

## **MATERIAL PARA LA PREPARACIÓN DEL TEMA 1**

### **CERTIFICACIÓN Y ACREDITACIÓN EN SISTEMAS DE GESTIÓN DE CALIDAD EN LABORATORIOS. CONCEPTO Y FUNCIONES. TIPOS DE ENTIDADES IMPLICADAS**

*Este material no tiene carácter oficial, por lo que en ningún caso vinculará al Tribunal Calificador. Constituye, únicamente, un instrumento complementario que servirá de apoyo al opositor para enfocar cada uno de los epígrafes, pero nunca de forma exclusiva ni excluyente. El Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación no se hace responsable del contenido del mismo.*

*Los materiales no serán objeto de actualización constante.*

## **ÍNDICE**

### **1. INTRODUCCIÓN**

### **2. CERTIFICACIÓN Y ACREDITACIÓN EN SISTEMAS DE GESTIÓN DE CALIDAD EN LABORATORIOS. CONCEPTO Y FUNCIONES.**

2.1. CERTIFICACIÓN EN SISTEMAS DE GESTIÓN DE CALIDAD EN LABORATORIOS.

2.2. ACREDITACIÓN EN SISTEMAS DE GESTIÓN DE CALIDAD EN LABORATORIOS.

2.3. DIFERENCIAS ENTRE CERTIFICACIÓN Y ACREDITACIÓN.

### **3. TIPOS DE ENTIDADES IMPLICADAS**

3.1. INFRAESTRUCTURA GLOBAL DE LA ACREDITACIÓN

MATERIAL NO OFICIAL

## 1. INTRODUCCIÓN

De manera general podemos decir que una de las formas básicas de consolidar la competitividad de las organizaciones reside en garantizar la calidad de sus productos o servicios y conseguir la satisfacción del cliente. En este sentido, la aparición de las normas ISO (International Standard Organization, o en español, Organización Internacional de Normalización) de aseguramiento de la calidad a partir del año 1987, así como los esquemas de acreditación y certificación basados en estas normas, han constituido el referente tanto a nivel europeo como mundial.

En la actualidad existen Normas para casi todo, por ejemplo para productos de consumo (juguetes, zapatos, productos alimenticios), maquinaria, servicios de limpieza, etc. No obstante, a lo largo del tema mencionaremos los sistemas de gestión y las normas de certificación y acreditación disponibles que se pueden aplicar a los Laboratorios de Sanidad y Genética Animal.

Los **estándares de gestión** tienen como finalidad proporcionar a las organizaciones elementos y herramientas para la gestión de la calidad, el medio ambiente y/o la seguridad y salud en el trabajo de un modo eficaz y además, pueden ser integrados con otros estándares y otros requisitos de gestión.

Además, debido a la adopción de **la estructura de alto nivel (HLS)**, en la que se ha establecido un mismo enfoque, misma terminología, mismo texto común para las normas de sistemas de gestión de ISO, independientemente de su ámbito de aplicación (calidad, medio ambiente, energía, seguridad y salud laboral, alimentación, etc.) se puede establecer un modelo integrado de gestión que sirva como herramienta para gestionar los elementos clave para la gestión de un laboratorio, es decir, garantizar que los resultados son válidos, que se trabaja protegiendo al medio ambiente y a los trabajadores.

Los estándares de gestión que pueden ser implantados en los laboratorios pueden ser: Normas como certificación UNE-EN ISO 9001 e UNE-EN ISO 14001 para la gestión de la calidad y la gestión ambiental de los laboratorios respectivamente, ISO 45001, para la gestión de la salud y seguridad de los trabajadores y por otro lado Normas de acreditación como UNE-EN ISO/IEC 17025 de competencia para laboratorios de ensayo y calibración o UNE-EN ISO 17034 de Productores de materiales de referencia.

Cabe reseñar que los importantes cambios acaecidos en los últimos años, ha provocado que los gobiernos de los diferentes países muestren preocupación por la protección de la salud humana y animal mediante la prevención, lucha, control y en su caso erradicación de las enfermedades animales susceptibles de ser transmitidas al hombre o que impliquen riesgos sanitarios que comprometan la salud de los consumidores. Asimismo, la política de protección del consumidor persigue la prevención de los riesgos para la salud humana derivados de consumo de productos alimenticios tanto de origen animal como de otros orígenes.

La vigilancia en salud pública y animal es un proceso de recolección, análisis e interpretación de los datos para ser usados en planificación, implementación y evaluación de la salud pública

y animal. El desarrollo y realización de análisis es una herramienta que tiene una repercusión decisiva en la Sanidad Animal y, los laboratorios que los realizan, trabajan en un entorno de creciente exigencia y responsabilidad tanto legal como social que reclama un nivel de calidad y de confianza extraordinarios.

Por ello, tanto los métodos de ensayo como los laboratorios que realizan los análisis deben asegurar, al máximo nivel permitido por el desarrollo científico, la fiabilidad de los resultados, lo cual implica que además de reunir los criterios técnicos que aseguren su validez, deben ser realizados con una serie de garantías que permitan obtener resultados comparables con independencia del laboratorio que los ejecute. En este sentido, el empleo de métodos de referencia, reconocidos y aceptados, es la herramienta más eficaz para obtener estas garantías.

Por otro lado, la eliminación de barreras para el comercio internacional requiere una estandarización de las técnicas para una aceptación recíproca de las pruebas realizadas. Por tanto la Sanidad Animal también debe regirse por las indicaciones de organismos internacionales como la OIE (Organización Mundial de Sanidad Animal, antigua Oficina Internacional de Epizootias) que, a través de su Manual de las Pruebas de Diagnóstico y de las Vacunas para los Animales Terrestres y el Manual de Diagnóstico para los Animales Acuáticos, marca las directrices a seguir en el diagnóstico analítico de la Sanidad Animal, o como EFSA (Agencia Europea de Seguridad Alimentaria) a través de sus documentos.

En ocasiones el cumplimiento con las normas no es suficiente y el mercado requiere una demostración de su cumplimiento, a veces la declaración del propio "afectado" es suficiente pero en un gran número de casos esto no es así. La Administración u otras partes (Compradores, Importadores, Aseguradoras, etc) necesitan en muchas ocasiones una demostración de cumplimiento con los requisitos establecidos reglamentariamente. En ocasiones dichas partes no dispone de recursos para llevar a cabo estas comprobaciones, y es en éstos en los que se requiere de una evaluación independientemente de su cumplimiento. Esta actividad la realizan los **Organismos Evaluadores de la Conformidad (OEC)** cuyo objetivo es demostrar a la sociedad (autoridades, empresas y consumidores en general) que los productos y servicios puestos a su disposición son conformes con ciertos requisitos (generalmente establecidos en normas) relacionados generalmente con su calidad y seguridad.

Dicho de otro modo, en el sector reglamentario, las administraciones públicas, responsables de la protección de la salud y seguridad de las personas, el medio ambiente y la defensa contra el fraude, entre otras, utilizan organismos que evalúan la conformidad de los productos, instalaciones o servicios que están sujetos a requisitos legales. Por otro lado, en el sector voluntario, en distintas áreas empresariales se han puesto igualmente en marcha sistemas de evaluación de la conformidad con objeto de conseguir un nivel técnico mínimo, así como garantizar la competencia en condiciones de igualdad.

Algunos ejemplos de OEC son:

- Análisis de productos alimenticios.
- Análisis clínicos.

- Inspección de seguridad de las instalaciones industriales.
- Certificación de Sistemas de Gestión.
- Inspección Técnica de Vehículos.
- Ensayos de productos industriales.
- Certificación de productos.
- Denominaciones de Origen.
- Verificaciones medioambientales o de gases de efecto invernadero.
- Ciencias forenses

El valor de las actividades de evaluación de la conformidad depende de la credibilidad de los OEC. Debido a la naturaleza de su actividad dicha credibilidad se fundamenta en su competencia e integridad y para lograr esa credibilidad es preciso establecer un mecanismo independiente, riguroso y global que de confianza en la competencia técnica de dichos organismos y su sujeción a normas de carácter internacional: **La acreditación.**

Dentro de la Normativa de Sanidad Animal se encuentra el Reglamento (CE) nº 2017/625 relativo a los controles y otras actividades oficiales realizados para garantizar la aplicación de la legislación sobre alimentos y piensos y de las normas sobre salud y bienestar de los animales, sanidad vegetal y productos fitosanitarios que describe en su articulado los requisitos para la designación de **Laboratorios Oficiales (LO), Laboratorios Nacionales de Referencia (LNR) y Laboratorios Europeos de Referencia (EU-RL).**

El Reglamento distingue actividades de control oficial, dentro del Plan Nacional de Control de la Cadena Alimentaria – PNCOCA, y otras actividades oficiales como puede ser el diagnóstico de enfermedades animales dentro de la amplia normativa de Sanidad Animal.

En el artículo 37 del citado Reglamento se establece como requisito que los laboratorios implicados en el control de la cadena agroalimentaria deben asegurar sus resultados mediante la acreditación en base a la Norma UNE-EN ISO/IEC 17025 de competencia para laboratorios de ensayo y calibración.

Laboratorios como el Laboratorio Central de Veterinaria de Algete (Madrid) y Laboratorio Central de Sanidad Animal de Santa Fe (Granada), nombrados como Laboratorios Nacionales de Referencia (LNR) y Laboratorios Europeos de Referencia (EU-RL) para el diagnóstico de enfermedades animales están acreditados en base a la Norma UNE-EN ISO/IEC 17025 de competencia para laboratorios de ensayo y calibración en cumplimiento de la Normativa Europea.

## **2. CERTIFICACIÓN Y ACREDITACIÓN EN SISTEMAS DE GESTIÓN DE CALIDAD EN LABORATORIOS. CONCEPTO Y FUNCIONES**

El término certificación hace referencia a la verificación por parte de terceros del cumplimiento de los requisitos establecidos, aunque dichos requisitos no necesariamente aseguran ni implican competencia técnica.

El término acreditación hace referencia al cumplimiento de los requisitos establecidos en una norma lo que conlleva al reconocimiento de **competencia técnica** por parte de terceros. De una manera resumida podemos decir que la competencia técnica implica que el laboratorio dispone de métodos analíticos técnicamente válidos y validados, que son realizados por personal cualificado y operan en un entorno con control medioambiental adecuados, equipos calibrados, evalúa y aplica medidas correctivas, evalúa con exactitud y controla la incertidumbre de sus medidas y demuestra la competencia de los métodos analíticos utilizados por ejemplo con la participación en ensayos de intercomparación.

**La Acreditación es una declaración pública de la competencia técnica de un OEC para realizar actividades de evaluación de la conformidad específicas.**

## **2.1 CERTIFICACIÓN EN SISTEMAS DE GESTIÓN DE CALIDAD EN LABORATORIOS.**

Podemos diferenciar dos **Sistemas de Gestión de Calidad (SGC)** basados en la Certificación y Acreditación.

Existe un modelo normativo general de gestión de la calidad, ampliamente conocido y extendido en el tejido empresarial, que corresponde a las llamadas Normas de la serie ISO 9000 y que constituyen el modelo internacional de referencia más utilizado para el diseño e implantación de Sistemas de Gestión de la Calidad aplicable a organizaciones tanto industriales como de servicios.

Dentro de las Normas de la serie ISO 9000, únicamente encontramos una Norma, concretamente la UNE-EN ISO 9001:2015, que puede ser objeto de certificación (reconocimiento) por parte de una Entidad de Certificación convenientemente acreditada. El resto de Normas de la serie 9000 corresponden, en general a documentos de soporte o mejora de los sistemas de calidad certificables.

- UNE-EN ISO 9001:2015 "Sistemas de Gestión de la Calidad. Requisitos".
- UNE-EN ISO 9000:2015 "Sistemas de Gestión de la Calidad. Fundamentos y vocabulario".
- UNE-EN ISO 9004:2018 "Gestión de la calidad. Calidad de una organización. Orientación para lograr el éxito sostenido".

Esta Norma UNE-EN ISO 9001, establece los requisitos del sistema de gestión de la calidad a implantar al objeto de poder utilizarse para su aplicación interna por las organizaciones, para su certificación o con fines contractuales. Su implantación conlleva una serie de beneficios, que son:

- demostrar su capacidad para proporcionar regularmente productos y servicios que satisfagan los requisitos del cliente y los reglamentarios aplicables;
- mejorar la imagen de sus productos y/o servicios ofrecidos;
- aumentar la satisfacción del cliente a través de la aplicación eficaz del sistema, incluidos los procesos para la mejora del sistema y el aseguramiento de la conformidad con los requisitos del cliente y los legales y los reglamentarios aplicables;

- y cimentar las bases de la gestión de la calidad y estimular la mejora continua.

Todos los requisitos son genéricos y pretenden ser aplicables a todas las organizaciones sin importar su tipo, tamaño o producto.

La adopción de un sistema de gestión de la calidad es una decisión estratégica para una organización que le puede ayudar a mejorar su desempeño global y proporcionar una base sólida para las iniciativas de desarrollo sostenible.

Los principios de la gestión de la calidad descritos en la Norma ISO 9000, son:

- el enfoque al cliente,
- el liderazgo,
- el compromiso de las personas,
- el enfoque a procesos,
- la mejora,
- la toma de decisiones basada en la evidencia,
- la gestión de las relaciones.

El 23 de septiembre de 2015 se publicó la nueva versión de la Norma ISO 9001 "Sistemas de gestión de la calidad. Requisitos" que sustituye a la versión anterior de 2008. Los cambios introducidos, van más allá de una mera reordenación de la estructura de los requisitos contenidos. Se han añadido requisitos que podían entenderse implícitos en la versión anterior y se ha ampliado el sentido del sistema de gestión de la calidad.

- En la versión del año 1994 el fondo del mensaje era lograr la conformidad del producto.
- En la versión del año 2000 el fondo del mensaje se amplió a la satisfacción del cliente.
- En la versión del año 2008 el fondo del mensaje no cambió, pero se reforzó la visión sobre la gestión por procesos (que ya figuraba antes).
- En esta nueva versión del 2015 el fondo del mensaje se vuelve a ampliar, no solo a la conformidad del producto y la satisfacción del cliente, sino también al posicionamiento de la organización mediante la satisfacción del resto de las partes interesadas de la organización.

Podemos decir que esta nueva versión incluye una nueva estructura, nuevos requisitos, y nuevos objetivos. A partir de septiembre de 2018 el certificado emitido según la ISO 9001:2008 deja de tener efecto, por lo que debe obtenerse el nuevo certificado según la ISO 9001:2015.

Los principales cambios en la nueva norma ISO 9001 son:

- la adopción de la estructura de alto nivel (HLS),
- un requisito explícito para el pensamiento basado en el riesgo para apoyar y mejorar la comprensión y aplicación del enfoque basado en procesos,
- menos requisitos prescritos,
- menor énfasis en los documentos,
- mejor aplicabilidad a los servicios,
- el requerimiento para definir los límites del SGC,

- mayor hincapié en el contexto organizacional,
- aumento de los requisitos de liderazgo,
- mayor énfasis en el logro de los resultados deseados para mejorar la satisfacción del cliente

La base del enfoque de las normas de certificación (ISO 9001 e ISO 14001) y acreditación (ISO/IEC 17025) siguen un modelo de gestión dinámico que persigue la mejora continua y que constan de 4 etapas: planificar, hacer, verificar y actuar (modelo PHVA) el cual se denomina ciclo *deming*.

- Planificar: establecer los objetivos y los procesos necesarios para generar y proporcionar resultados de acuerdo con la política de la organización.
- Hacer: Implementar los procesos según lo planificado.
- Verificar: Hacer el seguimiento y medir los procesos respecto a la política, incluidos sus compromisos, objetivos y criterios operacionales e informar de sus resultados.
- Actuar: emprender acciones para mejorar continuamente.

Las organizaciones que requieran demostrar el cumplimiento con el modelo Normativo de Sistemas de gestión de la Calidad establecido en UNE-EN ISO 9001, deberán contar con el reconocimiento (certificación) de su sistema de gestión de la calidad respecto a la norma que corresponda, realizado u otorgado por una organización independiente cuya competencia y fiabilidad se encuentre bajo el respaldo de una acreditación.

## 2.2 ACREDITACIÓN EN SISTEMAS DE GESTIÓN DE CALIDAD EN LABORATORIOS.

Los modelos normativos de aseguramiento de la calidad aplicables a los Organismos Evaluadores de la Conformidad pueden ser los siguientes:

- UNE-EN ISO/IEC 17025:2017 "Requisitos generales relativos a la competencia de los laboratorios de ensayo y calibración".
- UNE-EN ISO/IEC 17043: 2010 "Evaluación de la conformidad. Requisitos generales para los ensayos de aptitud".

Además, existe un compendio de Normas de la serie ISO 17000 que complementan, como pueden ser:

- UNE-EN ISO/IEC 17020:2012 "Evaluación de la conformidad. Requisitos para el funcionamiento de diferentes tipos de organismos que realizan la inspección".
- UNE-EN ISO/IEC 17011:2017 "Evaluación de la conformidad. Requisitos para los organismos de acreditación que realizan la acreditación de organismos de evaluación de la conformidad".
- UNE-EN ISO/IEC 17021-1:2015 "Evaluación de la conformidad. Requisitos para los organismos que realizan la auditoría y la certificación de sistemas de gestión. Parte 1: Requisitos".

- EN ISO/IEC 17021-2:2019 “Evaluación de la conformidad. Requisitos para los organismos que realizan la auditoría y la certificación de sistemas de gestión. Parte 2: Requisitos de competencia para la auditoría y la certificación de sistemas de gestión ambiental”.
- UNE-EN ISO/IEC 17021-3:2019 “Evaluación de la conformidad. Requisitos para los organismos que realizan la auditoría y la certificación de sistemas de gestión. Parte 3: Requisitos de competencia para la auditoría y la certificación de sistemas de gestión de la calidad”.

Cabe reseñar la acreditación en modalidad de alcance flexible según el documento de ENAC:

- NT - 18 Rev. 2 Laboratorios de Ensayo: Acreditación para Categorías de Ensayo (Marzo 2020).

De una manera esquemática podemos definir que un laboratorio acreditado, es decir, un laboratorio que se considera competente es aquel que cumple con los siguientes aspectos:

- ✓ dispone de métodos analíticos, procedimientos y especificaciones técnicamente válidos y validados, documentados de acuerdo con los requisitos de la Norma;
- ✓ dispone de personal cualificado y formado con elevado grado de conocimientos técnicos acorde con los niveles correspondientes de la autoridad;
- ✓ equipos con programas de mantenimiento, verificación y calibración;
- ✓ instalaciones y control medio ambiental adecuado;
- ✓ procedimientos y especificaciones que garantizan resultados exactos y fiables;
- ✓ implementa mejora continua en la gestión de análisis y calidad;
- ✓ evalúa y aplica medidas correctivas, acciones de mejora y establece riesgos y oportunidades;
- ✓ evalúa con exactitud y controla la incertidumbre de sus medidas;
- ✓ y demuestra la competencia de los métodos analíticos utilizados con la participación en Ensayos de intercomparación.

### **2.3. DIFERENCIAS ENTRE CERTIFICACIÓN Y ACREDITACIÓN**

La acreditación y la certificación ISO 9001 son actividades profundamente diferentes, una organización certificada ISO 9001 ha demostrado que su sistema de gestión de calidad cumple los requisitos establecidos en la norma ISO 9001 mientras que una organización acreditada ha demostrado su competencia para llevar a cabo las actividades de evaluación para las que esté acreditado y su cumplimiento con los requisitos establecidos en una norma internacional específica a cada tipo de organismo de evaluación (laboratorios, entidades de certificación e inspección, verificadores, etc.).

La certificación ISO 9001 es una actividad comercial realizada por empresas en libre competencia y dirigida a todo tipo de organizaciones de cualquier tamaño y área de actividad. La certificación ISO 9001 es una actividad que ENAC acredita, en este sentido es conveniente recordar que la certificación ISO 9001 es una actividad no regulada y, por tanto, puede ser

ofrecida por cualquier empresa sin someterse a norma alguna y solo aquellas que están acreditadas por ENAC han demostrado su competencia y su sujeción a normas internacionales.

La acreditación, por su parte es una actividad especializada dirigida exclusivamente a organizaciones que realizan actividades de evaluación de la conformidad (laboratorios, entidades de inspección, entidades de certificación y verificadores entre otros) regulada en la UE como un servicio de interés público por el Reglamento (CE) 765/2008 y que solo puede ser desempeñada en cada Estado miembro por un único organismo de acreditación (ENAC en el caso de España).

Por otro lado, ¿Una organización acreditada cumple ISO 9001?

Sí. Las entidades acreditadas cumplen con los requisitos de la ISO 9001 desde el momento en que obtienen la acreditación según la norma que corresponda a su actividad. Esto está aceptado a nivel internacional por las Organizaciones internacionales de acreditación (ILAC e IAF) y por la propia ISO (Organismo Internacional de Normalización). En resumen, la certificación ISO 9001 aporta información sobre el sistema de gestión de calidad de una empresa mientras que la acreditación aporta información sobre la competencia técnica de un organismo de evaluación específico para ejecutar actividades concretas.

Cabe reseñar que la página web de ENAC tiene un buscador de entidades acreditadas para su consulta pública. Aquellos laboratorios acreditados se reconocerán por medio de uso de la marca ENAC en sus informes emitidos, de manera que cualquier informe que no incluya la marca, no garantiza el cumplimiento de los requisitos de acreditación y, por tanto, no podrá beneficiarse de las ventajas de la acreditación, en particular, de su reconocimiento internacional.

No obstante, cabe reseñar que no todos los ensayos incluidos en un informe con marca de ENAC están acreditados. Los laboratorios pueden incluir en informes que incluyan la marca de ENAC el resultado de ensayos o calibraciones no acreditados, siempre y cuando identifiquen claramente en el propio informe cuáles están cubiertos por la acreditación y cuáles no (ENAC ha establecido reglas específicas que los laboratorios deben seguir en estos casos).

Por otro lado, la acreditación concedida no implica la aceptación o validación de ENAC de los resultados de una actividad de evaluación concreta ni exime al laboratorio acreditado de su responsabilidad en caso de resultados erróneos. La acreditación aporta un nivel de confianza alto en la capacidad demostrada por el laboratorio para prestar sus servicios de manera técnicamente fiable pero en ningún caso avala resultados concretos que son de la exclusiva responsabilidad del laboratorio.

### **3. TIPOS DE ENTIDADES IMPLICADAS**

En Europa la acreditación está regulada en el Reglamento (CE) nº 765/2008 del Parlamento Europeo y del Consejo de 9 de julio de 2008 por el que se establecen los requisitos de acreditación y vigilancia del mercado relativos a la comercialización de los productos y en el

que se fija un modelo de acreditación basado en la existencia de un único Organismo Nacional de Acreditación en cada Estado miembro formalmente designado y con potestad pública para llevar a cabo su función.

Así, la Comisión Europea reconoce la acreditación como el medio preferente para demostrar la competencia técnica para el correcto funcionamiento del mercado común en los Estados miembros a través del Reglamento (CE) Nº 765/2008 del Parlamento Europeo y del Consejo:

*“Cuando la legislación comunitaria de armonización prevea la selección de organismos de evaluación de la conformidad para su aplicación, la acreditación transparente tal como se dispone en el marco del presente Reglamento, para garantizar el nivel necesario de confianza en los certificados de conformidad, debe considerarse, por las autoridades públicas nacionales en toda la Comunidad, como el medio preferente de demostrar la competencia técnica de dichos organismos”.*

Los principios fundamentales en el funcionamiento de los Organismos Nacionales de Acreditación son:

- ✓ Ausencia de ánimo de lucro: entendiendo que la acreditación es una actividad que no pretende acrecentar los recursos de los propietarios o miembros de la organización con beneficios pecuniarios.
- ✓ Independencia: el Organismo Nacional de Acreditación no podrá ofrecer o facilitar actividades o servicios facilitados por los OEC, ni podrá prestar servicios de consultoría, poseer acciones, ni tener intereses financieros o de gestión en un OEC.
- ✓ No competencia: sólo se designará un Organismo de Acreditación en cada Estado miembro y los Organismos Nacionales de Acreditación no competirán entre sí. La aplicación de este principio lleva aparejada la obligación general a los OEC de solicitar la acreditación al organismo de acreditación del Estado miembro en el que estén radicados (excepto en casos excepcionales establecidos en el propio reglamento).
- ✓ Evaluación internacional: el Organismo Nacional de Acreditación deberá ser miembro de la organización europea de acreditadores EA (European cooperation for Accreditation) y superar satisfactoriamente los procesos de evaluación por pares establecidos por ésta.

El sistema de acreditación español nace en 1986. Desde entonces España ha ido incorporando a su ordenamiento jurídico y en su práctica diaria, a través de la Entidad Nacional de Acreditación (ENAC), la doctrina y los requerimientos que la Unión Europea y los Organismos Internacionales venían acordando para este sector de actividad, dando cumplimiento a la inmensa mayoría de las cuestiones contenidas en el Reglamento (CE) nº 765/2008. Este proceso culminó en 2010 con la promulgación del Real Decreto 1715/2010 en el que el Gobierno designa a **ENAC como único organismo nacional de acreditación dotado de potestad pública para otorgar acreditaciones.**

ENAC es un organismo que integra a todas las partes interesadas, contando con una amplia representación de la Administración en sus órganos de gobierno. Además mantiene una activa

y estrecha relación institucional y técnica con las administraciones públicas a todos los niveles (europeo, nacional, autonómico y local) en la práctica totalidad de sectores de actividad, y permite que la administración participe, en la medida de sus necesidades, en los procesos de evaluación y supervisión establecidos por ENAC.

Contar con la acreditación de ENAC, supone superar un proceso de evaluación riguroso, conforme a normas internacionalmente reconocidas, que demostrará la competencia técnica de un evaluador para realizar su actividad en España y el mercado internacional. Con ello, la entidad acreditada (OEC) obtendrá beneficios como:

- Reconocimiento: el prestigio y la confianza que aporta conseguir la acreditación de ENAC, puede hacerse valer múltiples veces ante diferentes públicos como son clientes o administraciones públicas reduciendo así el riesgo de tener que someterse a múltiples evaluaciones por parte de diferentes agentes (clientes, autoridades, etc.) en diferentes países o sectores que usarán requisitos diferentes, incluso cuando la actividad del evaluador sea la misma. Esto es así porque la acreditación de ENAC es reconocida en prácticamente la totalidad de los diferentes sectores económicos independientemente de que operen en el campo reglamentario o en el voluntario, tanto en España como en el resto de Europa y del mundo.
- Ventaja competitiva: la acreditación proporciona además una garantía independiente de su solvencia técnica ayudándole así a diferenciarse de la competencia, y permitiéndole competir con el resto de organizaciones, incluidas las más grandes. Además en algunos sectores, la acreditación es un requisito para poder ofrecer determinados servicios; en otros es una “licencia” de facto exigida por los compradores.
- Mercados: la acreditación de ENAC es reconocida y aceptada en más de 100 países de todo el mundo abriendo, por lo tanto, oportunidades en el extranjero ya que cada vez más es requerida por organizaciones del sector público y privado en todo el mundo. Consulta más información sobre como la acreditación puede ayudar a abrir las puertas a nuevos mercados.
- Mejora continua: la acreditación es un medio por el que los evaluadores suelen detectar áreas de mejora, proporcionando así la oportunidad de mejorar de manera continua los resultados de la organización.
- Acceso a compras públicas: ya que el uso de evaluadores de la conformidad acreditados es una exigencia en la Ley de Contratos del Sector Público (LCSP). Más información en la Guía sobre el uso de la acreditación en compras públicas.

Por otro lado, la propia Administración, también verá reconocidos una serie de beneficios:

La acreditación es el mecanismo elegido, cada vez más, por los gobiernos de todo el mundo para garantizar la seguridad e integridad de actividades de evaluación y control que intervienen en sectores clave para las políticas públicas como la salud, la protección del medioambiente y las infraestructuras críticas, la seguridad de los alimentos o la ciberseguridad. Y es que las organizaciones acreditadas ponen a disposición de los

poderes públicos un conjunto de medios que pueden ser usados en la implantación de sus políticas, logrando los objetivos fijados con:

- Reducción de costes: al proporcionar un sistema de vigilancia y control sin impacto en el contribuyente, lo que permite a los gobiernos central, autonómico o local concentrar sus recursos en los aspectos a regular, dejando el peso técnico de la supervisión en manos de una organización especializada (ENAC), pero sin merma en las competencias gubernamentales, ya que el sistema de acreditación de ENAC permite una coordinación continua con las autoridades.
- Agilidad: ya que facilita el uso de nuevas técnicas de regulación más ágiles y flexibles favoreciendo la autorregulación al tiempo que se asegura la fiabilidad de las actividades con un impacto en la confianza pública.
- Armonización: al ser la acreditación una actividad regulada en Europa permite su uso en diferentes países con plena garantía de compatibilidad y armonización.

En la actualidad, tanto en España como en Europa, la acreditación es ampliamente usada por el legislador y prueba de ello son las más de 170 disposiciones nacionales y autonómicas, así como las más de 100 a nivel europeo que incorporan la acreditación como herramienta para garantizar la fiabilidad de los productos y servicios, desarrollar mercados seguros y reforzar la protección de los consumidores.

### 3.1. INFRAESTRUCTURA GLOBAL DE LA ACREDITACIÓN

Para ser totalmente efectivo, un organismo de acreditación debe de estar integrado en la infraestructura global de la acreditación. Dicha infraestructura mundial opera a través de dos organizaciones, International Laboratory Accreditation Cooperation (ILAC) e International Accreditation Forum (IAF), que se apoyan a su vez en organizaciones regionales (América, Asia/Pacífico, etc). Las decisiones de estas organizaciones determinan los criterios que deben aplicar tanto ENAC como el resto de organismos equivalentes en otros países.

Dentro de estas organizaciones se han establecido acuerdos internacionales basados en el reconocimiento mutuo de certificados e informes emitidos por las entidades acreditadas que facilitan el comercio y crean un entorno que facilita la consecución del objetivo final: **“acreditado una vez, aceptado en todas partes”**.

Acuerdos de reconocimiento:

- Unión Europea y EFTA (EA): ensayo, calibración, inspección y certificación de sistemas de gestión, de producto y de personas.
- Fuera de Europa (ILAC): ensayo, calibración e inspección.
- Fuera de Europa (IAF): certificación.

ENAC es firmante de todos los acuerdos internacionales de EA, ILAC e IAF. Esto significa que un informe o certificado emitido bajo acreditación de ENAC será reconocido por el

resto de firmantes de todo el mundo. De esta manera, estos acuerdos actúan como un pasaporte internacional para el comercio.



Por otro lado, existen multitud de entidades que tienen la competencia de Certificar sistemas de Gestión de Calidad en base a la Norma UNE/EN ISO 9001. Por poner un ejemplo, en España, AENOR-confía, cuenta con cerca de 150 acreditaciones, reconocimientos, acuerdos y nombramientos para las actividades de certificación, validación, verificación, inspección y ensayos, otorgados por distintas entidades nacionales e internacionales.

En 2017 la entidad sufrió una gran reestructuración en la que la anteriormente conocida como Asociación Española de Normalización y Certificación desdobló sus actividades en dos organizaciones:

- La Asociación Española de Normalización, **UNE**, entidad legalmente responsable del **desarrollo de la normalización** en España, que también lleva a cabo actividades de cooperación.
- **AENOR**, entidad mercantil, trabaja en los ámbitos de la evaluación de la conformidad (**certificación**, verificación, validación, inspección y ensayos) y otros relacionados, como la formación y las venta de publicaciones.

## **BIBLIOGRAFÍA**

UNE-EN ISO/IEC 17025 “Requisitos generales para la competencia de los laboratorios de ensayo y calibración”

UNE-EN ISO 9001:2015 "Sistemas de Gestión de la Calidad. Requisitos”

Reglamento (CE) nº 765/2008 del Parlamento Europeo y el Consejo de 9 de julio de 2008 por el que se establecen los requisitos de acreditación y por el que se deroga el Reglamento (CEE) nº 339/93.

Entidad Nacional de Acreditación-ENAC.

MATERIAL NO OFICIAL

**MATERIAL PARA LA PREPARACIÓN DEL TEMA 2**

**POLITICA DE CALIDAD EN LOS LABORATORIOS DE CONTROL. SISTEMAS DE GESTIÓN DE LA CALIDAD. REQUISITOS GENERALES RELATIVOS A LA COMPETENCIA DE LOS LABORATORIOS DE ENSAYO. NORMA UNE-EN ISO/IEC 17025**

*Este material no tiene carácter oficial, por lo que en ningún caso vinculará al Tribunal Calificador. Constituye, únicamente, un instrumento complementario que servirá de apoyo al opositor para enfocar cada uno de los epígrafes, pero nunca de forma exclusiva ni excluyente. El Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación no se hace responsable del contenido del mismo.*

*Los materiales no serán objeto de actualización constante.*

## **ÍNDICE**

- 1. INTRODUCCIÓN**
- 2. POLITICA DE CALIDAD EN LOS LABORATORIOS DE CONTROL**
- 3. SISTEMAS DE GESTIÓN DE LA CALIDAD**
- 4. REQUISITOS GENERALES RELATIVOS A LA COMPETENCIA DE LOS LABORATORIOS DE ENSAYO**
- 5. NORMA UNE-EN ISO/IEC 17025**

MATERIAL NO OFICIAL

## 1. INTRODUCCIÓN

Los términos *norma* y *documento* son en realidad las herramientas de una calidad operativa y no puramente filosófica. Podemos identificar el concepto sistema de calidad con el “binomio calidad-norma”. La razón es que para trabajar con calidad parece lógico dejarse guiar por normas donde se han previsto posibles situaciones de no-calidad y se proponen, de forma general, soluciones para evitarlas. Esto nos lleva a proporcionar una definición quizá poco ortodoxa, pero práctica: *La calidad consiste en seguir una norma, especialmente cuanto más armonizada internacionalmente esté.*

Esta filosofía, extendida a lo largo de los años, se ha concretado en el desarrollo de sistemas de calidad en formato documento, como por ejemplo el sistema de calidad ISO. En este sistema encontramos normas a distintos niveles y alcances:

- ISO 9001, gestión de calidad de carácter general
- ISO 17025, competencia técnica de laboratorios

Las entidades deberán elegir el tipo de norma que se adapte a sus necesidades y objetivos. Las entidades acreditadas o certificadas bajo sistemas de calidad del tipo ISO trabajan bajo el amparo de una calidad consensuada internacionalmente. La decisión de adoptar un sistema de calidad no es trivial ya que supone un compromiso y un cambio de mentalidad, incremento de esfuerzo, tanto a nivel de trabajo como económico debido al coste de las auditorías.

La calidad es dinámica, la evolución de las normas sometidas por principio a revisiones periódicas y la aparición de nuevas normas, son dos aspectos que marcan el dinamismo en materia de fuentes de información sobre calidad. No obstante, la única excepción que encontramos en el aspecto técnico está relacionada con el análisis de datos, ya que la mayor parte de la estadística empleada actualmente es la clásica, casi invariable.

## 2. POLITICA DE CALIDAD EN LOS LABORATORIOS DE CONTROL

El sistema de calidad que requiere un laboratorio depende del tipo de actividad que se desarrolle. Si dicha actividad se halla integrada en un ámbito reglamentado, se debe optar por el sistema de las “buenas prácticas de laboratorio” (BPL). En caso contrario, el dado su ámbito voluntario, se puede escoger un sistema de calidad internacional como el de las Normas ISO.

En el sector reglamentario, las administraciones públicas, responsables de la protección de la salud y seguridad de las personas, el medio ambiente y la defensa contra el fraude, entre otras, utilizan organismos que evalúan la conformidad (OEC) de los productos, instalaciones o servicios que están sujetos a requisitos legales.

El valor de las actividades de evaluación de la conformidad depende de la credibilidad de los OEC. Debido a la naturaleza de su actividad dicha credibilidad se fundamenta en su competencia e integridad y para lograr esa credibilidad es preciso establecer un mecanismo

independiente, riguroso y global que de confianza en la competencia técnica de dichos organismos y su sujeción a normas de carácter internacional: **La acreditación.**

Dentro de la Normativa de Sanidad Animal se encuentra el Reglamento (CE) nº 2017/625 relativo a los controles y otras actividades oficiales realizados para garantizar la aplicación de la legislación sobre alimentos y piensos y de las normas sobre salud y bienestar de los animales, sanidad vegetal y productos fitosanitarios. Esta norma describe en su articulado los requisitos para la designación de Laboratorios Oficiales (LO), Laboratorios Nacionales de Referencia (LNR) y Laboratorios Europeos de Referencia (EU-RL)(UE-LR).

El Reglamento distingue actividades de control oficial, dentro del Plan Nacional de Control de la Cadena Alimentaria – PNCOCA, y otras actividades oficiales como puede ser el diagnóstico de enfermedades animales dentro de la amplia normativa de Sanidad Animal.

En el artículo 37 del citado Reglamento se establece como requisito que los Laboratorios implicados en el control de la cadena agroalimentaria deben asegurar sus resultados mediante la acreditación en base a la Norma UNE-EN ISO/IEC 17025 de competencia para Laboratorios de ensayo y calibración.

Laboratorios como el Laboratorio Central de Veterinaria de Algete (Madrid) y Laboratorio Central de Sanidad Animal de Santa Fe (Granada), nombrados como Laboratorios Nacionales de Referencia (LNR) y Laboratorios Europeos de Referencia (EU-RL) para el diagnóstico de enfermedades animales están acreditados en base a la Norma UNE-EN ISO/IEC 17025 de competencia para Laboratorios de ensayo y calibración en cumplimiento de la Normativa Europea.

Podemos definir **Política de la Calidad** como aquellas directrices e intenciones de una organización relativos a la calidad expresados formalmente por su alta dirección.

La política tiene una serie de características que son:

- Es adecuada al propósito de la organización
- Incluye el compromiso de cumplir con los requisitos y de mejorar continuamente la eficacia del Sistema de Gestión de Calidad (SGC)
- Proporciona un marco de referencia para establecer y revisar los objetivos de la calidad
- Es comunicada y entendida dentro de la organización
- Es revisada para su continua adecuación

Cabe reseñar la diferenciación entre calidad técnica, relacionada con el trabajo experimental y los resultados obtenidos por una entidad y calidad de gestión, relacionada con la organización de la entidad. Las dos facetas son igualmente importantes para la calidad de un laboratorio.

### 3. SISTEMAS DE GESTIÓN DE LA CALIDAD

Un sistema de gestión de la calidad afecta a cada proceso individual del laboratorio y consta de varias capas. Se puede visualizar como una pirámide:



La base de la pirámide es la inspección. Se trata únicamente de inspecciones arbitrarias del trabajo por parte del técnico de laboratorio mismo. La detección de errores depende de lo alerta que esté el técnico.

Una inspección más estructurada, concienzuda y racional del rendimiento de los procesos que se llama Control de Calidad (QC). Se trata de la implementación de pasos de control en puntos lógicos y estratégicos de cada proceso del laboratorio para realizar un seguimiento del correcto rendimiento y asegurar unos resultados de calidad. Esto permite que el laboratorio esté seguro de que su elemento de salida final, es decir, el resultado del análisis, es de buena calidad. El QC es específico de cada prueba y garantiza que los resultados sean los esperados. Con el control de calidad, los errores solo se pueden detectar después de que ya hayan sucedido.

La Garantía de Calidad (QA) es el proceso sistemático y planificado destinado a garantizar que el servicio ofrecido cumple con los requisitos establecidos en todas las áreas. Los requisitos pueden ser internos o bien pueden estar definidos por una norma de acreditación/certificación. La QA es específica de cada proceso y asegura que se realicen las cosas correctas y de la forma correcta.

Un **Sistemas de Gestión de Calidad** (SGC) se puede describir como un conjunto de componentes fundamentales necesarios para controlar, asegurar y gestionar la calidad de los procesos del laboratorio. El sistema que se usa en esta **herramienta** es el marco de referencia de 12 componentes fundamentales, llamado los elementos clave del sistema de gestión de la calidad:



Podemos diferenciar dos **Sistemas de Gestión de Calidad (SGC)** basados en la Certificación y Acreditación.

Existe un modelo normativo general de gestión de la calidad, ampliamente conocido y extendido en el tejido empresarial, que corresponde a las llamadas Normas de la serie ISO 9000 y que constituyen el modelo internacional de referencia más utilizado para el diseño e implantación de Sistemas de Gestión de la Calidad aplicable a organizaciones tanto industriales como de servicios. Dentro de las Normas de la serie ISO 9000, únicamente encontramos una Norma, concretamente la UNE-EN ISO 9001:2015, que puede ser objeto de certificación (reconocimiento) por parte de una Entidad de Certificación convenientemente acreditada.

