



**La tuberculosis bovina en el contexto europeo.
European Reference Laboratory for Bovine Tuberculosis
y el subgrupo de la Task Force.**





Bioseguridad Nivel 3



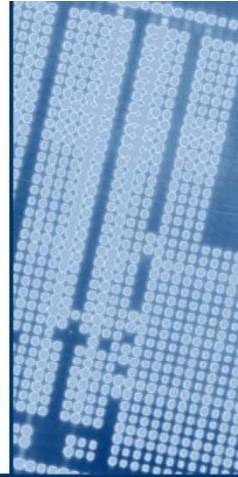
Salud Animal



Salud Pública



Seguridad Alimentaria

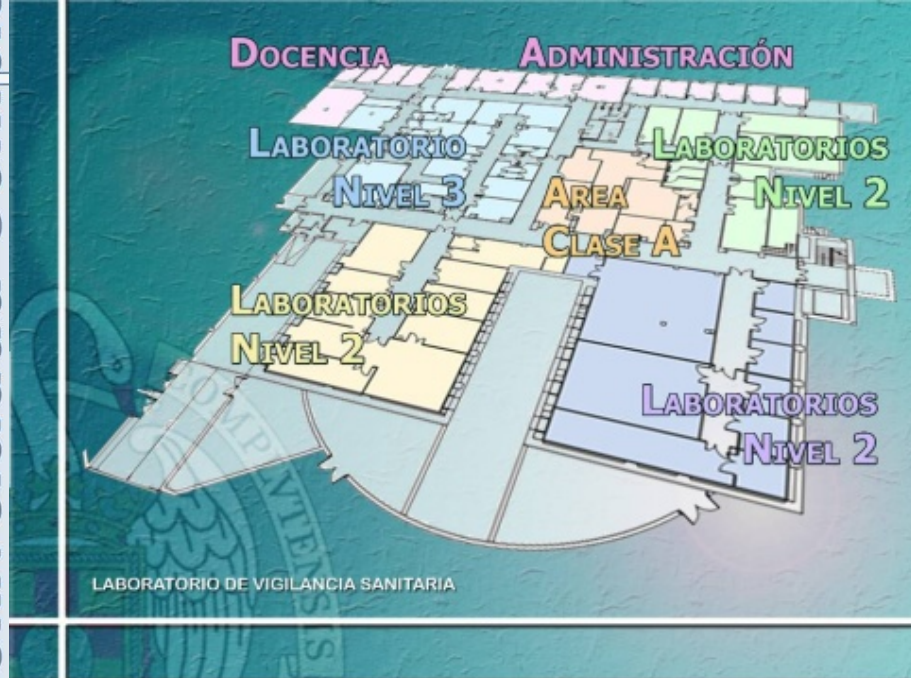


Medio Ambiente



Universidad Complutense

Centro de Vigilancia Sanitaria Veterinaria **VISAVET**



Centro de
Vigilancia Sanitaria Veterinaria
Universidad Complutense

Avda. Puerta de Hierro s/n.
28040 Madrid

Spain

Tel.: 913 944 083

FAX: 913 943 795

visavet@vet.ucm.es

www.vigilanciasanitaria.es

Equipamiento



- Lab. Nivel 3: cultivo, extracción ADN
- Lab. Inmunología: estimulaciones sangre y ELISAS
- Lab. PCRs: zona limpia, zona intermedia, zona sucia
- Pruebas de campo: explotaciones, granja experimental y animalario del nivel 3





**EUROPEAN COMMISSION
HEALTH & CONSUMERS
DIRECTORATE-GENERAL
Directorate D – Animal Health and Welfare
Unit D1- Animal health and Standing
Committees**

COMMUNITY REFERENCE LABORATORY FOR BOVINE TUBERCULOSIS

ACTIONS PLANNED UNDER THE 5-YEAR PROPOSAL



CENTRO DE VIGILANCIA SANITARIA VETERINARIA
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE

www.vigilanciasanitaria.es

- Laboratorio Comunitario de Referencia de tuberculosis bovina (EC) No 737/2008.
- Artículo 32 de (EC) No 882/2004 y responsabilidades y tareas adicionales estipuladas en el Anexo II del reglamento de la Comisión (EC) No 737/2008.

