

# Toma y envío de muestras para diagnóstico mediante PCR directa y cultivo microbiológico en infecciones por miembros del Complejo *Mycobacterium tuberculosis*

Programa Nacional de Erradicación de la Tuberculosis Bovina 2021



## Manuales de Procedimiento Sanitario

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE MADRID



GOBIERNO  
DE ESPAÑA

MINISTERIO  
DE AGRICULTURA, PESCA  
Y ALIMENTACIÓN



**Manual de procedimiento de toma y envío de muestras para diagnóstico mediante PCR directa y cultivo microbiológico en infecciones por miembros del Complejo *Mycobacterium tuberculosis***

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 permitida 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. It is not allowed the total or partial reproduction of this work 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.

© 2021 by Centro de Vigilancia Sanitaria Veterinaria (VISAVET). Universidad Complutense de Madrid.

Avenida Puerta de Hierro, s/n. 28040 Madrid  
Tel.: (+34) 913 943 975. Fax: (+34) 913 943 795  
sic@visavet.ucm.es  
www.visavet.es

© 2021 by Subdirección General de Sanidad e Higiene Animal y Trazabilidad. Dirección General de Sanidad de la Producción Agraria. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación (MAPA).

Calle Almagro, 33 - 2ª planta. 28071 Madrid  
Tel.: (+34) 913 478 297 Fax: (+34) 913 478 299  
sganimal@mapa.es  
www.mapa.gob.es

Primera edición: octubre 2021  
First edition: October 2021

Autores /Authors: Romero B., Bezos J., de Juan L., Lozano F.J., González S., Perales A., Sáez JL.

Diseño y Maquetación / Design and Layout : Servicio de Informática y Comunicación. VISAVET-UCM  
Impreso en España / Printed in Spain



# Índice

<b>1. Ámbito de aplicación</b>	<b>4</b>
<b>2. Muestras de tejidos y órganos para la detección mediante PCR directa y cultivo microbiológico</b>	<b>5</b>
Toma de muestras	5
Conservación de muestras	6
Envío de muestras al laboratorio	6
<b>3. Muestras de cultivo de micobacterias</b>	<b>7</b>
<b>4. Muestras de ADN de micobacterias</b>	<b>8</b>
<b>5. Perfiles de espoligotipado</b>	<b>10</b>
<b>6. Documentación a adjuntar en el envío de muestras</b>	<b>11</b>



# 1. Ámbito de aplicación

Este manual es aplicable a la toma de muestras y su envío al laboratorio para la detección y la identificación de los agentes etiológicos de la tuberculosis bovina, así como para el envío de cultivos con crecimiento positivo de micobacterias pertenecientes al **complejo *Mycobacterium tuberculosis* (CMT)**, ADN o perfiles de espigotipado de las mismas.

Para la detección del CMT mediante PCR directa sobre muestra, como alternativa al cultivo microbiológico para la confirmación de casos sospechosos, se utilizará el protocolo recomendado por el Laboratorio de Referencia de la Unión Europea (EURL) para la Tuberculosis Bovina, o protocolos homologables y publicados en cada momento en su página web. En el caso de establecimientos T3H ubicados en provincias declaradas oficialmente libres de CMT o que estén dentro del periodo de cumplimiento de las condiciones para ser declaradas como tales, para considerar un caso sospechoso como confirmado se requerirá siempre el aislamiento microbiológico del CMT.

► Laboratorio de contención biológica BSL-3 del EURL for bovine tuberculosis. Centro VISA VET. Universidad Complutense de Madrid.





## 2. Muestras de tejidos y órganos para la detección mediante PCR directa y cultivo microbiológico

### Toma de muestras

- **Presencia de lesiones compatibles:**

Si existen lesiones compatibles con tuberculosis debe recogerse la lesión/es incluyendo tejido sano adyacente, tanto de los linfonodos como de los órganos parenquimatosos afectados.

