 30 animales se debieran a un mayor volumen de antígeno utilizado. De cualquiera de las maneras, la pistola McLintock demostró una aceptable precisión al inocular 100 µl, excepción hecha de los primeros y últimos disparos hechos en cada carga de la pistola.

Servicio de Micobacterias

Centro de Vigilancia Sanitaria Veterinaria (VISAVET)
Universidad Complutense Madrid

Memoria justificativa para la realización de una prueba de campo para la valoración de la jeringa DERMO JET y su posible uso en la ejecución del programa nacional de erradicación de la tuberculosis bovina

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.

Los Programas Nacionales de Erradicación frente a esta enfermedad comenzaron a aplicarse en los años 60, centrados fundamentalmente en el vacuno lechero, para posteriormente extenderse al ganado de aptitud cárnica. A partir de 1986, con la entrada de España en la CEE, el programa empieza a aplicarse de forma sistemática.

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 2007, 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 mediante la Decisión 2006/875/CE.

Las pruebas de diagnóstico oficial están definidas en el Anexo B de la Directiva 64/432/CEE y modificaciones, con especial relevancia las contempladas por el Reglamento 1226/2002 en lo que se refiere a la técnica e interpretación de la 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.

Intradermotuberculinización simple (IDTBS)

La IDTBS es la prueba de rutina a utilizar en el marco del Programa Nacional de Erradicación de la tuberculosis bovina 2007-2010, 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 un 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 resutado 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.

Técnica de aplicación 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.

Intradermotuberculinización de comparación (IDTBC)

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.

La utilización de la IDTBC está contemplada en el Programa Nacional de Erradicación de Tuberculosis Bovina presentado por España para los años 2007-2010 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 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 investigación que se considere necesaria para realizar un diagnóstico diferencial que confirme o descarte 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 por dosis.

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 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 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.

Posteriormente se inocula las dosis de tuberculinas por un método que asegure su administración por vía intradérmica. Para ello se ha utilizado hasta la fecha una pequeña aguja estéril y una jeringa graduada. La aguja es 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.

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.

El espesor del pliegue de piel en cada punto de inoculación volverá a ser medida y anotada a las 72 horas (+/- 4 h) de la inoculación.

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:

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.

JUSTIFICACIÓN DE LA PRUEBA DE CAMPO

Petición de varias Comunidades Autónomas de la valoración de la jeringa denominada "DERMO JET" para su posible uso en la ejecución por los equipos de campo del Programa Nacional de Erradicación de la Tuberculosis Bovina. El funcionamiento de dicha jeringa permite la inyección de las tuberculinas sin aguja y sin necesidad de contacto con la piel de los animales, lo que facilita el manejo y el bienestar de los mismos por la ausencia de dolor y las mayores condiciones de asepsia. Así mismo, disminuye el riesgo de accidentes para el aplicador por la ausencia de agujas.

La descripción del aparato, su funcionamiento y las técnicas de inyección vienen especificadas en la ficha técnica (anexo I).

La prueba de campo se centrará en valorar la fiabilidad de la jeringa de forma que la técnica de inyección asegure la aplicación intradérmica y la correcta lectura a las 72 horas, en comparación con los métodos tradicionales. Así mismo se valorará su facilidad de uso y mantenimiento por SVO y los equipos de campo respecto a las jeringas tradicionales, y otras cuestiones relativas al bienestar de los animales.

DESARROLLO DE LA PRUEBA DE CAMPO

Se procederá a la realización de la técnica de diagnóstico IDTBS en 2 rebaños de diferente aptitud seleccionados por sus diferentes características en cuanto a su manejo y al grosor de su piel y presencia de pelo, de forma que se valore la correcta administración de la PPd bovina en las distintas condiciones de campo. Por ello, un rebaño será de aptitud láctea y raza Frisona y otro de aptitud cárnica y raza Avileña-Negra Ibérica o Limusina.

Ambos rebaños estarán formados por un número de animales tal que permita valorar la aplicación y lectura de la reacción a la tuberculina en un mínimo de 50 animales mayores de 6 semanas de edad.

En la prueba participarán técnicos veterinarios de 3 ámbitos de actuación diferentes dentro del Programa Nacional de Erradicación de la Tuberculosis Bovina, todos ellos con una experiencia contrastada en sus respectivas responsabilidades y, principalmente, en la realización de las pruebas de diagnóstico de la tuberculosis bovina:

1. MARM: veterinarios responsables de la elaboración, planificación y coordinación del Programa Nacional de Erradicación de la Tuberculosis Bovina, pertenecientes a la Subdirección General de Sanidad de la Producción Primaria.