El plan de trabajo descrito en la propuesta se dirige a la implementación en el de tareas específicas del CRL dedicadas a:

- (1) Maximizar las interacciones entre los Estados Miembros mediante colaboraciones activas;
- (2) Armonizar los protocolos entre los países de la Unión Europea;
- (3) Contribuir a los objetivos científicos, técnicos y relacionados con la regulación que sean propuestos por la Comisión.



Responsabilidades y tareas

1. Coordinación de los métodos utilizados en los estados miembros para el diagnóstico de la tuberculosis bovina.

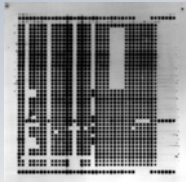
1.1. Aislamiento e identificación de *Mycobacterium* spp.

- Diagnóstico bacteriológico
- Cultivo en medio sólido y líquido + PCR



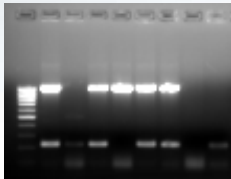
1.2. Caracterización de cepas de *Mycobacterium* spp.

- DVR-spoligotyping
- Análisis MIRU/VNTR



1.3. Colección de cultivos de *Mycobacterium* spp.

- *M. bovis* y *M. caprae*
- Otros patógenos



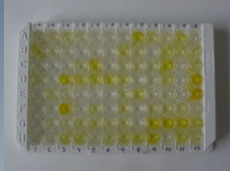
1.4. Base de datos de cepas aisladas en la Unión Europea.

- *M. bovis* y *M. caprae*
- Epidemiología: "cepas viajeras"



1. Coordinación de los métodos utilizados en los estados miembros para el diagnóstico de la tuberculosis bovina (cont.)

1.5. Validación de reactivos para pruebas inmunológicas.



- Ensayos de potencia de PPDs
- Prueba de interferon-gamma

1.6. Armonización de protocolos.

- Manual de procedimiento de metodologías

1.7. Preparación y control de reactivos de referencia.

1.8. Pruebas comparativas.

2. Organización de workshops y formación de personal.



3. Asistencia técnica a la Comisión.

4. Actividades de investigación.



Herramientas de diagnóstico:

- Tests de diagnóstico: IDTB (SIT, SICCT)
- Inspección en matadero

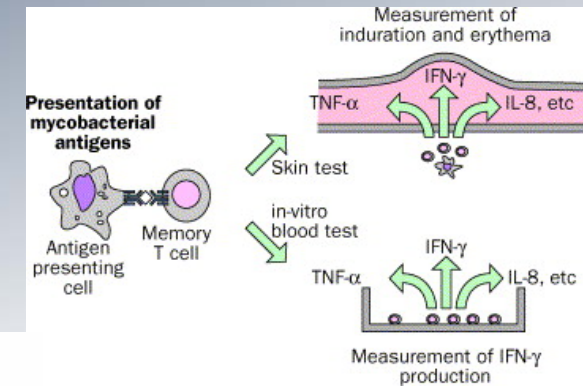
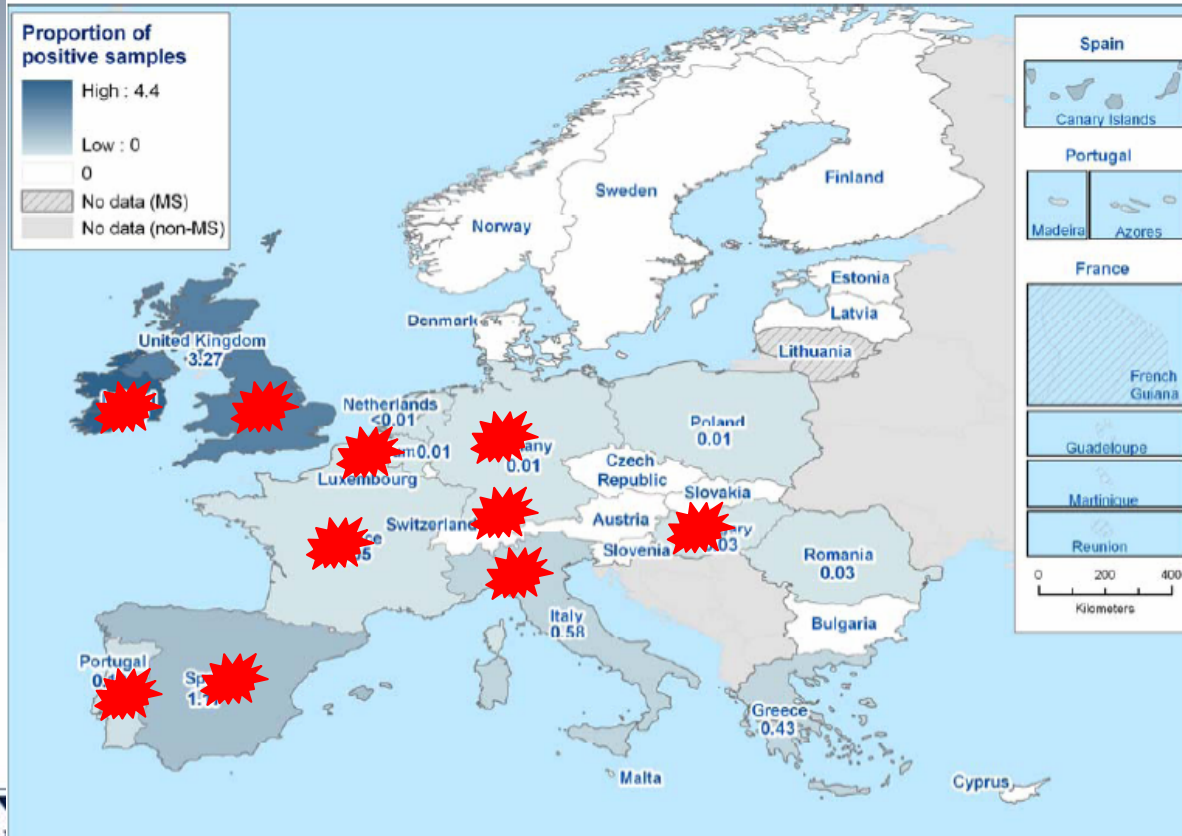
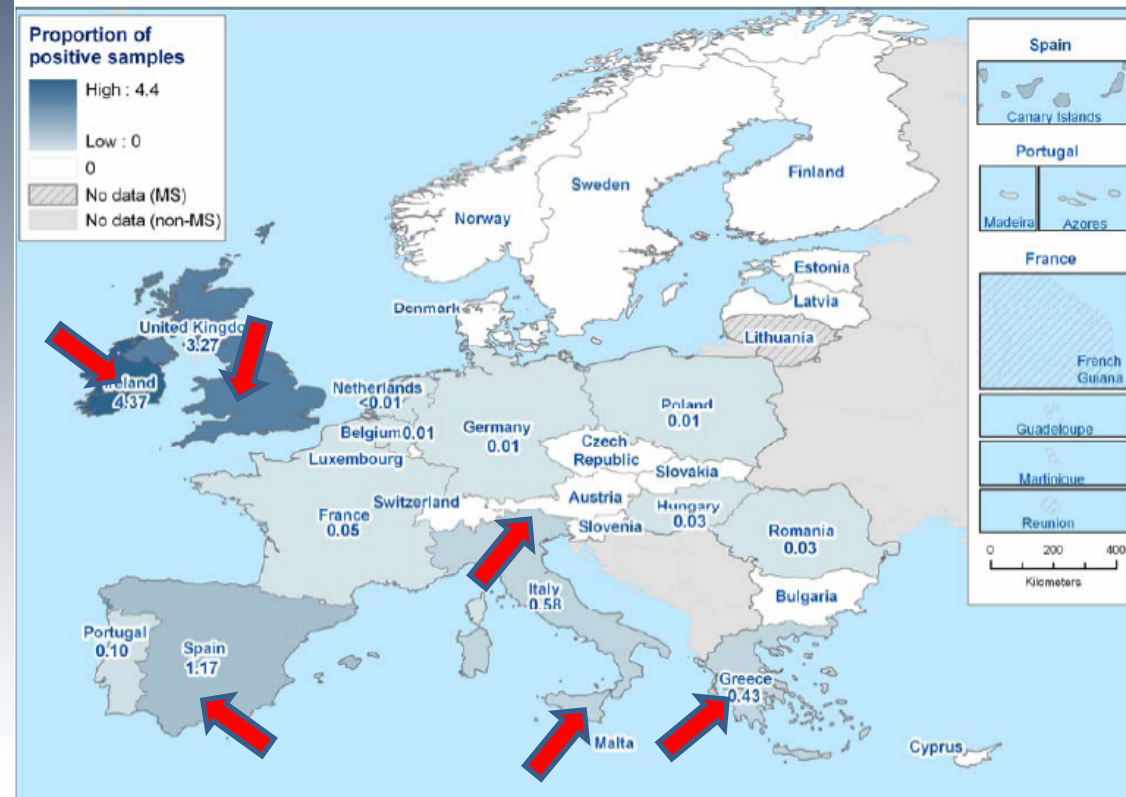


