	Instructivo Tuberculosis Prueba de Interferón Gamma	INS 507-17 Versión 01 Fecha vigencia: 13/04/17
Elaborado: RC	Aprobado: DT	Pág. 1 de 2

Objetivo:

Obtener y manipular correctamente las muestras para diagnóstico de Tuberculosis en rumiantes por medio de la técnica de Interferón Gamma (IFNG).

Alcance:

Muestras de plasma (sangre con anticoagulante) de Bovinos, Ovinos y Caprinos.
Sobrenadantes de cultivo.

Introducción:

La Tuberculosis es una enfermedad infecciosa de los animales y humanos (zoonosis), causada por el agente *Mycobacterium bovis* y otras bacterias del complejo *Mycobacterium tuberculosis*.

La Tuberculosis bovina suele tener un curso prolongado y los signos pueden tardar desde meses hasta años en manifestarse. Entre ellos se encuentran: debilidad, anorexia, pérdida de peso, fiebre fluctuante.

Los programas de control tienen como objetivo la detección temprana, a fin de minimizar el riesgo de transmisión.

En Argentina, la única prueba oficial para certificación de rodeos es la Intradermo reacción (IDR) en el pliegue ano caudal con Tuberculina PPD Bovina y también se puede utilizar la prueba doble comparativa con PPD Bovina y Aviar, en la tabla del cuello.

La prueba de IFNG es utilizada como complemento de la IDR con el fin de mejorar la detección de animales infectados, en rodeos con TBC persistente o con alta prevalencia.

La ventaja radica en que el test puede ser repetido tantas veces como sea necesario, sin la necesidad de aguardar 60 días, tal lo requerido para la IDR.

El método de IFNG utiliza un ELISA sándwich para detectar la respuesta celular a *Mycobacterium bovis*, midiendo la diferencia de respuesta de IFNG, en muestras de plasma activadas con antígenos específicos (PPD bovina) e inespecíficos (PPD aviar). La prueba incluye un control de activación (Mitógeno) y un control de negativo de activación (no-activación).

Estudios estadísticos han demostrado una sensibilidad del 88.3% y una especificidad del 99%.

Desarrollo:

Materiales remitidos / necesarios


- Gradillas
- Tubos con anticoagulante Heparina
- Jeringas, agujas
- PRO 404 REG02 Pedido de Determinaciones
- Etiqueta para envío de encomienda
- Refrigerantes

Extracción, preparación de las muestras

Extraer la muestra de sangre en condiciones de asepsia y colocarla en un tubo conteniendo **heparina** (17 U/mL). No utilizar EDTA como anticoagulante. Llenar los tubos hasta la marca, tapar y proceder a la homogenización, mediante inversión suave (mínimo 10 movimientos).

Conservar las muestras refrigeradas entre 15 y 22°C, para asegurar la sobrevivencia de los Linfocitos.

Remitir las muestras al laboratorio, recordando que deberán ser procesadas **dentro de las 16 hs de extraídas** (ideal: entre 6 a 8 hs. post colecta).

	Instructivo Tuberculosis Prueba de Interferón Gamma	INS 507-17 Versión 01 Fecha vigencia: 13/04/17
Elaborado: RC	Aprobado: DT	Pág. 2 de 2

Demora en el envío

En caso de no poder cumplir con los tiempos requeridos y de contar con los materiales necesarios, se podrá hacer la activación de las muestras, para luego enviarlas con más tiempo:

Materiales necesarios:

- Tubos, preferentemente estériles (cuatro por muestra)
- Microplaca estéril de 96 pocillos (opcional)
- Viales tipo eppendorf (cuatro por muestra)
- Micropipeta o pipeta, con capacidades para medir 0.2 y 0.02 mL
- Agitador
- Centrífuga
- Estufa a 37°C

1. preparación de la sangre:

Homogeneizar la muestra de sangre entera, trasvasar 0.2mL a cuatro tubos o a cuatro pocillos de microplaca de 96 wells, en condiciones de esterilidad.

2. adición de los antígenos de estimulación:

Agregar 20 uL de TBC PPD bovina (estimulación específica) al primer tubo; 20uL de TBC PPD aviar (estimulación inespecífica) al segundo; 20 uL de Mitógeno (control de estimulación) al tercero y 20uL de PBS (control de no-estimulación) al cuarto tubo de la misma muestra.

Mezclar la placa o los tubos durante 3 – 5 minutos (500 rpm)

Incubar la placa o los tubos a 37°C en cámara húmeda, por 18 – 24 hs

Centrifugar 10 minutos a 3000g

Trasvasar el sobrenadante (no se deben aspirar los glóbulos rojos) a un vial (uno por tubo).

A partir de este momento, se podrá:

Conservar la muestra a 5°C y enviarla dentro de las 72 hs

Conservar la muestra en freezer (< -16°C) y enviarla dentro de los tres meses

Acondicionamiento

Ubicar las muestras dentro de la caja isotérmica de modo que no hayan pérdidas por volcado de tubos y agregar refrigerantes

Completar el formulario de remisión de muestras (PRO 404 REG02 Pedido de Determinaciones)

Rotular la caja con la etiqueta de envío

Envío

Por transporte, comisionista, correo, etc.; avisando al laboratorio del momento, forma de envío y número de guía.

Aclaración:

Un buen diagnóstico depende fundamentalmente de una buena toma de muestra. El laboratorio no podrá hacerse responsable de los resultados obtenidos a partir de muestras mal extraídas.