Por otro lado, los modelos normativos de aseguramiento de la calidad aplicables a los Organismos Evaluadores de la Conformidad siguen la Norma UNE-EN ISO/IEC 17025:2017 "Requisitos generales relativos a la competencia de los laboratorios de ensayo y calibración".

La acreditación de laboratorios debe basarse en alcances de acreditación definidos de forma clara, precisa y sin ambigüedades que proporcionen, tanto al cliente del laboratorio como a otras partes interesadas, una información concreta sobre la competencia técnica demostrada por el laboratorio.

Por ello, para describir dichos alcances, en los Anexos Técnicos a los certificados de acreditación se incluye una lista pormenorizada de los ensayos para los que el laboratorio ha sido acreditado. (Alcance cerrado).

Este sistema de definición de los alcances permite, por un lado, describir fielmente la competencia del laboratorio, y por el otro, garantizar que se lleva a cabo una evaluación de su competencia cada vez que éste desea incorporar un nuevo ensayo en su alcance.

No obstante, se ha visto la necesidad de establecer mecanismos que permitan que, en determinadas circunstancias, los laboratorios puedan incluir nuevos ensayos en su alcance, sobre la base de que se haya evaluado su competencia no solo para realizar ensayos de acuerdo con un procedimiento previamente evaluado, sino también para desarrollar y validar dichos procedimientos de acuerdo a un sistema preestablecido. El documento de ENAC, NT – 18 de “Laboratorios de Ensayo: Acreditación para Categorías de Ensayo” establece los requisitos para la acreditación por alcance flexible. En él, se establecen los requisitos para que el laboratorio pueda asumir la responsabilidad de la gestión de parte de su alcance de acreditación y de utilizar métodos de ensayo concretos, validados y adecuados al uso, sin necesidad de una evaluación previa por parte de ENAC de dicho método.

La obtención de este tipo de alcance va a requerir del laboratorio:

- ✓ Un nivel de competencia técnica añadida al necesario para disponer de un alcance por ensayos, ya que debe demostrar, a priori, que es competente no solo para realizar determinados ensayos sino para desarrollar y validar procedimientos de ensayo concretos en el momento, con las condiciones establecidas por un cliente y con las restricciones establecidas en este procedimiento.
- ✓ Una capacidad de gestión añadida, que se concretará en extender su sistema de gestión para garantizar que en todo momento cada ensayo concreto se realiza cumpliendo todos los requisitos de acreditación.

Este modelo de acreditación por alcance flexible (por **categorías de ensayo**) es solamente aplicable a unidades técnicas de laboratorios de ensayo que hayan superado con éxito el primer ciclo de acreditación (cuatro años).

Es necesario puntualizar sobre las siguientes definiciones:

- Ensayo: Un ensayo viene descrito por lo siguiente:
  - Producto o material a ensayar (p.e. agua residual, acero, etc).
  - Parámetro a determinar (p.e. cobre disuelto, resiliencia, etc).
  - Técnicas o método de medida (p.e. absorción atómica, péndulo Charpy, etc).
  - Los intervalos o capacidades de ensayo.
- **Categoría de ensayo:** un conjunto de ensayos realizados por una **técnica o método de ensayo común** para determinar un parámetro o **familia de parámetros** en un producto o **familia de productos**.

El alcance de acreditación para categorías de ensayo se describe en el Anexo Técnico que será como el habitualmente utilizado para ensayos individuales con las siguientes particularidades:

- a) Se indicará la categoría de ensayo.
- b) Se indicarán la familia de productos y/o parámetros que definen la categoría.
- c) Se hará mención a un procedimiento de ensayo aplicable a la categoría.
- d) Se hará referencia a la Lista de Ensayos Bajo Acreditación (LEBA).

Es de vital importancia aclarar que cuando un laboratorio solicita la acreditación para una categoría de ensayos, está declarando su competencia técnica para desarrollar procedimientos y realizar todos los ensayos concretos incluidos en la categoría. Este hecho debe ser tenido en cuenta por el laboratorio a la hora de definir las categorías para las que solicita la acreditación ya que la incapacidad sistemática de un laboratorio para emitir resultados válidos en un ensayo concreto dentro de una categoría, invalida a ésta para ser una categoría aceptable a efectos de acreditación.

La LEBA es un documento controlado por el propio laboratorio en la que se incluyen los ensayos para los que efectivamente está acreditado el laboratorio dentro de cada categoría.

Esto significa que, si bien el Anexo Técnico indica una Categoría de Ensayos, en realidad solamente están amparados por la acreditación los ensayos incluidos en la LEBA y, por tanto, solo estos pueden dar lugar a un informe acreditado.

La LEBA es un documento público que debe de estar disponible para quien la solicite y tendrá el contenido siguiente:

- Título: “Lista de Ensayos Bajo Acreditación”.
- Referencia al código y revisión del Anexo Técnico de ENAC.
- Familia(s) de productos (tal y como aparece en el Anexo Técnico) y los productos concretos que, dentro de cada familia, han sido autorizados por el laboratorio de acuerdo a su sistema.
- Familia(s) de parámetros (tal y como aparece en el Anexo Técnico) y los parámetros concretos que, dentro de cada familia, han sido autorizados por el laboratorio de acuerdo a su sistema.
- Procedimiento de ensayo aplicable a la categoría (tal y como aparece en el Anexo Técnico) y referencia a cada procedimiento de ensayo concreto desarrollado por el laboratorio que está incluido dentro de la categoría de ensayo correspondiente.
- Intervalos de medida o límites de determinación según sea aplicable.

Cabe reseñar que el laboratorio debe extender y adaptar su sistema de gestión considerando el tamaño y complejidad de la(s) categoría(s) de ensayo para la que pretende estar acreditado y que dé la adecuada confianza de su capacidad técnica para realizar ensayos en toda la categoría y cumpliendo en todo momento todos los requisitos de la norma UNE EN ISO/IEC 17025.

La acreditación para categorías de ensayo implica el compromiso del laboratorio de ofrecer ensayos acreditados en toda la categoría. Por tanto, la emisión generalizada de informes de ensayo no acreditados dentro de una categoría, aún con la autorización de los clientes, puede poner en cuestión la acreditación para categorías de ensayo.

#### **4. REQUISITOS GENERALES RELATIVOS A LA COMPETENCIA DE LOS LABORATORIOS DE ENSAYO**

En el punto 5 del presente documento se detallan los requisitos de la Norma UNE-EN ISO/IEC 17025, no obstante de una manera esquemática podemos definir que un laboratorio acreditado, es decir, un laboratorio que se considera competente es aquel que cumple con los siguientes aspectos:

- ✓ Dispone de métodos analíticos, procedimientos y especificaciones técnicamente válidas y validadas, documentados de acuerdo con los requisitos de la Norma.
- ✓ Dispone de personal cualificado y formado con elevado grado de conocimientos técnicos acorde con los niveles correspondientes de la autoridad.
- ✓ Dispone de equipos con programas de mantenimiento, verificación y calibración.
- ✓ Dispone de instalaciones y control medio ambiental adecuado.
- ✓ Dispone de procedimientos y especificaciones que garantizan resultados exactos y fiables.
- ✓ Implementa mejora continua en la gestión de análisis y calidad.
- ✓ Evalúa y aplica medidas correctivas, acciones de mejora y establece riesgos y oportunidades.
- ✓ Evalúa con exactitud y controla la incertidumbre de sus medidas.
- ✓ Demuestra la competencia de los métodos analíticos utilizados con la participación en Ensayos de intercomparación.

#### **5. NORMA UNE-EN ISO/IEC 17025**

Los antecedentes de la Norma UNE-EN ISO/IEC 17025 se remontan al año 2000, cuando se publica por primera vez, fruto de la integración de la Guía ISO/IEC 25 *Requisitos generales para la competencia de los laboratorios de ensayo y calibración* y la Norma Europea EN 45001 *Criterios generales para el funcionamiento de los laboratorios de ensayo*.

Este hecho supuso una importante transformación de los requisitos aplicados hasta el momento en Europa, ya que se incorporaron determinados requisitos más alienados con los sistemas de gestión, como son la gestión de los proveedores, las reclamaciones y quejas de los clientes en los laboratorios.

En ese mismo año se publicó una revisión de la Norma ISO 9001 en la que se introdujo un cambio sustancial de orientación en la misma, ya que se incorporaron los conceptos de “enfoque a procesos” y “enfoque basado en el cliente”, condicionando, entre otras, la sistemática de documentación de los sistemas de gestión de la calidad.

Estos conceptos no se incorporaron en UNE-EN ISO/IEC 17025 hasta 2005, fecha en la que se publicó una nueva versión que ha estado en vigor hasta el 2017 con la última revisión de la Norma.

En octubre de 2014, se aprobó la revisión de la norma atendiendo a los siguientes argumentos:

- Las normas actuales se basaban más en la evaluación del desempeño y en el enfoque a gestión de procesos
- La terminología estaba obsoleta
- El concepto de imparcialidad debía abordarse con más detalle
- Era necesario aclarar el alcance de la subcontratación
- Debían aclararse los requisitos de trazabilidad
- El mercado estaba solicitando mayor reconocimiento a las actividades de muestreo, en su relación con los ensayos y calibraciones
- Parecía necesario separar más los requisitos específicos de los ensayos y de las calibraciones
- Deberían contar con mayor detalle las condiciones de uso de los sistemas informáticos, registros electrónicos y emisión de informes y, por tanto, las actividades de validación del *software*
- Debía reducirse el número de notas incluidas en la versión del año 2005

Tras 36 meses de trabajo del grupo de trabajo WG44 del Comité de Evaluación de la Conformidad de ISO (ISO/CASCO), vio la luz la nueva versión de 2017, cuyos cambios más relevantes se resumen en:

- Modificación de la estructura documental para adecuarlo a los nuevos requisitos del documento QS-CAS-PORC/33 *Common elements in ISO/CASCO Standards*.
- Se elimina así el anterior agrupamiento en requisitos de gestión y requisitos técnicos, con el fin de facilitar el despliegue de la función calidad a lo largo del cuerpo de la norma

En cuanto a su contenido, hay cambios fundamentales:

- La inclusión de requisitos particulares para la imparcialidad y la confidencialidad de los laboratorios
- La planificación de la calidad debe basarse en la gestión de los riesgos y las oportunidades
- Incorporación de nuevos apartados sobre el análisis de resultados y declaración de conformidad, así como nuevas consideraciones sobre la incertidumbre de las medidas y la trazabilidad de las mismas

La Norma fue publicada en noviembre de 2017 en inglés y francés, y la versión oficial en español la realizó un grupo de traducción internacional ISO/CASCO *Spanish Translation Task Force*, en el que participaron 17 países con español como idioma oficial, coordinados por la Asociación Española de Normalización, UNE.

La nueva versión se estructura en 8 puntos y 2 anexos de la siguiente manera:

- **Punto 1 de Objeto y campo de aplicación**, establece el alcance de aplicación a las organizaciones que desarrollan actividades de laboratorio, salvo algunos detalles menores y modificaciones en la redacción (quedó más sintético), es muy similar al de la versión anterior.
- **Punto 2 de Referencias normativas**.
- **Punto 3 de Términos y definiciones**, algunas son imparcialidad, quejas, comparación interlaboratorio, método y validación.
- **Punto 4 de Requisitos Generales**: establece la **imparcialidad** y la **confidencialidad**. Si bien estos puntos se mencionan en varias ocasiones en la versión anterior, aquí se le dedicó una sección completa. Son puntos sumamente importantes para un laboratorio libre de intereses ajenos a la propia actividad técnica.
  - 4.1 imparcialidad: Las actividades del Laboratorio deben llevarse a cabo de manera imparcial y estructurada. El Laboratorio debe identificar los riesgos a su imparcialidad de forma continua. Esto debe incluir aquellos riesgos que surgen de sus actividades o de sus relaciones, o de las relaciones de su personal. Además, debe tener la capacidad de demostrar cómo se elimina o se minimiza ese riesgo.
  - 4.2 confidencialidad: El Laboratorio debe ser responsable, por medio de acuerdos legalmente ejecutables, de la gestión de toda la información obtenida o creada durante la realización de actividades del laboratorio. La información acerca del cliente debe ser confidencial entre el cliente y el laboratorio. Además, el laboratorio debe mantener la confidencialidad de toda la información obtenida o creada durante la realización de las actividades del laboratorio, excepto lo requerido por ley.
- **Punto 5 de Requisitos relativos a la estructura**: Aquí se define cómo debe estar organizado el laboratorio y cómo debe interactuar con el entorno. El Laboratorio debe ser una entidad legal o parte definida de una entidad legal, que es responsable legalmente de sus actividades de laboratorio. Debe identificar el personal de la dirección que tiene la responsabilidad general del laboratorio y debe definir y documentar el alcance de las actividades de laboratorio que cumplen con el documento ISO/IEC 17025. Debe definir la organización y la estructura de gestión, documentar sus procedimientos, contar con personal que tengan la autoridad y los recursos necesarios para implementar y mantener el sistema de gestión, identificar las desviaciones del sistema de gestión, asegurar la eficacia de las actividades, etc.
- **Punto 6 de Requisitos relativos a los recursos**: define los requerimientos para establecer procedimientos y metodologías destinados a gestionar y controlar:
  - 6.2 personal: se debe contar con personal competente para el manejo de equipos y realización de los ensayos, evaluación de resultados, aprobación de informes y certificados de calibración. Plantear en un Plan de formación anual todas las necesidades detectadas.
  - 6.3 instalaciones y condiciones ambientales: es fundamental para la correcta realización de los ensayos y calibraciones que se realicen en unas condiciones

ambientales de luz, humedad, fuente de energía que permita realizarlos de un modo adecuado. Las instalaciones y las condiciones ambientales deben ser adecuadas para las actividades del laboratorio y no deben afectar adversamente a la validez de los resultados. El laboratorio debe realizar el seguimiento, controlar y registrar las condiciones ambientales de acuerdo con las especificaciones, los métodos o procedimientos pertinentes, o cuando influyen en la validez de los resultados.

- 6.4 equipamiento: el Laboratorio debe tener acceso al equipamiento (incluidos pero sin limitarse a, instrumentos de medición, software, patrones de medición, materiales de referencia, datos de referencia, reactivos, consumibles o aparatos auxiliares) que se requieren para el correcto desempeño de las actividades de laboratorio y que pueden influir en los resultados. Los equipos deben asegurar la fiabilidad de los resultados que producen por lo que deben ser sometidos a planes de mantenimiento, verificación y calibración. El equipo de medición debe ser calibrado cuando la exactitud o la incertidumbre de medición afectan a la validez de los resultados informados y/o se requiere la calibración del equipo para establecer la trazabilidad metrológica de los resultados informados.
- 6.4 trazabilidad metrológica: el Laboratorio debe establecer la trazabilidad metrológica de los resultados de sus mediciones por medio de una cadena ininterrumpida y documentada de calibraciones, cada una de las cuales contribuye a la incertidumbre de medición, vinculándolos con la referencia apropiada. Se debe asegurar que los resultados de las mediciones sean trazables al Sistema Internacional de Unidades, dicha trazabilidad se obtiene mediante el uso de patrones de referencia para la calibración de los equipos implicados en los ensayos.
- 6.6 productos y servicios suministrados externamente: el Laboratorio debe asegurarse de que los productos y servicios suministrados externamente, que afectan a las actividades del laboratorio, sean adecuados. Se debe realizar una selección y evaluación de proveedores y subcontratistas en base a la calidad de sus servicios, organizando las compras, la recepción de los pedidos y asegurando que se reciben en las condiciones óptimas.
- **Punto 7 de Requisitos del proceso:** define los requerimientos para establecer procedimientos y metodologías destinados a gestionar y controlar:
  - 7.1 Revisión de solicitudes, ofertas y contratos: el Laboratorio debe contar con un procedimiento para la revisión de solicitudes, ofertas y contratos asegurando que los requisitos se definan, documenten y comprendan adecuadamente. El Laboratorio debe informar al cliente cuando el método solicitado por éste se considere inapropiado o desactualizado.
  - 7.2 Selección, verificación de validación de los métodos: El Laboratorio debe usar métodos y procedimientos apropiados para todas las actividades de laboratorio y, cuando sea apropiado, para la evaluación de la incertidumbre de medición, así como también las técnicas estadísticas para el análisis de datos. Es fundamental el empleo de métodos validados (normalizados, aprobados por comunidad científica) y en caso de utilizar métodos no normalizados, deben ser acordados por el cliente. Además, el Laboratorio debe asegurarse que se utiliza la última versión vigente de un método, a menos que no sea apropiado o posible. Respecto a la validación de los métodos, es

fundamental que todos los ensayos susceptibles de acreditación estén validados. La validación debe ser tan amplia como sea necesaria para satisfacer las necesidades de la aplicación o del campo de aplicación dados. Cabe reseñar, que cuando se hacen cambios a un método validado, se debe determinar la influencia de estos cambios, y cuando se encuentre que éstos afectan la validación inicial, se debe realizar una nueva validación del método. El laboratorio debe conservar los registros de validación (procedimiento de validación utilizado, especificaciones de los requisitos, determinación de las características del desempeño del método, los resultados y una declaración de la validez del método).

- 7.3 Muestreo: el Laboratorio debe tener un plan y un método muestreo cuando realiza el muestreo de sustancias, material o productos para el subsiguiente ensayo o calibración.
- 7.4 Manipulación de los ítems de ensayo o calibración: se debe contar con un procedimiento para el transporte, recepción, manipulación, protección, almacenamiento, conservación y disposición o devolución de los ítems de ensayo o calibración.
- 7.5 Registros técnicos: el Laboratorio debe asegurar que los registros técnicos para cada actividad de laboratorio contengan los resultados, el informe y la información suficiente para facilitar, si es posible, la identificación de los factores que afectan al resultado de la medición y su incertidumbre de medición asociada y posibiliten la repetición de la actividad del laboratorio en condiciones lo más cercanas posibles a las originales. Los registros técnicos deben incluir la fecha y la identidad del personal responsable de cada actividad del laboratorio y de comprobar los datos y los resultados. Las observaciones, los datos y los cálculos originales se deben registrar en el momento en que se hacen y deben identificarse con la tarea específica. El Laboratorio debe asegurar que las modificaciones a los registros técnicos pueden ser trazables a las versiones anteriores o a las observaciones originales. Se deben conservar tanto los datos y archivos originales como los modificados, incluida la fecha de corrección, una indicación de los aspectos corregidos y el personal responsable de las correcciones.
- 7.6 Evaluación de la incertidumbre de medición: Los laboratorios deben identificar las contribuciones a la incertidumbre de medición. Cuando se evalúa la incertidumbre de medición, se deben tener en cuenta todas las contribuciones que son significativas, incluidas aquellas que surgen del muestreo, utilización los métodos apropiados de análisis. Se debe evaluar la incertidumbre de medición. Cuando se evalúa la incertidumbre de medición, se deben tener en cuenta todas para todas las calibraciones.
- 7.7 Aseguramiento de la validez de los resultados: El Laboratorio debe contar con un procedimiento para hacer seguimiento de la validez de los resultados. Los datos resultantes se deben registrar de manera que las tendencias sean detectables y cuando sea posible, se deben aplicar técnicas estadísticas para la revisión de los resultados. Este seguimiento se debe planificar y revisar y debe incluir, cuando sea apropiado pero sin limitarse a:
  - Uso de materiales de referencia,

- Uso de instrumentos alternativos que han sido calibrados para obtener resultados trazables,
- Comprobaciones funcionales del equipamiento de ensayo y de medición,
- Uso de patrones de verificación o patrones de trabajo con gráficos de control,
- Comprobaciones intermedias en los equipos de medición,
- Repetición del ensayo o calibración usando los mismos métodos o métodos diferentes,
- Reensayo o recalibración de los ítems conservados,
- Correlación de resultados para diferentes características de un ítem,
- Revisión de resultados informados,
- Comparaciones intralaboratorio
- Ensayos de muestras ciegas.

Además, el laboratorio debe hacer seguimiento de su desempeño mediante comparación con los resultados de otros laboratorios, cuando estén disponibles y sean apropiados. Este seguimiento se debe planificar y revisar y debe incluir, pero no limitarse a, una o ambas de las siguientes: participación en ensayos de aptitud y participación en comparaciones interlaboratorio interlaboratorio diferentes de ensayos de aptitud.

Para aquellos casos de validación de categorías de ensayo (NT-18) cabe reseñar que el laboratorio establecerá una estrategia sobre validaciones adecuada a la extensión y naturaleza técnica de la categoría de ensayos para la que solicite la acreditación.

- o 7.8 Informe de resultados: Los resultados se deben revisar y autorizar antes de su liberación. Se deben suministrar de manera exacta, clara, inequívoca y objetiva, usualmente en un informe que debe incluir toda la información acordada con el cliente y la necesaria para la interpretación de resultados y toda la información exigida en el método utilizado. Todos los informes se deben conservar como registros técnicos. Cada informe debe incluir al menos la siguiente información:
  - Título del informe (p.ej. "Informe del Análisis").
  - Nombre y dirección del laboratorio
  - Lugar de realización del ensayo cuando éste no se haya efectuado en las instalaciones permanentes del laboratorio.
  - Identificación única de que todos sus componentes se reconocen como una parte de un informe completo y una clara identificación del final
  - Nombre y dirección del remitente o contacto del cliente.
  - Identificación de cualquier método o procedimiento de ensayo que haya sido utilizado.
  - Descripción e identificación inequívoca y, cuando sea necesario, la condición del ítem.
  - La fecha de recepción de los ítems de calibración o ensayo, y la fecha del muestreo, cuando esto sea crítico para la validez y aplicación de los resultados.
  - Las fechas de ejecución de la actividad.
  - La fecha de emisión del informe.

- La referencia al plan y métodos de muestreo usados por el laboratorio u otros organismos, cuando sean pertinentes para la validez o aplicación de los resultados.
- Una declaración acerca de que los resultados se relacionan solamente con los ítems sometidos a ensayo, calibración o muestreo.
- Los resultados con las unidades de medición, cuando sea apropiado.
- Las adiciones, desviaciones o exclusiones del método.
- La identificación de las personas que autorizan el informe.
- Una identificación clara cuando los resultados provengan de proveedores externos.
- Identificación de información facilitada por el remitente con la consiguiente descarga de responsabilidad.
- Declaración expresa de confidencialidad de los datos
- Logo de la marca ENAC en los informes que incluyan técnicas acreditadas.

Requisitos específicos para los informes de ensayo:

- Información sobre las condiciones específicas del ensayo, tales como las condiciones ambientales.
- Declaración de conformidad con los requisitos o especificaciones cuando sea pertinente.
- Cuando sea aplicable, la incertidumbre de medición presentada en la misma unidad que el mensurando o en un término relativo al mensurando cuando:
  - sea pertinente a la validez o aplicación de los resultados de ensayo,
  - una instrucción del cliente que lo requiera,
  - la incertidumbre de medición afecte a la conformidad con un límite de especificación.
- Opiniones e interpretaciones cuando sea apropiado.
- Cualquier otra información requerida por métodos específicos o por solicitantes

Requisitos específicos para los certificados de calibración:

- La incertidumbre de medición del resultado de medición presentado en la misma unidad que la de la unidad del mensurando o en un término relativo a dicha unidad (por ejemplo %).
- Las condiciones en las que se hicieron las calibraciones, que influyen en los resultados de medición.
- Una identificación que identifique cómo las mediciones son trazables metrológicamente.
- Los resultados antes y después de cualquier ajuste o reparación, si están disponibles.
- Cuando sea pertinente, una declaración de conformidad con los requisitos o especificaciones.
- Cuando sea apropiado, opiniones e interpretaciones.

En lo que se refiere a la información sobre opiniones e interpretaciones, cuando se expresen opiniones e interpretaciones, el Laboratorio debe asegurar que solo el personal autorizado para expresar opiniones e interpretaciones, libere la declaración respectiva.

Cuando se necesite cambiar, corregir o emitir nuevamente un informe ya emitido, cualquier cambio en la información debe estar identificado claramente, y cuando sea apropiado, se debe incluir la razón del cambio.

- 7.9 Quejas: El Laboratorio debe contar con un proceso documentado para recibir, evaluar y tomar decisiones acerca de las quejas. El tratamiento debe incluir una descripción del proceso de recepción, validación, investigación de la queja y decisión sobre las acciones a tomar para darles respuesta.
- 7.10 Trabajo no conforme: El Laboratorio debe contar con un procedimiento que se debe implementar cuando cualquier aspecto de sus actividades de laboratorio o de los resultados de este trabajo no cumplan con sus propios procedimientos o con los requisitos acordados con el cliente.
- 7.11 Control de los datos y gestión de la información: El Laboratorio debe tener acceso a los datos y a la información necesaria para llevar a cabo las actividades de laboratorio.
- **Punto 8 de Requisitos del sistema de gestión:** En este punto aparece la gran diferencia con la versión anterior, algo muy interesante. La Norma permite dos alternativas para dar cumplimiento con la ISO/IEC 17925 en función de la actividad del Laboratorio, una Opción A y una opción B:
  - Opción A: Cumplir los requisitos de gestión indicados explícitamente, tales como:
    - Control de documentos y registros, deben existir procedimientos para controlar los documentos internos, externos y conservados en soporte informático. Es fundamental la actualización y control de la distribución para garantizar que el sistema utilizado está en vigor y que todo el personal actúa de acuerdo con los que están aprobados, así como el control de los documentos obsoletos. Por otro lado, es importante modificar los procedimientos a medida que se producen cambios en la organización, legislación o se introducen cambios.
    - En lo referente a la mejora, concepto nuevo que viene a asemejar a las acciones preventivas, se deben identificar y planificar todas aquellas acciones enfocadas a perseguir la mejora continua del sistema.
    - Determinar acciones para abordar riesgos y oportunidades asociados con las actividades del laboratorio para asegurar que el sistema de gestión logre sus resultados previstos.
    - Un sistema para estimar las acciones correctivas con objeto de eliminar la fuente de No Conformidades y evitar que se repitan.
    - Realización de auditoría internas a intervalos planificados.
    - Realizar revisiones por la dirección a intervalos planificados con el fin de asegurar su conveniencia, adecuación y eficacia.

- Opción B: Contar con un sistema de gestión de la calidad existente bajo ISO 9001, lo que nos exceptúa de verificarlo en ISO 17025, ya que se supone que con ISO 9001 ya se contemplan dichos requerimientos

El Anexo A hace mención a la trazabilidad metrológica y el Anexo B a las opciones de sistemas de gestión.

MATERIAL NO OFICIAL

## BIBLIOGRAFÍA

UNE-EN ISO 9001:2015 "Sistemas de Gestión de la Calidad. Requisitos

UNE-EN ISO/IEC 17025 Requisitos generales para la competencia de los laboratorios de ensayo y calibración

NT-18 Rev. 2 de Marzo 2020 de "Laboratorios de Ensayo: Acreditación para Categorías de Ensayo"

CEA-ENAC-22 Rev. 1 de Mayo 2027 de "*Laboratorio de ensayos en el ámbito de la Sanidad Animal: Directrices para la acreditación*".

Reglamento (CE) nº 765/2008 del Parlamento Europeo y el Consejo de 9 de julio de 2008 por el que se establecen los requisitos de acreditación y por el que se deroga el Reglamento (CEE) nº 339/93.

Sistema de gestión de la calidad en el laboratorio (LQMS), Manual OMS.  
<https://www.who.int/es/publications/i/item/9789241548274>

OiE, Capítulo 1.1.3 Gestión de calidad en los laboratorios de pruebas veterinarias (mayo 2012).

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

## **MATERIAL PARA LA PREPARACIÓN DEL TEMA 3**

### **SISTEMAS DE GESTIÓN AMBIENTAL. REQUISITOS APLICABLES EN EL LABORATORIO. NORMA UNE-EN ISO 14001**

*Este material no tiene carácter oficial, por lo que en ningún caso vinculará al Tribunal Calificador. Constituye, únicamente, un instrumento complementario que servirá de apoyo al opositor para enfocar cada uno de los epígrafes, pero nunca de forma exclusiva ni excluyente. El Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación no se hace responsable del contenido del mismo.*

*Los materiales no serán objeto de actualización constante.*

## **ÍNDICE**

- 1. INTRODUCCIÓN**
- 2. SISTEMAS DE GESTIÓN AMBIENTAL.**
- 3. NORMA UNE-EN ISO 14001**
- 4. REQUISITOS APLICABLES EN EL LABORATORIO**

MATERIAL NO OFICIAL

## 1. INTRODUCCIÓN

No se puede pasar un solo día en nuestro planeta sin ejercer un impacto sobre el medio ambiente. Lo que cada individuo hace, marca una diferencia y está en nuestra mano decidir qué tipo de diferencia queremos marcar. Esta reflexión de Jane Goodall, antropóloga y mensajera de la paz de la ONU, invita a pensar sobre las consecuencias, negativas o positivas, que puede tener la actividad empresarial para el entorno.

A partir de la aparición en los años 80 de los referentes Normativos orientados al diseño e implantación de los sistemas de aseguramiento y gestión de la calidad, surge la necesidad de desarrollar paralelamente, modelos normativos que aseguren la gestión de los aspectos medioambientales de las organizaciones, como una de las formas básicas de consolidar la competitividad de las organizaciones, a través, entre otros elementos, de la internalización de los costes medioambientales derivados de sus actividades.

Como en otros sectores de actividad, el origen histórico de los actuales modelos de gestión medioambiental, surge asociado directamente al sector químico. Así, después de algunos accidentes industriales ocurridos en los años 60 y 70<sup>1</sup> con gravísimas consecuencias sobre la seguridad y salud de las personas, además de sobre el medio ambiente, el sector químico en su conjunto emprende una serie de acciones orientadas a definir criterios de actuación para asegurar la seguridad y salud de las personas, además de la protección medioambiental.

Estas acciones y criterios de actuación han dado lugar a un instrumento de gestión no normalizado conocido actualmente como "Compromiso de Progreso" (*Responsible Care*), al que pueden adherirse de forma voluntaria las organizaciones del sector químico, para demostrar tanto el compromiso, como la implantación real de sistemas de gestión que aseguren la protección de la seguridad, salud e higiene del personal propio y de partes interesadas, además de la prevención de la contaminación asociada a sus procesos productivos.

Más tarde, a partir de los años 90, con la aparición de Reglamentos Europeos de gestión medioambiental y posteriormente, la aparición de las Normas ISO (*International Standard Organization*) de gestión medioambiental, así como los esquemas de acreditación y certificación basados en estas normas, han constituido el referente tanto a nivel europeo como mundial.

El aumento progresivo de acreditaciones y certificaciones a nivel internacional en los últimos años, pone de manifiesto el grado de competitividad que están adquiriendo las organizaciones en sus ámbitos específicos de actuación, y en materia de la gestión medioambiental, de sus aspectos ambientales y su relación con las partes interesadas, considerando entre ellas, al

---

<sup>1</sup> El desastre de Seveso en Italia en el 76 donde un incendio industrial en una planta química causó la liberación de dioxina TCDD; o el desastre de Bhopal en el 84 que, al no cumplirse con las medidas de limpieza y mantenimiento de la planta, produjo una fuga de gas de isocianato de metilo en una fábrica de pesticidas dando lugar a la muerte de aproximadamente 7000 personas en la primera semana.

personal propio de la organización, la Administración, entorno social, proveedores, clientes, etc.

## 2. SISTEMAS DE GESTIÓN AMBIENTAL.

La definición de un sistema de gestión ambiental dentro de una organización no es una tarea sencilla. Para favorecer el trabajo de las organizaciones, identificar los elementos esenciales y conseguir una uniformidad de criterios, se han establecido diversos modelos de carácter voluntario que cubren objetivos similares pero tienen ámbitos de actuación geográficos diferentes y que, por tanto, cubren los requerimientos de su entorno inmediato.

Actualmente se dispone a nivel internacional de dos modelos de Sistemas de Gestión Medioambiental, que constituyen un conjunto de estándares que proporcionan a las organizaciones, un sistema para la gestión de los aspectos medioambientales asociados a sus actividades y procesos y, que pueden ser reconocidos (certificados o verificados) por organismos independientes:

- Las llamadas Normas de la serie ISO 14000 constituyen el modelo internacional de referencia más utilizado para el diseño y la implantación de SGA aplicable a organizaciones industriales y de servicio. Dentro de esta serie encontramos ISO 14001 "Sistemas de Gestión Medioambiental. Requisitos con orientación para su uso"
- Otro referente normativo es el surgido a nivel europeo y conocido bajo las siglas EMAS: *Environment Management and Audit System*; Reglamento (CE) nº 1221/2009 del Parlamento Europeo y del Consejo de 25 de noviembre de 2009 relativo a la participación voluntaria de organizaciones en un sistema comunitario de gestión y auditoría medioambientales. Las organizaciones que deseen ser incluidas en el registro europeo EMAS deben realizar un análisis medioambiental inicial de sus actividades con el contenido mínimo especificado en el anexo I del Reglamento. Después, en función de los resultados obtenidos en dicho análisis, aplicar un sistema de gestión basado en ISO 14001, realizar una auditoría interna y una declaración ambiental con los contenidos conforme a los requisitos que se establecen en el propio reglamento.

En ambos casos son modelos que las organizaciones adoptan de forma voluntaria y en el momento que se requiera demostrar su cumplimiento deberán contar con el reconocimiento de una organización independiente que certifique o verifique el sistema de gestión adoptado. Cabe reseñar que la entidad de certificación o de verificación debe estar bajo el respaldo de una acreditación, los denominados Organismos Evaluadores de la Conformidad. Diferenciamos por tanto los concepto de certificación: actuación conforme a una norma; acreditación: reconocimiento de competencia técnica. En España el único organismo autorizado para acreditar (reconocer competencia técnica) en cualquier ámbito de actuación es ENAC, Entidad Nacional de Acreditación. Por otro lado, existen multitud de entidades de certificación, como por ejemplo AENOR, Bureau veritas, etc.

El objetivo de un Sistema de Gestión Ambiental es proporcionar a las organizaciones un marco de referencia para proteger el medio ambiente y responder a las condiciones ambientales

cambiantes, en equilibrio con las necesidades socioeconómicas. En este propósito se puede ver claramente el concepto de desarrollo sostenible y cómo el sistema de gestión ambiental debe contribuir al “pilar ambiental” de la sostenibilidad. La norma ISO 14001 especifica requisitos que permiten que una organización logre los resultados previstos que ha establecido para su sistema de gestión ambiental. Un enfoque sistemático a la gestión ambiental puede proporcionar información a la alta dirección para generar éxito a largo plazo y crear opciones para contribuir al desarrollo sostenible mediante:

- La protección del medio ambiente mediante la prevención o mitigación de impactos ambientales adversos;
- La mitigación de efectos potencialmente adversos de las condiciones ambientales sobre la organización;
- El apoyo a la organización en el cumplimiento de los requisitos legales y otros requisitos;
- La mejora del desempeño ambiental;
- El control o la influencia sobre la forma en la que la organización diseña, fabrica, distribuye, consume y lleva a cabo la disposición final de productos o servicios, usando una perspectiva de ciclo de vida que pueda prevenir que los impactos ambientales sean involuntariamente trasladados a otro punto del ciclo de vida;
- El logro de beneficios financieros y operacionales que puedan ser el resultado de implementar alternativas ambientales respetuosas que fortalezcan la posición de la organización en el mercado;
- La comunicación de la información ambiental a las partes interesadas pertinentes.

El éxito de un sistema de gestión ambiental depende del compromiso de todas las funciones y niveles de la organización bajo el liderazgo de la alta dirección. Las organizaciones pueden aprovechar las oportunidades de prevenir o mitigar impactos ambientales adversos e incrementar los impactos ambientales beneficiosos, particularmente los que tienen consecuencias estratégicas y de competitividad. La alta dirección puede abordar eficazmente sus riesgos y oportunidades mediante la integración de la gestión ambiental a sus procesos de negocio, dirección estratégica y toma de decisiones, alineándolos con otras prioridades de negocio, e incorporando la gobernanza ambiental a su sistema de gestión global. La demostración de la implementación exitosa de esta Norma Internacional se puede usar para asegurar a las partes interesadas que se ha puesto en marcha un sistema de gestión ambiental eficaz.

Sin embargo, la adopción de esta Norma Internacional (ISO 14001) no garantiza en sí misma resultados ambientales óptimos. Su aplicación puede ser diferente de una organización a otra debido al contexto de la organización. Dos organizaciones pueden llevar a cabo actividades similares pero pueden tener diferentes requisitos legales y otros requisitos, diferentes compromisos de política ambiental, diferentes tecnologías ambientales y diferentes objetivos de desempeño ambiental, y aun así ambas pueden ser conformes con los requisitos de la Norma Internacional.

El nivel de detalle y complejidad del sistema de gestión ambiental variará dependiendo del contexto de la organización, el alcance de su sistema de gestión ambiental, sus requisitos

legales y otros requisitos y la naturaleza de sus actividades, productos y servicios, incluidos sus aspectos ambientales y los impactos ambientales asociados.

### **3. LA NORMA UNE-EN ISO 14001**

Sin duda alguna, la Organización Internacional de Normalización (ISO) marcó la diferencia en el año 1996 cuando publicó la norma ISO 14001. Desde entonces, este documento ha constituido un modelo de referencia a nivel internacional para las organizaciones que pretenden gestionar de una manera sistemática sus aspectos ambientales desde el compromiso del cumplimiento de la legislación, de la prevención de la contaminación y de la mejora continua de su comportamiento ambiental.

Organizaciones de todo tipo están cada vez más interesadas en alcanzar y demostrar un sólido desempeño ambiental, realizado en el contexto de una legislación cada vez más exigente, del desarrollo de políticas económicas y otras medidas para fomentar la protección ambiental, y de un aumento de la preocupación expresada de las partes interesadas por los temas ambientales, incluido el desarrollo sostenible.

En España, a través de la Asociación Española de Normalización (UNE), se publica la norma en español como Norma UNE-EN ISO 14001.

El Comité Técnico ISO/TC 207 Gestión ambiental, ha sometido a la norma a un proceso de revisión en dos ocasiones. En consonancia con uno de los lemas de esta organización, “las normas internacionales hacen que las cosas funcionen”, la revisión de las normas se hace necesaria porque las circunstancias y el contexto de sus usuarios van cambiando a lo largo del tiempo, y porque las organizaciones que utilizan y adoptan estas normas son generadoras de cambio.

Como resultado del primer proceso de revisión de la ISO 14001, se publicó una segunda versión del documento en el año 2004. A pesar de que no supuso un cambio significativo en el contenido del documento, se introdujeron algunas novedades que trataban de dar respuesta a un gran número de organizaciones que ya tenían implantadas otras normas ISO, en concreto, la ISO 9001 de sistemas de gestión de la calidad, de manera que se potenció su alineamiento facilitando la integración de ambos sistemas de gestión. Además, se dio relevancia a la necesidad de asegurar el cumplimiento legal y se reforzó la implicación de proveedores y contratistas en la gestión ambiental de la organización.

El segundo proceso de revisión, que se inició en el año 2012, ha dado como resultado la tercera versión de la ISO 14001, publicada en septiembre de 2015. En este proyecto han participado 121 expertos de 88 países, en España AENOR como Organismo Español de Normalización.

Hay dos documentos de ISO que han sido determinantes en esta revisión: el documento Retos futuros de los sistemas de gestión ambiental y de la ISO 14001 y la incorporación de la estructura de alto nivel (*High Level Structure, HLS*).

El informe Retos futuros de los sistemas de gestión ambiental y de la ISO 14001 fue elaborado por el TC 207/SC 1 y aprobado en el año 2010 con dos objetivos fundamentales: analizar los

retos que los sistemas de gestión ambiental deberían acometer en el futuro, y considerar nuevos enfoques y metodologías en el ámbito de los sistemas de gestión ambiental, incluyendo las necesidades y expectativas de las partes interesadas surgidas desde la primera publicación de la norma en 1996.

Así, se identificaron cuestiones como la necesidad de integrar la gestión ambiental en la estrategia de negocio de la organización, aumentar el grado de compromiso ambiental potenciando el liderazgo al más alto nivel e implementar proactivamente las iniciativas para proteger el medio ambiente evitando su degradación. También se contemplaron otros retos, como la incorporación de una estrategia de comunicación, tanto interna como externa, enfocada a dar respuesta a las necesidades y expectativas de las partes interesadas y la necesidad de incluir la perspectiva de ciclo de vida, asegurando la consideración de los aspectos ambientales desde el diseño hasta el fin de vida de un producto o servicio.