2. Junta de Castilla y León: veterinarios responsables de la planificación, coordinación, supervisión y ejecución de las pruebas de campo a nivel provincial y local, pertenecientes a la Sección de Sanidad Animal de Ávila y a la Unidad Veterinaria de San Pedro del Arroyo.

3. AVESCAL: veterinarios pertenecientes a un equipo de campo encargado de la realización de las pruebas de campo dentro de las campañas de saneamiento ganadero y bajo supervisión de los SVO.

La valoración final de la idoneidad de la jeringa DERMO JET para su posible uso en las pruebas de campo será realizada por los técnicos del MARM tomando como base los resultados de la prueba y la valoración personal que resulte de la ejecución de la técnica por parte de los SVO de la Junta de Castilla y León y del equipo de campo que participan en este ensayo. Para ello, cada veterinario participante valorará, como mínimo, las siguientes variables:

- facilidad del manejo de la jeringa, tanto en lo relativo a la carga de la tuberculina como en su posterior inoculación
- correcta administración intradérmica de la PPd bovina: valoración de los posibles fallos y sus causas. Se comprobará la formación de una "lenteja" en el punto de inoculación.
- facilidad en cuanto al mantenimiento de las jeringas
- facilidad en el manejo y el bienestar de los animales por la ausencia de dolor durante la inoculación
- valoración de las ventajas e inconvenientes respecto a los métodos tradicionales de inoculación de las tuberculinas
- presencia o ausencia de reacciones inespecíficas o adversas en el punto de inoculación asociadas a la técnica de administración
- valoración personal respecto a la fiabilidad de DERMO JET en comparación con las técnicas tradicionales de administración con jeringa automática/individual y aguja.

Para cada una de las variables anteriores, cada veterinario asignará una puntuación entre 0 y 10 para el método DERMO JET; para el método tradicional, se ha asignando a éste un valor de referencia de 5. Para que el resultado de la prueba de campo se considere favorable, será imprescindible que la puntuación obtenida al menos en el segundo y en el último guión por DERMO JET sea igual o superior a la de los métodos tradicionales (> o = 5).

Las conclusiones de esta prueba de campo serán presentadas al Grupo de Trabajo de Tuberculosis Bovina y al Comité Nacional del Sistema de Alerta Sanitaria Veterinaria, indicarán la conveniencia o no del uso de la jeringa DERMO JET adicionalmente a los métodos tradicionales existentes, y serán consideradas dentro del ámbito de las evaluaciones de riesgo que permitan a los gestores de riego una correcta toma de decisiones en el desarrollo y planificación del Programa Nacional de Erradicación de la Tuberculosis Bovina.

RESULTADOS

Previamente a su uso se realizó en laboratorio una medición de 100 disparos para comprobar que las pistolas usadas inoculaban el volumen correcto de PPd bovina, comprobándose que estaban correctamente calibradas.

Se realizó la inoculación el 02/07/2007 de la PPd bovina en un total de 53 animales en el rebaño de leche (unos 10 animales por evaluador) y 108 animales en el rebaño de carne (unos 20 animales por evaluador). A las 72 horas se efectuó la lectura de las reacciones, siendo todos los animales negativos a la prueba y con ausencia de reacciones inespecíficas. Los resultados por evaluador se relacionan en la siguiente tabla:

EVALUADOR	Raquel	Juan Carlos	Damián	Equipo 1	Equipo 2	VF
Correcta administración intradérmica	7	6	6	6	8	6,6
Facilidad manejo jeringa	5	5	4,5	4	5	4,7
Facilidad mantenimiento	5	5	6	5	7	5,6
Facilidad manejo y bienestar animales	7	6	6	5	5	5,8
Ventajas e inconvenientes respecto a tradicionales	7	6	5	5	5	5,6
Valoración personal respecto a tradicionales	7	6	5	5	5	5,6
Reacciones inespecíficas o adversas	5*	5	5	5	5	5
VALORACION TOTAL POR EVALUADOR	6,14	5,57	5,36	5	5,7	5,55
VALORACION FINAL	**5,55**					

* este evaluador no participó en la lectura, por lo que se le asigna el valor medio de los demás evaluadores.

Como se especificaba en el apartado de justificación de la prueba de campo, este estudio debe centrarse principalmente en la fiabilidad obtenida para asegurar la aplicación intradérmica de la tuberculina y la correcta lectura a las 72 horas, de acuerdo con lo establecido en el anexo B de la Directiva 64/432/CEE.

La mejor valoración obtenida por la jeringa DERMO JET es en uno de estos apartados, el de asegurar la correcta administración intradérmica, con un valor de 6,6 respecto a los métodos tradicionales de jeringas manuales o automáticas con aguja. Cabe reseñar que en todos los animales se apreció correctamente la aparición de la "lenteja", más evidente en los animales de aptitud lechera, lo que tiene especial importancia sobre todo en animales jóvenes de piel fina. Respecto a la correcta lectura a las 72 h, hubo ausencia de reacciones inespecíficas o adversas, al igual que ocurre con los métodos tradicionales.