- **Ausencia de lesiones compatibles:**

Cuando el animal no presente lesiones patológicas se debe recoger para su examen y cultivo bacteriológico al menos un linfonodo de cada uno de los siguientes linfocentros:

1. Cabeza: retrofaríngeo y mandibular.
2. Cavidad torácica: mediastínico y bronquial.
3. Miembro torácico: cervical superficial o preescapular.
4. Cavidad abdominal: mesentérico y hepático.
5. Glándula mamaria: supramamarios.

El material patológico para la confirmación de CMT debe ser tomado de linfonodos y órganos parenquimatosos con lesiones compatibles con tuberculosis, tales como pulmón, hígado, bazo, etc. Real Decreto 2611/1996

Legislación

+ info

[www.mapa.gob.es](http://www.mapa.gob.es)

Laboratorio Central de Sanidad Animal (LCSA) Santa Fe (Granada)  
Ministerio de Agricultura y Pesca y Alimentación.

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

Centro de Vigilancia Sanitaria Veterinaria (VISAVET)  
Universidad Complutense Madrid

[www.bovinetuberculosis.eu](http://www.bovinetuberculosis.eu)

European Union Reference Laboratory for bovine tuberculosis  
European Commission



VISAVET



▲ Linfonodo con lesión compatible con tuberculosis.

Este material debe recogerse porque son las localizaciones más frecuentes de *M. bovis* y *M. caprae* en los animales, que están descritas en la literatura científica y/o porque así está contemplado en el protocolo EURL y el Manual de la Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE).

La toma de muestras, en el caso de que el cadáver corresponda a un animal procedente de un rebaño de estatuto T3, con la calificación suspendida por la aparición de algún reaccionante positivo en espera de confirmación, comprenderá obligatoriamente los **linfonodos mesentéricos** y al menos 4 de las 5 localizaciones anteriormente descritas, ya que en otro caso la toma de muestras se considerará no válida y el estatuto del rebaño será retirado, independientemente del resultado de la prueba de aislamiento efectuada sobre las muestras de linfonodos remitidos.

Las muestras deben recogerse de forma aséptica en botes con cierre de rosca resistente al escape de fluidos (tipo duquesa). Siempre que sea posible, los granulomas compatibles con tuberculosis y linfonodos deben enviarse al laboratorio sin seccionar para minimizar el riesgo de contaminaciones. En cada bote debe indicarse la identificación completa del animal, tipo de muestra biológica y fecha de recogida.

## Conservación de las muestras

Siempre que se pueda garantizar, la temperatura óptima de conservación de las muestras es de refrigeración (4°C) con un tiempo máximo de llegada al laboratorio de 24-36 horas. Si esto no fuera posible, es necesario mantenerlas en congelación (-20°C), lo que además permite prolongar el tiempo de envío.

## Envío de las muestras de tejidos al laboratorio

Antes de remitir un envío, deben contactar con el responsable del laboratorio autorizado donde vaya a realizarse la PCR directa o el cultivo bacteriológico. Las muestras se remitirán refrigeradas o congeladas según conservación previa, y acorde con la normativa de transporte de sustancias infecciosas.

El transporte de las muestras se realizará siguiendo lo descrito en la Guía Técnica del Real Decreto 664/1997 del 12 de mayo para la Evaluación y Prevención de los Riesgos relacionados con la Exposición a Agentes Biológicos. En caso de no disponer de esta guía puede contactar con la Subdirección de Sanidad e Higiene Animal y Trazabilidad del MAPA o los laboratorios colaboradores.

Legislación



### 3. Muestras de cultivo de micobacterias

Siempre que el laboratorio regional autorizado no pueda realizar la identificación y/o caracterización de micobacterias, el material se remitirá al Servicio de Micobacterias del Centro de Vigilancia Sanitaria Veterinaria (VISAVET) de la Universidad Complutense de Madrid o al Laboratorio Central de Sanidad Animal (LCSA) para su caracterización y registro en la Base de Datos Nacional de Micobacteriosis Animal (mycoDB.es).

En el caso de cultivos de micobacterias se remitirán los tubos de cultivo (sólido o líquido) que tengan un crecimiento sospechoso y/o positivo a micobacterias del CMT. El envío se realizará según la normativa de transporte de sustancias infecciosas. Se recomienda a los laboratorios la conservación de los aislados en medios de congelación adecuados y a una temperatura igual o inferior a  $-70^{\circ}\text{C}$ .