Por otro lado, la adopción de la estructura de alto nivel en la elaboración de la versión del 2015 ha constituido el punto de inflexión a la hora de entender e implantar la nueva ISO 14001. El origen de esta estructura se remonta a febrero del año 2006, cuando la dirección técnica de ISO constituyó un grupo de coordinación técnica con la misión de desarrollar las directrices para la redacción de las futuras normas de sistemas de gestión y para la revisión de las ya existentes

¿Qué es la estructura de alto nivel (HLS)? Mismo enfoque, misma terminología, mismo texto común para las normas de sistemas de gestión de ISO. Es decir, es la hoja de ruta que deberán utilizar todos los comités técnicos de ISO para elaborar y revisar normas de sistemas de gestión, independientemente de su ámbito de aplicación (calidad, medio ambiente, energía, seguridad y salud laboral, alimentación, etc.).

Este modelo, ciclo Deming, asegura la compatibilidad del modelo PHVA (planificar, hacer, verificar y actuar) de la ISO 14001 con el modelo de gestión por procesos de la ISO 9001.

- Planificar: establecer los objetivos ambientales y los procesos necesarios para generar y proporcionar resultados de acuerdo con la política ambiental de la organización
- Hacer: Implementar los procesos según lo planificado
- Verificar: Hacer el seguimiento y medir los procesos respecto a la política ambiental, incluidos sus compromisos, objetivos ambientales y criterios operacionales e informar de sus resultados.
- Actuar: emprender acciones para mejorar continuamente

De esta forma, la adopción de la HLS mejora el alineamiento de las normas de sistemas de gestión para facilitar su integración y ayudar a las organizaciones, de cualquier índole, tamaño, ubicación geográfica, su implantación y certificación, lo que, entre otras ventajas, aporta valor añadido y reduce costes.

El pensamiento basado en riesgo, el concepto de información documentada y la desaparición de la necesidad de documentar la acción preventiva son consecuencia de la adopción de la estructura de alto nivel. Esto es así dado que los sistemas de gestión basados en esta estructura son en sí mismos una acción preventiva, porque introducen la necesidad de tener

en cuenta los riesgos asociados a las actividades de la organización, de forma que se minimicen sus posibles efectos adversos pero, a su vez, se potencien los efectos beneficiosos.

La Norma UNE-EN ISO 14001:2015, de “Sistema de gestión ambiental. Requisitos con orientación para su uso” especifica los requisitos de un Sistema de Gestión Ambiental que permita a las organizaciones desarrollar e implementar una política y unos objetivos que tengan en cuenta los requisitos legales y la información sobre los aspectos ambientales significativos, para mejorar su desempeño ambiental.

El objetivo global de la Norma es apoyar la protección ambiental y la prevención de la contaminación en equilibrio con las necesidades socioeconómicas de una forma que sea fácil de integrar con otros sistemas de gestión y con los procesos de negocio de la organización.

Para lograr objetivos ambientales, el Sistema de Gestión Ambiental puede estimular a las organizaciones a considerar la implementación de las mejores técnicas disponibles cuando sea apropiado y económicamente viable, y a tener en cuenta completamente, la relación entre el costo y la eficacia de estas técnicas.

La implantación de un Sistema de Gestión Ambiental (SGA) según la norma internacional ISO 14001 suscita varias ventajas en una organización:

Desde el punto de vista más comercial, la organización se posicionará como socialmente responsable, diferenciándose de la competencia y reforzando, de manera positiva, su imagen ante clientes y consumidores.

Entre otras ventajas ambientales, optimizará la gestión de recursos y residuos, reducirá los impactos ambientales negativos derivados de su actividad o aquellos riesgos asociados a situaciones accidentales.

Económicamente, además de potenciar la innovación y la productividad, tendrá la posibilidad de reducir costes de la gestión de residuos o primas de seguros, eliminar barreras a la exportación, reducir el riesgo de litigios y sanciones, tener mayor acceso a subvenciones y otras líneas de financiación preferentes o disminuir los riesgos laborales motivando al personal.

La Norma UNE-EN ISO 14001:2015 contiene los requisitos utilizados para evaluar la conformidad, de manera que, aquellas organizaciones que deseen demostrar conformidad con dicha norma internacional pueden:

- realizar una autodeterminación y una autodeclaración, o
- buscar la confirmación de su conformidad por partes que tengan interés en la organización, como por ejemplo los clientes, o
- buscar la confirmación de su autodeclaración por una parte externa a la organización, o
- buscar la certificación/registro de su sistema de gestión ambiental por una parte externa a la organización.

Los requisitos de la Norma se establecen en 10 puntos, que son:

Prólogo

Prólogo de la versión en español

## **0 Introducción**

### **1 Objeto y campo de aplicación**

### **2 Referencias normativas**

### **3 Términos y definiciones**

3.1 Términos relacionados con organización y liderazgo

3.2 Términos relacionados con planificación

3.3 Términos relacionados con soporte y operación

3.4 Términos relacionados con la evaluación del desempeño y con la mejora

### **4 Contexto de la organización**

4.1 Comprensión de la organización y de su contexto

4.2 Comprensión de las necesidades y expectativas de las partes interesadas

4.3 Determinación del alcance del sistema de gestión ambiental

4.4 Sistema de gestión ambiental

### **5 Liderazgo**

5.1 Liderazgo y compromiso

5.2 Política ambiental

5.3 Roles, responsabilidades y autoridades en la organización

### **6 Planificación**

6.1 Acciones para abordar riesgos y oportunidades

6.1.1 Generalidades

6.1.2 Aspectos ambientales

6.1.3 Requisitos legales y otros requisitos

6.1.4 Planificación de acciones

6.2 Objetivos ambientales y planificación para lograrlos

6.2.1 Objetivos ambientales

6.2.2 Planificación de acciones para lograr los objetivos ambientales

### **7 Apoyo**

7.1 Recursos

7.2 Competencia

7.3 Toma de conciencia

7.4 Comunicación

7.4.1 Generalidades

7.4.2 Comunicación interna

7.4.3 Comunicación externa

7.5 Información documentada

7.5.1 Generalidades

7.5.2 Creación y actualización

7.5.3 Control de la información documentada

### **8 Operación**

8.1 Planificación y control operacional

8.2 Preparación y respuesta ante emergencias

### **9 Evaluación del desempeño**

9.1 Seguimiento, medición, análisis y evaluación

9.1.1 Generalidades

9.1.2 Evaluación del cumplimiento

- 9.2 Auditoría interna
- 9.2.1 Generalidades
- 9.2.2 Programa de auditoría interna
- 9.3 Revisión por la dirección

#### **10 Mejora**

- 10.1 Generalidades
- 10.2 No conformidad y acción correctiva
- 10.3 Mejora continua

Anexo A (Informativo) Orientaciones para el uso de esta Norma Internacional

Anexo B (Informativo) Correspondencia entre ISO 14001:2015 e ISO 14001:2004 44

#### **4. REQUISITOS APLICABLES EN EL LABORATORIO**

En un laboratorio de sanidad y genética animal, en el que se desarrollan diversas actividades con agentes biológicos, químicos peligrosos, OMG, etc. y que pueden ser fuente potencial de enfermedades animales y contaminación del medio ambiente por su presencia, incluidas las zoonóticas, la toma en consideración del medio ambiente puede tener especial relevancia en la estrategia de gestión ambiental.

Siguiendo la estructura de los requisitos de la Norma, se irán explicando cada uno de ellos y su aplicación en el Laboratorio.

En lo referente a la estrategia de la organización, se da gran peso a lo que se denomina “**contexto de la organización**”, es decir, la organización debe examinar el contexto en el que opera, sus alrededores, identificando los factores internos y externos que pueden ser relevantes para su eficacia y lograr los resultados previstos. Como resultados principales que se esperan de una implantación de una SGA 14001 son, la mejora del desempeño ambiental, el cumplimiento de los requisitos legales y el cumplimiento de objetivos de mejora.

La finalidad del análisis del contexto es alcanzar un nivel de conocimiento de las cuestiones importantes para la organización que puedan afectar positiva o negativamente a la estrategia y a la gestión ambiental, para tenerlas en cuenta a la hora de diseñar el SGA y para planificar la operación y la mejora.

El contexto puede referirse a condiciones ambientales como la disponibilidad de recursos, tales como la posibilidad de acceder a suministro de energías renovables, situación política ya que puede afectar a la operativa de la organización imponiendo o sugiriendo determinados comportamientos ambientales o establecimiento de determinadas políticas de desarrollo económico; Un ejemplo sería la incorporación de requisitos ambientales en la compra de productos o servicios por parte del Laboratorio (limitar la compra de equipamiento con distintivos ambientales, marcado triple A, etc.).

Sobre estas cuestiones la organización debe hacer un análisis, la norma no establece un método, por ejemplo se puede utilizar **análisis DAFO**: debilidades, amenazas, fortalezas y oportunidades. Es una metodología de estudio de la situación de una organización, proceso, proyecto, que analiza los factores internos (debilidades y fortalezas) y externos (amenazas y oportunidades) que influyen en los resultados. Una vez establecidas estas cuestiones

mediante la construcción de una matriz permite conocer las capacidades internas e identificar desafíos presentes y futuros a abordar por la organización, consolidando las fortalezas, minimizando las debilidades, aprovechando las ventajas de las oportunidades, y eliminando o reduciendo las amenazas.

Algunos ejemplos de planes de acción al considerar los factores del contexto en la estrategia y la gestión ambiental en un laboratorio podrían ser:

- Diseño de ensayos de diagnóstico de enfermedades animales con menor impacto para el medio ambiente reduciendo o eliminado el uso de reactivos tóxicos y peligrosos y sustituyéndolos por otros de menor impacto sin comprometer el aseguramiento de la validez de los resultados.
- Implementación de un programa de reducción de las emisiones totales de CO<sub>2</sub>,
- Implementación de un sistema de gestión para la eficiencia energética,

Por otro lado las organizaciones no operan de forma aislada, sino que interactúan con varios elementos de su contexto. Las **partes interesadas** forman parte del contexto. Se define en la norma como persona u organización que puede afectar, o verse afectada o percibirse afectada por una decisión o actividad. Con este concepto se ha pretendido introducir el concepto de responsabilidad social que cada vez es más demandado por distintas partes interesadas.

Al desempeñar sus actividades, las organizaciones impactan en la sociedad a varios niveles, económica, ambiental y social, a escala local y global. Partes interesadas pueden ser por ejemplo proveedores, contratistas, ONG, grupos de presión, medios de comunicación, personal interno de la organización, administraciones públicas, etc. Como resultado de la identificación de las partes interesadas y de la comunicación/relación con ellos la organización obtiene resultados útiles y ventajosos como mejor comprensión del contexto, mejora de prácticas de gestión empresarial, fomentar la innovación y el cambio incorporando mejoras en los procesos, etc.

Tras la identificación, se debe analizar sus **necesidades y expectativas** para que la organización las tenga en cuenta en la gestión de sus responsabilidades ambientales, determinando aquellas que se convertirán en requisito. Para ello se puede utilizar cuestionarios, reuniones, acceso web, etc.

Cuando pensamos en las necesidades de la parte interesada, estamos hablando necesariamente de todo lo que necesitan para ejecutar el proceso, de todo lo que es necesario para su trabajo. Entonces, estamos hablando de recursos, materias primas, un lugar de trabajo adecuado, cumplimiento de requisitos acordados en pedidos y contratos, comunicación y todo lo que desarrolla su proceso de producción o de prestación de un servicio.

Al hablar de las expectativas, nos estamos refiriendo a lo que la parte interesada espera de la empresa y lo que la empresa eligió entregar a la parte interesada. Podemos citar, por ejemplo, como expectativas una remuneración justa, incentivo a la calificación de su puesto de trabajo, posibilidades de crecimiento, y una serie de otros factores.

Una vez obtenida la información de las partes interesadas, es conveniente responderles con las acciones emprendidas que hayan repercutido de manera positiva en el medio ambiente.

La filosofía de la Norma da mayor peso que en las anteriores revisiones de la norma al **liderazgo**, es decir, a la implicación y el compromiso de la alta dirección como una parte esencial para la implementación de un SGA efectivo y capaz de alcanzar los resultados esperados. Debe hacer visible su implicación ante el resto de la organización y ante las partes interesadas. El liderazgo del sistema implica la toma en consideración del medio ambiente en el momento de definir la estrategia y también la integración de la gestión ambiental en los procesos de negocios. Dentro de las responsabilidades que debe asumir la alta dirección se encuentra definir y aprobar la política ambiental y los objetivos que la desarrollan, proporcionar recursos financieros, materiales y humanos requeridos, promover la mejora continua, etc.

Un ejemplo de liderazgo aplicado en un laboratorio de sanidad y genética animal podría ser la realización de un estudio de la contaminación que provoca el uso de determinados descontaminantes y desinfectantes y su sustitución por otros de menor impacto perjudicial en el medio ambiente y sin comprometer la bioseguridad.

El núcleo central de la nueva revisión de la Norma ISO 14001 es las **acciones para abordar riesgos y oportunidades**. Según esta nueva filosofía la organización debe tener un pensamiento basado en riesgos, esto significa que la organización debe pensar en cómo es su interacción con el medio ambiente, y si va originar una serie de amenazas (riesgo como amenazas) que pueda ocasionar serios problemas ambientales. Del mismo modo, el pensamiento debe estar basado en la búsqueda de la oportunidad de mejora ambiental y de negocio (riesgo como oportunidad).

Se considera un requisito clave que al planificar el SGA, se debe considerar el resultado del análisis del contexto (incluyendo necesidades y expectativas) y el alcance del sistema de gestión, de forma que determine los riesgos y las oportunidades relacionados con los aspectos ambientales, los requisitos legales y otras cuestiones derivadas del análisis del contexto económico, tecnológico y social.

Esta valoración es de vital importancia para asegurar que el sistema de gestión alcanza los resultados previstos, previniendo o reduciendo los efectos no deseados y logrando la mejora continua. Tras la identificación se debe planificar las acciones necesarias para abordar los riesgos y las oportunidades.

Para la mejor comprensión de estos conceptos se describe algunos ejemplos:

Ejemplo 1. Si el centro se encuentra alejado del centro urbano, se puede presuponer que los trabajadores acudirán en su coche individual, identificándose como riesgo la contaminación ambiental; como oportunidad se extrae la realización de campañas para el fomento de uso de transporte público o compartido.

Ejemplo 2. En la identificación de requisitos legales, se determina que aplica al centro la Ley 10/1993, de 26 de octubre, de vertidos líquidos industriales al sistema integral de saneamiento de la Comunidad de Madrid; se puede identificar como riesgo la superación del límite legal de los parámetros definidos y sus límites en dicha ley debido a malas prácticas de laboratorio y adición por la pila de sustancias no permitidas.

Ejemplo 3. Si la instalación posee equipos de aire acondicionado o cámaras de refrigeración con gases fluorados de efecto invernadero (el ya prohibido R22) se puede establecer como oportunidad de mejora la sustitución de estos equipos por gases de sustancias permitidas en cumplimiento del Reglamento (UE) nº 517/2014 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 16 de abril de 2014, sobre los gases fluorados de efecto invernadero y por el que se deroga el Reglamento (CE) nº 842/2006.

Siguiendo con los requisitos de planificación, se deben identificar y evaluar los **aspectos ambientales** de la organización, productos y servicios. Estos son los aspectos que se derivan de las actividades que realiza la organización y que tienen un impacto en el medio ambiente, ya sea beneficioso (como reciclado, mejora de un ecosistema: plantación de árboles) o perjudicial (como vertidos contaminantes, producción de residuos, consumo de recursos naturales). Hay que tener en cuenta que puede haber aspectos directos (que son aquellos sobre los que la organización tiene una influencia directa o un control) o indirecto (sobre los que no se dispone de control, pero si una influencia, ej; los clientes, proveedores). Tras una evaluación en la que se tenga en cuenta parámetros como la magnitud, la frecuencia del aspecto, el grado de impacto que provoque y los sistemas que se disponga para su control y contención se deben tener en cuenta aquellos que hayan resultado ser significativos o muy significativos para el medio ambiente (ya sea perjudicial o beneficioso) para la formulación de los objetivos del próximo año.

La identificación de los aspectos ambientales en el laboratorio se llevará a cabo cuando se den algunas de las siguientes circunstancias:

- Aparición de nuevos requisitos legales y otros requisitos.
- Cambios en la operación/diseño de la actividad o proceso.
- Implantación o cese de una actividad/proceso.
- Modificaciones en la naturaleza de las materias/productos/sustancias utilizadas.
- Funcionamiento en condiciones anormales o situaciones de emergencia.
- Otras causas.

Además, se deben identificar y evaluar los **requisitos legales y otros requisitos** que la organización suscriba, relativos a los aspectos ambientales de la organización. Estos serán en relación a diferentes vectores como aguas, suelo, aire, seguridad industrial, prevención de riesgos laborales, etc. Se debe realizar una identificación de los requisitos legales y otros requisitos, identificar las evidencias legislativas y realizar un seguimiento y control de la evaluación del cumplimiento legal. Un ejemplo dentro del laboratorio es la existencia de un centro de transformación de Alta Tensión y, tras el estudio de la normativa aplicable, se identifica como requisito realizar una inspección cada tres años por un organismo de control autorizado de la instalación. El laboratorio deberá evidenciar que se ha realizado con éxito y que se cumple la periodicidad establecida, es decir, se realiza un seguimiento de la evaluación del cumplimiento legal.

Fomentar la planificación ambiental a través del **ciclo de vida** del producto o servicio. El ciclo de vida se define como un conjunto de etapas consecutivas e interrelacionadas de un

producto o servicio, desde la adquisición de materias primas o la generación a partir de recursos naturales hasta su disposición y eliminación final.

Aunque no significa que deba realizarse un análisis del ciclo de vida, sí es importante considerar una perspectiva de ciclo de vida en varios puntos de la implantación de la norma, por ejemplo, al determinar los aspectos ambientales. De esta manera, en un laboratorio de sanidad y genética animal la actividad de realización de ensayos tiene asociado un impacto ambiental negativo que es la segregación de residuos peligrosos, dentro de ellos, los envases vacíos de reactivos de laboratorio. La perspectiva de ciclo de vida podría verse integrada teniendo en cuenta el material de los envases de los reactivos con el fin de poder adquirir aquellos que puedan ser gestionados con el menor impacto ambiental posible, de este modo, los envases de plástico de reactivos peligrosos pueden ser reciclados mientras que los envases de reactivos peligrosos de vidrio son soterrados.

Por otro lado, es necesario evaluar el **desempeño ambiental** frente a la política, los objetivos y metas ambientales de la organización y buscar mejoras donde sea apropiado. En este sentido, es importante establecer indicadores de desempeño ambiental, (IDA) elegidos para la evaluación de la organización.

Los IDA aseguran una rápida evaluación de las principales mejoras y de los puntos débiles en la protección ambiental de la empresa, cuantificándolas y haciéndolas comparables año tras año.

Así, los IDA pueden cumplir diversas funciones:

- Ilustrar mejoras ambientales en un análisis de series temporales
- Obtener reducciones en la contaminación
- Detectar potenciales de optimización
- Obtener y perseguir objetivos y metas ambientales cuantificables
- Identificar oportunidades de mercado y potenciales de reducción de costes
- Evaluar el comportamiento en comparaciones entre empresas
- Proporcionar datos esenciales para informes y declaraciones ambientales

Los IDA se pueden dividir en tres grandes grupos:

1. Indicadores de comportamiento ambiental, indicadores de materiales, consumos, residuos, vertidos, emisiones, energía, infraestructura, etc. Se centran en la planificación, control y seguimiento del impacto ambiental.

2. Indicadores de gestión, reflejan las acciones organizativas que la Dirección está emprendiendo para minimizar el impacto ambiental. Podría servir como ejemplo el número y resultados de las auditorías realizadas, la formación de los trabajadores, evaluación de proveedores, etc. No reflejan el impacto ambiental, pero sirven como medidas de control interno y de información.

3. Indicadores de situación ambiental que describen la calidad del entorno ambiental, por ejemplo la calidad del aire de la región, la contaminación acústica. Se deben determinar si la empresa tiene una gran influencia en las condiciones ambientales locales.

Establecer un proceso para el logro de los **objetivos y metas ambientales**. Estos serán documentados, mensurables cuando sea factible, objeto de seguimiento y actualización y serán en todo caso coherentes con la política establecida. Para establecer los objetivos y metas se tendrá en cuenta entre otros factores:

- Los riesgos y las oportunidades
- Los compromisos establecidos en la política de sistema integrado de gestión, tales como prevención de contaminación, mejora continua, etc.
- Los aspectos ambientales significativos y muy significativos
- Los requisitos legales y otros requisitos
- Quejas y reclamaciones
- Las opciones tecnológicas
- Los requisitos financieros, operacionales y comerciales
- La opinión de las partes interesadas
- Los resultados de las últimas auditorías
- Los resultados de las últimas revisiones por la Dirección

Dentro del bloque **apoyo**, se establecen requisitos relacionados con los recursos, la competencia, toma de conciencia, comunicaciones, entre otros. Es requisito para la organización suministrar recursos apropiados y suficientes, incluida la formación, para cumplir con los requisitos legales y otros requisitos que la organización suscriba, y alcanzar los objetivos y metas ambientales en forma constante.

En relación al bloque de operación, la **planificación y control operacional** se refiere a todas las medidas adoptadas para identificar, establecer, implementar y controlar los procesos necesarios para satisfacer los requisitos del sistema de gestión así como todas aquellas operaciones y actividades, productos o servicios que se realizan, que se deben controlar y que están asociadas con los aspectos ambientales previamente identificados, así como con los requisitos legales. Algunas acciones y/o actividades objeto de control y evaluación pueden ser:

- Control y gestión de los distintos tipos de residuos generados en las instalaciones
- Control de los vertidos líquidos
- Control de la propagación de agentes infecciosos
- Control de los bienes, equipamientos y servicios adquiridos
- Control de las instalaciones y evaluación del cumplimiento legal de requisitos (tales como inspecciones reglamentarias por organismos de control autorizados)
- Control y gestión de compras y contrataciones
- Control y gestión de proveedores
- Control y gestión del almacén

Además, se debe establecer una metodología de **preparación y respuesta ante emergencias** para identificar y responder a incidentes, accidentes potenciales y situaciones de emergencia, con el fin de prevenir y reducir los incidentes y accidentes que sobre las personas puedan recaer y los impactos negativos sobre el medio ambiente que puedan suponer. Estos sucesos pueden estar ocasionados por un incorrecto funcionamiento de los equipos e instalaciones de

forma puntual, un mal uso de los mismos por los trabajadores o cualquier otra circunstancia desafortunada.

Se debe realizar una **identificación de peligros y evaluación de riesgos** de las instalaciones en el que pueda verse afectado el medio ambiente. Los incidentes y accidentes que pueden ocurrir pueden ser incendios, fugas, vertidos, etc.

Una vez identificados serán evaluados en función de su probabilidad de ocurrencia y la gravedad de sus consecuencias, determinando para cada una de ellas las medidas preventivas y de control que son precisas para prevenir su ocurrencia y minimizar sus consecuencias. En ocasiones, estas situaciones pueden causar también un impacto sobre las personas, de manera que se realizará conjuntamente la identificación de los peligros, evaluación de los riesgos y determinación de controles.

En cuanto al bloque para la **Evaluación del desempeño**, se incluyen diversos requisitos como, seguimiento, medición, análisis y evaluación, evaluación del cumplimiento, auditoría interna revisión por la dirección, es decir todas aquellas herramientas que permiten comprobar la eficacia del SGA implantado y la búsqueda de la mejora continua. Cabe reseñar que los **procesos de auditoría** deben ajustarse al alcance establecido y deben suplementarse con otras específicas cuando se dé alguna de las siguientes circunstancias:

- Cuando se introduzcan cambios significativos en el SGA, a fin de evaluar su impacto.
- Cuando exista sospecha o se tenga certeza de que no se cumplen los requisitos establecidos.
- Cuando se requiera verificar la implantación de acciones correctivas.

Los objetivos básicos a cubrir por un programa de auditorías son los siguientes:

- Verificar la implantación del Sistema Gestión implantado.
- Controlar periódicamente su funcionamiento.
- Evaluar la eficacia del Sistema.
- Detectar No Conformidades y acciones de mejora
- Controlar la corrección y cierre de No Conformidades del sistema.

Una **No Conformidad** es una desviación de los requisitos de la Norma o aquellos establecidos de manera interna por la organización. Se debe establecer una sistemática que contemple la detección de trabajos no conformes y no conformidades, el análisis de causas y las propuestas para subsanar, de forma eficaz, las causas que han originado la No Conformidad y evitar así la repetición de la misma. Por último se debe determinar su efectividad y decidir su cierre cuando dichas acciones haya cumplido sus objetivos.

Como se ha mencionado anteriormente, la Norma sigue un modelo denominado ciclo Deming enfocado hacia la **mejora continua**. Empleando las herramientas que nos provee la Norma en cuanto a la identificación de riesgos y oportunidades, establecimiento de objetivos y metas extraídos de la identificación y evaluación de aspectos ambientales, seguimiento y evaluación del desempeño, el laboratorio puede dirigirse hacia la mejora continua, liderada por la alta dirección, teniendo en cuenta las partes interesadas y el contexto en el que se encuentra y seguida y entendida por todo el personal.

## **BIBLIOGRAFÍA**

Norma UNE-EN ISO 14001:2015 “Sistema de gestión ambiental. Requisitos con orientación para su uso”.

Guía para la aplicación de UNE-EN ISO 14001:2015, José Luis Valdés Fernández, María Cristina Alonso García, Natalia Calso Moralesmy, Marisa Novo Soto.

MATERIAL NO OFICIAL

## **MATERIAL PARA LA PREPARACIÓN DEL TEMA 4**

**AUDITORÍAS: CONCEPTO Y TIPOS. ACTUACIÓN FRENTE A DESVIACIONES. NORMAS ISO DE REFERENCIA**

*Este material no tiene carácter oficial, por lo que en ningún caso vinculará al Tribunal Calificador. Constituye, únicamente, un instrumento complementario que servirá de apoyo al opositor para enfocar cada uno de los epígrafes, pero nunca de forma exclusiva ni excluyente. El Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación no se hace responsable del contenido del mismo.*

*Los materiales no serán objeto de actualización constante.*

## **ÍNDICE**

### **1. INTRODUCCIÓN**

### **2. AUDITORÍAS: CONCEPTO Y TIPOS**

#### 2.1 AUDITORÍAS EXTERNAS

#### 2.2. AUDITORÍAS INTERNAS

### **3. ACTUACIÓN FRENTE A DESVIACIONES**

### **4. NORMAS ISO DE REFERENCIA**

MATERIAL NO OFICIAL

## 1. INTRODUCCIÓN

El término certificación hace referencia a la verificación por parte de terceros del cumplimiento de los requisitos establecidos, no obstante dichos requisitos no necesariamente aseguran ni implican competencia técnica. El término acreditación hace referencia al cumplimiento de los requisitos establecidos en una norma lo que conlleva al reconocimiento de competencia técnica por parte de terceros. La competencia técnica implica que el Laboratorio dispone de métodos analíticos técnicamente válidos y validados, que son realizados por personal cualificado y operan en un entorno con control medioambiental adecuados, equipos calibrados, evalúa y aplica medidas correctivas, evalúa con exactitud y controla la incertidumbre de sus medidas y demuestra la competencia de los métodos analíticos utilizados por ejemplo con la participación en ensayos de intercomparación.

La base del enfoque de las normas de certificación (ISO 9001 e ISO 14001) y acreditación (ISO/IEC 17025) siguen un modelo de gestión dinámico que persigue la mejora continua y que constan de 4 etapas: planificar, hacer, verificar y actuar (modelo PHVA) el cual se denomina ciclo *deming*.

- Planificar: establecer los objetivos y los procesos necesarios para generar y proporcionar resultados de acuerdo con la política de la organización
- Hacer: Implementar los procesos según lo planificado
- Verificar: Hacer el seguimiento y medir los procesos respecto a la política, incluidos sus compromisos, objetivos y criterios operacionales e informar de sus resultados.
- Actuar: emprender acciones para mejorar continuamente

La etapa de verificar es aquella en la que se realizan los seguimientos y evaluaciones necesarias para comprobar el estado del sistema. Las series de normas ISO de gestión ponen énfasis en la importancia de las auditorías internas como una herramienta de gestión para el seguimiento y la verificación de la implementación eficaz de la política de la organización o del Laboratorio.

El ciclo se cierra con el proceso de una auditoría externa en la que el Laboratorio recibe un reconocimiento formal de su sistema de gestión y de sus análisis mediante la verificación por parte de terceros. Podemos decir por tanto, que las auditorías son una parte esencial de las actividades de evaluación de la conformidad.

## 2. AUDITORÍAS: CONCEPTO Y TIPOS

Definimos **auditoría** como **el proceso de verificación sistemático, programado y documentado para obtener y evaluar objetivamente evidencias que determinen si el sistema implantado se ajusta a los criterios de auditoría**. Los criterios de auditoría son el conjunto de políticas, procedimientos o requisitos usados como referencia frente a la cual se compara la evidencia de la auditoría. La evidencia de la auditoría son todos aquellos registros,

declaraciones de hechos o cualquier otra información que es pertinente para los criterios de auditoría y que es verificable.

De manera general podemos decir que la auditoría se caracteriza por depender de varios principios. Estos principios deberían ayudar a hacer de la auditoría una herramienta eficaz y fiable en apoyo de las políticas y controles de gestión, proporcionando información sobre la cual una organización puede actuar para mejorar su desempeño. Estos principios serían:

1. Integridad: los auditores y las personas que gestionan un programa de auditoría deberían:

- desempeñar su trabajo con honestidad, diligencia y responsabilidad
- observar y cumplir todos los requisitos legales aplicables
- demostrar su competencia al desempeñar su trabajo
- desempeñar su trabajo de manera imparcial
- ser sensible a cualquier influencia que se pueda ejercer sobre su juicio mientras lleva a cabo una auditoría.

2. Presentación imparcial: la obligación de informar con veracidad y exactitud. Se debería informar, asimismo, de los obstáculos significativos encontrados durante la auditoría y de las opiniones divergentes. Comunicación veraz, exacta, objetiva, oportuna, clara y completa.

3. Debido cuidado profesional: la aplicación de diligencia y juicio al auditar.

4. Confidencialidad: los auditores deberían proceder con discreción en el uso y la protección de la información adquirida en el curso de sus tareas.

5. Independencia: los auditores deberían ser independientes de la actividad que se audita siempre que sea posible, y en todos los casos deberían actuar de una manera libre de sesgo y conflicto de intereses. Para las auditorías internas, los auditores deberían ser independientes de los responsables operativos de la función que se audita.

6. Enfoque basado en la evidencia: la evidencia de la auditoría debería ser verificable. En general se basará en muestras de la información disponible, ya que una auditoría se lleva a cabo durante un período de tiempo delimitado y con recursos finitos.

Las auditorías pueden clasificarse en función de lo que se audite, así por ejemplo se tiene auditorías de producto que son aquellas destinadas a comprobar el proceso de producción de un producto o auditorías técnicas para comprobar que un determinado proceso y/u operación se realiza de acuerdo con los criterios operacionales definidos.

Debemos diferenciar dos tipos de auditorías: externas e internas.

**Auditorías externas:** Llevadas a cabo por entidades acreditadoras o certificadoras. No dependen de la organización, sino del organismo acreditador y/o certificador. Dichas auditorías permiten mantener el certificado adquirido y las frecuencias y programa de las mismas dependerá del organismo que expide dicho Certificado.

**Auditorías internas:** pueden ser realizadas por entidades certificadoras o incluso, por personal del mismo centro pero siempre y cuando se asegure la objetividad e imparcialidad del proceso.

El Laboratorio debe planificar estos procesos periódicamente de acuerdo con un calendario y procedimiento predeterminado. Para ello se desarrolla un programa de auditoría en el que se debe definir los criterios de auditoría y el alcance de dicha auditoría.

Existen dos formas generales de realizar una auditoría que podemos describir de la siguiente manera:

- Auditoría horizontal: La que incide específicamente sobre uno o varios elementos del sistema de gestión, tales como la formación de personal, equipos de medida y calibración, actividad de control de calidad, etc.
- Auditoría vertical: Es aquella en la que partiendo de un elemento del sistema se selecciona al azar todos los elementos del sistema que están asociados, esto es, partiendo de la evaluación de un determinado ensayo, se evalúa, el equipo, personal, material de referencia involucrado en dicho ensayo, registros de ensayo, informe de resultados, etc.

Además, se pueden distinguir auditorías de adecuación para la verificación solamente de la documentación del sistema de gestión y auditoría de conformidad que es la verificación “in situ” del sistema de gestión para ver que cumple con la norma de referencia y con su documentación.

En función de su alcance, puede ser parcial verificando solo algunos elementos (documentación, registros, calibración, aspectos ambientales, objetivos y metas, validaciones, etc.) del sistema de gestión o global.

## 2.1 AUDITORÍAS EXTERNAS

Como se ha comentado anteriormente son llevadas a cabo por entidades acreditadoras o certificadoras.

Las auditorías externas de certificación, son llevadas a cabo por un organismo de certificación que está acreditado por el organismo nacional de acreditación para llevar a cabo estas evaluaciones. En ellas se manifiesta que una organización, producto, proceso o servicio, cumple los requisitos definidos en unas normas o especificaciones técnicas. No son de carácter obligatorio y sus requisitos no necesariamente aseguran ni implican competencia técnica. Como ejemplo de Normas de certificación pueden ser, ISO 9001 o 14001. Algunas entidades certificadoras pueden ser AENOR, GSC, Bureau Veritas, etc.

Las auditorías externas de acreditación, son llevadas a cabo por organismos evaluadores de la conformidad e implican el reconocimiento de competencia técnica. Como ejemplo de Normas de acreditación pueden ser UNE-EN ISO/IEC 17025 o UNE-EN ISO 17034. A diferencia de las entidades certificadoras, solamente existe una entidad para acreditar competencia técnica, ENAC, Entidad Nacional de Acreditación.

En cualquier caso es necesario fijar el alcance de la certificación y/o acreditación, es decir, si el sistema de gestión certificado o acreditado aplica al laboratorio entero o a una parte, si la aplicación de la acreditación es para una técnica, conjunto de técnicas, familias de ensayo,

etc. El alcance de acreditación describirá de forma clara, precisa y sin ambigüedades las actividades acreditadas, de forma que se proporcione una información concreta sobre la competencia técnica demostrada.

Para solicitar la certificación en base a una Norma de la serie ISO, dado que existen multitud de entidades certificadoras, deberán seguirse los requisitos para solicitud establecidos en cada caso.

Para solicitar la acreditación de ensayos en el caso de Laboratorios de sanidad y genética animal, mediante la Norma UNE-EN ISO/IEC 17025, se deberán seguir las indicaciones del documento “*Procedimiento de Acreditación, PAC-ENAC*”, en el que se describe el procedimiento para la solicitud y obtención de la acreditación. De manera resumida el proceso de acreditación consta de las siguientes fases:

### **1ª Solicitud de acreditación**

Mediante la cumplimentación de un formulario de solicitud, se envía a ENAC una serie de documentación que servirá para conocer las características de la organización y el modo en el que se llevan a cabo las actividades para las que solicita la acreditación y para preparar adecuadamente la evaluación. El alcance de acreditación es una parte fundamental de la solicitud ya que en él el solicitante define las actividades concretas para las que desea ser acreditado en función de sus necesidades y objetivos. Además, será necesario identificar al personal clave entendiendo por tal aquel que tiene encomendada la correcta ejecución desde el punto de vista técnico de la actividad acreditada e identificar a la persona de contacto oficial a la que ENAC hará llegar sus comunicaciones y que actuará como interlocutor último del solicitante con ENAC.

Una vez recibida la solicitud de acreditación, ENAC revisa la documentación suministrada con objeto de comprobar que la actividad es susceptible de ser acreditada y comunica al solicitante tanto el número de expediente asignado como el técnico responsable de coordinar su proceso de acreditación.

### **2ª Evaluación**

Designación del equipo auditor: ENAC designa, de entre sus auditores y expertos cualificados, al equipo auditor que llevará a cabo el proceso de evaluación, constituido por un auditor jefe, responsable final de la auditoría, y tantos expertos técnicos como sean necesarios en función de las actividades para las que la organización solicita la acreditación.

Estudio documental: Previo a la auditoría “in situ” se realiza un estudio de los documentos técnicos del Laboratorio con el fin de determinar que son adecuados para realizar la actividad para la que se solicita la acreditación.

Auditoría y visitas de acompañamiento: Durante la auditoría se comprueba el cumplimiento con los requisitos de acreditación mediante la evaluación del sistema de gestión de la organización, su funcionamiento y la ejecución de las actividades. Con objeto de verificar la correcta aplicación e interpretación de los procedimientos de trabajo y la competencia técnica

del personal se seleccionan actividades representativas del alcance de acreditación para presenciar la actuación del personal técnico.

La auditoría se desarrollará en 3 fases:

1) Reunión inicial: entre los representantes del solicitante y el equipo auditor, durante la cual se harán las presentaciones oportunas, se confirmará el plan de la auditoría y el alcance de la misma, y se indicará la sistemática a seguir.

2) Desarrollo de la auditoría: en esta fase se procederá a la evaluación del cumplimiento de los requisitos de acreditación y la correcta aplicación de los procedimientos establecidos por la organización mediante la evaluación de registros, entrevistas con el personal y la observación del funcionamiento del solicitante en condiciones normales de trabajo.

Para ello es necesario que éste lleve a cabo su trabajo de manera rutinaria durante los días de la auditoría. En los casos en que esto no sea posible o cuando el alcance solicitado así lo aconseje, ENAC podrá aportar muestras u objetos (o requerir al solicitante que disponga de ellas) para que sean evaluados por el solicitante durante la auditoría (p.ej. realizar ensayos en una muestra); solicitar, en el caso de laboratorios de calibración, la calibración y cálculo del índice de compatibilidad de uno o varios patrones adaptados a las posibilidades de calibración para las que el laboratorio solicita la acreditación (Medidas de comparación) o programar una serie de visitas de acompañamiento.

3) Reunión final: del equipo auditor con los representantes del solicitante con objeto de presentar a los responsables del mismo un resumen de los resultados de la investigación.

Posteriormente, el equipo auditor, en un plazo no superior a 15 días naturales desde la fecha de realización de la auditoría, elaborará un informe con los resultados e información recopilada durante el proceso de evaluación que le será enviado al solicitante. El informe contendrá las desviaciones (No Conformidades) encontradas que precisas de respuesta y corrección.

El informe tendrá un periodo de validez de 6 meses a partir de su fecha de emisión. Transcurrido este periodo podrá ser necesaria la realización de una nueva auditoría para decidir sobre la acreditación del solicitante.

### **3ª Respuesta del solicitante**

En respuesta a los hallazgos de auditoría y expuestos en el informe de auditoría, el Laboratorio deberá analizar las causas de las desviaciones que se hayan podido detectar, revisar la repercusión que pueden tener en el resto de actividades relacionadas y remitir a ENAC un plan de acciones correctivas (PAC) en un plazo determinado en la Nota Operativa NO-11 de ENAC. En dicho PAC se aportarán evidencias que demuestren que han recibido el tratamiento adecuado para su resolución.

Cabe reseñar, que el solicitante deberá informar a ENAC si, en cualquier momento del proceso de evaluación, lleva a cabo cambios significativos en su organización, personal, medios o documentación aportada. Ante una comunicación de cambio ENAC procederá a su revisión y establecerá, si es preciso, la realización de actividades de evaluación complementaria; la no

comunicación de cambios puede tener como consecuencia la ralentización del proceso de evaluación o la repetición de fases anteriores.

#### **4ª Decisión de Acreditación**

Las decisiones de acreditación son tomadas por un órgano denominado Comisión de Acreditación formado por personal técnico de ENAC independiente del que ha tomado parte en el proceso de evaluación.

Para conceder o mantener la acreditación, la Comisión de Acreditación deberá obtener la confianza adecuada en la competencia técnica del solicitante para llevar a cabo las actividades para las que solicitó la acreditación, en que se cumplen los requisitos de acreditación y en que las desviaciones detectadas en su caso han sido convenientemente tratadas

Para ello analizará la información generada durante el proceso de evaluación y basándose en ello adoptará una de estas decisiones:

- a) Conceder o mantener la acreditación.
- b) Determinar las actividades de evaluación extraordinarias que sean necesarias para asegurarse de la subsanación de las desviaciones detectadas.
- c) Denegar la concesión de la acreditación.