Figure TB3. Proportion of *M. bovis* infected/positive cattle herds, country based data, 2007



- Detección de interferon- γ
- ↓
- uso estratégico

Figure TB3. Proportion of *M. bovis* infected/positive cattle herds, country based data, 2007



En Europa:

- Diferente prevalencia
- "positivos": reactores vs. cultivo, *M. bovis* / *M. caprae*,
- "análisis de datos", ...
- Diferente epidemiología: tipo explotación, fauna, pastos alpinos, ...
- Diferentes programas: si/no, edad animales, tipo de prueba, frecuencia
- Regionalización



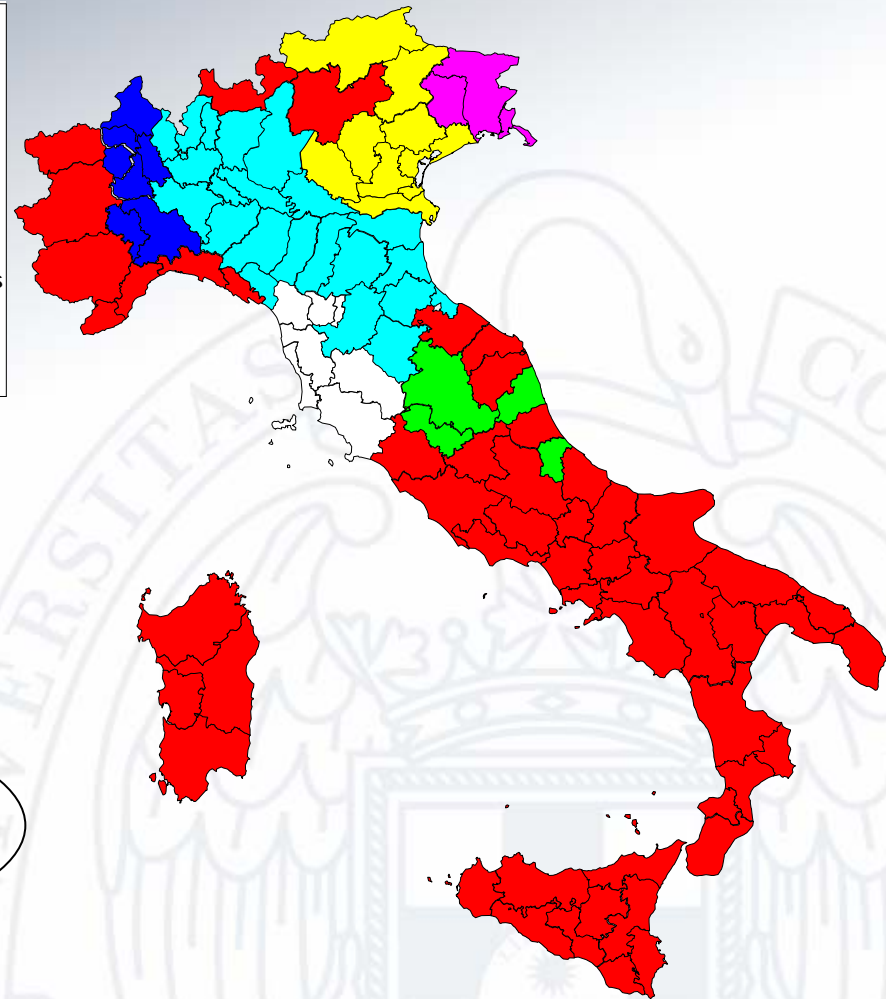
Frequency of routine testing applied in 2009