VISAVET



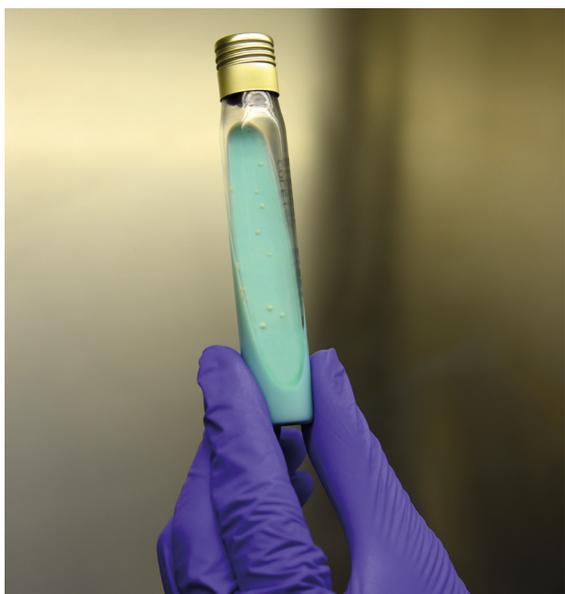
◀ Ejemplos de contenedores para el transporte de sustancias infecciosas.



## 4. Muestras de ADN de micobacterias

Una alternativa al medio de cultivo es la realización de la extracción de ADN en el laboratorio donde se procesen las muestras y posteriormente realizar el envío de ADN. Para la extracción de ADN se debe seguir el siguiente protocolo:

VISA VET



### • Extracción de ADN a partir de cultivo sólido

Con un asa de siembra se seleccionan 1 o 2 colonias sospechosas de ser micobacterias pertenecientes al CMT y se resuspenden en 200 µl de agua ultrapura estéril. Esta suspensión se inactiva durante 15 minutos a 100°C, y después de 5 minutos a temperatura ambiente se da un pulso en una minifuga. El ADN se conserva a una temperatura igual o inferior a -20°C hasta su utilización.

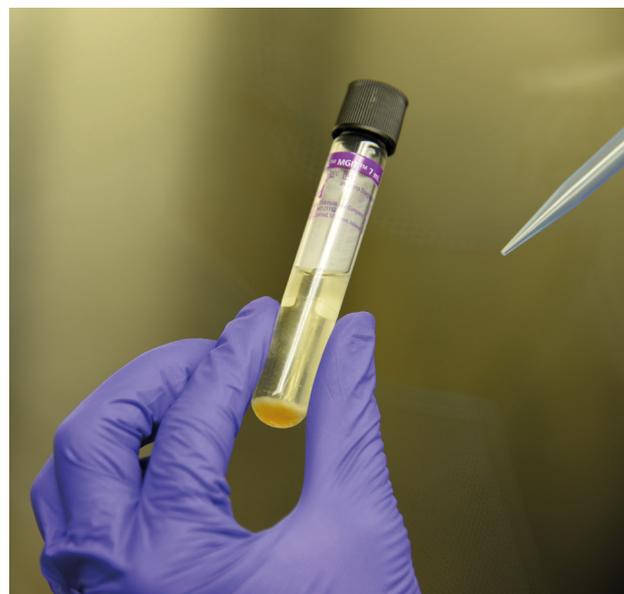
◀ Cultivo de micobacterias en medio sólido Colestos.



### • Extracción de ADN a partir de cultivo líquido

Se recogen 1,5 ml de medio líquido con crecimiento de micobacterias pertenecientes al CMT y se centrifuga a 12.000 g durante 10 minutos. Se descarta el sobrenadante y se resuspende el sedimento en 1 ml de agua ultrapura estéril. Se centrifuga a 12.000 g durante 10 minutos. Se elimina el sobrenadante, se resuspende el sedimento en 100 µl de agua ultrapura estéril y se inactiva 15 minutos a 100°C. El ADN se conserva a una temperatura igual o inferior a -20°C hasta su utilización.