Pero la acreditación no es el resultado de un proceso puntual. ENAC vigila mediante evaluaciones periódicas que las entidades acreditadas continúan cumpliendo los requisitos de acreditación. Si en algún momento se constata que el Laboratorio incumple algunas de las obligaciones de la acreditación, ENAC puede suspender temporalmente o retirar la acreditación hasta que se demuestre de nuevo el cumplimiento con los requisitos de acreditación.

El mantenimiento de la acreditación se estructura en un primer ciclo de cuatro años y ciclos posteriores de cinco años.

Las auditorías de mantenimiento de la acreditación se realizan de manera periódica dentro de cada ciclo y se clasifican en auditorías de seguimiento y de reevaluación.

El primer seguimiento se realizará en un plazo no superior a 12 meses desde la fecha inicial de acreditación, siempre y cuando no se superen 15 meses desde la fecha de realización de la auditoría de acreditación inicial.

Los siguientes seguimientos se realizarán no más tarde de 18 meses desde el anterior seguimiento en el primer ciclo de acreditación y de 24 meses en los siguientes.

Cabe reseñar que para acreditaciones según alcance flexible (NT-18) solamente podrán solicitarse una vez superado el primer ciclo de cuatro años.

Solamente podrán optar a la acreditación por Categoría de ensayos los laboratorios que cumplan con los siguientes requisitos:

- Dispongan de dilatada experiencia en la realización de un número de ensayos concretos suficientemente representativos de la categoría.
- Dispongan de experiencia adecuada en el desarrollo y validación de métodos de ensayo.
- Puedan demostrar buenos resultados en sus controles de calidad internos y externos y en las auditorías de ENAC.
- Dispongan de los equipos de medida precisos para operar en toda la categoría.

ENAC debe garantizar que se evalúa todo el alcance acreditado en cada ciclo de acreditación para lo cual el alcance de dichas auditorías se ajustará, con este fin, en función del tipo y extensión del alcance acreditado.

Al final de cada ciclo de acreditación ENAC debe reevaluar que el sistema implantado cumple los requisitos de acreditación en vigor y la competencia del Laboratorio acreditada para su alcance teniendo en cuenta para ello las actividades evaluadas durante los seguimientos, y, realizando una auditoría equivalente a la inicial.

Cuando el Laboratorio acreditada desee ampliar su alcance de acreditación para incorporar nuevos ensayos y/o calibraciones, variar los rangos, mejorar las capacidades de medida y calibración o incluir nuevos objetos a ensayar y/o calibrar, deberá solicitarlo utilizando para ello el formulario de solicitud correspondiente.

Para acreditaciones según alcance flexible (NT-18), durante las auditorías de seguimiento se comprobará la implantación y eficacia del control establecido por el laboratorio para la gestión de la LEBA. El laboratorio debe evidenciar que mantiene su capacidad técnica y que utiliza el sistema de gestión definido.

## 2.2. AUDITORÍAS INTERNAS

Tal como reflejan los requisitos de las normas ISO que puedan estar implantadas en un Laboratorio, se debe tener un procedimiento para las auditorías internas en el que se describa la metodología de su realización, la periodicidad con la que se van a realizar, los requisitos de formación del personal que vaya a formar parte del equipo auditor, etc.

Para llevar a cabo una auditoría interna de un sistema de gestión, el Laboratorio deberá, por tanto, considerar los siguientes aspectos:

Planificación: Con carácter anual, el responsable del sistema de gestión del Laboratorio elaborará un Plan de Auditorías Internas, en el que se establece el calendario y el alcance de las auditorías a realizar, las áreas o actividades afectadas y la propuesta de los auditores que intervendrán en cada una. Lo habitual es que el Plan de Auditorías Internas sea aprobado por la alta dirección del Laboratorio. Siempre se deberá tener en cuenta que se podrán realizar auditorías adicionales de carácter extraordinario, cuando se estime necesario, pero como mínimo deberá llevarse a cabo una auditoría anual.

Perfil de los auditores: El equipo auditor estará formado por personas cualificadas, con los suficientes conocimientos acerca del sistema de gestión a auditar y sobre la realización de auditorías internas y que no tengan responsabilidades directas en los aspectos del sistema que va a auditar. Podrá ser una persona o un equipo de personas, en cuyo caso se designará un Responsable de la auditoría (auditor jefe). El Laboratorio podrá gestionarlo con personal interno o externo. En ambos casos establecerá unos requisitos de formación y experiencia demostradas.

El desarrollo de la auditoría se puede basar en el procedimiento comentado anteriormente establecido por ENAC. Habitualmente puede constar de las siguientes etapas y singularidades:

Preparación: Antes de la auditoría siempre existirá un proceso previo de preparación donde se lleva a cabo la recopilación y estudio de la documentación aplicable. Es decir, el responsable de los sistemas de gestión del Laboratorio deberá facilitar al auditor o equipo auditor la documentación relativa al Laboratorio, como pueden ser: registros de organización y de personal, procedimientos generales o de ensayo, informes de auditorías previas, etc.). Toda esta documentación será estudiada previamente por el auditor o equipo auditor, quien a su vez, preparará el "cuestionario de auditoría" sobre el que trabajará en el momento de la auditoría. Estos cuestionarios suelen incluir preguntas o verificaciones concretas a realizar, así como referencias al documento que establece el requisito (cuando se crea necesario) y espacio para anotar las observaciones y los registros consultados que presentan la evidencia que da respuesta a la pregunta. No obstante, la auditoría no se debe limitar al cuestionario, sino que, además, el auditor se debe extender a aquellas áreas que a su juicio merecen atención en función del desarrollo de las comprobaciones.

El auditor o equipo auditor remitirá con la antelación suficiente el Programa de Auditoría al responsable del sistema de gestión del Laboratorio, quien a su vez deberá informar a las áreas que van a ser auditadas. El programa deberá incluir, como mínimo:

- Alcance de la auditoría.
- Día y hora.
- Duración.
- Agenda.
- Requisitos necesarios (presencia responsable del área auditada, etc.).
- Equipo auditor (incluyendo el *curriculum* si es personal externo)

**Realización:** Podemos decir que la realización de la auditoría consiste en verificar, mediante el examen y obtención de pruebas objetivas, que se cumplen de forma eficaz los requisitos de la Norma a auditar. Habitualmente se seguirían los siguientes pasos dentro de la realización de la auditoría como tal:

- Reunión previa: dependiendo de la estructura del área auditada, puede ser necesario realizar una reunión previa entre el auditor, el equipo auditor y el responsable del Laboratorio o del área a auditar, teniendo como objetivo la presentación del equipo auditor, comentar si el programa se entiende como adecuado y coordinar la forma de actuación en el proceso en sí mismo.
- Comprobaciones: el auditor y equipo auditor seguirán los cuestionarios de auditoría y se profundizará en aquellos aspectos que se crea necesario. Se anotarán todas las observaciones y desviaciones detectadas, indicando los registros en los que se basan.

Será el equipo auditor, guiado por el auditor jefe, quienes decidan el tipo de auditoría que es mejor aplicar en cada caso (horizontal o vertical); incluso los diferentes expertos técnicos que compongan un equipo auditor pueden decidir utilizar un tipo u otro. Dependerá de factores como son el hecho de estar en una auditoría inicial o de seguimiento, los años que lleva implantado el sistema de gestión en un Centro, el proceso que se va a auditar, etc.

En el caso de las auditorías internas, el Laboratorio puede decidir qué tipo de auditoría puede ayudarle más a mejorar su sistema. De manera general podríamos decir que en los primeros años de la gestión de calidad de un Laboratorio puede ser más fácil y más completo llevar a cabo auditorías horizontales; sin embargo cuando el Laboratorio ya tiene una experiencia de años implantando un sistema de gestión de calidad puede llevar a cabo auditorías verticales en los departamentos donde se llevan a cabo los ensayos.

- Reunión final: este paso puede ser opcional, pero una reunión del auditor o equipo auditor con los responsables de las áreas auditadas suele facilitar después la comprensión del informe. Durante esta reunión se agradece la colaboración a los participantes y se dan algunas conclusiones y comentarios que puedan considerarse adecuados.

**Informe de auditoría:** Una vez terminada la fase de comprobación, se debe generar un informe sobre los resultados de la auditoría. Este tiene la finalidad principal de aportar un conocimiento detallado y útil al responsable de sistema de gestión o y del área auditada. Será elaborado por el Responsable de la auditoría en colaboración con el resto de su equipo. Lo habitual es emitirlo en un plazo entre 15 y 30 días, siempre que sea posible. Este informe contendrá como mínimo los siguientes datos: breve declaración del alcance y finalidad de la auditoría; equipo auditor; personas entrevistadas; fecha de realización; áreas, sistemas, y

secciones auditadas; documentación aplicable; comprobaciones realizadas (se incluirán las observaciones y No Conformidades detectadas de las que hablaremos a continuación).

Es habitual que en los informes de auditorías internas, figuren desviaciones que identifican un defecto del sistema pero que se produce de manera puntual o se ha encontrado de manera aislada. Estas desviaciones puntuales se pueden denominar “**Observaciones o Comentarios**”. En el caso de observaciones o comentarios referidos a un requisito técnico no cuestionarían la validez técnica de los resultados de la actividad acreditada. El Laboratorio evaluará la necesidad de corregir dicha observación o comentario de manera puntual y de la necesidad de establecer otro tipo de acciones correctivas en base al análisis de causas, extensión e impacto. Cabe reseñar que una observación detectada en dos auditorías consecutivas, se convierte automáticamente en grado de No Conformidad.

Si el auditor o equipo auditor así lo considera puede añadir también conclusiones e indicar su impresión general durante el proceso de auditoría o incluso hacer referencia a puntos fuertes o puntos débiles de mejora detectados durante el proceso.

Seguimiento: una vez recibido el Informe de auditoría, el Responsable del sistema de gestión informará de su contenido a las áreas auditadas y a la dirección del Laboratorio. Posteriormente pondrá en marcha las acciones correctivas necesarias para dar respuesta a las observaciones o no conformidades incluidas en el mismo.

La auditoría es una actuación fundamentalmente documental; por tanto, deben obtenerse y conservarse registros escritos de todas las acciones realizadas durante la misma: comunicaciones de la auditoría, programa, cuestionario, *currículum* de los auditores, informe de auditoría, etc.

### 3. ACTUACIÓN FRENTE A DESVIACIONES

La Entidad Nacional de Acreditación (ENAC) recoge en su Nota Operativa NO-11 de “*No conformidades y toma de decisión*”, el método establecido para la clasificación, en función de su gravedad, de las desviaciones detectadas durante los procesos de acreditación, estableciendo asimismo las medidas que tanto el auditado como ENAC deben adoptar para cada una de ellas. Este documento es aplicable a cualquier actividad de evaluación realizada por ENAC que implique la identificación de No Conformidades (auditorías, visitas de acompañamiento, estudios de documentación) excepto en aquellas que se rijan por las reglas de un esquema específico en cuyo caso se aplicarán éstas.

Los tipos de desviaciones que se definen en la NO-11 son:

- **No Conformidad (NC)**: incumplimiento de los requisitos de acreditación puesto de manifiesto por un conjunto de hechos identificados durante la auditoría.
- **Acción correctiva**: Acción encaminada a eliminar las causas que han dado lugar a una no conformidad con el fin de prevenir su recurrencia.

- **Acción de contención:** Acción encaminada a contener o paliar los efectos del problema detectado y evitar su recurrencia y en especial sus efectos sobre la emisión de informes/certificados acreditados hasta que se haya demostrado la implantación de la acción correctiva. Estas acciones pueden incluir controles adicionales, procesos de supervisión reforzados, restricciones temporales de uso en equipos o en cualificaciones del personal, etc.
- **Acción reparadora:** Acción encaminada a corregir de manera inmediata el efecto provocado por una No Conformidad en el pasado (informes/certificados emitidos, etc.).

Los incumplimientos que dan lugar a las no conformidades pueden estar referidos a:

- Requisitos Técnicos, tales como:
  - personal que no demuestra competencia en el trabajo que realiza;
  - procedimientos de trabajo como métodos de ensayo o inspección, procedimientos de certificación, etc., que no son técnicamente adecuados;
  - actividades de evaluación de la conformidad (ensayo, inspección, auditoría, etc.) realizadas de forma ineficaz o inadecuada;
  - ausencia de registros que demuestren que las actividades técnicas se realizan correctamente, ...
- Requisitos de gestión, tales como:
  - documentación que no cumple los requisitos de la norma;
  - fallos en el funcionamiento del sistema de gestión del Laboratorio;
  - actividades no documentadas,
  - ausencia de registros que demuestren el cumplimiento de los requisitos de acreditación, ...
- Requisitos del proceso de acreditación, tales como
  - mal uso de la marca de acreditación
  - incumplimiento de obligaciones establecidas en el Procedimiento de Acreditación o por Comisión de Acreditación, ...

Las no conformidades se basan en hechos identificados en la auditoría (tales como: cierto equipo no está calibrado; no hay registros de la cualificación o supervisión de ciertas personas; ciertos registros no incluyen cierta información; ciertos registros incluyen el uso de equipos de los que no hay evidencia de su mantenimiento; no hay registro de la justificación de cierta decisión técnica; no se dispone de cierto equipo, etc.) que son comunicados a los interlocutores del Laboratorio conforme se detectan para permitir que, en su caso, se complete la información y se aclaren los puntos de duda o desacuerdo, facilitando así la identificación del problema y su alcance.

Cualquier discrepancia que pudiese tener el Laboratorio sobre los hechos identificados por el equipo auditor debe ser justificada y puesta de manifiesto durante la auditoría.

Cualquier situación que, a juicio del equipo auditor, de no resolverse puede dar lugar a una no conformidad en el futuro o situaciones que, aun cumpliendo con los requisitos de la norma,

tengan un evidente potencial de mejora, se documentarán como un comentario en el informe de auditoría.

La clasificación de las No Conformidades que se definen en la NO-11 son:

### **No Conformidad Mayor (NCM)**

- En relación con requisitos técnicos

Aquellas que cuestionan la competencia del personal, la validez de los métodos de evaluación de la conformidad o la validez de los resultados de la actividad acreditada.

- En relación con requisitos de gestión

Aquellas que ponen de manifiesto un incumplimiento de los requisitos de gestión, que afectan a los resultados de la actividad acreditada o que ponen en cuestión que la actividad de evaluación se ejecute de manera adecuada a lo largo del tiempo.

- En relación con requisitos del Proceso de Acreditación

- El incumplimiento sistemático de las obligaciones de los Laboratorios acreditados establecidas en los procedimientos de acreditación o, aun no siendo sistemático, cuando impida o dificulte seriamente el adecuado control que ENAC debe mantener de los Laboratorios acreditados, o sea intencionado.
- El incumplimiento reiterado de las normas relativas al uso de la marca de ENAC o la referencia a la condición de acreditado.
- La manipulación, falseamiento u ocultación de los registros que sirven como base para demostrar el cumplimiento de los requisitos de acreditación.
- El incumplimiento de los compromisos con ENAC
- Se considerará especialmente grave si se pone de manifiesto que el Laboratorio era consciente de la existencia de un problema y no tomó medidas para resolverlo.

### **No Conformidad menor (NCm)**

- En relación con requisitos técnicos

Aquellas que no cuestionan la competencia del personal, la validez de los métodos de evaluación de la conformidad o la validez de los resultados de la actividad acreditada.

- En relación con requisitos de gestión

Aquellas que se producen de manera aislada o puntual, y no afectan a los resultados de la actividad ni ponen en cuestión la eficacia del sistema de gestión ni, por tanto, la consistencia en la prestación de las actividades acreditadas.

- En relación con requisitos del Proceso de Acreditación

Los incumplimientos esporádicos de las obligaciones de los Laboratorios acreditados establecidos en los Procedimientos de Acreditación, siempre que no impida o dificulten el

adecuado control que ENAC debe mantener de los Laboratorios acreditados, y no sea intencionado.

Respecto al **tratamiento de las No Conformidades y la respuesta frente al informe de auditoría** de acreditación, para que ENAC considere que una no conformidad ha recibido un tratamiento adecuado debe disponer de suficiente información que justifique que las causas han sido adecuadamente identificadas, que el Laboratorio conoce la extensión del problema, que las acciones correctivas abordan cada una de dichas causas de manera adecuada y que se han aplicado las acciones reparadoras necesarias.

El Laboratorio debe mantener registros de cada una de las acciones y decisiones indicadas, así como de las investigaciones llevadas a cabo para tomarlas (p.ej. registros evaluados, porcentaje respecto al total, procesos revisados, etc.). Dichos registros estarán disponibles para ENAC en cualquier momento.

Como se ha comentado anteriormente, el Laboratorio debe elaborar un Plan de acciones correctivas (PAC) en respuesta a los hallazgos de auditoría siguiendo la clasificación y tipos de desviaciones de la Nota Operativa 11. Cabe reseñar, que el Laboratorio puede presentar alegaciones a una no conformidad. Las alegaciones deben estar referidas a la no conformidad y no poner en cuestión la veracidad de los hechos que las soportan.

Es importante tener en cuenta la **política de plazos** que se describe para el tratamiento de no conformidades e información a **enviar** a ENAC en el **PAC**.

En el caso de auditorías para la concesión de la acreditación (iniciales y ampliación), se determina que el Laboratorio debe realizar para las No Conformidades Mayores (NCM) y menores (NCm) en un plazo máximo de 4 meses:

a) **Análisis de las causas** que han dado lugar al incumplimiento

b) **Análisis de la extensión** del problema, tanto en términos organizativos (si el problema se da en diferentes áreas de la organización) como en sus efectos (número de casos afectados), para determinar su gravedad. Debe constar la descripción y la justificación.

c) Establecimiento de **acciones correctivas** orientadas a eliminar dichas causas identificando un plazo para su implantación y para la evaluación de su eficacia. Se debe definir el responsable de la implantación.

Para No Conformidades Mayor (NCM) además, hay que hacer llegar evidencias de la implantación de cada acción correctiva.

En el caso de auditorías para el mantenimiento de la acreditación (seguimiento, reevaluación y levantamiento de suspensión temporal), se determina que el Laboratorio debe realizar para las No Conformidades Mayores (NCM) y menores (NCm) en un plazo máximo de 30 días naturales desde la recepción del informe:

a) **Análisis de las causas** que han dado lugar al incumplimiento

b) **Análisis de la extensión** del problema, tanto en términos organizativos (si el problema se da en diferentes áreas de la organización) como en sus efectos (número de casos afectados), para determinar su gravedad. Debe constar la descripción y la justificación.

c) Establecimiento de **acciones correctivas** orientadas a eliminar dichas causas identificando un plazo para su implantación y para la evaluación de su eficacia. Se debe definir el responsable de la implantación.

Para No Conformidades Mayor (NCM) además:

- hay que hacer llegar evidencias de la implantación de cada acción correctiva.
- En el caso de que no puedan implantarse acciones correctivas en el plazo establecido se establecerán **acciones de contención**.
- Establecimiento de **acciones reparadoras** si son relevantes, en función del resultado de los análisis anteriores y de la naturaleza de las desviaciones

Posteriormente, el PAC es evaluado por el equipo auditor para determinar si, a su juicio, el tratamiento dado a las no conformidades demuestra que se han resuelto los problemas. Para ello, y partiendo de las causas y la extensión del problema identificados por el Laboratorio, evaluará si las acciones son coherentes con lo anterior y, en el caso de las no conformidades mayores, si las evidencias de implantación de las acciones aportan la adecuada confianza. Adicionalmente evaluará si las acciones reparadoras son suficientes y adecuadas y si, en caso de no haberse establecido, su ausencia está justificada. En el caso de que se haya presentado acciones de contención, se evaluará si dichas acciones son coherentes con el análisis de causas y extensión y con las acciones correctivas planteadas y si la justificación de su pertinencia es adecuada.

Típicamente los procesos de evaluación del PAC y decisión tienen una duración aproximada de 40 días desde la presentación del PAC por lo que solamente en casos muy favorables la decisión podrá tomarse antes de ese plazo.

El proceso finaliza tras la decisión de la Comisión de Acreditación como “Favorable” o “Desfavorable” lo que determinará si se concede la acreditación o no.

En el caso de resultado “Desfavorable Condicionada”, en el caso que existan NC mayores con acciones correctivas y reparadoras adecuadas sin evidencias suficientes de implantación, pero con acciones de contención adecuadas, el Laboratorio debe aportar evidencias de la implantación en el plazo máximo de tres meses desde la fecha de la decisión. ENAC evaluará dicha implantación en un plazo no superior a tres meses, mediante una evaluación complementaria documental o in situ dependiendo de la naturaleza de las NC y de las evidencias recibidas. Un resultado negativo de esta evaluación puede dar lugar a la suspensión de la acreditación o, en su caso, a la reducción del alcance.

Por otro lado, en el caso que existan NC mayores con acciones correctivas y reparadoras adecuadas e implantadas pero que por la naturaleza de la NC y de las acciones propuestas requieren comprobación in situ de dicha implantación, o con acciones correctivas y

reparadoras adecuadas sin evidencias de implantación y sin acciones adecuadas de contención o con acciones correctivas o reparadoras no adecuadas, insuficientes o incompletas, ENAC evaluará el tratamiento dado a las NC en el plazo que se establezca, mediante una evaluación complementaria documental o in situ dependiendo de los casos. Un resultado negativo de esta evaluación puede dar lugar a la suspensión de la acreditación, o, en su caso, a la reducción del alcance.

En lo que se refiere al **análisis de causas**, hay que tener en cuenta que la causa de una no conformidad es la razón que la origina, es decir, el “por qué” se ha dado la no conformidad. En ningún caso es el propio requisito que se incumple. P.ej. si la no conformidad es que se ha utilizado un procedimiento obsoleto, la causa no es que se usen documentos obsoletos, sino por qué se están utilizando estos documentos.

El análisis de causas debe:

- ser tan profundo como sea necesario, con el fin de identificar cada uno de los motivos (causas) que originaron el problema que dio lugar a la desviación. Este proceso no debe limitarse a los hechos detectados en una auditoría, debido al carácter muestral y puntual de la misma, siendo responsabilidad del Laboratorio ampliar la investigación tanto como sea preciso.
- dar respuesta a preguntas como: ¿qué ha sucedido?, ¿dónde?, ¿cómo?, ¿desde cuándo?, para poder concluir con el “por qué”.
- huir de causas del tipo: “error puntual”, “error humano”, ...a menos que se tengan evidencias que justifiquen dichas conclusiones, como por ejemplo un análisis de extensión muy profundo que las justifique.
- estar documentado e incluir la justificación de las diferentes investigaciones llevadas a cabo por el Laboratorio.

El análisis de causas depende del resultado del análisis de extensión, ya que de este resultado pueden surgir nuevas líneas de investigación o interpretación de los hechos que den lugar a la modificación de la causa.

Realizar un buen análisis de causas es fundamental para emprender buenas acciones correctivas. Algunas recomendaciones para verificar si el análisis de causas se ajusta a los requisitos sería realizar las siguientes comprobaciones:

- Ha sido suficientemente profundo, según los resultados del análisis de extensión del problema.
- Ha tenido en cuenta situaciones similares o relacionadas.
- Ha identificado las causas que han dado lugar a la desviación y que son las necesarias para resolver el problema y evitar que vuelva a ocurrir.
- Ha entrevistado, si es el caso, a las distintas partes involucradas.

- Ha identificado que existe una relación clara entre la causa y el problema.
- Justifica y documenta las decisiones que se han tomado a lo largo de este proceso.
- Obtiene respuestas al porqué ha sucedido la desviación

En lo que se refiere al **análisis de extensión**, hay que tener en cuenta que es un análisis que se realiza para encontrar el conjunto de aspectos que pueden estar afectados por el problema detectado. El Laboratorio tiene que evaluar si la desviación detectada se ha producido en otros ámbitos.

El análisis de extensión persigue comprobar si el problema detectado en la no conformidad se da en otros campos, otro personal, etc... NO es sólo identificar las consecuencias de la no conformidad. Además, el Laboratorio debe justificar la necesidad y el alcance del análisis de extensión para que dé confianza en que se ha realizado adecuadamente.

Si el Laboratorio no tiene muy claro la causa de la no conformidad, deberá revisar en qué puntos se ha podido manifestar ésta teniendo en cuenta todos aquellos procesos en los que influya directa o indirectamente. Si por el contrario, tiene identificadas posibles causas, pero no ha concluido cuál de ellas puede ser, el determinar qué partes se han visto afectadas y cuáles no (análisis de la extensión), puede ayudar a detectar cual es la causa.

Si de forma extraordinaria, el Laboratorio ha concluido que la causa de la no conformidad se ha debido a un fallo u error puntual, se aportará justificación del análisis de extensión que demuestra este resultado.

Algunas recomendaciones para verificar si el análisis de extensión se ajusta a los requisitos sería realizar las siguientes comprobaciones:

- Ha tenido repercusión en los resultados de actividades acreditadas realizadas con anterioridad, Ejemplo: informes de ensayo o inspección emitidos, certificados de sistemas, productos o personas concedidos.
- Se ha acotado el tiempo en el que se ha producido la no conformidad y sus consecuencias.
- Se repite en otros recursos (personal, equipos, actividades subcontratadas, ...) o en otros aspectos (métodos de evaluación de la conformidad, sistema de gestión) que por su naturaleza compartan con el detectado la posibilidad de error. Ejemplos: si el fallo detectado es la ausencia o la incorrecta calibración de un equipo, se deberá revisar el resto de los equipos, si se refiere a una inadecuada actuación de un auditor/inspector/analista, se deberán evaluar el resto de sus actuaciones y las de aquellos que han sido cualificados con el mismo sistema, ...
- Ocurre en otras actividades acreditadas del Laboratorio. Ejemplos: si se ha detectado en el área del Laboratorio microbiológico, el Laboratorio deberá revisar si se da la misma circunstancia en el Laboratorio de virología.

- Se ha producido en otras localizaciones geográficas (distintos emplazamientos, delegaciones o en actividad in situ).

En lo que se refiere a las **acciones correctivas**, hay que tener en cuenta lo siguiente:

Las acciones correctivas establecidas deben:

- ser coherentes con las causas identificadas
- ser capaces de eliminar las causas y evitar que el problema vuelva a suceder.
- ser concretas, precisas y que expliquen suficientemente la acción a realizar por sí mismas.

Las evidencias de las acciones correctivas:

- deben demostrar que dichas acciones han sido definidas e implantadas.
- deben demostrar a su vez que el problema ha sido resuelto y que éste no se vuelve a repetir.
- no deben usarse para completar la descripción de la acción correctiva. La evidencia sirve para demostrar que una acción se ha implantado, pero no para sustituir la descripción y explicación de la acción que se ha realizado.

Algunas recomendaciones para verificar si las acciones correctivas se ajustan a los requisitos sería realizar las siguientes comprobaciones:

- Son claras y autoexplicativas.
- van dirigidas a eliminar las causas de la no conformidad.
- Evitan la repetición del problema.
- Están implantadas y se han adjuntado las evidencias que lo demuestran

En lo que se refiere a las **acciones reparadoras**, hay que tener en cuenta lo siguiente:

Son cualquier acción encaminada a corregir de manera inmediata el efecto provocado por una No Conformidad en el pasado (informes/certificados emitidos, etc.).

El Laboratorio debe realizar acciones reparadoras, si estas son necesarias, según el resultado del análisis de extensión del problema realizado. En el caso de no ser necesarias se debe justificar por qué. Las acciones reparadoras pueden necesitar varias acciones. P.ej. si un equipo está fuera de calibración puede ser necesario identificar el equipo, revisar los expedientes en los que se ha usado el equipo, etc...

Las acciones reparadoras enviadas deben incluir las acciones identificadas y evidencias que demuestren que se han realizado o el plazo en el que se prevé que serán terminadas.

Cuando la No Conformidad pone en cuestión la validez técnica de informes/certificados o cuando se ha hecho un uso indebido de la marca de ENAC el Laboratorio debe plantearse la

necesidad de emitir modificaciones de los informes o informar de lo ocurrido a los clientes afectados.

Algunas recomendaciones para verificar si las acciones reparadoras se ajustan a los requisitos sería realizar las siguientes comprobaciones:

- son completas y permiten demostrar a ENAC que el problema en todos los casos ha sido corregido

En lo que se refiere a las **acciones de contención**, hay que tener en cuenta lo siguiente:

Las acciones de contención son cualquier acción encaminada a contener el problema detectado y evitar que se siga repitiendo, hasta que se haya implantado la acción correctiva (y por consiguiente se hayan podido enviar a ENAC las evidencias de su implantación).

No es obligatorio realizar siempre acciones de contención, sino que son una vía de solución que puede utilizar el Laboratorio para aquellas desviaciones en las que no tiene tiempo de implantar las acciones correctivas en el plazo establecido para el envío del Plan de acciones (PAC).

Las acciones de contención no sustituyen a las acciones correctivas, es decir, no sería aceptable un plan de contención si las acciones correctivas que se van a llevar a la práctica no dan confianza en que resuelven los problemas detectados. Tampoco sería aceptable un plan de contención si no se proponen acciones correctivas, ya que esto sería lo mismo que dar mayor plazo para presentar el plan de acciones correctivas, y éste no es su objetivo.

Estas acciones pueden incluir controles adicionales, procesos de supervisión reforzados, restricciones temporales de uso en equipos o en cualificaciones del personal, etc. Son especialmente importantes en aquellos casos en que una No Conformidad pone en cuestión la validez técnica de informes o certificados.

Las acciones de contención presentadas deben incluir una explicación de qué acciones se han establecido y justificación de por qué son útiles para contener el problema.

Algunas recomendaciones para verificar si las acciones de contención se ajustan a los requisitos sería realizar las siguientes comprobaciones:

- Garantizan a corto plazo (antes de poder tener implantada la acción correctiva) que se elimina el problema y que se evita que siga ocurriendo. Por ejemplo, evitar que se sigan emitiendo informes incorrectos.
- Cubren también problemas en otras actividades acreditadas, otras áreas geográficas... que se hayan detectado como resultado del análisis de extensión.

Por otro lado, tal y como establecen los requisitos de las Normas ISO que tenga implantadas el Laboratorio, se debe tener un procedimiento para la gestión y control de las desviaciones detectadas

En lo que se refiere a las **alegaciones**, hay que tener en cuenta lo siguiente:

Alegar sobre una no conformidad es solicitar a ENAC que reconsidere la no conformidad emitida por el auditor en el informe de auditoría.

El Laboratorio puede presentar alegaciones si no está de acuerdo con las no conformidades emitidas por el auditor, por ejemplo, porque entiende que no existe incumplimiento o no en los términos definidos por el auditor.

En la alegación el Laboratorio debería explicar por qué, a su juicio, la no conformidad no está justificada.

Los incumplimientos descritos en las no conformidades (p.ej. el Laboratorio no mantiene registros de cualificación de su personal) son conclusiones a las que llega el auditor y se basan en hechos detectados por el equipo auditor durante la auditoría (p.ej.: no hay registros de la cualificación de unas personas).

La alegación debe estar referida al incumplimiento descrito en la no conformidad y no poner en duda si los hechos que la soportan son ciertos. Si el Laboratorio no está de acuerdo con los hechos que detecta el equipo auditor debe comunicarlo durante la auditoría e intentar aclararlo; si no se llega a un acuerdo debe solicitar al auditor que deje registrado este hecho.

Adicionalmente a lo descrito en los documentos de ENAC, (Procedimiento de Acreditación, PAC-ENAC y NO-11: No conformidades y toma de decisión) en las Normas ISO implantadas en el Laboratorio se establecen requisitos relacionados con las No Conformidades y Trabajos No Conformes. Concretamente en el punto 7.10 de "*Trabajos No Conformes*" de la Norma UNE-EN ISO/IEC 17025 se establece como requisito que el Laboratorio debe contar con un procedimiento que se debe implementar cuando cualquier aspecto de sus actividades de laboratorio o los resultados de este trabajo no cumplan con sus propios procedimientos o con los requisitos acordados con el cliente. Por otro lado, este requisito también viene referido en el punto 10.2 de "*No conformidad y acción correctiva*" de la Norma UNE-EN ISO 14001.

Para el desarrollo de un procedimiento interno para la gestión y control de las No Conformidades y Trabajos No Conformes el Laboratorio puede utilizar como modelo interno lo establecido en dichos documentos de ENAC. Es decir, clasificar No Conformidades entre mayores y menores, establecimiento de acciones, reparadoras, de contención y realizar un análisis de extensión. No obstante es requisito obligatorio realizar un análisis de causas, definir acciones correctivas y verificar su eficacia en el tiempo y fijar plazos y responsabilidades. La No Conformidad se deja constancia en un formato que puede denominarse informe, registro, parte, etc. en el que deben figurar todos los aspectos anteriormente señalados. Además, se deben conservar todos los registros relacionados con las No Conformidades, sus evidencias y evaluaciones de eficacia en el tiempo.

De manera, que el procedimiento interno para la gestión y control de las No Conformidades y Trabajos No Conformes se empleará para dejar constancia de las desviaciones encontradas en

auditoría (a nivel interno) y de las desviaciones e incumplimientos detectados por el propio Laboratorio en el trabajo del día a día. Cabe reseñar que el mencionado PAC como respuesta a un informe de auditoría de ENAC, es un formato de la propia entidad ENAC que se debe cumplimentar y enviar de manera telemática, pudiendo adjuntar como parte de las evidencias el informe, registro o parte de No Conformidad elaborado por el Laboratorio según su procedimiento interno.

#### **4. NORMAS ISO DE REFERENCIA**

Para facilitar que las auditorías se lleven a cabo de una manera homogénea existe una Norma internacional UNE-EN ISO 19011:2018 Directrices para la auditoría de los sistemas de gestión que proporciona orientación sobre la auditoría de los sistemas de gestión, incluyendo los principios de la auditoría, la gestión de un programa de auditoría y la realización de auditorías de sistemas de gestión, así como la orientación sobre la evaluación de la competencia de los individuos que participan en el proceso de auditoría, incluyendo a la persona que gestiona el programa de auditoría, los auditores y los equipos auditores.

Relacionadas con esta existen también Normas que recogen sistemáticas de puntos concretos de las auditorías como son:

- Norma UNE-ISO/IEC TS 17023:2014 Evaluación de la conformidad. Directrices para determinar la duración de las auditorías de certificación de sistemas de gestión.
- UNE-EN ISO/IEC 17011:2017 Evaluación de la conformidad. Requisitos para los organismos de acreditación que realizan la acreditación de organismos de evaluación de la conformidad
- UNE-EN ISO/IEC 17021-1:2015 Evaluación de la conformidad. Requisitos para los organismos que realizan la auditoría y la certificación de sistemas de gestión. Parte 1: Requisitos
- UNE-EN ISO/IEC 17021-2:2019 Evaluación de la conformidad. Requisitos para los organismos que realizan la auditoría y la certificación de sistemas de gestión. Parte 2: Requisitos de competencia para la auditoría y la certificación de sistemas de gestión ambiental
- UNE-EN ISO/IEC 17021-3:2019 Evaluación de la conformidad. Requisitos para los organismos que realizan la auditoría y la certificación de sistemas de gestión. Parte 3: Requisitos de competencia para la auditoría y la certificación de sistemas de gestión de la calidad

## **BIBLIOGRAFÍA**

UNE-EN ISO/IEC 17025 Requisitos generales para la competencia de los laboratorios de ensayo y calibración

Procedimiento de Acreditación, PAC-ENAC Rev. 5 Abril 2021.

NO-11: No conformidades y toma de decisión Rev. 10 Abril 2022

NT-72: Notificación de cambios

Reglamento (CE) nº 765/2008 del Parlamento Europeo y el Consejo de 9 de julio de 2008 por el que se establecen los requisitos de acreditación y por el que se deroga el Reglamento (CEE) nº 339/93.

[www.enac.es/web/enac/documentos/](http://www.enac.es/web/enac/documentos/)

[https://www.enac.es/web/enac/documentos?p\\_p\\_id=MensajeCookie\\_WAR\\_Gestionportlet&p\\_p\\_lifecycle=1&p\\_p\\_state=normal&p\\_p\\_mode=view&\\_MensajeCookie\\_WAR\\_Gestionportlet\\_javax.portlet.action=aceptarTodas](https://www.enac.es/web/enac/documentos?p_p_id=MensajeCookie_WAR_Gestionportlet&p_p_lifecycle=1&p_p_state=normal&p_p_mode=view&_MensajeCookie_WAR_Gestionportlet_javax.portlet.action=aceptarTodas)

## **MATERIAL PARA LA PREPARACIÓN DEL TEMA 5**

### **ASEGURAMIENTO DE LA VALIDEZ DE LOS RESULTADOS DE LOS ENSAYOS EN LOS LABORATORIOS. CONTROLES INTERNOS Y EXTERNOS. GRAFICOS DE CONTROL: TIPOS Y APLICACIONES**

*Este material no tiene carácter oficial, por lo que en ningún caso vinculará al Tribunal Calificador. Constituye, únicamente, un instrumento complementario que servirá de apoyo al opositor para enfocar cada uno de los epígrafes, pero nunca de forma exclusiva ni excluyente. El Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación no se hace responsable del contenido del mismo.*

*Los materiales no serán objeto de actualización constante.*

## **ÍNDICE**

- 1. INTRODUCCIÓN**
- 2. ASEGURAMIENTO DE LA VALIDEZ DE LOS RESULTADOS DE LOS ENSAYOS EN LOS LABORATORIOS.**
- 3. CONTROLES INTERNOS**
- 4. CONTROLES EXTERNOS**
- 5. GRAFICOS DE CONTROL: TIPOS Y APLICACIONES**

MATERIAL NO OFICIAL

## 1. INTRODUCCIÓN

El desarrollo y realización de análisis es una herramienta que tiene una repercusión decisiva en la Sanidad Animal y Seguridad Alimentaria y los laboratorios que los realizan trabajan en un entorno de creciente exigencia y responsabilidad tanto legal como social que reclama un nivel de calidad y de confianza extraordinarios. Es esencial para el diagnóstico, la vigilancia y la comercialización el que los resultados del laboratorio sean válidos y se asegure la fiabilidad de los resultados. Dichos resultados, válidos y fiables, se consiguen mediante la utilización de buenas prácticas de manejo, métodos analíticos y de calibración válidos, técnicas apropiadas y control y garantía de calidad, todo ello dentro de un sistema de gestión de calidad.

La gestión de calidad en el laboratorio incluye elementos técnicos, de gestión y de funcionamiento de los sistemas analíticos y la interpretación de los resultados de las pruebas.

Un sistema de gestión de calidad permite al laboratorio demostrar tanto competencia como capacidad de generar repetidamente resultados técnicamente válidos que satisfagan las necesidades de sus clientes. La necesidad de una aceptación recíproca de los resultados de las pruebas realizadas para el comercio internacional y la aceptación de estándares internacionales tales como la Norma UNE-EN ISO/IEC 17025 de *Requisitos Generales para la Competencia de los Laboratorios de Análisis y de Calibración* requiere un buen sistema de gestión de calidad en el laboratorio.

## 2. ASEGURAMIENTO DE LA VALIDEZ DE LOS RESULTADOS DE LOS ENSAYOS EN LOS LABORATORIOS

La Norma UNE-EN ISO/IEC 17025 establece en su punto 7.2 de Selección, verificación y validaciones de métodos se establecen los requisitos que permitirán al Laboratorio conocer y confirmar el desempeño de los métodos que selecciones para todas sus actividades de laboratorio. Si bien este paso es esencial para garantizar el cumplimiento de especificaciones y la competencia del laboratorio, no es suficiente para demostrar su continuidad en el tiempo. Es por ello que la Norma incluye un apartado sobre los requisitos de Aseguramiento de la validez de los resultados (punto 7.7). Ello engloba el conjunto de actividades que el Laboratorio debe abordar para demostrar que los resultados originales “de adecuación al uso”, obtenidos en las verificaciones y validaciones iniciales, se mantienen. No hay que olvidar que una fuente de información para la revalidación de métodos son los datos procedentes de los controles del Laboratorio.

Para la comprobación de que los resultados son correctos son necesarias unas actividades de control periódico. Los parámetros de la validación pueden servirnos para establecer intervalos de control que aplicar a estas actividades de aseguramiento de calidad.