Italian provinces Controls in bovine and buffalo holdings

- All animals above 6 weeks of age in all holdings once a year
- All animals above 6 weeks of age in all holdings once every two years
- All animals above 6 weeks of age in all holdings once every three years
- No routine testing
- All animals above 24 months of age in all holdings once every two years
- All animals above 6 weeks of age in 50% of holdings once a year
- All animals above 6 weeks of age in 25% of holdings once a year

Morgan Avetta
Ministry of Health, Italia
(Brescia, Junio 2010)

→ Subgrupos de población
→ 100% en tres años



Subgrupo de la TASK FORCE

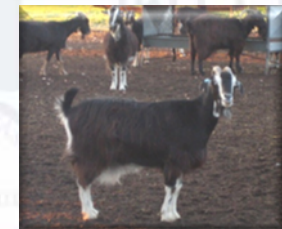
- Comisión (2), Suecia, Irlanda, UK, Italia, Portugal, España, EURL.
- Asesoría técnica.

Ministerio
Veterinarios
Matadero
Laboratorio
Ganadero



Programa erradicación
Estrategia largo plazo
Fases finales

- Desarrollo del programa
- Identificación de los animales - bases de datos
- Compensaciones
- Conocimiento de los problemas
- Estudios especiales (lidia, búfalo, fauna salvaje)



Puntos críticos:

- Formación de los veterinarios:
 - cursos
 - control de calidad
- Detección en matadero:
 - confirmación de positivos
 - zonas de riesgo
 - programa de muestreo de granulomas
- Red de laboratorios de Sanidad Animal
- Diagnóstico en el laboratorio y estudios de epidemiología
- Salud Pública (hospitales)



Ensayos de potencia PPDs

Tuberculina (PPD) bovina: *Mycobacterium bovis* cepa AN5

Tuberculina (PPD) aviar: *Mycobacterium avium* cepa D4ER

Standard EU de PPD bovina se produce en Lelystad (1962)

32500 UI / mg

Diferencias en los sistemas de producción:

European Pharmacopeia

- cepa (subcultivos)
- precipitación
- inactivación

Ensayos de potencia

- Cobayas (infección experimental)
- Reactores de campo

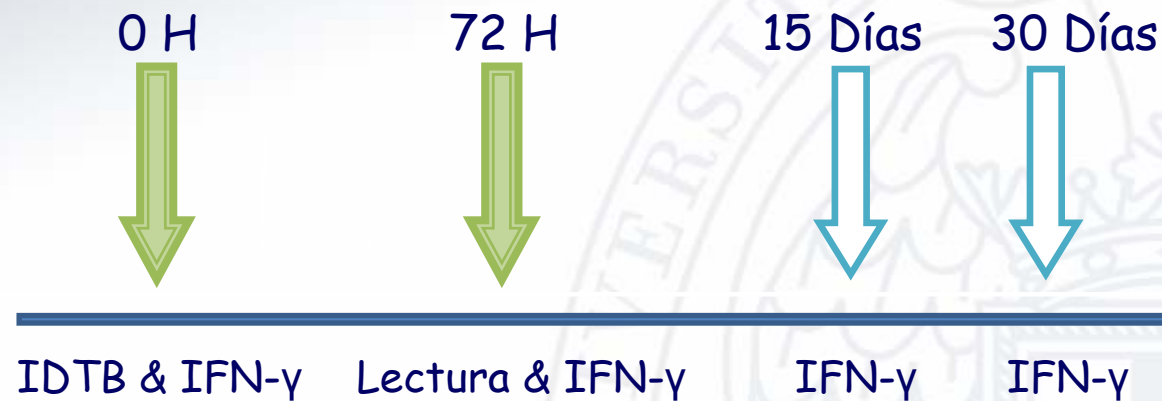
Uso en animales

- vacuno (1891, 1908), caprino, cérvidos, cerdos, primates, ...