En el resto de valoraciones, DERMO JET obtiene mayor puntuación que los métodos tradicionales excepto en la facilidad de manejo de la jeringa. Esto se considera normal al ser la primera vez que todos los evaluadores utilizaban la jeringa, mientras que las jeringas tradicionales las han usado con regularidad y durante mucho tiempo, y dado que la

realización de la técnica conlleva un protocolo habitual de manejo, la introducción de un elemento novedoso implica ciertas dificultades hasta su utilización de forma rutinaria y en el tiempo.

Respecto a la comparación entre la valoración de los evaluadores, no existen diferencias entre el equipo de campo y los Servicios Veterinarios Oficiales respecto a los parámetros de correcta administración intradérmica, facilidad del manejo de la jeringa o facilidad de mantenimiento, pero sí en los referidos a la facilidad de manejo y bienestar de los animales, ventajas y valoración personal respecto a los métodos tradicionales, donde la valoración por parte de los SVO es superior a la del equipo de campo.

Finalmente, respecto a la valoración total por evaluador, cuatro de los cinco evaluadores asignan una puntuación final a la jeringa DERMO JET superior con respecto a los métodos tradicionales, mientras que el quinto evaluador asigna una puntuación igual. La valoración final de la jeringa es de 5,5 puntos, con lo que se considera **APTA** y recomendable para su uso en la ejecución de las pruebas intradérmicas de la tuberculosis bovina dentro del Programa Nacional de Erradicación de la Tuberculosis Bovina. Así mismo, se consideran aptas jeringas equivalentes a la evaluada, siempre que cumplan sus prescripciones técnicas.

AGRADECIMIENTOS

La Subdirección General de Sanidad de la Producción Primaria quiere agradecer la excelente colaboración prestada por los Servicios Veterinarios Oficiales de la Junta de Castilla y León en la planificación y ejecución de esta prueba de campo, y especialmente a las personas que directamente han participado en el desarrollo de la misma:

Sección de Sanidad y Producción Animal de Ávila:

Tomás de la Hera: preparación y organización de la prueba de campo
Raquel Ranea: evaluador
Juan Carlos Blázquez: evaluador

Unidad Veterinaria de San Pedro del Arroyo

Damián Blázquez: preparación de la prueba de campo y evaluador

Equipo de campo AVESCAL:

Cristina Martín: coordinación equipo de campo
Manuela Patón: evaluador
Elena Rodríguez: evaluador

Esta prueba de campo ha sido elaborada y coordinada por José Luís Sáez Llorente, de la Subdirección General de Sanidad de la Producción Primaria del MARM.

CONCLUSIONES

La aplicación de sistemas de inoculación automática para la realización de la prueba de la IDTB puede suponer una importante mejora en la estandarización de la técnica, ya que permite si son utilizadas adecuadamente asegurar la correcta inoculación y administración de las tuberculinas, minimizando la posibilidad de errores del operario en la inyección derivados del uso de jeringas manuales. Los estudios incluidos en el presente informe tenían como objetivo evaluar su precisión en condiciones de laboratorio y su aplicabilidad en condiciones de campo. Los resultados presentados permiten concluir que:

- La pistola DERMO JET permite una adecuada dosificación de las tuberculinas siguiendo el protocolo recomendado (dos disparos al aire tras cada carga para purgar el exceso de aire y realización de no más de 40 disparos por tanda).

- Los desinfectantes utilizados en la pistola McLintock para minimizar el riesgo de contaminación cruzada en la realización de las pruebas en el bovino no tienen un efecto apreciable sobre la capacidad antigénica de las tuberculinas, basándose en la valoración en la prueba de detección de IFNγ. De igual forma, esta pistola muestra una precisión apreciable en la administración de 100 microlitros, si bien el hecho de que tenga una aguja constituye una desventaja con respecto a la pistola DERMO JET.

- La evaluación en condiciones de campo de la pistola DERMO JET por parte de operarios experimentados en la realización de la prueba de la IDTB demuestra que es una herramienta fiable, segura y eficaz, ofreciendo un rendimiento igual o superior a otros métodos tradicionales (sistemas de inoculación con aguja).

Protocolo de utilización e informe de valoración del uso de pistolas de inoculación intradérmica

GOBIERNO DE ESPAÑA
MINISTERIO DE MEDIO AMBIENTE Y MEDIO RURAL Y MARINO

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

VISAVET
CENTRO DE VIGILANCIA SANITARIA VETERINARIA
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE
MADRID

Madrid, 4 de abril de 2011
Diseño: Sergio González Domínguez (VISAVET-UCM)