Es importante hacer hincapié en la diferencia que existe entre actividades de validación y actividades de aseguramiento de la calidad. Las diferencias las podemos resumir en el siguiente esquema:

ACTIVIDAD	APLICA	MOMENTO	RESULTADO	CARACTERÍSTICAS
Validación	Método de ensayo	Inicial	Cumple objeto previsto	Veracidad
Aseguramiento de la validez de los resultados	Ensayos reales	Periódico (* debe ser adecuado, ya que depende de factores como el coste o de si tenemos muestras destructiva	Resultados garantizados "mantenimiento de validación"	Exactitud

Todas las actividades de aseguramiento de la calidad deberán **planificarse** de forma que, en el tiempo y en función del alcance del método se incluya una adecuada representación de la variedad de matrices con las que trabaja el laboratorio.

El **plan de aseguramiento de la validez de los resultados**, (antiguamente denominado Plan de la calidad) debe ser elaborado por una persona con competencia para ello. En él se contemplarán:

- ✓ Los parámetros o familia de parámetros a controlar, deberá incluirse tanto los parámetros como las matrices en las que el laboratorio normalmente trabaja
- ✓ La actividad de evaluación a desarrollar, debe abarcar todas las actividades analíticas, desde el procesamiento de muestras hasta la obtención del resultado final.
- ✓ La frecuencia de realización
- ✓ El responsable de control.

La periodicidad de las actividades de aseguramiento de la validez de los resultados deberá establecerse considerando diversos factores como pueden ser:

- La robustez del método utilizado (en función de los controles específicos incluidos en el mismo, método de referencia o de rutina, pruebas de confirmación, datos de validación, vigencia del método etc.).
- La frecuencia con la que el laboratorio ejecuta dichos análisis (dado que se debe asegurar que el laboratorio mantiene la destreza en la ejecución del mismo en cuanto a los materiales, equipos y cualificación del personal).
- Los resultados históricos de aseguramiento de la validez de los resultados, así como la correcta evaluación de los mismos.

La Norma agrupa estas actividades en dos tipos:

- Aquellas que abordan el seguimiento dentro del Laboratorio (Controles Internos).

- Las que abordan dicho seguimiento mediante la comparación de resultados fuera del laboratorio. (Controles Externos).

### 3 CONTROLES INTERNOS

Son actividades realizadas para verificar que los procedimientos analíticos siguen cumpliendo los criterios de calidad (por ejemplo, repetición de muestras, contaminación de muestras).

Consiste en una comprobación, a lo largo del tiempo, de la ejecución adecuada y correcta de todos los pasos que componen el proceso de análisis, incluyendo el ajuste o calibración del instrumento de medición. En la práctica supone la evaluación continua de los parámetros de validación.

Su objetivo principal es evaluar el funcionamiento de los procedimientos a lo largo del tiempo; asimismo, constituyen una herramienta muy valiosa para la formación y cualificación del personal del laboratorio.

Dentro del **plan de aseguramiento de la validez de los resultados**, se debe incluir las muestras y procedimientos sobre los que se realizarán los controles, la periodicidad (trimestral, mensual, etc.), responsable/s de realización y criterios de aceptación/rechazo. La frecuencia podrá establecerse teniendo en cuenta el número de mediciones, ensayos o muestreos realizados por tipo de producto o servicio, coste y la complejidad operacional que conllevan.

Se tendrá en cuenta diferentes factores como, el método utilizado para el diagnóstico, la enfermedad a diagnosticar, la situación epidemiológica de la enfermedad, disponibilidad de material de referencia primario o secundario, muestras de valor conocido, etc.

Además, debe asegurarse la utilización de muestras débilmente positivas en los controles y cuando sea necesario representativas de todas las especies o matrices objeto de la acreditación.

Las actividades de control interno que se recomiendan para asegurar la calidad de los resultados son las siguientes:

- ✓ Control de las condiciones de trabajo: proporciona información sobre la buena práctica en la realización de los ensayos (ej. control de equipos, control de reactivos etc) y sobre la posible contaminación en algún punto del procedimiento (ej. muestras blanco, control de arrastre en métodos automatizados, etc).
- ✓ Análisis de muestra/s por duplicado y repetición de ensayos con distinto analista, o distinto método, lectura de placas cruzadas entre analistas, reensayo o recalibración de los ítems conservados, etc. El objetivo final es evaluar la eventual discrepancia de resultados.
  - Muestras duplicadas → repetibilidad (r)
  - Muestras repetidas → reproducibilidad (R)
  - Correlación → relación de parámetros

- ✓ Uso regular de muestras de control de calidad interno de valor conocido: se utilizarán muestras control positivas y negativas y en las mismas condiciones que las muestras problema.
- ✓ Uso de Material de Referencia Certificado (MRC) o un control interno que emplee Material de Referencia Secundario (MRS).
- ✓ Ensayos de muestras ciegas
- ✓ Uso de patrones de verificación o patrones de trabajo con gráficos de control
- ✓ Revisión de resultados informados

De las opciones mencionadas, el Laboratorio recurrirá a aquellas (a una o a la combinación de varias) que le proporcione mayor y mejor información de retorno de la aplicación de sus métodos o, lógicamente, podrá poner en marcha otras que no han quedado recogidas explícitamente en la Norma.

En cuanto a la definición de material de referencia mencionado, éste se puede diferenciar en diferentes categorías:

Material de referencia primario (MRP) o Estándar de referencia internacional: Representa el estándar de referencia respecto al cual se comparan y se calibran todos los demás.

Material de referencia secundario (MRS) o Estándares secundarios: los estándares secundarios se preparan comparándolos directamente con MRP o estándar de referencia internacional. Están preparados por el Laboratorio Nacional de Referencia y se designa como "estándar nacional"

Material de referencia de trabajo (MRT): estos pueden ser "MR terciarios" si se comparan respecto al secundario y "MR cuaternarios" si se comparan respecto al terciario. Los estándares de trabajo deben estar disponibles en cantidad suficiente en los laboratorios de diagnóstico con el fin de usarlos como controles internos.

Una vez realizados los controles deben registrarse los resultados y la conclusión respecto al cumplimiento/incumplimiento de los criterios.

Por el hecho de ser mecanismos de control, el Laboratorio deberá establecer criterios de aceptación y rechazo de los datos obtenidos y que tendrán que guardar relación con los obtenidos durante la verificación y validación de los métodos para cada una de las actividades. Por ejemplo, si en esta fase se evaluaron como características del desempeño de un método de ensayo su veracidad, precisión (repetibilidad y precisión intermedia) y recuperación, el plan de aseguramiento de la validez de los resultados debería contar con criterios de comprobación del mantenimiento de estas mismas características en el tiempo.

Normalmente se utilizan criterios estadísticos, por ejemplo pueden ser:

- Diferencia entre dos resultados
- Diferencias con el Valor de referencia
- Inclusión dentro de gráfico de control en el que se ha establecido unos límites de aceptación
- Aceptación con respecto a un conjunto de laboratorios (Z score)
- Correlación de magnitudes medidas independientes

Algunos ejemplos pueden ser:

TIPO DE MÉTODO	ACTIVIDADES DE CONTROL
<b>Métodos ELISA</b>	Control de suero positivo del kit por duplicado Control de suero negativo del kit por duplicado Control límite de detección Control de duplicados Control de aceptación de lote de reactivos
<b>FIXACIÓN COMPLEMENTO</b>	Control positivo Control negativo Control poder anticomplementario Control de complemento, Ag y sistema hemolítico Control de duplicados
<b>PCR (convencional/tiempo real)</b>	Control positivo extracción Control negativo extracción Control positivo PCR Control negativo PCR
<b>HEMAGLUTINACIÓN</b>	Control positivo Control negativo Control de glóbulos rojos

Para la realización de los ensayos correspondientes al plan aseguramiento de la validez de los resultados se deben emplear:

- Muestras naturales, positivas y negativas.
- Muestras positivas y negativas, preparadas a partir de materiales de referencia y materiales de referencia certificados que permite comprobar la exactitud de un proceso analítico, ya que los valores de incertidumbre de sus componentes son conocidos.

Dichos materiales deben ser homogéneos, es decir, presentar una composición regular respecto a una o varias propiedades especificadas, y estables cuando son almacenados en las condiciones definidas, conservando un valor de la propiedad dada dentro de los límites establecidos, por un periodo de tiempo definido.

Además, han de presentar similitud con la muestra real y deben ser trazables, propiedad que permitirá establecer el resultado previsible por comparación directa con los patrones apropiados mediante una serie de comparaciones reales.

Cuando se incumplan los criterios marcados, se deberá actuar en consecuencia y con la extensión apropiada del incumplimiento obtenido. Si se trata de incidencias puntuales, el Laboratorio deberá decidir cómo las traslada a los resultados que ha de comunicar a sus clientes. Si, por el contrario, el número de valores fuera de control es significativo y sistemático, será necesario revisar la adecuación al uso del procedimiento de medición.

Dada la cantidad de datos que se pueden generar a partir de estas actividades de control interno, resultará útil recurrir a herramientas que faciliten el análisis de los mismos. Los **gráficos de control** son un recurso habitual para este fin, ya que a partir de un conjunto de datos (son aplicables a variables y atributos) podemos obtener, de manera rápida y simple, imágenes intuitivas que facilitan la evaluación y la toma de decisiones ya que proporcionan información sobre:

- La estabilidad del proceso de medición
- La existencia de modelos de tendencias, agrupaciones de datos o ciclos
- La presencia de errores sistemáticos
- La posibilidad de aplicar ajustes o correcciones.

#### 4. CONTROLES EXTERNOS

La principal actividad que se puede considerar como evaluación externa de aseguramiento de la validez de los resultados, es la participación en ejercicios de intercomparación. Consisten en la realización simultánea, por parte de distintos laboratorios, del análisis de una muestra de acuerdo con unas condiciones predeterminadas.

Esta herramienta permite evaluar la capacidad del Laboratorio de realizar un ensayo concreto, obteniendo información externa e independiente que asegura, en la medida de lo posible, que la validación de su método y su estrategia de control interno de calidad son suficientemente eficaces y por tanto puede asegurar con cierto grado de confianza que no tiene un sesgo en sus resultados de rutina.

La participación en intercomparaciones permite que el laboratorio pueda demostrar que se mantiene dentro de los criterios de aceptación definidos por normas, reglamentos o por laboratorios nacionales/internacionales de referencia.

Es necesario participar en intercomparaciones con una periodicidad de al menos 2 años para cada enfermedad. En caso de que se disponga de más de una técnica por enfermedad, debe garantizarse que se cubre la participación en todas las técnicas en el periodo entre re-evaluaciones.

El programa y frecuencia de ejercicios en los que se participa deberá ser coherente con el empleo de otras herramientas de control implantadas en el laboratorio para asegurar la adecuación al fin pretendido del método de ensayo

Si para alguna técnica acreditada no existen intercomparaciones organizadas a nivel nacional ni internacional, se deberán ampliar los controles internos y/o trabajar con muestras ciegas recibidas de otro laboratorio.

El laboratorio deberá realizar una evaluación de los posibles proveedores de ejercicios de intercomparación, de modo que pueda seleccionar el más adecuado a sus necesidades, y como mínimo la información analizada incluirá la planificación de los trabajos, el número de rondas, el rango de trabajo, el número de participantes, los parámetros y matrices a analizar, el transporte de las muestras, las instrucciones, la estadística empleada, el método de evaluación de los participantes y el contenido del informe. En cualquier caso, la norma ISO 17043 establece los criterios de calidad que un proveedor de ejercicios de intercomparación debe cumplir, y la acreditación del proveedor por esa norma es una herramienta muy útil para que el laboratorio pueda seleccionarlo de un modo sencillo.

Aspectos importantes a considerar por un Laboratorio cuando participa en un ejercicio de intercomparación son los estudios de homogeneidad y estabilidad que aseguren la calidad de la muestra ensayada, y los estudios estadísticos empleados, que deberán estar basados en estadísticas robustas de modo que se reduzca la influencia de valores extremos.

El valor asignado se obtendrá en la mayoría de las ocasiones por consenso entre los participantes, dado la dificultad en microbiología de encontrar material de referencia certificado.

También es fundamental la evaluación del rendimiento que hace el proveedor. En este sentido, el sistema más habitualmente empleado es el del Z-score, donde se relaciona la diferencia entre el resultado obtenido por el laboratorio y el valor asignado considerado como verdadero, con un valor de referencia o diana de incertidumbre y que utiliza el organizador para considerar que los resultados son adecuados.

El proveedor del control externo de calidad deberá establecer una evaluación frente a objetivos de calidad que sea independiente de los resultados obtenidos por los laboratorios participantes, de modo que ésta sea adecuada al fin pretendido para lo cual puede emplear un criterio de precisión, obtenido bien a partir de una legislación, de un modelo matemático de precisión, de un estudio intercolaborativo entre laboratorios expertos, o como ocurre en la mayoría de los ensayos microbiológicos a partir de un histórico de precisión obtenido en circuitos anteriores para dicho parámetro y método.

Entre los múltiples usos que permite la participación en ejercicios de intercomparación, destacan los siguientes:

- ✓ Permite confirmar la correcta validación inicial de un método por medio de la comparación de los resultados de exactitud y precisión con los obtenidos en la validación y permite evaluar si la incertidumbre estimada por el laboratorio es realista.
- ✓ Los datos obtenidos de la participación en ejercicios de intercomparación pueden ser utilizados para la validación de métodos de medida, siempre y cuando los tipos de parámetros y los intervalos de trabajo sean coherentes con el objetivo de la validación.

Esta herramienta de control de calidad representa un examen de la pericia del laboratorio para proporcionar resultados con un nivel apropiado de calidad.

Pero también pueden cubrir otros objetivos como son:

- ✓ La evaluación del desempeño y su seguimiento continuado para un procedimiento o medida específico.
- ✓ La identificación de problemas en el laboratorio y adopción de acciones correctivas.
- ✓ El establecimiento de la eficacia del ensayo.
- ✓ La identificación de diferencias entre laboratorios

## 5. GRAFICOS DE CONTROL: TIPOS Y APLICACIONES

Todo proceso de funcionamiento regular, como los procesos de determinación analítica, están sujetos a una cierta variabilidad debida fundamentalmente a dos causas:

- No asignables, comunes o aleatorias: Presentes siempre y que producen una variabilidad homogénea y estable, y por tanto, predecible. Son causas no identificables.
- Asignables o sistemáticas o no aleatorias: Solo intervienen en determinados momentos y producen una variabilidad considerable. No desaparecen hasta que se elimine la causa que los produce.

Causas No Asignables	Causas Asignables Sistemáticas
Elevado número, sin importancia, no identificables	Pequeño número, efecto considerable
Producen variabilidad estable y medible	Producen variabilidad imprevisible
Es difícil reducir sus efectos	La eliminación de la causa reduce los efectos
Variabilidad debida a la muestra, trabajador que realiza el ensayo, factores ambientales	Desajuste de equipos, fallos humanos, lotes defectuosos de kits, fallos de controles

Se considera que un proceso está en estado de control estadístico si no hay desviaciones sistemáticas y es fácil predecir su comportamiento. Si el proceso está afectado por causas no aleatorias, es decir el proceso se encuentra fuera de control estadístico, el resultado está sujeto a los resultados de estas causas y no se puede predecir. Es necesaria una investigación y eliminación de la causa para llevarlo de nuevo a un estado de control estadístico.

El uso de herramientas de control estadístico del proceso de la determinación analítica, hace posible la detección temprana de errores sistemáticos y asegura la calidad y fiabilidad de los resultados emitidos por el laboratorio a lo largo del tiempo.

Una de las herramientas estadísticas más importantes en el control estadístico de procesos son los gráficos de control. Fueron propuestos en 1924 por el Dr Shewart como una

herramienta gráfica que aplica los principios estadísticos de significancia al control de procesos.

Un **gráfico de control** se basa en niveles de confianza, y permite detectar visualmente los datos que no son aceptables. Constituyen una herramienta simple pero efectiva para evaluar si un proceso está o no está en un estado de control estadístico, es decir, cuando sólo actúan las causas comunes o aleatorias, inherentes a cualquier proceso. Son indicadores de la marcha de los procesos, pudiendo observar tendencias, periodicidades, inestabilidad, etc.

Los objetivos del gráfico de control podemos resumirlos en:

- Asegurar y mantener el proceso bajo control, detectando causas asignables
- Estimar los parámetros del proceso
- Aprender sobre el proceso, de forma que se puedan identificar qué causas asignables influyen sobre su medida así como su variabilidad
- Medir los efectos de las causas asignables y aprender a corregirla y evitarlas
- Servir como herramienta para mejorar el proceso, reduciendo la variabilidad y aumentando su capacidad
- Seguir la reproducibilidad del proceso

Los distintos **tipos de gráficos de control** se pueden utilizar bien sea para **datos de variables o datos de atributos**. Los primeros son datos obtenidos para una variable continua, que es el caso de las magnitudes medidas en gran número de determinaciones analíticas, mientras que los datos de atributos representan observaciones obtenidas registrando la presencia o ausencia de alguna característica o atributo.

Pueden ser empleados por ejemplo para control de controles internos o subpatrones generados a partir de material de referencia y que por tanto tienen un valor asignado.

En los ensayos de laboratorio se miden, por lo general valores de una variable de tipo continuo: Ejemplos son el %Inhibición o bloqueo de un enzimoimmunoensayo, títulos de anticuerpos o de virus, Ct, % recuperación, % A, etc.

Los **datos de variables** se representan a través de **dos tipos de gráficos de control**:

- los que usan medidas de localización (media, mediana, etc.) de la muestra o subgrupo y que sirven para evaluar una desviación real en el nivel del proceso, y
- los que usan medidas de dispersión de observaciones dentro de la muestra o subgrupo (rango, desviación estándar muestral, etc.) que miden un cambio en la variabilidad inherente dentro de la muestra o grupo.

Se requieren ambos para que el gráfico de control de variables sea efectivo.

En un gráfico de control se representa una característica o parámetro de referencia, ya sea, media, rango, valor, etc., según el tipo de gráfico en función del tiempo o de la serie de

datos y se observa la variabilidad con respecto a unos límites establecidos, los denominados **límites de control**. Los límites de control son los criterios que señalan la necesidad de aplicar una acción o valorar si un conjunto de datos indica o no un “estado de control estadístico”.

De forma muy general, como se ve en la figura 1, el gráfico de control consiste en una línea central (LC) y un par de líneas, por encima y por debajo de la línea central que se denominan límite superior de control (LSC) y límites inferiores de control (LIC).

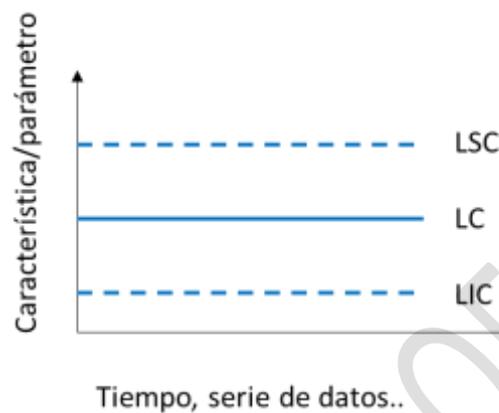


Fig. 1 Representación básica de los parámetros que definen un gráfico de control: la línea central y los límites de control.

Los límites de control se eligen de tal manera que los valores de los datos situados entre los límites puedan atribuirse al azar, mientras que los que caigan fuera puedan interpretarse como una carencia de control.

A veces también se usa un segundo conjunto de límites, llamados **límites de advertencia o aviso**. En tal caso los límites de control pasan a llamarse límites de acción.

El establecimiento de la línea central y de los límites de control, o de límites de aviso y acción si es el caso, guarda relación con la distribución de los valores de la variable.

Para realizar un gráfico de control es necesario identificar el modelo que siguen los datos del proceso en estado de control, es decir, es necesario clasificar la características o variables de interés bajo los modelos de distribución más comunes, que serán la distribución Normal, la Binominal y la de Poisson. En la mayoría de los gráficos de control para variables se asume la distribución Normal (ISO 3534-1).

Es usual representar los promedios de “n” medidas de un subgrupo o muestra (gráficos de localización) porque, salvo excepciones, las medias siguen una distribución normal, incluso cuando el patrón de distribución de las observaciones individuales no lo sea, y porque las contribuciones de variaciones aleatorias se reducen a lo largo del proceso de obtención de promedios, aumentando la capacidad de detectar causas asignables.

Para una distribución Normal los límites de control se generalizan como:  $\mu \pm 3\sigma$ , donde:

$\mu$  : Representa la media del proceso

$\sigma$ : Representa la desviación típica del proceso.

Es decir, los límites de control se encontrarán:

LCS:  $+3\sigma$

LIC:  $-3\sigma$

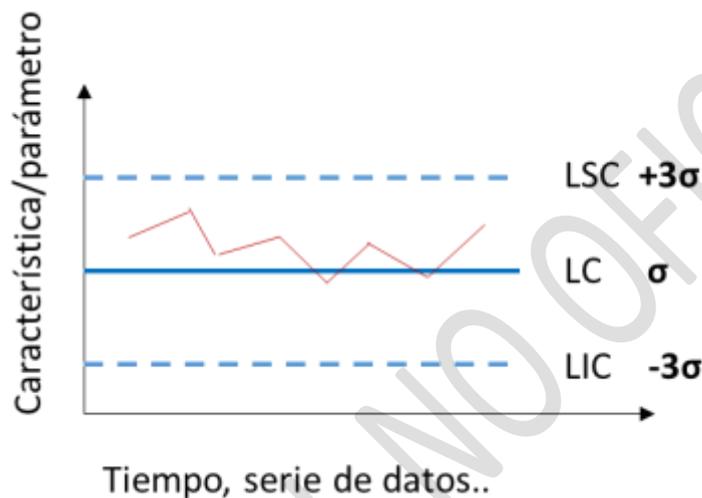


Fig 2. Representación de valores de una variable una vez establecidos el valor de referencia (medias, rangos,...) y los límites de control

El límite  $\pm 3\sigma$  incluiría el 99,7% de los valores representados mientras el proceso esté bajo control. Es decir, el 0.3% de las observaciones obtenidas en un proceso bajo control caerían fuera de los límites de control dando un mensaje erróneo de "proceso fuera de control". Es posible establecer límites adicionales (límites de aviso) en  $\pm 2\sigma$ , que incluiría el 95,5% de las observaciones.

Los límites de aviso permiten detectar, si una observación cae fuera de estos límites, potenciales e inminentes situaciones en las que se puede perder el control estadístico del proceso. Esto posibilitaría iniciar acciones de tipo preventivo una vez identificada la causa. La fig. 3 muestra la correspondencia entre los límites de aviso y control con las probabilidades de una distribución normal.

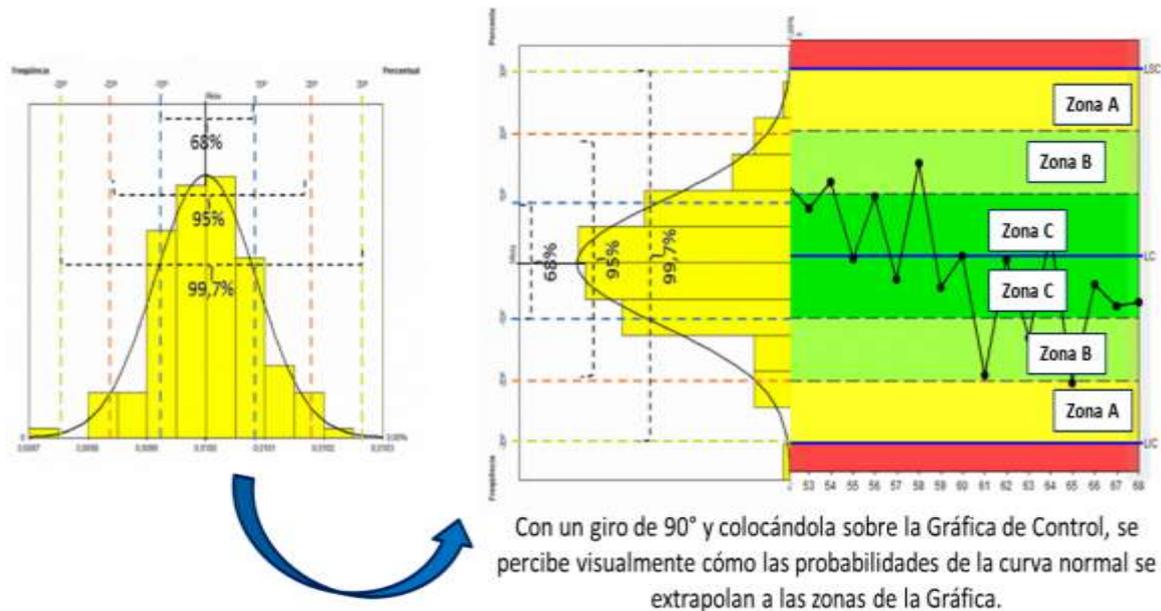


Fig. 3 Correspondencia entre los niveles de confianza en la distribución normal y el establecimiento de límites en los gráficos de control

En ocasiones y aunque las series de observaciones no caigan fuera de los límites de aviso y/o acción (control) que indique un cambio de nivel en el proceso, si es posible detectar cambios o tendencias en la variabilidad inherente al proceso que pueden requerir de un análisis de las causas y de la implementación de medidas de tipo preventivo y/o correctivo.

Un factor fundamental a considerar al elaborar el gráfico de control es el llamado **subgrupo racional o la muestra** que se utiliza para construir el gráfico de control, y que se elige por razones técnicas, ya que se puede considerar que dentro de un subgrupo o muestra las variaciones del valor de la variable a estudiar se deben únicamente a causas no asignables, pero entre cada muestra o grupo de observaciones puede haber variaciones debidas a causas asignables. La variabilidad medida con los datos recolectados para una muestra en un periodo de tiempo corto permite determinar los límites de control y verificar la estabilidad a corto plazo. La estabilidad a largo plazo se evalúa con cambios entre los subgrupos o muestras.

En el laboratorio de ensayo se usan patrones de referencia certificados, patrones de referencia internos o muestras bien caracterizadas de las que se disponga volumen suficiente como para realizar el seguimiento del proceso a largo plazo. La recolección de un número suficiente de datos en un periodo de tiempo corto y en condiciones de repetibilidad y reproducibilidad intralaboratorio permite establecer los parámetros que definen tanto la línea central como los límites de control y verificar la estabilidad a corto plazo. La estabilidad a largo plazo con los datos recogidos sobre el mismo material en el tiempo, pudiendo comprobarse el impacto de factores como los cambios de lote, reactivos de distinto origen, nuevo personal, etc.

Cuando se observan los gráficos de control, fijaremos la atención en dos situaciones:

1.- Si un punto se localiza fuera de los límites de control, es un indicador de que el proceso está fuera de control.

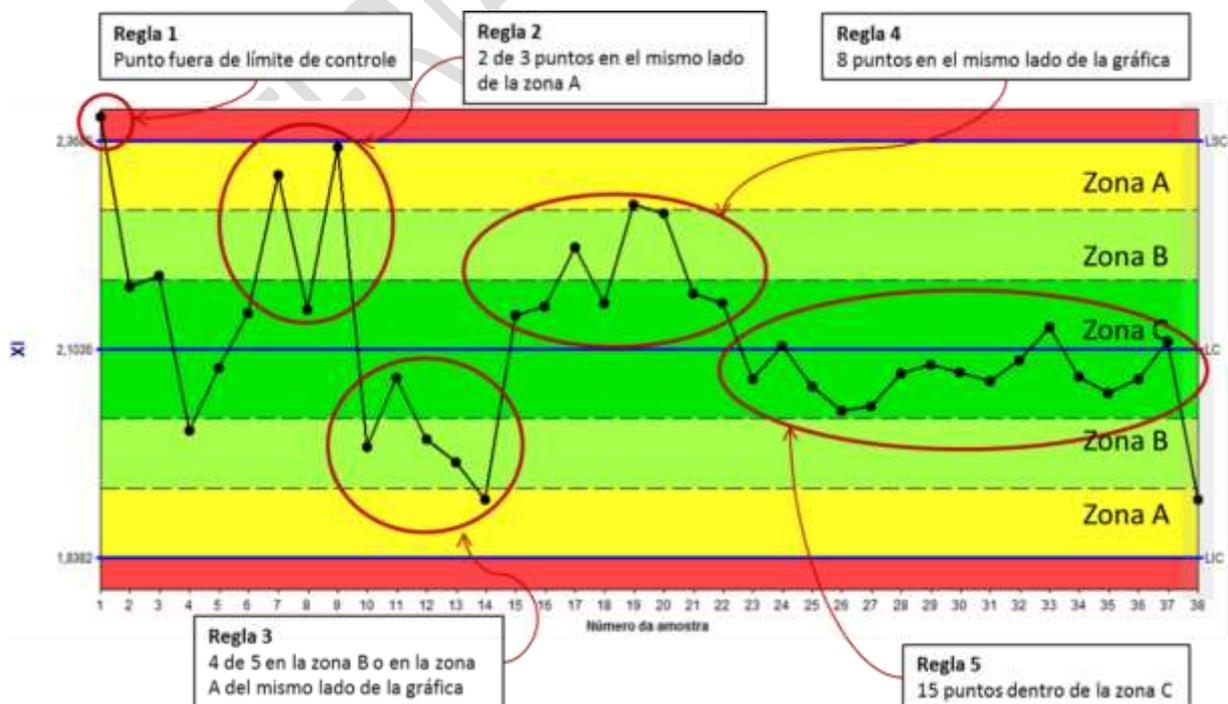
Se deben identificar las causas especiales de variación y proceder a eliminarlas. En este caso, tras eliminar la causa que provocó la variación, se suprimen los datos o muestras que están fuera de la zona de control y se recalculan las estimaciones pertinentes, línea central y límites de control con las muestras restantes. Tras proceder a realizar estos pasos se volvería a realizar el gráfico, con los nuevos límites establecidos, para ver los cambios del proceso y si se encuentra ya bajo control, realizando el nuevo procedimiento establecido.

En ocasiones puede ser necesario tomar acciones tales como cambio de lote de un producto o cualquier otro aspecto del ensayo, como puede ser el título del virus en las técnicas de neutralización.

2.- Si aun encontrándose entre los límites de control, los puntos se comportan de manera sistemática o no aleatoria, estos pueden llevar alguna tendencia u otro patrón sistemático que pueden servir para advertir que tal acción debe interpretarse a fin de evitar algún problema serio. Sin embargo, no indica motivo por el cual el proceso está fuera de control. En este caso, si fuese necesario se podrían realizar mejoras para corregir esa tendencia.

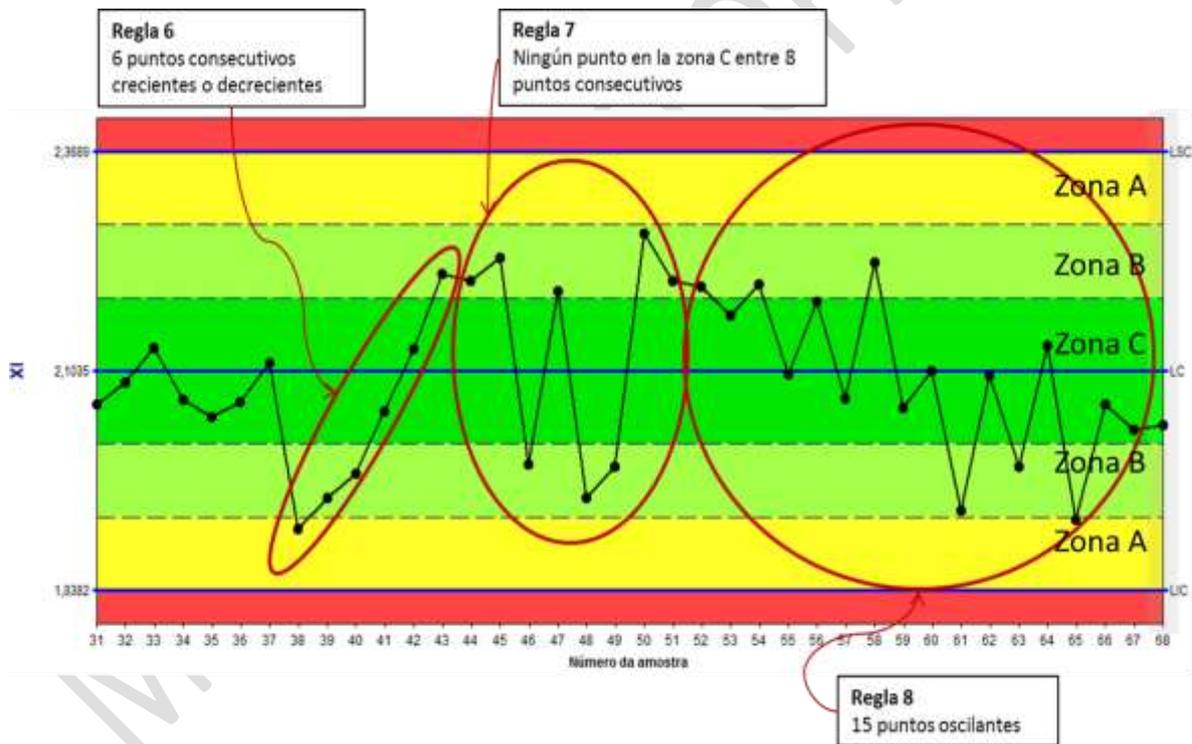
En las normas internacionales específicas para los gráficos de control (ISO 7870-2 "Gráficos de control de Shewart" ISO 7870-3 "gráficos de control para aceptación..") se establecen pautas para la interpretación de los patrones dentro de los límites y se establecen reglas para determinar qué constituye exceder los límites de acción o aviso.

Algunas de estas reglas son:



## Reglas de decisión

- Regla 1: Probabilidad del 99,97% de una causa especial estar actuando.
- Regla 2: El punto aún no está fuera de los límites, pero la concentración de puntos comienza a alejarse del promedio, en un área donde no deberían tener muchos puntos, lo que puede ser una indicación de que el promedio ha cambiado.
- Regla 3: Concentración de puntos en una región de baja probabilidad, pudiendo indicar también un cambio en el promedio.
- Regla 4: Es la misma probabilidad de jugar una moneda 8 veces y las 8 veces caen cara.
- Regla 5: Probablemente el promedio se mantuvo pero ocurrió una disminución en la variabilidad del proceso. Es importante ver que, en estos casos de secuencias grandes, es más difícil de investigar pues el cambio del proceso no ocurrió exactamente en aquel momento, sino allá atrás, donde comenzó la secuencia.



- Regla 6: Puede indicar algún desgaste en el proceso o algún cambio en ese sentido.
- Regla 7: Casi el 70% de los puntos deberían estar en la zona C. Muy probablemente en una situación como ésta, se puede estar mezclando datos de dos procesos como si fueran de un solo proceso, donde los procesos presentan promedios diferentes.

- Regla 8: Muy probablemente también son dos procesos mezclados, pero con una determinada directriz en el sentido de que la primera muestra (por ejemplo), es recogida del lado A, la segunda muestra del lado B, la tercera del lado A y así sucesivamente. Forzando esa tendencia a subir y bajar. Otra posibilidad de causa sería en función de ajustes en el proceso a cada medición (clasificando una interferencia en lugar de ajuste).

MATERIAL NO OFICIAL

## **BIBLIOGRAFÍA**

UNE-EN ISO 9001:2015 "Sistemas de Gestión de la Calidad. Requisitos

UNE-EN ISO/IEC 17025 Requisitos generales para la competencia de los laboratorios de ensayo y calibración

NT-18 Rev. 2 de Marzo 2020 de "Laboratorios de Ensayo: Acreditación para Categorías de Ensayo"

CEA-ENAC-22 Rev. 1 de Mayo 2027 de "*Laboratorio de ensayos en el ámbito de la Sanidad Animal: Directrices para la acreditación*".

Reglamento (CE) nº 765/2008 del Parlamento Europeo y el Consejo de 9 de julio de 2008 por el que se establecen los requisitos de acreditación y por el que se deroga el Reglamento (CEE) nº 339/93.

OiE, Capítulo 1.1.3 Gestión de calidad en los laboratorios de pruebas veterinarias (mayo 2012).

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

## **MATERIAL PARA LA PREPARACIÓN DEL TEMA 6**

**MATERIALES DE REFERENCIA: CONCEPTO, TIPOS, CARACTERÍSTICAS Y USOS EN EL LABORATORIO DE ANÁLISIS. NORMA ISO DE REFERENCIA**

*Este material no tiene carácter oficial, por lo que en ningún caso vinculará al Tribunal Calificador. Constituye, únicamente, un instrumento complementario que servirá de apoyo al opositor para enfocar cada uno de los epígrafes, pero nunca de forma exclusiva ni excluyente. El Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación no se hace responsable del contenido del mismo.*

*Los materiales no serán objeto de actualización constante.*

## **ÍNDICE**

- 1. INTRODUCCIÓN**
- 2. CONCEPTO DE MATERIAL DE REFERENCIA**
- 3. TIPOS DE MATERIAL DE REFERENCIA**
- 4. CARACTERÍSTICAS DE MATERIAL DE REFERENCIA**
- 5. USOS DE MATERIAL DE REFERENCIA EN EL LABORATORIO DE ANÁLISIS**
- 6. NORMA ISO DE REFERENCIA**

MATERIAL NO OFICIAL

## **1. INTRODUCCIÓN**

Uno de los principales parámetros a verificar en la validación de un método analítico es la exactitud de los resultados proporcionados por dicho método. La exactitud, suma de la veracidad y la precisión, se comprueba asegurando la trazabilidad de los resultados proporcionados por el método analítico a una referencia. Por lo tanto, un elemento clave en el aseguramiento de la trazabilidad de los resultados es la utilización de una correcta referencia.

La verificación de la trazabilidad de los resultados de un método analítico se lleva a cabo mediante la comparación con una referencia. Cada vez son más los centros que necesitan y quieren utilizar materiales de referencia para establecer la trazabilidad de sus resultados y validar sus métodos. Así de este modo la industria del sector está avanzando tecnológicamente en la producción de estos materiales y la propuesta de organización de ensayos de intercomparación para certificarlos.

## **2. CONCEPTO DE MATERIAL DE REFERENCIA**

Dos clases de materiales son reconocidas por ISO, denominados “materiales de referencia certificados” (MRCs) y “materiales de referencia” (MRs). Se definen de la siguiente manera:

- Material de Referencia (MR) se define como aquel material suficientemente homogéneo y estable con respecto a una o más propiedades específicas, que se ha creado para que se adecúe a su uso en un proceso de medición.
- Material de referencia certificado (MRC) se define como aquel material de referencia que se caracteriza por un procedimiento metrológicamente válido para una o más propiedades especificadas, acompañado de un certificado que proporciona el valor de la propiedad especificada, su incertidumbre asociada, y una declaración de la trazabilidad metrológica.

Valor certificado se define como el valor asignado a una propiedad de un material de referencia, que se acompaña de una declaración de incertidumbre y una declaración de trazabilidad metrológica, identificada como tal en el certificado del material de referencia.

## **3. TIPOS DE MATERIAL DE REFERENCIA**

Se pueden diferenciar distintos tipos de MR:

- Físicos, como pueden ser de masa (pesas), longitud de onda, temperatura y otras propiedades físicas.
- Sustancias puras, soluciones y mezclas de alta pureza, utilizadas para la calibración en procedimientos de análisis.

- MR matriciales, materiales naturales y/o materiales naturales adicionados usados para la verificación de procedimientos analíticos y en casos específicos para la calibración de instrumentos de medida.

Pueden presentarse bajo la forma de un gas, un líquido o un sólido, puro o compuesto. También tratarse de una pieza para ensayo o análisis o de un artículo manufacturado. En ocasiones necesitan de cierta preparación, como los materiales liofilizados o las disoluciones concentradas.

Además, se pueden diferenciar atendiendo al estándar de referencia respecto al cual se comparan, estos son:

- Material de referencia primario (MRP) o Estándar de referencia internacional: Representa el estándar de referencia respecto al cual se comparan y se calibran todos los demás.
- Material de referencia secundario (MRS) o Estándares secundarios: los estándares secundarios se preparan comparándolos directamente con MRP o estándar de referencia internacional. Están preparados por el Laboratorio Nacional de Referencia y se designa como “estándar nacional”
- Material de referencia de trabajo (MRT): estos pueden ser “MR terciarios” si se comparan respecto al secundario y “MR cuaternarios” si se comparan respecto al terciario. Los estándares de trabajo deben estar disponibles en cantidad suficiente en los laboratorios de diagnóstico con el fin de usarlos como controles internos.