OBJETIVOS

- Potencia de distintas tuberculinas
- Sensibilidad de la IDTB vs IFN- γ
- Efecto de la IDTB en el IFN- γ
- Efecto del tiempo hasta el cultivo en el IFN- γ



Standard internacional:

- PPD bovina, CVL Lelystad
- PPD aviar, SSI Denmark

[National Institute for Biological Standards and Control (HPA, UK)]



PPD bovina y PPD aviar:

- CZ Veterinaria S.A. (España).
 - Prionics A.G. (Holanda).
 - Istituto Zooprofilattico dell'Umbria e delle Marche (Italia).
 - WDT Serumwerk Memsen Wirtschaftsgenossenschaft deutscher Tierärzte eG (Alemania).
 - Bioveta, a.s. (República Checa)
-
- Antígenos sintéticos
 - Etlik Merkez Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsü Tuberküloz, Paratuberküloz & Ruam Laboratuvarı (Turquía)





Instalaciones del EURL para animales reactivos

- estudios I y III
- n = 21





Rebaño de frisonas
• estudio II
• n = 58





Inyección de PPDs con DermoJet

Cada PPD:

- 1 mg/mL → 0,1 mL
- 0,2 mg/mL

en cada animal se inyectan
ocho preparaciones de PPDs





Medida del incremento del grosor de la piel





Toma de muestras de sangre
para el IFN- γ assay



Tabla 1. Ensayo de potencia, estudio I [(n=12), reactivos ≥ 2 mm].

PPD	incremento piel	Relación con IS	I.U./ml
Bovine IS	5.625	1.00	32500
Bovine PPD (CZ)	5.333	0.9481	30812.89

Tabla 2. Ensayo de potencia, estudio II [(n=34), reactivos ≥ 2 mm].

PPD	incremento piel	Relación con NS	I.U./ml
NS PPD CZ	7.12	1.00	30812.89
Bovine PPD x	6.63	0.93	28692.34
Bovine PPD x	7.34	1.03	31764.97

Tabla 3. Ensayo de potencia, estudio III [(n=11), reactivos ≥ 2 mm].

PPD	incremento piel	Relación con IS	I.U./ml
NS PPD CZ	5.5	1.00	30812.89
Bovine PPD x	6.07	1.10	34006.23
Bovine PPD x	0.92	0.17	5154.16



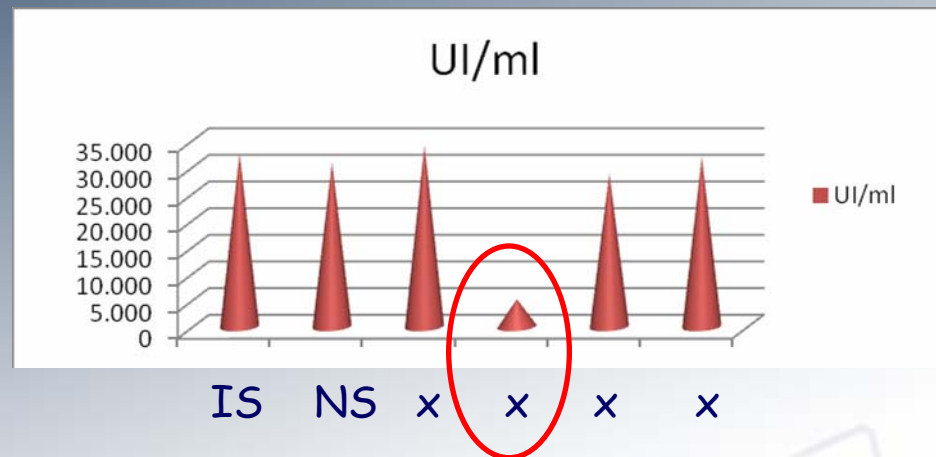
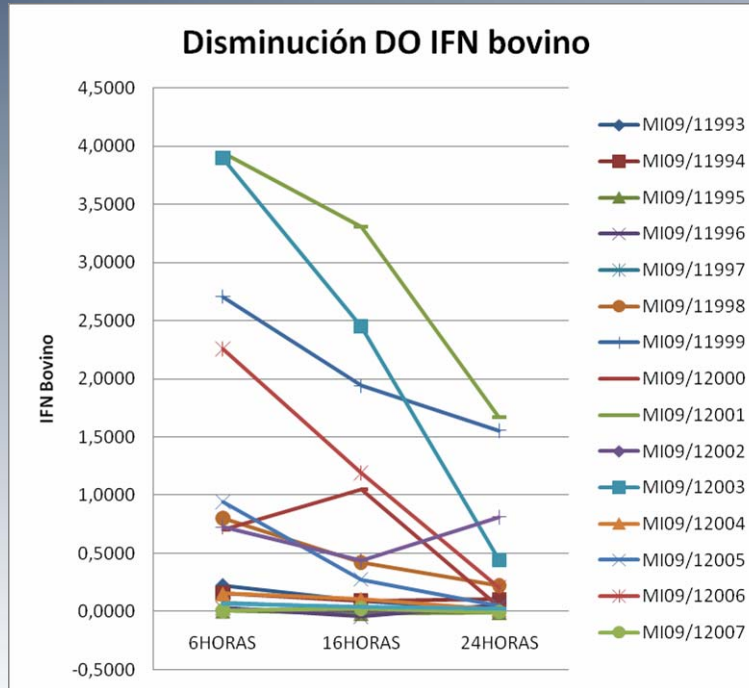