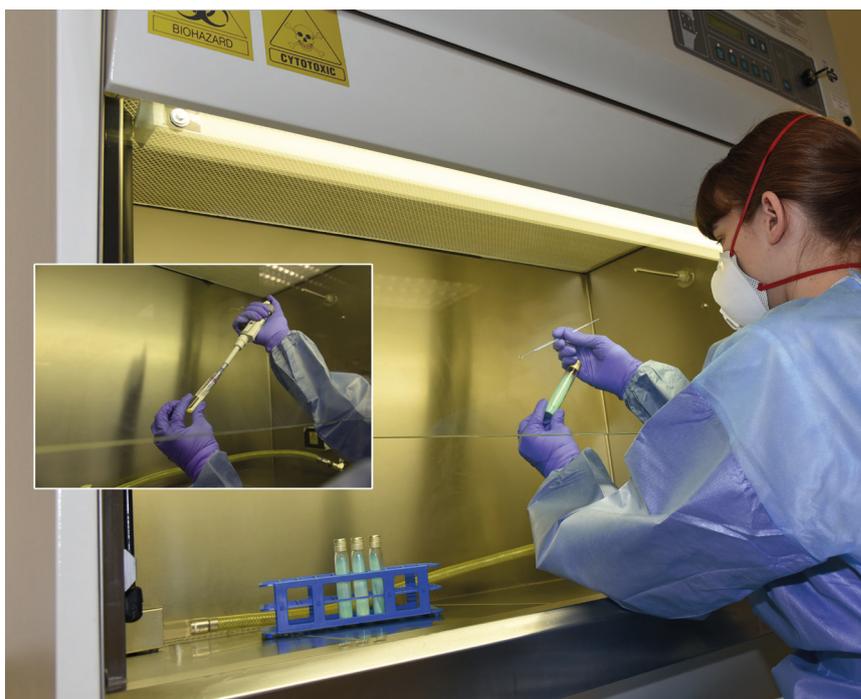
► Cultivo de micobacterias en medio líquido BD BACTEC™ MGIT™



VISAVET

Las muestras de ADN se remitirán al Centro VISAVET o LCSA en condiciones de refrigeración/ congelación en una caja isotérmica. En estos casos, el laboratorio de origen debe conservar siempre una alícuota del ADN ante una posible pérdida o deterioro en el transporte.

► Manejo de cultivos de micobacterias en cabina de seguridad biológica.



VISAVET



## 5. Envío de perfiles de espoligotipado

En el caso de que el laboratorio realice la técnica de caracterización molecular para los miembros del CMT "Direct Variable Repeat Spacer Oligonucleotide Typing o DVR-spoligotyping", deberá remitir al Centro VISAVET el perfil de espoligotipo y la especie de CMT para su incorporación en la Base de Datos Nacional de Micobacteriosis Animal (mycoDB.es).

Los perfiles de espoligotipado deben remitirse de acuerdo con la nomenclatura internacional de la base de datos Mbovis.org e incluyendo los datos mínimos requeridos.

◀ Membrana de espoligotipado.

VISAVET





## 6. Documentación a adjuntar en el envío de muestras

En todos los casos descritos, es necesario incluir un informe que especifique al menos:

1. Especie animal.
2. Identificador del animal (crotal, chip, etc.).
3. Código de la explotación.
4. Calificación de la explotación o, en su defecto, los análisis solicitados.
5. Localización geográfica (comunidad autónoma, provincia y municipio).
6. Fecha de sacrificio del animal.
7. Información sobre el tipo de muestra biológica remitida:
  - Tejido (especificar linfonodos y órganos).
  - Cultivo (especificar el medio).
  - ADN.
8. Información de la especie del CMT y spoligotipo si procede.



UNIVERSIDAD  
COMPLUTENSE  
MADRID

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

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



Subdirección General de Sanidad e Higiene Animal y Trazabilidad  
Dirección General de Sanidad de la Producción Agraria  
**Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación**

[www.mapa.gob.es](http://www.mapa.gob.es)