#### **4. CARACTERÍSTICAS DE MATERIAL DE REFERENCIA**

Para que un material pueda ser considerado como MRC, tiene que cumplir una serie de características, estas son:

- **Trazabilidad metrológica:** El MRC debe ser trazable a patrones de referencia nacionales o internacionales. Esto debe quedar perfectamente reflejado en el certificado que aporte el organismo productor.  
La Norma UNE-EN ISO/IEC 17034 establece los requisitos generales para la competencia de productores de materiales de referencia (PMR). En consonancia con estos requisitos los productores de materiales de referencia deben evidenciar la trazabilidad metrológica del valor certificado a una referencia establecida. La referencia debe ser una definición de una unidad de medida a través de su realización práctica, o un procedimiento de medida que incluya la unidad de medida, o un patrón de medida.  
El valor certificado de la propiedad deseada del MRC se puede determinar en un ejercicio interlaboratorio, como el valor consenso de los resultados obtenidos mediante los diferentes laboratorios participantes.
- **Homogeneidad:** Es requisito indispensable que el MRC sea homogéneo y de composición constante, significa que presenta el mismo valor de la propiedad certificada dentro de una misma unidad y entre todas las unidades del mismo material.

Desde un punto de vista práctico, un MRC puede ser suficientemente homogéneo respecto a la propiedad de interés, aunque no lo sea respecto a otras propiedades, siempre y cuando esta falta de homogeneidad no suponga una influencia significativa en la incertidumbre asociada a la propiedad de interés.

Es un parámetro crítico y puede contribuir de forma importante a la incertidumbre del valor certificado de la propiedad.

Esta característica no forma parte general del ensayo y puede desarrollarse previa o posteriormente.

Se evalúa en condiciones de repetibilidad y se valora si la heterogeneidad que pueda detectarse puede incluirse como una componente más de la incertidumbre. La homogeneidad puede evaluarse con los datos de certificación.

Si el material se produce en lotes múltiples, se deberá demostrar la equivalencia de los lotes o evaluación de la homogeneidad de cada lote por separado.

- **Estabilidad:** El material debe ser estable durante las condiciones de envío, y el usuario debe conocer durante cuánto tiempo permanece estable el MRC desde su recepción y desde que se abre el recipiente. La estabilidad tiene que referirse tanto a las propiedades certificadas como a la matriz. Algunos MRC pueden verse afectados por numerosos factores como la luz, la temperatura o la exposición a la atmósfera, por lo que el fabricante deberá indicar las condiciones de transporte, manejo y almacenamiento recomendadas para el material.

La estabilidad se realiza a partir de la obtención de la reproducibilidad a largo plazo y no forma parte del ensayo. Se puede establecer a corto plazo mediante tratamientos estadísticos basados en análisis de varianza y largo plazo mediante análisis de tendencias. El periodo de la evaluación de la estabilidad deberá cubrir al menos un 30% del periodo de vida útil. En función de los resultados se considera si el proceso de fabricación es adecuado.

- **Valor asignado de la propiedad (concentración):** Interesa elegir el MRC que tenga el valor numérico de la propiedad de interés o característica certificada, lo más similar posible al que se espera encontrar en las muestras o material. A veces es difícil encontrar distintas concentraciones para un mismo MRC. Cuando deba optarse por una única concentración es preferible elegir el valor más crítico (por ejemplo: el valor más próximo a un valor límite establecido).
- **Incertidumbre:** Los valores certificados de la propiedad deseada en el MRC deben ir acompañados por un valor de incertidumbre (U). El nivel de U asociado también informa de la calidad de un MRC concreto. Es importante que el usuario verifique que dicha U es compatible con los requisitos de precisión y exactitud de las determinaciones a realizar (calidad del método, exigencias legales o de acreditación, etc.) y ser los más próximos a los valores reales.  
La U asociada a un MRC se propaga al valor final de las U, por lo que la U del MRC nunca será mayor a la establecida en el ensayo. (Debería contribuir menos de 1/3 a la U total).

- **Fecha de validez del certificado y conservación:** Es importante que el certificado indique la fecha de validez, ya que las demás propiedades (homogeneidad, estabilidad...) van asociadas a un espacio de tiempo. El fabricante debe proporcionar

información sobre las condiciones óptimas de transporte, manejo y almacenamiento y, siempre que sea posible, sobre el periodo de validez del MRC. En muchos casos, la garantía de la composición es para un periodo determinado o hasta su utilización.

Otras características que pueden tener los MR, y que es necesario tener en cuenta para su elección pueden ser:

- **Matriz:** conviene que sea la más similar posible a las muestras objeto de análisis y tener información relativa a su origen o composición.
- **Presentación o estado físico:** se debe seleccionar la forma de presentación más estable y con un procedimiento de utilización o preparación más simple, para evitar introducir factores de incertidumbre asociados al resultado de la medida.
- **Cantidad o dosificación:** está en función de que el procedimiento de medida sea, o no, destructivo. Cuando deba prepararse todo el material (por ejemplo, orinas liofilizadas) y ya no pueda utilizarse más adelante, debe seleccionarse, cuando sea posible, una dosificación que permita emplear cantidades más pequeñas.

No obstante, se presentan puntos críticos habituales en la selección de MRC, como puede ser la escasez de MRC en el mercado, su alto coste (lo que limita su aplicación), escasa información por parte de los fabricantes, lo cual dificulta la evaluación de si un determinado MRC es adecuado a los objetivos, que el analito requerido no se encuentra certificado en una matriz idéntica o parecida a la composición del producto o de la muestra, etc.

## **5. USOS DE MATERIAL DE REFERENCIA EN EL LABORATORIO DE ANÁLISIS**

El laboratorio debe disponer de procedimientos para la selección, adquisición, recepción, registro, almacenamiento y utilización de los materiales de referencia, del mismo modo que para el resto de los reactivos y materiales consumibles utilizados en los ensayos y calibraciones.

El primer paso para seleccionar un MRC debe ser comparar las especificaciones requeridas con las de los MRC disponibles en el mercado, para ello se debe consultar la información disponible (catálogos de fabricantes, bancos de datos, publicaciones, recomendaciones, etc.) y asegurar que el MRC seleccionado está certificado para la medida o propiedad de interés y no es un valor meramente indicativo, y que su procedimiento de certificación tiene un nivel de confianza apropiado y está suficientemente documentado.

Para la adquisición, el laboratorio deberá evaluar a los proveedores, mantener un registro de dichas evaluaciones y elaborar una lista de los posibles fabricantes y/o suministradores.

En su recepción, y antes de su uso, se verificará que cumple con las especificaciones o requisitos solicitados y para ello se revisará la documentación que acompaña al MRC. Habrá que prestar especial atención a los valores certificados y sus incertidumbres, trazabilidad a patrones nacionales o internacionales, caducidad, instrucciones de utilización, etc.

Para su uso correcto en el laboratorio, es conveniente realizar un registro e identificación mediante un etiquetado interno conteniendo al menos fecha de recepción, fecha de

caducidad y/o apertura del envase e indicaciones especiales de seguridad y almacenamiento. Las condiciones de almacenamiento y conservación del MRC deben ser proporcionados por el propio fabricante y dependerán de las características y posibles alteraciones del mismo (termoestabilidad, higroscopicidad, fotosensibilidad, oxidabilidad, etc.).

En cuanto a su utilización, deberán prestarse atención a las siguientes recomendaciones:

- Los MRC no deben usarse de forma rutinaria para el control de calidad. Es más aconsejable utilizar un material de referencia con trazabilidad al material de referencia certificado.
- El material deberá ser manipulado con la máxima precaución y escurpulosidad, especialmente en la apertura o conservación, evitando cualquier alteración o contaminación.
- Cuando sea preciso tomar alícuotas de los MRC, deberá prestarse especial atención en mantener la homogeneidad del material, evitar posibles influencias o alteraciones por la humedad, luz, temperatura excesiva, etc. y contaminaciones potenciales. Además, no se debe devolver el material sobrante, ya sea líquido o sólido, al recipiente.

Los principales usos de los materiales de referencia que se pueden dar en un laboratorio pueden ser:

### **Uso en calibración**

La calibración instrumental es necesaria para asegurar que un instrumento y/o equipo funciona correctamente. Su objetivo es corregir la respuesta instrumental hasta alcanzar el valor considerado como verdadero que lleva implícito el estándar utilizado (patrón de referencia). Por ejemplo, para la calibración de un pHmetro se emplean disoluciones tampón de diferentes pH, 4, 7, 9 con un valor de incertidumbre dado, abarcando todo el rango de medida de pH. Con una solución de dicromato de potasio de absorbancias conocidas a diferentes longitudes de onda podemos calibrar un espectrofotómetro.

Los MRC también pueden ser empleados en la calibración de métodos de medición y poder relacionar una señal analítica con la concentración/composición de la sustancia que se está analizando mediante la construcción de una recta de calibrado. Pueden ser mediante métodos directos o interpolación de un patrón de concentración/composición conocida, método de adición de patrón o adicionando un patrón interno a la muestra. En cualquier caso, debe realizarse empleando un medidor patrón calibrado por un organismo que pueda proveer la trazabilidad exigida en los laboratorios de análisis y calibración. La incertidumbre asociada con la pureza de MR contribuirá a la incertidumbre total de la medición.

### **Validación de métodos**

La validación es el proceso mediante el cual se demuestra que el método en cuestión es adecuado para alcanzar unos objetivos previamente establecidos, definidos en función de los requisitos o necesidades del cliente y de las posibilidades técnicas del laboratorio.

Los MRC pueden emplearse para la determinación de los parámetros de la validación, como puede ser la precisión, la cual es el grado de concordancia entre los valores dados de una serie

repetida de ensayos condiciones de repetibilidad, reproducibilidad, robustez, etc. y/o la exactitud, la cual indica la capacidad del método analítico para dar resultados lo más próximos posibles al valor verdadero.

Mediante MRC podemos disponer de material con un valor asignado a la propiedad con el que podamos obtener datos trazables y por lo tanto válidos.

Las muestras de referencia que se utilicen en la ejecución y validación de una prueba deberán:

- Contener el analito de interés, que puede ser un anticuerpo, un antígeno o ácido nucleico
- Encontrarse en la misma matriz que se va a utilizar en la prueba (por ejemplo, suero, tejido, sangre total, excreciones, alimento para animales o muestras del entorno que contienen el analito de interés y que suelen obtenerse de animales infectados y sus entornos.)
- Ser representativas de la especie que vaya a analizarse, especialmente para el caso de pruebas que puedan aplicarse a varias especies
- Representar adecuadamente el intervalo de concentraciones de analito a detectar mediante la prueba.

#### **Asignación de valores a otros materiales**

Estos reactivos, normalmente conocidos como **patrones de trabajo**, controles de calidad o del proceso, se calibran respecto a patrones internacionales, nacionales o internos. Las concentraciones y/o reactividades deben situarse en el intervalo de funcionamiento normal de la prueba. El objetivo es que estos controles imiten, de la forma más fiel posible, las muestras de campo y debe manipularse y analizarse como las muestras reales. Se pueden preparar en grandes cantidades, dividirse en alícuotas y almacenarse para utilizarlas de forma rutinaria en cada ejecución de la prueba diagnóstica o analítica.

Así por ejemplo en un laboratorio de microbiología destinado a la identificación y aislamiento de diversas bacterias se emplean **cepas de referencia**, microorganismos obtenidos directamente de una colección de referencia en la que está definida por lo menos a nivel de especie y género, catalogados y descritos según características. Mediante su reconstitución, en los medios de cultivos indicados por la colección de procedencia, podrán subcultivarse para obtener cepas de reserva, y a su vez, a partir de estas últimas cepas de trabajo para el empleo de los controles de calidad en el ensayo. Estas cepas de trabajo garantizan su trazabilidad a la cepa de referencia.

#### **Control de reactivos, métodos y procedimientos**

La evaluación de la calidad de los ensayos es el conjunto de actividades que permite garantizar a los laboratorios que proporciona resultados correctos. En condiciones normales, al mismo tiempo le permite detectar errores existentes durante la realización de los ensayos. Estas actividades son de control periódico y se establecen en procedimientos de control de calidad para comprobar la validez de los ensayos.

En este sentido, los MR secundarios o controles internos son empleados para este uso y pueden ser utilizados en cada ensayo a modo de control. No se emplea MRP ya que son costosos y no se aconsejan para este uso.

En el ámbito de la Sanidad Animal, en el caso concreto de las pruebas con anticuerpos, la OIE ha establecido unas directrices para la preparación, validación y distribución de **anticuerpos estándar de referencia internacional** para las pruebas de detección de anticuerpos de las enfermedades infecciosas de los animales.

Los estándares de referencia internacional son necesarios para asegurarse de que una prueba determinada puede medir la actividad de los anticuerpos con un nivel específico de sensibilidad de diagnóstico. La sensibilidad de diagnóstico está relacionada con el riesgo de que la prueba dé una falsa reacción negativa cuando, en realidad, el animal está, o ha estado, infectado.

Para la mayoría de las pruebas, habrá que establecer tres estándares primarios de referencia: un **positivo fuerte, un positivo débil y uno negativo**. Serán seleccionados y caracterizados por un laboratorio de referencia designado que utilice un protocolo de prueba estándar internacionalmente aceptado y reactivos internacionalmente aceptados.

El estándar positivo débil es fundamental para garantizar la sensibilidad de diagnóstico de la prueba. Para las pruebas no cuantitativas (como las de inmunodifusión) puede ser el único estándar positivo requerido. Para las pruebas cuantitativas, sin titulación, como el ELISA indirecto, el estándar positivo fuerte definirá un nivel arbitrario de positividad al 100%. Se asignará entonces a los estándares negativo y positivo débil un porcentaje proporcional de positividad que corresponda a su reactividad al ser sometidos al protocolo estándar.

La mayoría serán preparados a partir de suero sanguíneo, que estará libre de hemólisis y de lipemia excesiva. Los antisueros, de ser posible, serán obtenidos en animales libres de patógenos específicos o gnotobióticos de una especie apropiada para la prueba que se va a normalizar. Otro tipo de material, como la leche desnatada o los anticuerpos monoclonales, podrá ser utilizado si resulta apropiado para la prueba en cuestión.

Los estándares de referencia positivos se seleccionarán a partir de animales que presenten una respuesta inmune humoral (o sea, de anticuerpos) típica al organismo en cuestión. Los animales hiperinmunes no son considerados como típicos y deberán ser evitados. La respuesta inmune puede ser inducida por infección experimental o con vacuna. Se medirá la respuesta del animal de acuerdo con el protocolo de prueba estándar para decidir en qué momento se procede a coleccionar el material tras la inmunización.

Para pruebas tales como la fijación del complemento, la neutralización vírica o ELISA indirecto, que demuestran curvas sigmoideas típicas de dosis/respuesta, el estándar positivo fuerte presentará una actividad de anticuerpos que se encuentre en la porción lineal de la curva justo antes de la fase de meseta. En otras pruebas, contendrá anticuerpos suficientes para producir la reacción máxima que corresponda a los límites seleccionados para la prueba, por ejemplo, una línea clara de corte de identidad en una prueba por inmunodifusión o un 100% de inhibición en un ELISA de competencia o inhibición.

El estándar positivo débil presentará una actividad de anticuerpos que se encuentre también en la porción lineal de la curva justo después del umbral positivo/negativo. En otras pruebas, el estándar de referencia positivo débil contendrá anticuerpos suficientes para producir de modo congruente la reacción detectable mínima, por ejemplo, una línea de identidad débil pero inequívoca en una prueba por inmunodifusión. Para las pruebas de competencia o inhibición que frecuentemente muestran una transición abrupta de positivo a negativo, la selección del estándar positivo débil puede ser especialmente difícil. Se aplican los mismos principios: el estándar debe dar una respuesta positiva congruente, justo por encima del umbral positivo/negativo, con el protocolo de prueba estándar.

Los estándares de referencia negativos se seleccionarán a partir de animales que nunca hayan estado expuestos al organismo en cuestión o vacunados contra él. Estarán libres de todo anticuerpo a organismos que podrían provocar una reacción cruzada en la prueba estándar.

Este dará siempre una reacción por debajo del umbral positivo/negativo con el protocolo de prueba estándar. La reacción obtenida nunca será equívoca.

En el caso de los **estándares de referencia internacional para pruebas con antígenos**, la mayoría se prepara purificando el antígeno mediante la infección de células permisivas con el virus, o infectando animales cobaya con el patógeno apropiado o con preparados (antígenos) de proteínas recombinantes. Estos se purificarán de nuevo con la columna cromatográfica y se verificará el grado de pureza por espectrómetro de masas, para producir un preparado de antígeno homogéneo libre de proteínas contaminantes. Se pueden utilizar varios métodos para concentrar más el antígeno, por ejemplo el liofilizado y el ultrafiltrado.

Siempre que sea posible, se producirán los antígenos en animales exentos del patógeno específico, o gnotobióticos, de una especie apropiada para el ensayo que se está estandarizando.

Los estándares de referencia positivos se seleccionarán a partir de cultivos o de animales de laboratorio infectados. Se medirá la replicación del patógeno en cultivo o en el animal de acuerdo con el protocolo de prueba estándar para decidir en qué momento se procede a coleccionar el material tras la inoculación. Todo dependerá de la patogénesis de la enfermedad y de la prueba. Habrá que facilitar todos los detalles sobre los plazos de inoculación y la naturaleza del inoculado para que los estándares secundarios puedan ser preparados con métodos equivalentes.

Los estándares de referencia negativos comprenderán cultivos no infectados o se seleccionarán a partir de animales que nunca hayan estado expuestos al organismo en cuestión o vacunados contra él.

Como se ha comentado anteriormente, hay algunas actividades en las que no se recomienda el uso de MRC, de manera resumida podemos diferenciar los usos de MR y MRC de la siguiente manera:

Uso MR que no son MRC:

- Demostrar control de un proceso de medida en un laboratorio durante un periodo de tiempo.
- Chequear funcionamiento de un equipo
- Estudios de repetibilidad y reproducibilidad
- Confirmación del grado de equivalencia de los resultados de medida de dos o más laboratorios, cuando los materiales son inherentemente inestables
- Chequear variabilidad entre el personal
- Investigar el impacto de cualquier cambio en las condiciones ambientales

Uso MRC:

- Realización de un punto fijo de una escala de medición (internacional)
- Calibración de instrumentos o sistemas de medida
- Transferencia de valores de la propiedad entre diferentes materiales
- Validación de métodos analíticos (veracidad)
- Determinación factor de recuperación en operaciones de separación de matrices (extracción)

## 6. NORMA ISO DE REFERENCIA

Existen varias Guías ISO publicadas en relación a los materiales de referencia, estas son:

- ISO GUIA 30 de "*Materiales de Referencia. Definiciones*". Actualmente está en proyecto de revisión denominada: PNE-ISO GUIA 30 IN.
- ISO GUIA 31 de "*Materiales de referencia. Contenido de sus certificados*". Esta guía ha sido actualizada en 2015, quedando anulada su versión anterior del año 2000 y por el momento se puede acceder a su versión en inglés y francés. ISO Guide 31:2015 "*Contents of certificates, labels and accompanying documentation*".
- ISO GUIA 33 de "*Usos de materiales de referencia*". Al igual que la anterior, esta guía ha sido actualizada en 2015, quedando anulada su versión anterior del año 2000 y por el momento se puede acceder a su versión en inglés y francés. ISO Guide 33:2015 "*Reference materials — Good practice in using reference material*".
- ISO GUIA 34 de "*Guía para sistemas de calidad aplicados a la producción de materiales de referencia*" ha sido anulada por la Norma UNE-EN ISO 17034:2017 de "*Requisitos generales para la competencia de productores de materiales de referencia*".
- ISO GUIA 35 de "*Certificación de Materiales de referencia. Principios generales y estadísticos para su certificación*". Esta guía ha sido actualizada en 2017, quedando anulada su versión anterior del año 2006 y por el momento se puede acceder a su

versión en inglés y francés. ISO Guide 31:2017 “Reference materials — Guidance for characterization and assessment of homogeneity and stability”

El constante aumento en la precisión de los instrumentos de medida y la exigencia de recibir datos cada vez más fiables en los diferentes ámbitos científicos y técnicos hacen necesario que los productores de materiales de referencia (PMR), además de suministrar información sobre sus materiales en forma de informes o certificados, también demuestren que disponen de la necesaria competencia técnica para producirlos. En este sentido, cabe destacar que la norma UNE-EN ISO/IEC 17025:2017 incluye en su apartado 6.4 (equipamiento) los materiales de referencia y materiales de referencia certificados, y especifica que la norma UNE-EN ISO 17034 contiene información adicional sobre los productores de materiales de referencia y que los productores que cumplan la citada norma se considerarán competentes.

La apertura del esquema de acreditación de los productores de material de referencia supone una ventaja competitiva a dos niveles, por una parte, para los productores de material de referencia españoles, puesto que al ser esta la actividad de evaluación de la conformidad con un mayor mercado global no puede permitirse no adaptarse a las nuevas exigencias. Por otra parte, para los laboratorios de ensayo y calibración que podrán contar con materiales de referencia fabricados por productores acreditados y, por tanto, que cumplen con los requisitos de la norma de referencia y, por ende, de las guías de selección y uso que mayor implantación tienen.

La acreditación es la herramienta establecida a escala internacional para lograr esa confianza y credibilidad.

Los productores de materiales de referencia pueden tener todos o parte de sus materiales de referencia producidos acreditados. Los criterios de acreditación están definidos en la norma ISO 17034, que es utilizada para evaluar a los PMR en todo el mundo. Los organismos de acreditación de PMR usan esta norma internacional específicamente para evaluar los factores relevantes para determinar la competencia de un PMR a la hora de producir materiales de referencia, incluyendo:

- El funcionamiento de su sistema de gestión
- La competencia técnica del personal
- La idoneidad del plan de producción
- Que los MRs producidos sean suficientemente homogéneos y estables
- Que los valores certificados sean metrológicamente trazables respecto a una referencia válida
- La completa y adecuada emisión de certificados o documentación que acompañe al material de referencia, incluidas las etiquetas
- La adecuación del proceso de distribución de los MRs

La implementación de la UNE-EN ISO/IEC 17034 es clave para los PMR ya que es la herramienta que reporta el reconocimiento necesario en cuanto a la trazabilidad y calidad de sus MRC:

- Demuestra competencia en la producción de materiales de referencia
- Fomenta la conformidad con normas internacionales
- Reduce posibles costes a su organización, al tener controlados los procesos
- Determina una ventaja competitiva en el mercado, ya que la disposición de MRC suministrados por PMR acreditados es un requisito solicitado por las Entidades evaluadores de los laboratorios.

La Norma UNE-EN ISO 17034:2017 se estructura en ocho puntos que son:

- **Punto 1 de Objeto y campo de aplicación**
- **Punto 2 de Referencias normativas**
- **Punto 3 de Términos y definiciones**, algunas son MR, MCR, valor certificado e imparcialidad.
- **Punto 4 de Requisitos Generales**: establece la **imparcialidad** y la **confidencialidad** al igual que ISO/IEC 17025.
- **Punto 5 de Requisitos relativos a la estructura**. La norma establece como requisito que el PMR debe tener personal directivo y técnico, con la autoridad y los recursos necesarios para identificar desviaciones del sistema de gestión o de los procedimientos para la producción de MR e iniciar acciones para prevenir o minimizar las desviaciones;
- **Punto 6 de Requisitos relativos a los recursos**. Este punto hace referencia a los requisitos del personal, incluidos los subcontratistas, en relación a que deberán cumplir con las políticas y procedimientos para el manejo de la información confidencial establecidos.

Cabe reseñar que la Norma se refiere a la subcontratación para parte de la producción incluyendo: muestreo, procesamiento, manejo, pruebas de homogeneidad y estabilidad, caracterización, almacenamiento y distribución. No obstante el PMR debe establecer un procedimiento que permita garantizar que los subcontratistas cumplan con los requisitos de la propia Norma y tienen la competencia técnica y experiencia requerida.

No se puede subcontratar algunas actividades como la planificación de la producción, la selección de subcontratistas, la asignación de los valores de la propiedad y sus incertidumbres, la autorización de los valores de la propiedad y sus Incertidumbres y la autorización de los documentos del MR.

En relación al requisito de las instalaciones y condiciones ambientales cabe reseñar que si las condiciones ambientales influyen en el MR, en PMR debe realizar la monitorización de las condiciones ambientales durante producción MR, con equipos calibrados, realizar el control y registro de todos los datos y verificar que los resultados y procesos no se vean afectados.

- **Punto 7 de Requisitos técnicos y de producción**. El PMR debe identificar y planificar los procesos que afectan a la calidad de la producción del MR y documentar el Plan de Producción.

El PMR deberá abordar en la planificación:

- a) La selección de material
- b) La verificación de la identidad del material
- c) Mantenimiento de ambientes adecuados para todos los aspectos de la producción
- d) El procesamiento de material
- e) La elección de los procedimientos de medida
- f) La validación de los procedimientos de medición
- g) La verificación y calibración de equipos de medición
- h) La especificación de los criterios de aceptación y evaluación de la homogeneidad, incluido el muestreo
- i) La especificación de criterios de aceptación, evaluación y monitoreo de la estabilidad, incluyendo muestreo
- j) El diseño y organización de la caracterización apropiada, incluido el muestreo
- k) La evaluación de la conmutabilidad
- l) La asignación de valores de propiedad
- m) El establecimiento de presupuestos de incertidumbre y estimar las incertidumbres de los valores certificados
- n) Definir criterios de aceptación para los niveles de medición y sus incertidumbres
- o) Establecer la trazabilidad metrológica de los resultados de medición y los valores certificados
- p) La emisión de documentos de MR
- q) Asegurar unas instalaciones y condiciones de almacenamiento adecuadas
- r) Garantizar el etiquetado y el embalaje adecuados de los MR
- s) Asegurar condiciones de transporte apropiadas
- t) Asegurar el seguimiento de la estabilidad posproducción, si corresponde
- u) Garantizar un servicio de distribución posterior adecuado para los usuarios de MR

Uno de los puntos más importantes en la producción de MR es la evaluación de la homogeneidad. La homogeneidad es una de las componentes de la incertidumbre declarada en el certificado. Para que el estudio de homogeneidad sea seguro es importante elegir las propiedades a estudiar, seleccionar un subconjunto representativo de unidades, seleccionar un procedimiento de medida adecuado con suficiente repetibilidad y selectividad, realizar las medidas bajo condiciones adecuadas siguiendo un diseño experimental apropiado y realizar el análisis estadístico usando métodos estadísticos válidos.

En cuanto a la evaluación y el seguimiento de la estabilidad del MR el PMR debe evaluar, experimentalmente si necesario, la estabilidad de todas las propiedades relevantes de un MR bajo condiciones de almacenamiento propuestas y elegir las condiciones de pretratamiento, envasado y almacenamiento en conformidad con los resultados de la evaluación. Debe evaluar, experimentalmente si necesario, la estabilidad de todas las propiedades relevantes de un MR bajo condiciones de transporte propuestas, y elegir las condiciones de transporte para mantener la estabilidad durante transporte. Además, debe establecer cualquier consejo

necesario sobre el almacenamiento y uso del material para mantener la estabilidad en el usuario final.

En cuanto al requisito de la caracterización, se establece que cuando el PMR asigna los valores de propiedad, se requiere la caracterización del MR. Se debe definir claramente su se caracterizará una propiedad cuantitativa o cualitativa y, si es cuantitativa, si el mensurando es definido operacionalmente o independientemente de cualquier procedimiento específico.

El PMR debe utilizar procedimientos documentados para la asignación de valores de la propiedad, y deben incluir detalles de los diseños experimentales y técnicas estadísticas utilizadas.

También se establecen el contenido mínimo de los certificados y hojas de información del producto, estos son:

- a. Título del documento
- b. Identificador único del MR
- c. Nombre del MR
- d. Nombre y detalles de contacto del PMR
- e. Uso previsto
- f. Tamaño mínimo de muestra (cuando corresponda)
- g. Período de validez
- h. Información de almacenamiento
- i. Instrucciones de manejo y uso suficientes para garantizar la integridad del material
- j. Número de página y el número total de páginas
- k. Versión del documento
- l. Información sobre la conmutabilidad del material (cuando corresponda).

Además de los requisitos deben contener la siguiente información adicional como la descripción del MRC, la propiedad de interés, el valor de la propiedad e incertidumbre asociada, el procedimiento de medición para mensurandos definidos operacionalmente, la trazabilidad metrológica de los valores certificados y el nombre y función del personal que aprueba.

En cuanto a los requisitos de la etiqueta del MR cabe reseñar que debe estar firmemente adherida al contenedor del MR individual y estar diseñada para permanecer legible e intacta bajo las condiciones definidas de almacenamiento y manipulación dentro de la vida útil del MR. La etiqueta identificará el material, el PMR, el lote, cualquier otra información necesaria para permitir que el material se distinga y haga referencia única (como el número de muestra individual) a su hoja de información del producto o certificado de MR.

- **Punto 8 de Requisitos del sistema de gestión.** Al igual que la Norma ISO/IEC 17025, La Norma permite dos alternativas en función de la actividad del Laboratorio. Una Opción A en la que se detallan los diferentes requisitos de gestión como puede ser el establecimiento de la política de calidad, la documentación, revisiones por la Dirección, auditorías, acciones para abordar riesgos y oportunidades, mejora, etc. y una opción B en consonancia con certificación de la Norma ISO 9001.

MATERIAL NO OFICIAL

## **BIBLIOGRAFÍA**

UNE-EN ISO 17034:2017 Requisitos generales para la competencia de productores de materiales de referencia

NTP 656: Materiales de referencia. Utilización en el laboratorio de higiene industrial

DIRECTRICES DE LA OIE: Sueros estándar de referencia internacional para pruebas de anticuerpos, (Norma de Calidad de la OIE y Directrices para los Laboratorios Veterinario).

Curso UNE-EN ISO 17034:2017 Requisitos generales para la competencia de productores de materiales de referencia, por la empresa GSC.

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

[www.gscsal.com](http://www.gscsal.com)

MATERIAL NO OFICIAL

## **MATERIAL PARA LA PREPARACIÓN DEL TEMA 7**

### **CALIBRACIÓN, VERIFICACIÓN Y MANTENIMIENTO DE EQUIPOS EN EL LABORATORIO DE ANÁLISIS. PLANES Y PROGRAMAS APLICABLES.**

*Este material no tiene carácter oficial, por lo que en ningún caso vinculará al Tribunal Calificador. Constituye, únicamente, un instrumento complementario que servirá de apoyo al opositor para enfocar cada uno de los epígrafes, pero nunca de forma exclusiva ni excluyente. El Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación no se hace responsable del contenido del mismo.*

*Los materiales no serán objeto de actualización constante.*

## **ÍNDICE**

**1. INTRODUCCIÓN**

**2. CALIBRACIÓN, VERIFICACIÓN Y MANTENIMIENTO DE EQUIPOS EN EL LABORATORIO DE ANÁLISIS**

**3. PLANES Y PROGRAMAS APLICABLES**

MATERIAL NO OFICIAL

## **1. INTRODUCCIÓN**

El desarrollo y realización de análisis es una herramienta que tiene una repercusión decisiva en la Sanidad Animal y Seguridad Alimentaria y los laboratorios que los realizan trabajan en un entorno de creciente exigencia y responsabilidad tanto legal como social que reclama un nivel de calidad y de confianza extraordinarios.

Por ello, tanto los métodos de ensayo como los laboratorios que realizan los análisis deben asegurar, al máximo nivel permitido por el desarrollo científico, la fiabilidad de los resultados, lo cual implica que además de reunir los criterios técnicos que aseguren su validez, deben ser realizados con una serie de garantías que permitan obtener resultados comparables con independencia del laboratorio que los ejecute.

Para asegurar la calidad y fiabilidad de los resultados los estándares sobre gestión de la calidad tienen como finalidad proporcionar a los laboratorios (y organizaciones en general) los elementos de un sistema de gestión eficaz de la calidad.

Si el laboratorio decide proceder a un reconocimiento formal de su sistema de gestión de la calidad y de sus análisis, será necesaria la verificación, por parte de terceros, de esta conformidad con las normas escogidas.

El comité internacional de acreditación de laboratorios (ILAC en inglés), ha publicado requisitos y directrices específicos para laboratorios y organismos de acreditación, de modo que para la acreditación de actividades analíticas y/o de calibración en un laboratorio de análisis, debe utilizarse la norma UNE-EN ISO/IEC 17025 de "Requisitos generales relativos a la competencia de los laboratorios de ensayo y calibración".

La acreditación va unida a la competencia técnica, que supone mucho más que disponer de unos procedimientos y seguirlos. Un laboratorio competente es aquel que dispone de métodos analíticos válidos y validados, garantizan resultados exactos, fiables y trazables, dispone de personal altamente cualificado y equipos calibrados, implementa mejoras continuas en la gestión de los análisis y de la calidad, evalúa con exactitud y controla la incertidumbre en los análisis, etc.

En este sentido, la Norma de Acreditación UNE-EN ISO/IEC 17025 de "Requisitos generales relativos a la competencia de los laboratorios de ensayo y calibración", contiene todos los requisitos que los laboratorios de análisis tienen que cumplir si desean demostrar que:

- Disponen de un sistema de gestión de calidad
- Son técnicamente competentes
- Son capaces de producir resultados válidos

La implantación de este sistema de acreditación permite, entre otras cosas:

- Facilitar la cooperación entre los laboratorios
- Ayudar a intercambiar información

- Ayuda a armonizar normas y procedimientos
- Facilita la aceptación de resultados de los ensayos en distintos países

En lo referente a los equipos, especifica como requisito en su punto 6.4 de “Equipamiento” que “El laboratorio debe tener acceso al equipamiento (incluidos pero sin limitarse a, instrumentos de medición, software, patrones de medición, aparatos auxiliares, etc) que se requiere para el correcto desempeño de las actividades de laboratorio y que pueden influir en los resultados”

Otros requisitos importantes respecto al equipamiento son:

- Asegurar el correcto funcionamiento mediante un procedimiento para la manipulación, transporte, almacenamiento, uso y mantenimiento planificado del equipamiento
- Asegurar que se cumplen los requisitos especificados antes de su instalación
- Asegurar la exactitud de la medición y/o la incertidumbre de medición requeridas para proporcionar un resultado válido

## **2. CALIBRACIÓN, VERIFICACIÓN Y MANTENIMIENTO DE EQUIPOS EN EL LABORATORIO DE ANÁLISIS**

En un laboratorio de análisis podemos encontrar distintos tipos de equipos:

- Equipos de medición directa. Son aquellos cuya escala de resultados se presenta en unidades de la magnitud que se desea medir. Ej. Pipetas de tipo pistón, termómetros, balanzas, etc.
- Equipos de medición indirecta. Son aquellos cuya respuesta o señal está relacionada con la magnitud que se está midiendo a través de una función numérica o gráfica conocida. Ej. espectrofotómetro, cromatógrafo, etc.
- Equipos auxiliares. Son aquellos que no se utilizan de manera directa para obtener resultados de las mediciones pero que son de gran importancia en los ensayos. Ej. Estufas, autoclaves, baños, cabinas de seguridad biológica y de extracción de gases, etc.

El sistema de calidad implantado fija un sistema para el control y la gestión del equipamiento, incluyendo las operaciones de calibración, verificación y mantenimiento para asegurar que los equipos se encuentran en perfectas condiciones, es decir, funcionan correctamente y nos garantizan que sus medidas son correctas, conocemos las correcciones a realizar y pueden ser utilizados cuando sea necesario.

Los equipos han de calibrarse dado que sus respuestas generalmente no son estables en el tiempo y varían con el paso del tiempo debido a diferentes causas, como deterioro, limpiezas inadecuadas, mantenimientos inadecuados, etc. Estas desviaciones se denominan “derivadas” y pueden afectar al equipo o a la medida que proporciona y así, superar la tolerancia que se haya establecido para dicha medida induciéndonos a un error en el dato.

Por tanto, el objetivo último es asegurar que si dos laboratorios tienen equipos que se calibran de una manera trazable a un patrón de referencia, se podrá suponer que, en ausencia de otros problemas debidos al personal, métodos, etc., sus medidas serán claramente comparables y no existirá variación entre las mismas.

Para ello es necesario realizar una operación de comparación de las respuestas de los equipos o sistemas de medidas con los valores conocidos de una medida y garantizar que medimos igual que otros laboratorios y que los valores de nuestras medidas se mantienen con el paso del tiempo. Esta comparación es conocida como calibración.

Para comprender la operación de calibración y verificación de la que hablaremos posteriormente, es necesario definir ciertos parámetros asociados a la medición, como son:

- Incertidumbre (U): La incertidumbre de la medición es el parámetro asociado al resultado de una medición, que caracteriza la dispersión de los valores que podrían ser razonablemente atribuidos al mensurando. Indica el nivel de probabilidad o nivel de confianza del intervalo de medidas.
- Corrección (C): Valor sumado algebraicamente al resultado sin corregir de una medición para compensar un error sistemático. La corrección es igual al opuesto del error sistemático estimado. Puesto que el error sistemático no puede conocerse perfectamente, la compensación no puede ser completa.
- Error de medida (E): Resultado de una medición menos un valor verdadero del mensurando. Considerando que un valor verdadero no puede ser determinado, en la práctica se utiliza un valor convencionalmente verdadero.

$$C = V_{\text{patrón}} - V_{\text{equipo}},$$

$$V_{\text{patrón}} = V_{\text{equipo}} + C \rightarrow C = -\text{Error}$$

C: corrección

$V_{\text{patrón}}$  el valor de la magnitud proporcionada por el patrón

$V_{\text{equipo}}$  el valor dado por el equipo

Un patrón de referencia puede ser un reactivo químico, una pesa patrón, una sonda Pt-100 (detector de temperatura por resistencia), etc.

La **calibración**, por tanto, se define como el conjunto de operaciones que establecen, en unas condiciones específicas, la relación que existe entre los valores de una magnitud indicados por un instrumento de medida (o sistema de medida, o los valores representados por una medida materializada o por un material de referencia) y los valores correspondientes de esa magnitud realizados por patrones.

Los resultados de una calibración se consignan en un documento denominado certificado de calibración o informe de calibración, en el que de manera general figurarán entre otros parámetros la incertidumbre y la corrección o error del equipamiento tras una serie de "n" medidas determinadas en cada caso.

Los certificados de calibración deben cumplir los requisitos especificados en la Norma UNE-EN ISO/IEC 17025 en lo referente al punto 7.8 de Informe de resultados. Los resultados se deben revisar y autorizar antes de su emisión y se deben suministrar de manera exacta, clara, inequívoca y objetiva. Un certificado o etiqueta de calibración no debe contener recomendaciones sobre el intervalo de calibración, excepto cuando así se haya acordado con el cliente.

En la Norma se establecen una serie de requisitos comunes para los informes de ensayo, de calibración o de muestreo, estos son:

- Incluir un título (por ejemplo “certificado de calibración”)
- Incluir el nombre y la dirección del laboratorio
- Incluir el lugar en donde se realizan las actividades
- Incluir una identificación única de que todos sus componentes se reconocen como una parte de un informe completo y una clara identificación del final
- Incluir el nombre y la información de contacto del cliente
- Incluir la identificación del método utilizado
- Incluir una descripción, una identificación inequívoca y, cuando sea necesario, la condición del ítem
- Incluir la fecha de recepción de los ítems de calibración o ensayo, cuando esto sea crítico para la validez y aplicación de los resultados
- Incluir las fechas de ejecución de la actividad del laboratorio
- Incluir la fecha de emisión del informe
- Incluir una declaración acerca de que los resultados se relacionan solamente con los ítems sometidos a ensayo, calibración o muestreo
- Incluir los resultados con las unidades de medición, cuando sea apropiado
- Incluir las adicionales, desviaciones o exclusiones del método
- Incluir la identificación de las personas que autorizan el informe
- Incluir una identificación clara cuando los resultados provengan de proveedores externos

Además, la Norma establece una serie de requisitos específicos para los certificados de calibración, estos son:

- Incluir la incertidumbre de medición del resultado de medición presentado en la misma unidad que la de la unidad del mensurando o en un término relativo a dicha unidad
- Incluir las condiciones (por ejemplo, ambientales) en las que se hicieron las calibraciones, que influyen en los resultados de medición
- Incluir una declaración que identifique cómo las mediciones son trazables metrológicamente
- Incluir los resultados antes y después de cualquier ajuste o reparación, si están disponibles
- Incluir cuando sea pertinente, una declaración de conformidad con los requisitos o especificaciones
- Incluir cuando sea apropiado, opiniones e interpretaciones

La importancia de la calibración reside en darnos una fotografía instantánea de cómo está midiendo nuestro instrumento o sistema de medida, estimando la incertidumbre con la que se ha medido.