Tabla 4. Sensibilidad del IFN- γ assay con diferentes PPDs, estudio II.

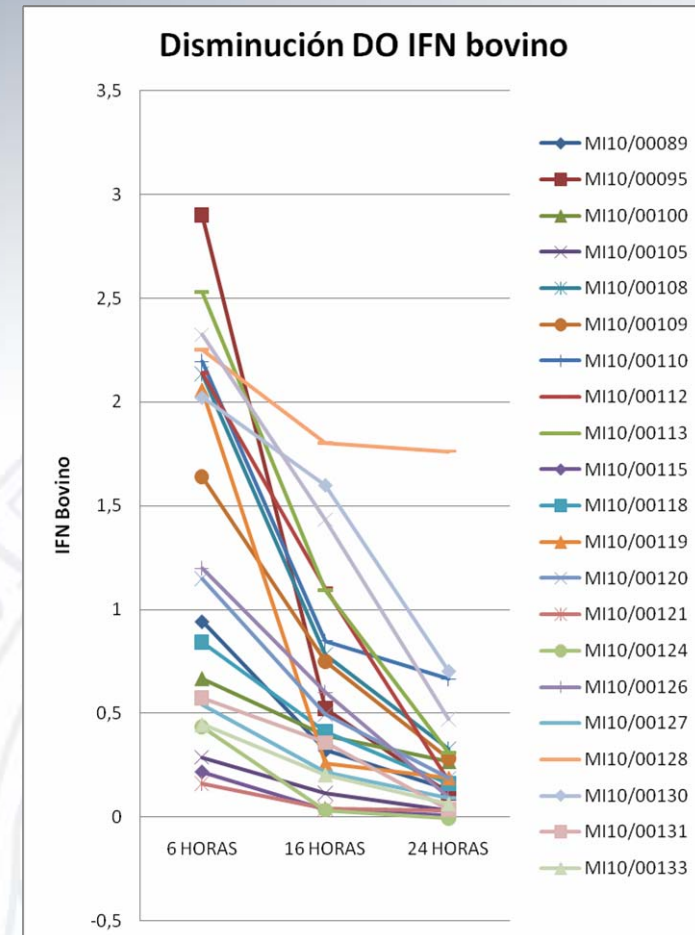
Criteria	PPD x	PPD x	PPD x
IFN bov > 0.05	43	50	41
IFN bov > 0.05 y > IFN aviar	37	24	34
IFN bov > 0.100 y > IFN aviar	34	24	31

Efecto del tiempo hasta cultivo:



1 grupo:
11 (8 hrs) - 10 (16 hrs) - 6 (24 hrs)

2 grupo:
20 (8 hrs) - 19 (16 hrs) - 17 (24 hrs)





Gracias por vuestra atención