Los puntos clave de la calibración son:

- Que se realiza en unas condiciones especificadas y que por tanto es válida solamente para dichas condiciones.
- Que su resultado es una relación entre valores.
- Que si se desea que esta comparación proporcione trazabilidad es necesario estimar la incertidumbre del valor obtenido en función de los patrones, el procedimiento y las condiciones en las que se ha desarrollado

La trazabilidad metrológica debe asegurarse mediante una cadena interrumpida y documentada de calibraciones cada uno de los resultados de las mediciones cada una de las cuales contribuye a la incertidumbre de medición, vinculándolos con la referencia apropiada.

La **verificación** se define como el conjunto de operaciones que permiten, mediante una comparación métrica respecto a un valor de referencia, establecer una relación de medidas y así asegurar la veracidad de la medida de nuestro instrumento.

Los resultados de una verificación se consignan en un documento denominado certificado de verificación o informe de verificación, en el que de manera general figurarán entre otros parámetros la corrección o error del equipamiento tras una serie de "n" medidas determinadas en cada caso.

Al adquirir un equipo, este ha de cumplir con una determinada norma o especificación, por ejemplo de fábrica, y es necesario establecer cuáles son las características que son necesarias asegurar y por tanto, verificar. Estas características pueden ser por ejemplo la de precisión y exactitud.

- **Exactitud:** capacidad de un instrumento de acercarse al valor de la magnitud real. La exactitud depende de los errores sistemáticos que intervienen en la medición, denotando la proximidad de una medida al verdadero valor y, en consecuencia, la validez de la medida. (Cuanto se acerca el valor al valor de referencia.
- **Precisión:** capacidad de un instrumento de dar el mismo resultado en mediciones diferentes realizadas en las mismas condiciones. (Cuanto se acercan los valores medidos entre sí).

En la verificación se comprueban que se mantienen las condiciones de la calibración. Se puede realizar debido a que el periodo de calibración sea largo y se desee comprobar que no ha habido variaciones.

Las operaciones de calibración y verificación deben cumplir una serie de requisitos, estos son:

- Deben ser realizadas periódicamente, el requisito a tener en cuenta para fijar estos periodos es garantizar la estabilidad del equipo, o dicho de otro modo, que la deriva

entre calibraciones y verificaciones no nos impida tener seguridad en nuestras medidas.

- Deben ser realizadas de acuerdo a procedimientos y haberse establecido previamente unos criterios de evaluación y conformidad.
- Deben ser realizadas con patrones trazables y de incertidumbre conocida.

El **mantenimiento** de los equipos son todas aquellas operaciones que se deben realizar para asegurar el correcto funcionamiento del equipo siguiendo las indicaciones de los fabricantes.

Pueden llevarse a cabo mantenimientos internos (llevados a cabo por el propio laboratorio) o externos. De manera general, las operaciones de mantenimiento son realizadas por las casas comerciales de los equipos quienes disponen de piezas originales, personal cualificado, etc.

Existen dos tipos de mantenimiento:

- Preventivo: conjunto de actividades encaminadas a reducir el desgaste y conservar los equipos en buenas condiciones de funcionamiento. La eficacia de estas operaciones puede materializarse en reducción de paros imprevistos por avería, menos inversión de horas de servicio técnico, ahorro de costes en piezas de sustitución.
- Correctivo: conjunto de actividades encaminadas a corregir fallos y averías de los equipos.

Los resultados de las operaciones de mantenimiento se consignan en un documento denominado parte de trabajo o informe de mantenimiento, en el que de manera general figurarán las operaciones realizadas, desviaciones encontradas tras el análisis y diagnóstico del equipo y recomendaciones para el correcto funcionamiento del equipo.

### **3. PLANES Y PROGRAMAS APLICABLES**

Se deben establecer planes y programas para las operaciones anteriormente descritas con el objeto de asegurar, como se ha comentado con anterioridad, el correcto funcionamiento del equipo (con las operaciones de mantenimiento) y la fiabilidad de las medidas dadas (con las operaciones de calibración y verificación).

La planificación se puede definir como el intervalo de tiempo que debe transcurrir entre dos operaciones sucesivas de un equipo de forma que la fiabilidad de los resultados de las medidas realizadas con ese equipo esté asegurada durante este tiempo con una probabilidad elevada, salvo mal uso o avería.

Para asignar los períodos de estas operaciones se podrá tener en cuenta por ejemplo:

- Normativa aplicable
- Grado de exactitud del equipo
- Frecuencia de uso
- Tipo de utilización del equipo (patrón, de medida, auxiliar, etc.)
- Estabilidad y deriva con el tiempo.
- Recomendaciones del fabricante.

- Datos de otros laboratorios de metrología.

La programación engloba las distintas partes o actividades de manera ordenada que se tienen que ejecutar para el fin previsto (asegurar funcionamiento y veracidad de las medidas). En función del tipo de equipamiento y de la finalidad de uso en la realización del ensayo, se debe definir un programa que englobe uno o varios de los tipos de operaciones comentados anteriormente y con periodos definidos. Además, deben revisarse y ajustarse según sea necesario para mantener la confianza en el estado de las mismas. Así, por ejemplo, puede establecerse de manera general que las operaciones de calibración se lleven a cabo anualmente y otras adicionales de verificación, para comprobar que se mantienen las condiciones de la calibración y se desee comprobar que no ha habido variaciones, seis meses después de la calibración. Como complemento se pueden fijar operaciones de mantenimiento o cambio de piezas clave (juntas en pipetas, lámparas en espectrofotómetros, etc).

Para aquellos que presenten mayor estabilidad y menor deriva en el tiempo se mantendrá el periodo exigido por la norma o los definidos por el laboratorio, y por el contrario para los equipos que muestren mayor inestabilidad y deriva en el tiempo, se analizará la conveniencia de acortar sus periodos de calibración y/o verificación.

En el caso de no poder cumplirse esta planificación por cualquier motivo, se deberá analizar el impacto sobre los resultados que se van a emitir y la toma de acciones que sean convenientes para que no influya en el aseguramiento de la validez de los resultados.

Será necesario elaborar procedimientos escritos específicos y determinar si estas operaciones se realizan de manera interna en el laboratorio por personal cualificado o por empresas externas acreditadas o aptas para realizar las operaciones.

Es importante tener en cuenta el concepto de trazabilidad metrológica, ya que para el caso específico de las operaciones de calibración, la trazabilidad se asegurará por medio de la selección de laboratorios de calibración externos de acuerdo con los siguientes criterios:

a) El laboratorio estará acreditado por ENAC o por cualquiera de los organismos de acreditación firmantes del acuerdo EA (*European Accreditation*) como por ejemplo UKAS, DKD, etc., para la magnitud y rango precisado o bien por laboratorios nacionales participantes en las intercomparaciones promovidas por BIPM (oficina internacional de pesos y medidas).

b) Si el laboratorio no está acreditado por un Organismo de Acreditación de EA o no está acreditado para el rango deseado, en el certificado de calibración se le exigirá el siguiente contenido:

- Expresión de los valores
- Incertidumbres asociadas
- Definición de los patrones utilizados
- Procedimiento interno en que se basa dicha calibración.
- La cadena de trazabilidad de sus medidas hasta llegar a un laboratorio acreditado

En el caso que se realicen operaciones de calibración por personal interno cualificado del laboratorio, estos procedimientos deberán estar revisados y aceptados por ENAC para su validez técnica.

El equipo de medición debe ser calibrado cuando:

- La exactitud o la incertidumbre de medición afectan a la validez de los resultados informados, y/o
- Se requiere la calibración del equipo para establecer la trazabilidad metrológica de los resultados informados.

En el momento de desarrollar los métodos y procedimientos de ensayo y calibración, deben ser tenidos en cuenta los diversos factores que contribuyen a la incertidumbre total de la medición. Dentro de los factores que determinan la exactitud y la confiabilidad de los ensayos y las calibraciones realizadas, se incluyen entre otros, factores humanos, instalaciones, condiciones ambientales, métodos de calibración y su validación, los propios equipos, la trazabilidad de las medidas y la manipulación de los ítems de calibración.

Un procedimiento de calibración o verificación podrá contener al menos los siguientes puntos:

- Objeto del procedimiento
- Alcance
- Definición de la tolerancia del ensayo, rango para el cual se van a realizar las medidas de calibración y verificación y los criterios de aceptación o rechazo del equipo.

El intervalo de tolerancia definido para el equipo es el que se establezca en la Norma o método que define el ensayo. Si el equipo se utiliza para varios ensayos, según distintas normas, se toma la tolerancia más estricta. Cuando el ensayo no se realiza según Norma, se utilizará como criterio la tolerancia definida bajo criterio interno del laboratorio. Así por ejemplo, un termociclador utilizado para la amplificación de fragmentos de ácidos nucleicos en la reacción PCR se utiliza a diversas temperaturas y la tolerancia establecida será en función de criticidad de cada una de las etapas de la PCR en cada ensayo. Así por ejemplo, la etapa de hibridación que es la más crítica tendrá una tolerancia más restrictiva,  $60 \pm 1^{\circ}\text{C}$ , y las etapas de desnaturalización y elongación menos restrictiva,  $\pm 2^{\circ}\text{C}$ .

Además de la tolerancia pueden definirse otros parámetros de aceptación de funcionamiento del equipo en términos de exactitud y precisión. Así por ejemplo, para las medidas de una placa de 96 pocillos proporcionadas por un espectrofotómetro o un robot de alicuotado pueden establecerse como criterios de aceptación el parámetro de coeficiente de variación de la placa entera, aceptando una variación del 5%.

En otros casos, como por ejemplo en incubaciones destinadas a inactivar virus, el valor de tolerancia que se impone sería superar la temperatura a la cual se considera que el virus ha sido inactivado.

- Establecimiento de condiciones ambientales que pueden afectar a las medidas y pasos previos (temperatura y humedad de una sala, descontaminación de equipos, preparación de reactivos o un patrón de medida, etc).

- Descripción del método de calibración o verificación incluyendo la toma de datos y los cálculos matemáticos.

La calibración implica al menos la medida de 10 valores y el cálculo de otros parámetros como la medida máxima, medida mínima, coeficiente de variación, la corrección o el error (diferencia entre el valor tomado y el valor del patrón de referencia) y la incertidumbre porque de nada sirve conocer el resultado de un análisis, si no somos capaces de estimar la incertidumbre con la que se ha medido.

Recordemos que la incertidumbre ( $U$ ) de una medida se define como la estimación de la parte del resultado completo que caracteriza el intervalo de valores dentro del cual se encuentra el valor verdadero de la cantidad de medida o mensurando, dicho de otro modo, ese intervalo de valores dentro de cual se haya el valor verdadero.

Ejemplo de expresión de  $U$ :  $37 \pm 1^\circ\text{C}$

Para el cálculo de la  $U$  hay que tener en cuenta todas las posibles fuentes de incertidumbre en una medida, muchas componentes que pueden ser agrupadas en dos categorías en función del método utilizado para estimar su valor numérico, estas son:

- Componentes de TIPO A: las estimadas aplicando métodos estadísticos de una serie de observaciones, como puede ser la desviación estándar.
- Componentes de TIPO B, son estimadas basándose en el certificado de calibración, la experiencia, recomendaciones del fabricante, etc. Éstas son:
  - Las debidas a la serie de mediciones: variaciones en observaciones repetidas bajo condiciones aparentemente iguales, repetibilidad de las medidas, uniformidad en el espacio, estabilidad en el tiempo.
  - Las debidas al certificado de calibración en el que se establecen las correcciones y las  $U$  asociadas a ellas.
  - Las debidas a las características de los equipos: deriva, resolución.
  - Otras: como el método de medida, redondeo.

Una vez consideradas y calculadas las fuentes de  $U$ , hay que calcular la  **$U$  total**.

Para ello, en primer lugar hay que calcular  **$U$  de calibración**: se calcula con la Ley de propagación de incertidumbre, es decir, la suma cuadrática de cada una de las aportaciones singulares anteriormente mencionadas y que sean de aplicación.

Así por ejemplo, en la calibración de un equipo térmico ( $U_{\text{CAL\_ET}}$ ), utilizaremos sondas pt-100 calibradas y las colocaremos en diversos puntos alcanzando las esquinas y el centro. Se tomarán datos durante una noche y en el cálculo de  $U$  calibración del equipo, consideraremos la suma cuadrática de las  $U$  del termómetro patrón ( $U_{\text{CP}}$ ),  $U$  de la deriva del termómetro patrón ( $U_{\text{DP}}$ ),  $U$  de la resolución del termómetro patrón ( $U_{\text{RP}}$ ),  $U$  de resolución del indicador de la estufa ( $U_{\text{RT}}$ ),  $U$  de repetición de la medidas ( $U_{\text{A}}$ ),  $U$  debida a la uniformidad en el espacio ( $U_{\text{U}}$ ) y  $U$  debida a la estabilidad en el tiempo ( $U_{\text{E}}$ ).

$$u_{calET} = \sqrt{u_{CP}^2 + u_{DP}^2 + u_{RP}^2 + u_{RT}^2 + u_A^2 + u_U^2 + u_E^2}$$

A continuación deberemos calcular la **U expandida**: se calcula multiplicando la U de calibración por un factor de cobertura que normalmente es K=2. Esto es así porque si atribuimos al mensurando una distribución estadística de tipo normal, la probabilidad de encontrar el valor verdadero estará dentro de un intervalo simétrico con una probabilidad de alcanzarlo del 95%. Ese intervalo se determina multiplicando la U<sub>cal</sub> por un factor K, que usualmente es k=2.

$$U_{CAL\_ET} = \pm k \cdot u_{calET}$$

Finalmente para obtener la incertidumbre de calibración total sumamos a la incertidumbre expandida la corrección. Considerando la corrección calculada podemos definitivamente calcular la **U equipo o U total**.

$$U_{TOTAL} = U_{CAL\_ET} + |Corrección|$$

Por último la **expresión del resultado final de calibración** viene determinado por el resultado final de una medida y se expresa por la estimación de la magnitud salida (Y), con el intervalo de incertidumbre para un factor de cobertura (K) dado (usualmente =2 para una probabilidad de cobertura del 95%); mediante la expresión:

$$Y \pm U \text{ (indicando siempre el valor k)}$$

En el caso de la verificación bastará con la comparación de una a tres medidas con un valor de referencia o patrón para verificar y el cálculo de la desviación estándar de la media de las tres medidas con el valor de referencia.

Una vez realizadas las operaciones y haber realizado los cálculos matemáticos es necesario realizar la **interpretación de los resultados**. Una vez fijado el valor de la tolerancia del equipo para el ensayo, se debe verificar que los datos obtenidos en la calibración cumplen y que por tanto el equipo es apto para su uso previsto. Así, mediante la siguiente expresión se puede verificar dicha conformidad. La incertidumbre sumado el valor de la corrección en valor absoluto, deberá ser menor que la tolerancia fijada.

$$U + |Corrección| \leq \text{Tolerancia}$$

Un supuesto numérico puede ser en el que tras una calibración se ha obtenido como incertidumbre expandida 0,42, la corrección del display del equipo es de -0,06°C y la tolerancia fijada para el equipo es de 1°C. Así, al ser la incertidumbre más la corrección en valor absoluto menor que la tolerancia, la calibración es "APTA" y por tanto el equipo puede usarse para el fin previsto.

$$0,42 + |0,06| \leq 1$$

Cuando los datos de calibración incluyen factores de corrección, el laboratorio debe asegurar que dichos factores se actualizan e implementan.

Cabe reseñar que para aquellos equipos calibrados empleados para el control de otros equipos, por ejemplo, un termómetro registrador de datos para la monitorización de una estufa o incubador de CO<sub>2</sub>, la incertidumbre de calibración del registrador debe ser siempre menor que la tolerancia del equipo que controla, pudiendo establecer la siguiente regla: La incertidumbre debe ser tres veces menor que la tolerancia del equipo que controla.

$$\frac{T}{3} \geq U$$

Como complemento a lo explicado anteriormente, debemos considerar que para el correcto control y gestión del equipamiento es necesario implantar un procedimiento para su recepción y puesta en marcha. Se deben tener en cuenta las Buenas Prácticas de Fabricación y las Normas de Calidad Nacionales e Internacionales vigentes que describen el diseño, fabricación, instalación y operativa de los equipos. Para la puesta en marcha es necesario que la empresa suministradora realice las siguientes operaciones:

- Cualificación de instalación (IQ) conjunto de operaciones que certifica que todos los aspectos clave del equipo y los necesarios para la instalación están conforme a los requisitos y normas de seguridad legales indicados en la cualificación de diseño (DQ).
- Cualificación de operación (OQ) conjunto de operaciones que verifica documentalmente que el equipo o maquinaria involucrada en el proceso de estudio opera como se definió en el diseño y determina los valores óptimos de operación para cada una de sus variables de control.
- Cualificación de funcionamiento (PQ) Aquí se demuestra la efectividad y reproducibilidad del proceso, bajo dos tipos de condiciones: la primera, pruebas del sistema en condiciones normales de operación, y la segunda, bajo límites de operación, en la situación más desfavorable para demostrar su funcionamiento correcto y constante.
- Validación de Software: Adicionalmente, para los desarrollos de sistemas informatizados, debe realizarse la Validación del Software de acuerdo a los requisitos. Esta evaluación se basa en un análisis de riesgos documentado y en las evidencias del cumplimiento del desarrollo efectuado.

Además, es necesario implantar un procedimiento para registrar el alta y baja de equipos, mantener un inventario e histórico de operaciones actualizado, un sistema de codificación inequívoco y etiquetado de operaciones ya que todos los equipos que requieran calibración o que tengan un periodo de validez definido, se deben etiquetar, codificar o identificar de otra manera para permitir que el usuario de los equipos identifique fácilmente el estado de calibración y/o verificación o el periodo de validez.

El equipo que haya sido sometido a una sobrecarga o a uso inadecuado, que dé resultados cuestionables, o se haya demostrado que esté defectuoso o que está fuera de los requisitos especificados, debe ser puesto fuera de servicio. Éste se debe aislar para evitar su uso o se debe rotular o marcar claramente que está fuera de servicio hasta que se haya verificado que funciona correctamente. Ello debe quedar debidamente registrado en un parte o informe de anomalía en el que se detalle la anomalía que se ha detectado, si afecta a resultados emitidos,

las posibles causas y las acciones que se han llevado a cabo para su resolución. Una vez finalizado el equipo puede haber quedado en uso de nuevo, con una limitación de uso o de baja definitiva.

MATERIAL NO OFICIAL

## **BIBLIOGRAFÍA**

UNE-EN ISO 17025 Requisitos generales relativos a la competencia de los laboratorios de ensayo y calibración

NT - 74 Rev. 4 Política de trazabilidad metrológica de ENAC

EA - 4 02 M 2021 Rev. 2 Evaluación de la incertidumbre de medida en las calibraciones

ILAC - P 14 09 2020 Rev. 1 Política ILAC sobre incertidumbre de medida en calibración

Curso “Calibración de equipos”, empresa ASECAL.

MATERIAL NO OFICIAL

## **MATERIAL PARA LA PREPARACIÓN DEL TEMA 8**

### **ENSAYOS DE INTERCOMPARACIÓN: CONCEPTO Y TIPOS. TRATAMIENTO ESTADÍSTICO DE LOS RESULTADOS.**

*Este material no tiene carácter oficial, por lo que en ningún caso vinculará al Tribunal Calificador. Constituye, únicamente, un instrumento complementario que servirá de apoyo al opositor para enfocar cada uno de los epígrafes, pero nunca de forma exclusiva ni excluyente. El Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación no se hace responsable del contenido del mismo.*

*Los materiales no serán objeto de actualización constante.*

## **ÍNDICE**

### **1. CONCEPTO Y TIPOS DE ENSAYOS DE INTERCOMPARACIÓN**

#### 1.1. CONCEPTO

#### 1.2. TIPOS DE ENSAYOS DE INTERCOMPARACIÓN:

1.2.1. Ensayos de Aptitud

1.2.2. Ensayos Colaborativos

1.2.3. Ejercicios de Certificación

#### 1.3. CARACTERÍSTICAS DE LOS ENSAYOS DE INTERCOMPARACIÓN

#### 1.4. FASES DEL DESARROLLO DE UN ENSAYO DE INTERCOMPARACIÓN

1.4.1. Planificación del ensayo

1.4.2. Definición de laboratorios participantes

1.4.3. Selección y preparación de muestras

1.4.4. Aceptación del ensayo por parte de los laboratorios participantes

1.4.5. Realización de ensayos

1.4.6. Recepción de resultados y análisis estadístico

1.4.7. Redacción y envío de informes

### **2. TRATAMIENTO E INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS**

#### 2.1. TRATAMIENTO ESTADÍSTICO DE LOS RESULTADOS

2.1.1. Cálculo del valor asignado

2.1.2. Ensayos cualitativos

2.1.3. Ensayos cuantitativos

2.1.4. Ensayos semicuantitativos

#### 2.2. ACTUACIÓN ANTE RESULTADOS NO SATISFATORIOS

#### 2.3. ERRORES COMUNES

## 1. CONCEPTO Y TIPOS DE ENSAYOS DE INTERCOMPARACIÓN

### 1.1. CONCEPTO

El término **ensayo de intercomparación** hace referencia a los ensayos, organizados y coordinados por un proveedor con un nivel suficiente de competencia técnica, en los cuales **participan diversos laboratorios** para la **consecución de un fin**, que será diferente en función del tipo de ensayo al que se haga referencia.

Según se recoge en la norma **ISO/IEC 17043:2010** (que establece los requisitos generales para la competencia de los proveedores de programas de ensayos de aptitud), se definen como la **“organización, realización y evaluación de mediciones o ensayos sobre el mismo ítem o ítems similares por dos o más laboratorios de acuerdo con condiciones predeterminadas”**.

Se establece así uno de los **principios básicos** de la organización y participación en ensayos de intercomparación: se basan en que **todos los laboratorios participantes** analicen, mediante las técnicas previamente establecidas, **los mismos ítems o ítems similares**, de tal manera que sus resultados sean **comparables mediante métodos estadísticos**. De esta manera, se pueden extraer valiosas conclusiones, haciendo de los ensayos de intercomparación una valiosa herramienta para diversos objetivos:

- Evaluar el **desempeño** de los laboratorios como principio de la evaluación de la calidad de los mismos. Esto incluye la detección de desviaciones, que permitirá iniciar **acciones correctoras** para mejorar dicho desempeño.
- Elaborar **recomendaciones** para los laboratorios en función de sus resultados.
- Establecer la **comparabilidad** de los métodos de análisis, siendo este un paso fundamental para su **validación**.
- Identificar el método o métodos más adecuados para el desarrollo de un determinado análisis, es decir, establecer la **eficacia** de los diferentes métodos para dicho análisis.

La norma **ISO/IEC 17025:2017** establece como requisito para la acreditación de los laboratorios, en su punto 7.7.2, que **“el laboratorio debe hacer seguimiento de su desempeño mediante comparación con los resultados de otros laboratorios, cuando estén disponibles y sean apropiados”**. Así, se establece como requisito la **participación en ensayos de intercomparación**.

La participación en este tipo de ensayos sirve a los laboratorios participantes, en primer lugar, para **determinar su capacidad para realizar los ensayos** estudiados, pudiendo así asegurar su **calidad** y mejorar su **confianza** de cara a entidades de acreditación y certificación y frente a sus clientes.

Además, se trata de una herramienta fundamental para **detectar de forma temprana deficiencias** en el desarrollo de las técnicas. Por ello, conlleva un **alto potencial de mejora**, ya que ante resultados no satisfactorios obliga al laboratorio a realizar un **análisis para detectar**

la **causa o causas de la desviación** y a implementar y justificar las **medidas correctoras oportunas**.

Así, la **participación en ensayos de intercomparación** debe formar parte de las actuaciones recogidas en el **sistema de gestión de la calidad** de los laboratorios, siendo un elemento fundamental de dicho sistema como parte del **control externo** realizado.

## 1.2. TIPOS DE ENSAYOS DE INTERCOMPARACIÓN

Los ensayos de intercomparación pueden clasificarse de acuerdo con diversos aspectos, relacionados tanto con la organización del ensayo como con el tipo de muestras o de técnicas a emplear. Algunas de las clasificaciones propuestas para los ensayos de intercomparación incluyen:

- En función del tipo de resultados obtenidos, se distingue fundamentalmente entre ensayos cualitativos y cuantitativos. Pueden existir también ensayos con resultados semicuantitativos, que generalmente se interpretarán bien como cualitativos o bien como cuantitativos.
- Según el tratamiento de datos realizado, se puede diferenciar las intercomparaciones de transformación y de interpretación de datos.
- En función de la frecuencia de organización:
  - Puntuales
  - Periódicos (normalmente organizados por proveedores comerciales o por los Laboratorios de Referencia)
- Según las muestras enviadas:
  - Empleando muestras homogéneas distribuidas a todos los participantes
  - Empleando la misma muestra o ítem que se circula entre todos los participantes

La clasificación más comúnmente empleada (aunque frecuentemente se emplea en combinación con las anteriores) se realiza teniendo en cuenta la **finalidad** con la que se realiza el ensayo de intercomparación, pudiendo distinguir:

- Ensayos de **aptitud**
- Ensayos **colaborativos**
- Ensayos de **certificación de materiales de referencia**
- Otros tipos de ensayos de intercomparación. En esta categoría se engloban los ejercicios organizados por el propio laboratorio como **control de calidad interno** para la detección de errores y del grado de variabilidad entre ensayos.

### 1.2.1. Ensayos de Aptitud

Los ensayos de **aptitud** son aquellos que tienen por objetivo evaluar la **competencia técnica** del laboratorio en la realización de sus labores de ensayo y calibración.

La norma ISO 17025 establece, como se ha mencionado en el apartado de generalidades, la participación en este tipo de ensayos como requisito para la acreditación. Así, para poder **acreditar una determinada técnica o familia de técnicas**, el laboratorio deberá participar en ensayos colaborativos organizados por proveedores de competencia demostrada, o en todo caso organizar ensayos comparativos con otros laboratorios en caso de que no existiera ningún circuito de ensayos de intercomparación ofrecido para dicha técnica.

Los laboratorios pueden participar en este tipo de ensayos bien a **petición propia**, para aumentar la confianza de cara a sus clientes, o bien como **exigencia** de los organismos de acreditación o evaluadores de la calidad.

Los ensayos de intercomparación pueden ser útiles herramientas para:

- Verificar el cumplimiento de los requisitos establecidos para la **validación de métodos analíticos**.
- Comprobar que los factores determinantes de la **incertidumbre no se han modificado** desde la validación del método.
- Asegurar que la gestión y uso **de materiales de referencia** se realiza correctamente.
- Valorar la adecuación de los métodos empleados para el **control de la calidad**.
- Comparar resultados obtenidos a lo largo del tiempo y bajo diversas circunstancias, como el uso de diferentes equipos, patrones, o personal.
- Detectar fuentes de error no detectadas previamente, e iniciar **las acciones correctoras** y preventivas que resulten oportunas.

Si se realizan en respuesta al requerimiento por parte de **organismos internacionales** de acreditación o certificación, un resultado satisfactorio sirve como garantía adicional a las comprobaciones realizadas por estos de que el laboratorio presenta un nivel suficiente de competencia técnica. Además, la participación en circuitos de ensayos de intercomparación celebrados de forma periódica se puede considerar un elemento principal en el **aseguramiento de la calidad**, garantizando que existen mecanismos para mantenerla en el tiempo, pudiendo detectar desviaciones y corregirlas.

En definitiva, representan una evaluación valiosa, **externa e independiente** y que permite obtener gran cantidad de información para el aseguramiento de la calidad en las labores rutinarias del laboratorio.

### 1.2.2. Ensayos Colaborativos

El término ensayos colaborativos hace referencia a los ejercicios interlaboratorio llevados a cabo para la **evaluación de un método analítico**, obteniendo resultados que permitan evaluar sus características de desempeño, su adecuación a un determinado fin, o su comparación con otros métodos empleados con el mismo objetivo.

Resultan útiles para la **validación de métodos**, así como para su **normalización**.

En este tipo de ensayos, cobra especial importancia el **asegurar que el ensayo se realiza de igual modo** por todos los laboratorios, debiendo ser comparables las condiciones y los equipos empleados. Además, el personal que lleve a cabo los ensayos debe estar cualificado y entrenado en su realización.

Así, se podrán obtener resultados sobre la **robustez, repetibilidad, reproducibilidad y sesgo** de los métodos.

En otras ocasiones, pueden plantearse con el objetivo de evaluar el desempeño de diferentes métodos para un tipo de ensayo, en cuyo caso será interesante que cada laboratorio realice los ensayos en las condiciones en las que lo haga normalmente. Así, se podrá comprobar si existen diferencias significativas entre los resultados obtenidos mediante los diversos métodos, pudiendo además determinarse si alguno de ellos es más recomendable que el resto para el análisis de ese tipo de muestras en concreto.

Puesto que el objetivo de este tipo de ensayos no es determinar el desempeño de un laboratorio concreto, sino interpretar los resultados en su conjunto, los posibles **errores** pueden tener un impacto muy significativo en las conclusiones obtenidas, por lo que es fundamental realizar una evaluación previa para determinar la coherencia de los resultados y eliminar los datos aberrantes.

### 1.2.3. Ejercicios de certificación

Los ejercicios de certificación se llevan a cabo como parte del proceso para **certificar un material de referencia**. Para ello, resulta fundamental emplear **métodos correctamente validados** para el análisis de la o las propiedades a certificar en el material en concreto que se desea certificar.

Los valores certificados deben acompañarse de una declaración de trazabilidad metrológica, debiendo ser **trazables a una realización exacta de la unidad o unidades** en las que se expresan, y de una declaración **incertidumbre** con la indicación de un nivel de confianza, según lo dispuesto en la ISO 17034:2016.

Para llevar a cabo este tipo de ensayos, se debe atender a lo dispuesto en dicha **Norma ISO 17034:2016**, sobre requisitos generales para la competencia de productores de materiales de referencia, así como en la **Guía ISO 35:2017**, que establece una guía para la caracterización de materiales de referencia y la evaluación de la homogeneidad y la estabilidad.

Este tipo de ensayos puede incluir el uso de uno o varios métodos para llegar al valor certificado.

### 1.3. CARACTERÍSTICAS DE LOS ENSAYOS DE INTERCOMPARACIÓN

Las principales características que influyen en un ensayo de intercomparación incluyen:

- **Objetivos**
- Número de **muestras** implicadas
- Número de **métodos** utilizados
- **Criterios estadísticos** de interpretación de los resultados

A pesar de que las características de los ensayos **difierán en función del tipo de ejercicio del que se trate**, existen ciertas premisas comunes que se deben cumplir en todos los casos para garantizar un correcto desarrollo:

- Los participantes deben firmar un documento de **aceptación de condiciones**.
- En cuanto a las **muestras**:
  - Las muestras a analizar, en caso de no emplearse una muestra única, deben ser **homogéneas** para minimizar las diferencias entre los resultados de laboratorios debidas a las propias muestras.
  - La **concentración del analito o analitos** a determinar debe ser realista, procurando no emplear muestras con valores extremos que podrían no representar los niveles medidos habitualmente.
  - La **matriz** de las muestras debe ser lo más similar posible a las muestras recibidas rutinariamente por los laboratorios.
  - En el momento de su recepción, se deberá comprobar que las **condiciones** en las que se han transportado son las adecuadas.
- El envío de los ítems a analizar debe incluir un **documento de instrucciones a seguir** por los participantes, que contendrá indicaciones sobre el tipo de técnicas a emplear, el medio para registrar y enviar los resultados al organizador, y los plazos para el envío de resultados y la emisión de informes.
- Los **análisis deben realizarse de acuerdo con las condiciones preestablecidas**, que podrán ser diferentes en función del objetivo y el tipo de ensayo (por ejemplo, en ensayos de aptitud, los laboratorios deberán llevar a cabo los análisis siguiendo sus procedimientos y en condiciones normales de trabajo).
- Los **resultados** deben analizarse estadísticamente de acuerdo con criterios previamente determinados por el organizador.

- El **informe final** debe incluir los resultados obtenidos, así como su análisis e interpretación. En el caso de ensayos de aptitud, se generarán además **informes individuales** para cada uno de los laboratorios participantes.
- Se debe preservar la **confidencialidad** de los laboratorios a lo largo de todo el desarrollo del ejercicio, incluida la publicación de los resultados en el informe final, para lo cual se identificará a los participantes con un código individual que no debe ser revelado a terceras partes.

## 1.4. FASES DEL DESARROLLO DE UN ENSAYO DE INTERCOMPARACIÓN

### 1.4.1. Planificación del ensayo

En primer lugar, es fundamental **establecer la necesidad de participación y/o de organización** de un ensayo de intercomparación, y elaborar un **programa** para ello.

Esto incluye determinar para **qué técnicas** y sobre **qué muestras** (por ejemplo, para qué diferentes enfermedades) se desea participar en un ensayo de intercomparación. Atendiendo a la complejidad del método, el volumen de actividad, o la posibilidad de interferencias en el mismo, se definirá una **frecuencia de participación**.

El programa y la frecuencia de participación en ensayos de intercomparación deberán estar en consonancia con el resto de las herramientas planteadas en el Sistema de Calidad del laboratorio.

Para definir el programa del ejercicio, se debe establecer:

- Los **objetivos** que se persiguen con la realización
- Los **medios** de los que se dispone
- El **laboratorio u organismo organizador**. Puede coincidir o no con el organismo que encarga el ensayo. En el caso de ensayos de aptitud para laboratorios de Sanidad Animal, por ejemplo, serán los Laboratorios Nacionales de Referencia (a nivel estatal) o los Laboratorios Comunitarios de Referencia (a nivel europeo) los encargados de la organización.
- El **programa** del ensayo. En caso de que el organismo que encargue el ensayo sea diferente al que lo organice, el primero deberá aprobar la propuesta presentada por el organizador.

En cuanto a la **propuesta del programa**, deberá incluir los **objetivos** perseguidos por el programa, el **número y tipo de muestras a analizar**, los **métodos de ensayo admitidos** para su uso por los laboratorios y el **número de laboratorios requeridos** para poder considerar la validez del ejercicio. Además, se establecerán los **criterios a cumplir por los laboratorios**, así como el **tratamiento estadístico** que se realizará.

Por último, se deberá definir la **documentación** que debe elaborarse en cada una de las fases de desarrollo, y el **calendario de actuaciones**, incluyendo los plazos para el envío de muestras, la remisión de resultados y la emisión de informes.

La fase de planificación **no puede ser subcontratada a terceras partes**, según lo dispuesto en la ISO 17043.

#### 1.4.2. Definición de laboratorios participantes

Una vez definido el **plan** a seguir para el desarrollo del ensayo, se debe determinar **qué laboratorios participarán** en él.

El **número de laboratorios participantes** puede ser determinante a la hora de realizar determinados análisis estadísticos, por lo que es fundamental considerarlo de antemano. Se debe tener en cuenta que **número bajo de participantes** podría dar lugar a una interpretación de los resultados con una **validez estadística limitada**. Este punto es especialmente relevante en los ensayos de colaboración y de certificación.

Se debe definir además los laboratorios candidatos a participar: por ejemplo, en el caso de un ensayo de aptitud organizado por el Laboratorio Comunitario de Referencia para una enfermedad, se debe invitar a los LNR para dicha enfermedad, pero también se podrá proponer para su participación a laboratorios expertos colaboradores de terceros países.

El organizador debe **contactar** con los laboratorios, haciéndoles llegar una invitación de participación que incluya información general sobre el programa definido, como los **objetivos** del ensayo, el número y tipo de **muestras a analizar**, los **métodos de ensayo** a emplear o los **requisitos exigibles** a los participantes.

#### 1.4.3. Selección y preparación de muestras

Es responsabilidad del **organizador** producir u obtener las muestras de ensayo, que se deben seleccionar en un **número adecuado** para que los resultados sean significativos. Además, se deberá disponer de ellas en **cantidad suficiente** para poder realizar las técnicas incluidas en el ensayo, para lo cual es además fundamental prever que puede ser necesario realizar repeticiones.

Puede seleccionarse **una única muestra**, según el objetivo del ensayo. Sin embargo, en algunos ensayos, fundamentalmente los ensayos diferentes a los ejercicios de certificación, esto no permitirá obtener resultados estadísticamente significativos. Además, puede dar lugar a resultados aberrantes por errores en la preparación o en la medida.

Así, lo más frecuente es seleccionar **un número variable de muestras** que cubran **un rango de valores de la propiedad a ensayar**. Así, se podrá comprobar el desempeño de los laboratorios o del método en el análisis de muestras que se encuentren en todo el rango de valores estudiado.

Además, **algunas de las muestras podrán ser idénticas**, permitiendo así comprobar por un lado la homogeneidad del lote preparado, y por otro lado la repetibilidad.

En caso de que las muestras requieran de algún tipo de preparación previa, es fundamental que se incluyan unas **instrucciones** a seguir por los participantes.

Para garantizar que las muestras recibidas por los participantes se encuentran en condiciones óptimas para su análisis en el momento de su recepción, es fundamental que el organizador realice pruebas de **homogeneidad y estabilidad**, basadas en calcular la **influencia** de estos parámetros en el resultado final. Así, se debe estudiar la **variabilidad de los resultados obtenidos sobre el mismo ítem** en diferentes condiciones:

- Test de **homogeneidad**. Busca analizar la variabilidad entre **diferentes viales del mismo ítem de ensayo**. Se debe utilizar una selección **estadísticamente aleatoria** (aunque en determinados casos puede ser más apropiada una selección aleatoria estratificada o sistemática) de un **número representativo** de las muestras de ensayo de todo el lote.

Normalmente, se debe realizar una vez que los ítems ya han sido **embalados** en su forma final, y siempre **antes de su distribución** a los participantes. El procedimiento debe estar documentado, y diseñarse conforme a diseños estadísticos aceptables.

- Test de **estabilidad**. Consiste en el análisis de la variabilidad entre **diferentes análisis realizados secuencialmente sobre la misma muestra**, para determinar si el resultado es el mismo tras un determinado periodo de tiempo. Para ello, se debe analizar la muestra en un primer momento (que puede coincidir con el análisis de homogeneidad), y posteriormente, tras pasar un tiempo determinado en ciertas condiciones. Esto permite demostrar que los ítems de ensayo son suficientemente estables, garantizando así que no sufrirán cambios significativos a lo largo del ensayo, incluyendo los periodos de almacenamiento y transporte. En caso de que no se cumplan las condiciones requeridas de estabilidad, se deberá calcular este parámetro e incluirlo como un componente de la **incertidumbre** asociada al valor asignado.

Para parámetros **cualitativos**, deberá valorarse el **mantenimiento del resultado** a lo largo de los ensayos planteados.

Para parámetros **cuantitativos**, el diseño de los tests de homogeneidad y estabilidad se describe en la ISO 13528:2015.

Según lo dispuesto en esta norma, **la variabilidad debida a la homogeneidad**, así como la **variabilidad debida a la estabilidad**, deben encontrarse en un rango **inferior a 0,3 veces la variación objetivo**:

- Para la **homogeneidad**, se debe **calcular la variabilidad en términos de desviación estándar**. Se calcularán:
  - $S_x$ : desviación estándar **intramuestra**, calculada como la desviación entre diferentes réplicas de un mismo vial de la muestra analizadas a la vez
  - $S_w$ : desviación estándar **intermuestra**, calculada como la desviación entre diferentes viales o ítems de la muestra

- $S_s$ : calculada mediante una fórmula matemática, como:

$$S_s = \sqrt{S_x^2 - (S_w^2/2)}$$

Siendo  $\sigma_{obj}$  la variación objetivo determinada, se debe cumplir el criterio

$$S_s < 0,3 \cdot \sigma_{obj}$$

- En el caso de la **estabilidad**, se debe calcular en función de la **diferencia** entre la media de valores obtenida para la propiedad analizada en la primera determinación ( $\bar{x}$ ) y en la segunda determinación ( $\bar{y}$ ):

$$|\bar{x} - \bar{y}| < 0,3 \cdot \sigma_{obj}$$

Sobre las muestras enviadas es también fundamental calcular el **valor asignado**, así como el valor de **incertidumbre** asociado a este. En función del diseño y de los objetivos del ensayo, el cálculo de este puede incluirse como un paso previo a la realización del ejercicio, en esta fase de preparación de las muestras, o bien como primer paso del análisis estadístico de los resultados.

#### 1.4.4. Aceptación del ensayo por parte de los laboratorios participantes

El organizador deberá enviar a los participantes la documentación definitiva, indicando:

- El objetivo u objetivos del ensayo
- El número de muestras a ensayar
- El número de ensayos a realizar sobre cada muestra
- Los métodos de ensayo admitidos
- Los criterios para el envío de resultados y otra documentación requerida
- Calendario, con los plazos para el envío de muestras y de resultados
- Procedimiento en caso de desviaciones
- **Declaración de aceptación**, que deberá remitirse firmada por el participante

#### 1.4.5. Realización de ensayos

Para el envío de los ítems de ensayo, es fundamental controlar que el **empaquetado** cumple con los requisitos legales de seguridad y transporte. Las **etiquetas deben estar bien pegadas**, ser **legibles** y mantenerse **intactas** durante el transporte.

En caso de que se vaya a realizar la **circulación** de las muestras entre los laboratorios, se deben incluir instrucciones para que esta se realice correctamente.

Tras el envío de las muestras, los laboratorios deben asegurarse de que las **condiciones de las muestras** en el momento de la recepción son las correctas y, en caso contrario, comunicarlo al organizador. Deberá **confirmarse la recepción** por el medio definido previamente.

En caso de darse cualquier problema a la hora de realizar los ensayos, o bien en caso de existir dudas en cuanto a su interpretación, los laboratorios deberán ponerse en contacto con el organizador para su resolución.

#### 1.4.6. Recepción de resultados y análisis estadístico

Al recibir los resultados, se debe comprobar que se han cumplido los **plazos** y los **requisitos de presentación** de los mismos. En caso de no darse esta condición, o bien de detectarse cualquier tipo de error de transcripción, el organizador deberá ponerse en contacto con el laboratorio participante para esclarecer o corregir la situación.

Los resultados se analizarán estadísticamente de acuerdo con lo dispuesto previamente en la programación del ensayo de intercomparación. Este punto será abordado en mayor profundidad en el siguiente apartado de este tema.

#### 1.4.7. Redacción y envío de informes

Una vez obtenidos y analizados los resultados, se redactará un **informe final** que será enviado a los laboratorios. Se podrá valorar la necesidad o conveniencia de realizar **una reunión final con los laboratorios participantes** para presentar los resultados y obtener conclusiones en común, para lo cual podrá haberse realizado en primer lugar un informe provisional sobre el que trabajar.

En el caso de los **ensayos de aptitud**, además, se generarán **informes individuales** que recojan el desempeño del laboratorio en concreto.

Los informes deben ser claros, e incluir información suficiente para su correcta interpretación:

- Datos sobre el programa de intercomparación: **nombre de la organización responsable, identificación del informe, objetivos del programa.**
- Datos de la **muestra o muestras analizadas: características** de los ítems enviados, desarrollo y resultados de las pruebas de **homogeneidad y estabilidad**, determinación de los **valores asignados e incertidumbre asociada.**
- Resultados del ejercicio:
  - **Métodos de ensayo** empleados e información complementaria al respecto
  - **Valores de las medidas** individuales
  - Resultados **aberrantes**
  - **Desviaciones detectadas**

- Valor del **rendimiento** del ejercicio
- Determinación de **parámetros estadísticos**, como la reproducibilidad o la repetibilidad en el caso de duplicados
- Conclusiones generales

En el caso de **informes individuales** en ensayos de aptitud, es además fundamental incluir la correcta **identificación del laboratorio participante**, así como su código asignado en el ensayo.

La **autorización** de los informes **no puede ser subcontratada**.

## 2. TRATAMIENTO E INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

### 2.1. TRATAMIENTO ESTADÍSTICO DE LOS RESULTADOS

Para el **análisis estadístico** de los resultados, se debe tener en cuenta el número de participantes, así como los datos aportados por estos. Se deben emplear métodos apropiados, según lo dispuesto en la **norma ISO 13528:2015** y en la **Guía ISO 35:2017**.

Los métodos a emplear serán diferentes en función del **tipo de ensayo** del que se trate. Además, deberá tenerse en cuenta si la propiedad analizada es **cualitativa o cuantitativa**.

Así, los métodos más utilizados según el tipo de ensayo incluyen:

- Para los ensayos de **aptitud**, la evaluación del desempeño y de tendencias a partir del estadístico **Z-score**.
- Para los ensayos **colaborativos**, será fundamental realizar primero un **test de datos aberrantes** para eliminarlos, pudiendo emplear tests como los de **Crochan o Grubbs**. Además, se deberá realizar la determinación de **parámetros estadísticos, incluyendo la sensibilidad, especificidad y eficiencia de los métodos**.
- En los ensayos de **certificación**, se realizarán ensayos para determinar la **homogeneidad y estabilidad** de las muestras, empleando los resultados obtenidos por todos los laboratorios.

En cualquier caso, se recomienda hacer en primer lugar una **inspección visual** de una representación gráfica de los resultados, pudiendo determinar así si la **distribución** es o no la esperada (una distribución normal o Gaussiana).

#### 2.1.1. Cálculo del valor asignado

En primer lugar, y de forma común a todos los tipos de ensayos, se deberá calcular el **valor asignado** de la propiedad a analizar para cada una de las muestras.

El valor asignado se define en la ISO 17043 como el “*valor utilizado como verdadero por el director del ensayo de intercomparación en el tratamiento estadístico de los resultados*”. Es, por tanto, una **estimación práctica del valor verdadero** que se empleará para evaluar los resultados de los participantes.

En primer lugar, debe tenerse en cuenta de si el resultado se analizará en términos **cuantitativos o cualitativos**. Para algunas técnicas empleadas en sanidad animal, como pueden ser el ELISA o la PCR, podrá requerirse a los participantes la remisión de resultados tanto cuantitativos como cualitativos, pero tomar para el análisis únicamente el resultado **cualitativo final**.

Para fijar el valor asignado, se pueden emplear diversos métodos:

- Valor de un **material de referencia certificado**. En caso de emplearse un material de este tipo como ítem de ensayo, se tomará su valor como valor asignado.
- Valor de **muestra adicionada**, en caso de utilizarse una muestra bruta sobre la cual se adicionan cantidades conocidas de la sustancia a determinar.
- Valor consenso obtenido por un **grupo de laboratorios expertos** mediante métodos de ensayo aceptados.
- Valor **medio o valor consenso del conjunto de laboratorios participantes** una vez eliminados los valores aberrantes. Este método comporta un mayor riesgo, ya que pueden existir datos erróneos.

Además, se deberá calcular la **precisión** (en términos de desviación, mediante el cálculo de  $\sigma_{obj}$ ) y la **incertidumbre asociadas** a este valor, bien mediante **experimentación** (a partir de resultados de reproducibilidad), por **prescripción** en el caso de materiales de referencia, o bien por otros sistemas (por referencia a metodología válida, o por referencia a un modelo generalizado).

Un modelo matemático general para el valor asignado y su componente de incertidumbre se describe en la ISO 13528, y puede expresarse como:

$$\chi_{pt} = \chi_{char} + \delta_{hom} + \delta_{trans} + \delta_{stab}$$

Así, los componentes del **valor asignado** ( $\chi_{pt}$ ) se pueden desglosar según este modelo en:

- El valor de la propiedad obtenido mediante caracterización experimental ( $\chi_{char}$ )
- El error o variabilidad debido a las diferencias entre los ítems de ensayo, que será menor a mayor homogeneidad del lote ( $\delta_{hom}$ )
- El error o variabilidad debido a la inestabilidad durante las condiciones de transporte ( $\delta_{trans}$ )
- El error o variabilidad debido a la inestabilidad durante el periodo del ensayo ( $\delta_{stab}$ )

Se debe tener en cuenta que en los casos en los que esté contemplado el uso de varios métodos diferentes (por ejemplo, en los ensayos de aptitud, en los que cada laboratorio empleará los métodos que utilice de rutina), un **único valor asignado** puede **no ser adecuado**

**para todos los participantes.** Por ello, este punto debe considerarse en el diseño del programa y, en caso de no establecerse valores asignados para los diversos métodos, se debe considerar este punto los pasos sucesivos de tratamiento estadístico e interpretación de los resultados.

### 2.1.2. Ensayos cualitativos

Se valorará si el resultado **coincide o no con el valor asignado**.

Además, es fundamental comprobar que existe un **consenso** (que se debe establecer en, al menos, el 75%) entre los laboratorios participantes. En caso de que el 25% o más de los laboratorios tengan resultados **no coincidentes con el valor asignado** se debe valorar:

- Las técnicas empleadas para la obtención del valor asignado y para los ensayos de homogeneidad y estabilidad
- La cercanía del valor de la propiedad al límite de detección
- La posibilidad de aparición de problemas con métodos específicos (por ejemplo, la falta de amplificación mediante un determinado método de PCR de muestras que presenten variantes genómicas con respecto a las secuencias consenso)

Se deben **estimar** ciertos **parámetros de evaluación**, que pueden incluir:

- **Eficiencia**, como el número o porcentaje de aciertos totales
- **Sensibilidad**, como el número o porcentaje de muestras positivas informadas como positivas
- **Especificidad**, como el número o porcentaje de muestras negativas informadas como negativas
- **Índice Kappa ( $\kappa$ )**. Se trata de un parámetro que valora la concordancia, y tiene en cuenta que existe una probabilidad aleatoria de dar el resultado correcto. El acuerdo será mejor cuanto más próximo se encuentre a 1, siendo:
  - **Po**: porcentaje de acuerdo obtenido
  - **Pe**: porcentaje aleatorio de acuerdo estimado

$$\kappa = \frac{Po - Pe}{1 - Pe}$$

### 2.1.3. Ensayos cuantitativos

Se debe tener en cuenta **el valor asignado y su incertidumbre asociada**. Además, se deberá establecer previamente el valor de desviación objetivo o precisión del ensayo ( $\sigma_{obj}$ ).

Para calcular la **desviación** o dispersión de los resultados se puede emplear el **modelo de Horwitz**. Este relaciona la concentración de analito en la muestra con la dispersión esperable de los resultados:

- %RSD: **desviación estándar relativa** o dispersión de los resultados
- C: **concentración de analito** expresada como **fracción decimal** o **potencia de 10**

$$\%RSD_{Horwitz} = 2^{(1-0,5 \cdot \log C)}$$

Esta ecuación únicamente depende de la **concentración de analito**, y no del analito en sí o del método empleado, lo cual resulta su punto débil. Existe otro **método**, el **método de Thompson**, que modifica la ecuación de Horwitz.

Posteriormente, es fundamental emplear métodos para **eliminar resultados anómalos**. Con este fin, se pueden emplear:

- Tests que eliminan los valores según su **distancia al valor medio**. Algunos ejemplos son los tests de **Dixon** y **Grubbs**, o la **h de Mandel**.
- Tests que eliminan **valores con un alto grado de variabilidad** con respecto al resto. Los más empleados son el test de **Cochran** y la **k de Mandel**. En la práctica, este tipo de tests ha caído en desuso.
- Actualmente, existe una tendencia a la aplicación de procedimientos basados en **estadística robusta**, según lo dispuesto en la Norma ISO 13528. Se basan en propiedades de la **mediana**, por lo que no se ven tan afectados por la distribución como los que utilizan el valor medio. Un ejemplo es el **sistema del algoritmo A**, que se basa en la realización de un proceso recursivo hasta la convergencia de los datos obtenidos.

Para la **evaluación del rendimiento** (fundamentalmente en **ensayos de aptitud**) se empleará el **estadístico Z-Score**, definido como la diferencia entre el valor del laboratorio ( $V_L$ ) y el valor asignado ( $V_A$ ), en relación con la desviación estándar:

$$Z = \frac{V_L - V_A}{\sigma_{obj}}$$

En caso de haberse detectado problemas de incertidumbre ( $u$ ), con valores más altos de los esperados, se puede corregir el estadístico incluyendo este parámetro en el denominador:

$$Z = \frac{V_L - V_A}{\sqrt{\sigma_{obj}^2 + u^2}}$$

Los resultados serán interpretados de acuerdo con lo siguiente:

- $Z \leq 2$ : el resultado es **satisfactorio**
- $2 < Z < 3$ : el resultado es **cuestionable**
- $Z \geq 3$ : el resultado es **insatisfactorio**

Existen otros parámetros que se pueden emplear de forma complementaria al Z-Score. Por ejemplo, el **valor Zeta hace referencia a la incertidumbre obtenida por los participantes**, pudiendo evaluar si su definición del valor asignado es correcta.

Además, el Z-Score permite la **evaluación de tendencias**, pudiendo valorar si existe una desviación sistemática. Esto se lleva a cabo mediante el parámetro **RSZ**, definido como **la suma de los valores Z de los ejercicios entre el número de ejercicios realizados** y que permite detectar desviaciones sistemáticas, o el parámetro **SSZ**, obtenido como el **sumatorio de los cuadrados de los valores Z**, que indica la existencia de variabilidades excesivas entre resultados.

#### 2.1.4. Ensayos semicuantitativos

Se podrán estudiar como **cuantitativos**, empleando el índice kappa (u otros índices que midan la distancia con respecto al rango previsto), o como **cuantitativos**, pudiendo emplear el Z-Score siempre que exista una distribución normal (o se pueda transformar a una distribución normal mediante operaciones matemáticas).

### 2.2. ACTUACIÓN ANTE RESULTADOS NO SATISFATORIOS

En caso de obtener **resultados no satisfactorios**, es fundamental considerar ciertas premisas. En primer lugar, se debe determinar si **la evaluación realizada ha sido adecuada al objetivo marcado**. Además, debe comprobarse que no se produjeron errores en la expresión de resultados.

Una vez comprobado que no se trata de un error de transcripción o interpretación de los resultados, se deberá:

- Comprobar que se han seguido las **instrucciones del organizador** en cuanto a la conservación y manipulación de los ítems.
- Verificar que las medidas se realizaron empleando el **método previamente determinado**.
- Comprobar que el **equipo o los equipos** empleados en el análisis funcionaron correctamente.
- Analizar la posibilidad de **contaminaciones** provenientes del material utilizado, el ambiente, o a través del personal.
- Comprobar los resultados de controles de calidad internos y de otros ítems similares ensayados el mismo día.

En caso de no encontrar **un origen claro al problema** se deberá repetir el ensayo, si es posible, o bien analizar otras muestras similares de valor conocido. En caso de obtenerse resultados

satisfactorios, se debe comprobar que no se han producido cambios significativos en las condiciones de ensayo, y realizar un seguimiento de resultados posteriores.

Si tras este análisis se considera oportuno, se podrán realizar modificaciones del método de ensayo o de algunas de las etapas.

Tras el establecimiento de estas medidas correctoras y su comunicación al organismo organizador, se debe **valorar su eficacia**, por ejemplo mediante la participación en un nuevo ensayo de intercomparación.

Así, la obtención de resultados no satisfactorios en ensayos de intercomparación se debe interpretar como una **oportunidad de mejora**, permitiendo así al laboratorio implementar medidas que contribuyan a la mejora continua y al aseguramiento de la calidad.

### 2.3. ERRORES COMUNES

Es fundamental evitar cometer ciertos errores al participar en ensayos de intercomparación, que pueden derivar de **un planteamiento erróneo** del mismo, como puede ser:

- Considerar el ejercicio de intercomparación como un **concurso** o un **examen**, estableciendo objetivos de rendimiento poco realistas (como un z-score igual a 0).
- Sobrevalorar los resultados **satisfactorios o no satisfactorios**, llegando a usarlos como medios sustitutivos de los controles de calidad internos.
- Tomar acciones frente a resultados no satisfactorios **sin realizar un análisis riguroso** de los resultados, por ejemplo, alegando que se trata de problemas puntuales.
- Algunos de los errores que deben evitarse incluyen:
  - No seguir las instrucciones del organizador
  - No realizar el ensayo de la forma habitual (en el caso de ensayos de aptitud)
  - Modificar las condiciones del ensayo para hacerlas más favorables
  - No respetar las condiciones de repetibilidad, mezclando metodologías, personal o equipos
  - Realizar un mayor número de medidas del requerido para poder seleccionarlas o promediarlas en virtud de los resultados obtenidos
  - Cometer errores en la transcripción de resultados
  - Comentar resultados con otros participantes
  - Presentar como propios resultados de medidas subcontratadas a otros laboratorios
  - Cometer errores en la identificación de los ítems
  - Cometer errores en la transmisión de resultados (por ejemplo, comunicar los resultados cometiendo errores en las unidades de medida)

## **BIBLIOGRAFÍA**

Organización Internacional de Normalización (2010). Evaluación de la conformidad — Requisitos generales para los ensayos de aptitud (*ISO 17043*)

Organización Internacional de Normalización (2017). Métodos estadísticos para uso en ensayos de aptitud por comparación interlaboratorio (*ISO 13528*)

Entidad nacional de acreditación (Revisión 1, 2008). Guía sobre la participación en programas de intercomparaciones (G-ENAC-14).

Entidad Nacional de Acreditación (Revisión 7, 2021). Política de ENAC sobre intercomparaciones (NT-03).

Centro Nacional de Capacitación Agraria (CENCA) (2016). Curso Ensayos de Intercomparación en Laboratorios.

RPS-Qualitas. Consultoría de Calidad y Laboratorio S.L. Ensayos de intercomparación — Proficiency Tests.

MATERIAL NO OFICIAL

**MATERIAL PARA LA PREPARACIÓN DEL TEMA 9**

**LA NORMA UNE-EN ISO/IEC 17043. EVALUACIÓN DE LA CONFORMIDAD.  
REQUISITOS GENETALES PARA LOS ENSAYOS DE APTITUD.**

*Este material no tiene carácter oficial, por lo que en ningún caso vinculará al Tribunal Calificador. Constituye, únicamente, un instrumento complementario que servirá de apoyo al opositor para enfocar cada uno de los epígrafes, pero nunca de forma exclusiva ni excluyente. El Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación no se hace responsable del contenido del mismo.*

*Los materiales no serán objeto de actualización constante.*

## **ÍNDICE**

### **1. INTRODUCCIÓN**

### **2. LA NORMA UNE-EN ISO 17043 DE “EVALUACIÓN DE LA CONFORMIDAD. REQUISITOS GENERALES PARA LOS ENSAYOS DE APTITUD”**

MATERIAL NO OFICIAL

## 1. INTRODUCCIÓN

Tal y como indica ISO/IEC 17025:2017, los laboratorios deben disponer de procedimientos que les permitan llevar a cabo el seguimiento de la validez de sus resultados y, además de las herramientas internas que pueda aplicar el Laboratorio, este objetivo se puede conseguir mediante la participación en ensayos de aptitud y en otras comparaciones interlaboratorio. Por este motivo, la competencia de los proveedores de programas de intercomparación (en un sentido amplio del término) será un aspecto clave en la evaluación de la competencia de los laboratorios de ensayo.

Los proveedores de programas de intercomparación proporcionan una valoración independiente de los datos del laboratorio, mediante la comparación de estos con valores de referencia o con el valor determinado mediante consenso de los laboratorios participantes, aportando así evidencias de su competencia o alertando sobre la necesidad de investigar problemas dentro del laboratorio.

Esta herramienta es de gran utilidad para los laboratorios, al permitirles, entre otros:

- Aportar resultados a los estudios de exactitud y cálculo de incertidumbre necesarios para realizar la correspondiente validación de los métodos.
- Verificar la calidad de los métodos de ensayo empleados,
- Detectar sesgos que pueden no detectarse con los programas de control de calidad intralaboratorio.
- Identificar los métodos de análisis que presentan menores sesgos en matrices complejas y conocer los sesgos asociados a las distintas técnicas
- Monitorizar la evolución de los métodos de ensayo a lo largo del tiempo.
- Comparar su "calidad técnica" con otros laboratorios.
- Identificar errores en el funcionamiento de sus equipos.
- Supervisar la formación, cualificación y competencia técnica de su personal.

Los laboratorios son, claramente, los principales interesados, y, a la vez, beneficiarios de la participación en programas de intercomparación. Pero también lo son, en todos los casos, sus clientes directos, y en muchas ocasiones sus clientes "indirectos", los usuarios del producto ensayado o las entidades reguladoras.

### **Acreditación de proveedores de programas de intercomparación**

Para que un ensayo de aptitud o ejercicio de intercomparación aporte todo su potencial de control y mejora es imprescindible que todo el proceso de gestión, desde la preparación y análisis de la muestra (homogeneidad y estabilidad), pasando por el envío a los participantes hasta el tratamiento de la interpretación de los datos, se haga con un elevado nivel de competencia técnica.

Sin estas garantías la participación se puede convertir, en el mejor de los casos, en un gasto de tiempo y dinero para los laboratorios y, en ocasiones, en algo contraproducente, al aportarle información que no reúne las suficientes garantías de fiabilidad para la toma de

decisiones. En este contexto aparecen los primeros esquemas de acreditación de proveedores de programas de intercomparación o de ensayos de aptitud como herramienta para su selección atendiendo a criterios de calidad y competencia técnica.

El uso de **proveedores acreditados** proporciona a los laboratorios la garantía de conocer que la competencia técnica de estos está avalada por una tercera parte independiente, organismos de acreditación, y por tanto no necesitan desarrollar una metodología ni invertir recursos para evaluarlos con sus propios medios.

La norma de referencia para la acreditación de los proveedores de programas de intercomparación es la UNE-EN ISO/IEC 17043 de “Evaluación de la conformidad. Requisitos generales para los ensayos de aptitud”. Cabe reseñar que el reconocimiento de esta acreditación es otorgada en España por ENAC.

Por aclarar términos, debemos hacer diferencia entre un ensayo de aptitud y un ensayo de intercomparación. Ensayos de aptitud son aquellos destinados a intercomparar muestras similares con el objeto de valorar la calidad de los resultados emitidos por los laboratorios participantes, con su metodología habitual de trabajo y las condiciones de rutina (ISO 17043). Ensayos Colaborativos son aquellos destinados a intercomparar muestras similares con objeto de obtener información de un método concreto en un tipo de muestras concreta, y poder disponer de datos del funcionamiento del método objeto, en cuanto a su veracidad y su precisión (ISO 5725).

## **2. LA NORMA UNE-EN ISO 17043 DE “EVALUACIÓN DE LA CONFORMIDAD. REQUISITOS GENERALES PARA LOS ENSAYOS DE APTITUD”**

El propósito principal de la ISO/IEC 17043 es especificar los requisitos generales que determinan la competencia de los proveedores de programas de ensayos de aptitud, de manera que sea posible desarrollar y ofrecer circuitos a los participantes, donde se lleve a cabo una evaluación de su desempeño con respecto a criterios previamente establecidos, y adecuados a las necesidades de calidad de los mismos.

Estos ensayos son cada vez más valorados ya que forman parte importante de los procesos de evaluación del desempeño de los laboratorios de ensayo que controlan aspectos relacionados con la seguridad alimentaria, el medio ambiente o la salud.

La UNE-EN ISO/IEC 17043 está compuesta por unos requisitos de gestión, y otros técnicos que demuestran que la organización tiene un Sistema de Calidad, es técnicamente competente, genera resultados válidos y, además, es aplicable a todos los proveedores de intercomparativos de aptitud, de diferentes campos.

La acreditación UNE-EN ISO/IEC 17043 aporta las bases para asegurar la competencia de las organizaciones que proveen ensayos de aptitud y la capacidad demostrar su competencia en el desarrollo y ejecución de los mismos, asegurando la idoneidad de las muestras implicadas, así como la evaluación coherente con unos objetivos previos de los resultados obtenidos por los participantes. Además, ofrece ventaja competitiva para destacar en el mercado, ya que la

participación en circuitos de proveedores acreditados es un requisito establecido por las entidades evaluadoras de los laboratorios de ensayo, aumenta el reconocimiento internacional y proporciona al cliente una evaluación de sus resultados en un ámbito de intercomparación interlaboratorio con respecto a criterios previamente establecidos en base a sus necesidades de calidad

Algunos ejemplos de propósitos típicos para las comparaciones interlaboratorios pueden ser:

- a) Evaluar el desempeño de los laboratorios para llevar a cabo ensayos o mediciones específicos y hacer el seguimiento del desempeño continuo de los laboratorios
- b) Identificar problemas en los laboratorios e iniciar acciones para la mejora que, por ejemplo, pueden estar relacionadas con procedimientos inadecuados de ensayo o medida, eficacia de la formación y supervisión del personal o la calibración de los equipos;
- c) Establecer la eficacia y la comparabilidad de los métodos de ensayo o medida
- d) Proporcionar confianza adicional a los clientes de los laboratorios
- e) Identificar las diferencias entre laboratorios
- f) Instruir a los laboratorios participantes sobre la base de los resultados de dichas comparaciones
- g) Validar las estimaciones de incertidumbre declaradas

La Norma UNE-EN ISO 17043:2010 se estructura en cinco puntos y tres anexos informativos que son:

- **Punto 1 de Objeto y campo de aplicación**
- **Punto 2 de Normas para consulta**
- **Punto 3 de Términos y definiciones**, algunas son:
  - Coordinador, una o más personas responsables de organizar y gestionar todas las actividades incluidas en la operación de un programa de ensayos de aptitud.
  - Participante, laboratorio, organización o persona que recibe los ítems de ensayo de aptitud y entrega los resultados para su revisión por el proveedor de ensayos de aptitud.
  - Proveedor del ensayo de aptitud, organización que es responsable de todas las tareas relacionadas con el desarrollo y la operación de un programa de ensayos de aptitud.
  - Ronda de ensayo de aptitud, secuencia completa única de distribución de ítems de ensayo de aptitud, y evaluación y comunicación de los resultados a los participantes.
- **Punto 4 de Requisitos Técnicos**. El cual se subdivide en 10 puntos.

#### 4.1 Generalidades

**4.2 Personal.** En cuanto a este punto remarcamos los siguientes requisitos:

El proveedor de ensayos de aptitud debe tener personal directivo y técnico con la autoridad necesaria, los recursos y la competencia técnica requerida para desempeñar sus funciones. Debe autorizar a personal específico para seleccionar ítems de ensayo de aptitud apropiados, planificar programas de ensayos de aptitud, realizar tipos particulares de toma de muestras, utilizar equipos específicos, etc.

El proveedor de ensayos de aptitud debe asegurarse de que el personal recibe la formación necesaria para garantizar que la realización de mediciones, la utilización de equipos y cualquier otra actividad que afecte a la calidad del programa de ensayos de aptitud, se lleva a cabo de manera competente. Se debe evaluar la eficacia de las actividades de formación.

**4.3 Equipos, instalaciones y medio ambiente.** En cuanto a este punto remarcamos los siguientes requisitos:

El proveedor de ensayos de aptitud debe asegurarse de que existe la infraestructura necesaria para operar el programa de ensayos de aptitud. Ello incluye las instalaciones y equipos para la fabricación, manipulación, calibración, ensayo, almacenamiento y entrega de los ítems de ensayo de aptitud, etc.

El proveedor de ensayos de aptitud debe asegurarse de que las condiciones ambientales no comprometen el programa de ensayos de aptitud o la calidad requerida de las operaciones.

El proveedor de ensayos de aptitud debe identificar las condiciones ambientales que puedan influir significativamente en la calidad de los ítems de ensayo de aptitud y en cualquier ensayo y calibración realizados, incluyendo las condiciones requeridas por las especificaciones apropiadas y los procedimientos de medida

**4.4 Diseño de los programas de ensayos de aptitud.** En cuanto a este punto remarcamos los siguientes requisitos:

El proveedor de ensayos de aptitud debe identificar y planificar aquellos procesos que afectan directamente a la calidad del programa de ensayos de aptitud y debe asegurar que se llevan a cabo de acuerdo con procedimientos descritos. El proveedor de ensayos de aptitud no debe subcontratar la planificación del programa de ensayos de aptitud.

El programa de ensayos de aptitud debe contener entre otros:

- el nombre y la dirección del proveedor de ensayos de aptitud
- las actividades a subcontratar y los nombres y direcciones de los subcontratistas que participan en la operación del programa de ensayos de aptitud
- los criterios que se deben satisfacer para la participación
- el número y tipo de participantes previstos en el programa de ensayos de aptitud

- la selección del(los) mensurando(s) o la(s) característica(s) de interés, incluyendo información sobre qué tienen que identificar, medir o ensayar los participantes en la ronda específica de ensayos de aptitud
- una descripción del rango de valores o características, o ambos, que se espera obtener a partir de los ítems de ensayo de aptitud
- los requisitos para la producción, el control de la calidad, el almacenamiento y la distribución de los ítems de ensayo de aptitud
- etc.

El proveedor de ensayos de aptitud debe establecer e implementar procedimientos para asegurarse de la adecuada adquisición, recolección, preparación, manipulación, almacenamiento, y cuando sea requerido, el destino final de todos los ítems de ensayo de aptitud.

Se deben establecer los criterios de homogeneidad y estabilidad apropiados que deben basarse en el efecto que tendría la ausencia de éstas sobre los resultados y la evaluación del desempeño de los participantes.

Normalmente se debe realizar la evaluación de la homogeneidad después de que los ítems de ensayo de aptitud hayan sido embalados en su forma final y antes de su distribución a los participantes, salvo que, por ejemplo, los estudios de estabilidad indiquen que se deberían almacenar a granel.

Se debe demostrar que los ítems de ensayo de aptitud son suficientemente estables para asegurarse de que no sufrirán cambios significativos a lo largo de la realización del ensayo de aptitud, incluyendo las condiciones de almacenamiento y transporte.

En los casos en que la determinación de la homogeneidad y estabilidad no sea factible, el proveedor de ensayos de aptitud debe demostrar que los procedimientos utilizados para reunir, producir, embalar y distribuir los ítems de ensayo de aptitud son suficientes para el propósito de los ensayos de aptitud.

El proveedor de ensayos de aptitud debe documentar el diseño estadístico y los métodos de análisis de datos que se utilizarán para identificar el valor asignado y evaluar los resultados de los participantes, y debe proveer una descripción de las razones para su selección y las hipótesis en las que se basan.

El proveedor de ensayos de aptitud debe documentar el procedimiento para determinar los valores asignados para los mensurando o las características en un programa particular de ensayos de aptitud.

**4.5 Elección del método o procedimiento.** En cuanto a este punto remarcamos los siguientes requisitos:

Normalmente se espera que los participantes utilicen el método de ensayo, procedimiento de calibración o de medida de su elección, que debería ser coherente con sus procedimientos habituales. El proveedor de ensayos de aptitud puede exigir que los participantes utilicen un método especificado de acuerdo con el diseño del programa de ensayos de aptitud. Cuando se permite a los participantes utilizar el

método de su elección, el proveedor de ensayos de aptitud debe tener una política y seguir un procedimiento para la comparación de resultados obtenidos por diferentes métodos de ensayo o medida y saber, para cualquier mensurando, qué métodos de ensayo o medida son técnicamente equivalentes, y tomar las medidas para evaluar los resultados de los participantes utilizando estos métodos como corresponde.

**4.6 Operación de los programas de ensayos de aptitud.** En cuanto a este punto remarcamos los siguientes requisitos:

El proveedor de ensayos de aptitud debe notificar a los participantes con suficiente anticipación, antes de enviar los ítems de ensayo de aptitud, la fecha probable de llegada de los ítems de ensayo de aptitud o la fecha en la que deben entregarse, salvo que debido al diseño del programa de ensayos de aptitud resulte inapropiado proceder de esta manera.

El proveedor de ensayos de aptitud debe proporcionar instrucciones detalladas y documentadas a todos los participantes. Las instrucciones a los anticipantes deben incluir entre otras:

- la necesidad de tratar los ítems de ensayo de aptitud de la misma manera que la mayoría de las muestras ensayadas rutinariamente.
- los detalles sobre los factores que podrían influir en los ensayos o la calibración de los ítems de ensayo de aptitud, por ejemplo, la naturaleza de los ítems de ensayo de aptitud, las condiciones de almacenamiento, si el programa de ensayos de aptitud se limita a métodos de ensayo seleccionados, y la fecha de los ensayos o la medida.
- el procedimiento detallado para preparar y/o acondicionar los ítems de ensayo de aptitud antes de realizar los ensayos o las calibraciones.
- toda instrucción apropiada para la manipulación de los ítems de ensayo de aptitud, incluyendo los requisitos de seguridad.
- las condiciones ambientales específicas en las que el participante debe realizar los ensayos.
- instrucciones específicas y detalladas sobre la manera de registrar e informar los resultados de ensayo o medida.

**4.7 Análisis de datos y evaluación de los resultados del programa de ensayos de aptitud.** En cuanto a este punto remarcamos los siguientes requisitos:

Los resultados recibidos de los participantes se deben registrar y analizar mediante métodos estadísticos apropiados. Se deben establecer e implementar procedimientos para verificar la validez de la entrada de datos, la transferencia de datos, el análisis estadístico y la presentación de informes.

El análisis de datos debe generar un resumen estadístico, estadísticas de desempeño e información coherente con el diseño estadístico del programa de ensayos de aptitud.

Se debe minimizar la influencia de los valores atípicos en el resumen estadístico utilizando métodos estadísticos robustos.

El proveedor de ensayos de aptitud debe utilizar métodos de evaluación válidos que satisfagan el propósito del programa de ensayos de aptitud atípicos.

Cuando corresponda para el propósito del programa de ensayos de aptitud, el proveedor de ensayos de aptitud debe proporcionar comentarios de un experto sobre el desempeño de los participantes con respecto a:

- el desempeño global en comparación con las expectativas previas teniendo en cuenta las incertidumbres de medida
- la variación inter e intra participantes, y las comparaciones con otras rondas previas de ensayos de aptitud, programas similares de ensayos de aptitud, o datos publicados de precisión
- la variación entre métodos o procedimientos
- las posibles fuentes de error (con referencia a los valores atípicos) y sugerencias para mejorar el desempeño
- el asesoramiento y la retroalimentación a los participantes con fines educativos como parte de los procedimientos de mejora continua de los participantes
- otras sugerencias, recomendaciones o comentarios generales

**4.8 Informes,** En cuanto a este punto remarcamos los siguientes requisitos:

Los informes de ensayos de aptitud deben ser claros y exhaustivos e incluir información sobre los resultados de todos los participantes, junto con una indicación del desempeño de los participantes individuales. La autorización del informe final no debe subcontratarse.

Los informes deben incluir los elementos siguientes, salvo que no corresponda o que el proveedor de ensayos de aptitud tenga razones válidas para no hacerlo así:

- nombre y datos de contacto del proveedor de ensayos de aptitud
- nombre y datos de contacto del coordinador
- nombre(s), función(es), y firma(s) o identificación equivalente de la(s) persona(s) que autoriza(n) el informe
- indicación de las actividades subcontratadas por el proveedor de ensayos de aptitud
- fecha de emisión y estado del informe (por ejemplo, preliminar, provisional o final)
- número de páginas y una indicación clara del final del informe
- declaración del alcance de la confidencialidad de los resultados
- resultados de los participantes
- datos y resúmenes estadísticos, incluyendo valores asignados y rango de resultados aceptables y representaciones gráficas
- procedimientos utilizados para establecer cualquier valor asignado
- detalles de la trazabilidad metrológica e incertidumbre de medida de todo valor asignado

**4.9 Comunicación con los participantes.** En cuanto a este punto remarcamos los siguientes requisitos:

El proveedor de ensayos de aptitud debe notificar sin demora a los participantes todo cambio en el diseño u operación del programa de ensayos de aptitud.

Los registros pertinentes de las comunicaciones con los participantes se deben mantener y conservar según corresponda.

**4.10 Confidencialidad.** En cuanto a este punto remarcamos los siguientes requisitos: La identidad de los participantes en el programa de ensayos de aptitud debe ser confidencial y conocida sólo por las personas que participan en la operación del programa de ensayos de aptitud, salvo que el participante renuncie a la confidencialidad.

Toda información proporcionada por un participante al proveedor de ensayos de aptitud debe tratarse como información confidencial

- **Punto 5 de Requisitos de gestión.** El cual se subdivide en 15 puntos.

**5.1 Organización.** En cuanto a este punto remarcamos los siguientes requisitos:

El proveedor de ensayos de aptitud, o la organización de la que forma parte, debe ser una entidad identificable y con responsabilidad legal.

Si el proveedor de ensayos de aptitud es parte de una organización que desarrolla otras actividades, el proveedor de ensayos de aptitud debe identificar las responsabilidades del personal clave de la organización que participa o que podría influir en las actividades de ensayos de aptitud.

El proveedor de ensayos de aptitud debe tener una dirección técnica con responsabilidad total sobre las operaciones técnicas y provisión de los recursos necesarios para asegurar la calidad requerida de los programas de ensayos de aptitud.

**5.2 Sistema de gestión.** En cuanto a este punto remarcamos los siguientes requisitos:

El proveedor de ensayos de aptitud debe establecer, implementar y mantener un sistema de gestión apropiado al alcance de sus actividades, incluidos el tipo, el rango y volumen de ensayos de aptitud que proporciona.

La alta dirección debe asegurarse de que se mantiene la integridad del sistema de gestión cuando se planifican e implementan cambios en éste.

**5.3 Control de los documentos.** En cuanto a este punto remarcamos los siguientes requisitos:

El proveedor de ensayos de aptitud debe establecer y mantener procedimientos para el control de todos los documentos que forman parte de su sistema de gestión (generados internamente o de fuentes externas), tales como la reglamentación, las normas, otros documentos normativos, los protocolos de programas de ensayos de aptitud, los métodos de ensayo o de calibración, o ambos, así como los dibujos, las especificaciones de software, las instrucciones y los manuales.

Los documentos del sistema de gestión generados por el proveedor de ensayos de aptitud deben ser identificados unívocamente.

Los cambios realizados a los documentos deben ser revisados y aprobados por la misma función que realizó la revisión y aprobación originales.

**5.4 Revisión de los pedidos, las ofertas y los contratos.** En cuanto a este punto remarcamos los siguientes requisitos:

El proveedor de ensayos de aptitud debe establecer y mantener políticas y procedimientos para la revisión de los pedidos, las ofertas y los contratos.

Se debe informar a los participantes y a otros clientes, según corresponda, de cualquier desviación con respecto al contrato o al diseño acordado del programa de ensayos de aptitud

**5.5 Subcontratación de servicios.** En cuanto a este punto remarcamos los siguientes requisitos:

Cuando un proveedor de ensayos de aptitud subcontrata trabajo, el proveedor de ensayos de aptitud debe demostrar que la experiencia y la competencia técnica de los subcontratistas son suficientes para las tareas que se les asigna.

El proveedor de ensayos de aptitud debe mantener un registro de todos los subcontratistas utilizados en la operación de los programas de ensayos de aptitud.

**5.6 Compra de servicios y de suministros.** En cuanto a este punto remarcamos los siguientes requisitos:

El proveedor de ensayos de aptitud debe tener una política y procedimiento(s) para la selección de los servicios y suministros que utiliza y que afectan a la calidad de sus programas de ensayos de aptitud. Deben existir procedimientos para la compra, recepción y almacenamiento de reactivos, ítems de ensayo de aptitud, materiales de referencia, y otros materiales consumibles, pertinentes a los programas de ensayos de aptitud.

El proveedor de ensayos de aptitud debe asegurarse de que los suministros, equipos y materiales consumibles comprados, que afectan a la calidad de los programas de ensayos de aptitud, no se utilicen hasta que se hayan inspeccionado o se haya

verificado de alguna otra manera que cumplen con las especificaciones o los requisitos.

El proveedor de ensayos de aptitud debe evaluar a los proveedores de suministros y servicios críticos que afectan a la calidad de los programas de ensayos de aptitud.

**5.7 Servicio al cliente.** En cuanto a este punto remarcamos los siguientes requisitos: El proveedor de ensayos de aptitud debe cooperar con los participantes y otros clientes aclarando las solicitudes del cliente y realizando el seguimiento del desempeño del proveedor de ensayos de aptitud en relación con el trabajo realizado.

**5.8 Quejas y apelaciones.** En cuanto a este punto remarcamos los siguientes requisitos:

El proveedor de ensayos de aptitud debe tener una política y seguir un procedimiento documentado para la resolución de las quejas y apelaciones que recibe de los participantes, clientes u otras partes. Se deben mantener los registros de todas las quejas, así como las investigaciones y acciones correctivas tomadas por el proveedor de ensayos de aptitud.

**5.9 Control de trabajo no conforme.** En cuanto a este punto remarcamos los siguientes requisitos:

El proveedor de ensayos de aptitud debe tener una política y uno o varios procedimientos que se deben implementar cuando cualquier aspecto de sus actividades no está conforme con sus propios procedimientos o los requisitos acordados con sus clientes.

**5.10 Mejora.** En cuanto a este punto remarcamos los siguientes requisitos:

El proveedor de ensayos de aptitud debe mejorar continuamente la eficacia de su sistema de gestión mediante el uso de la política de la calidad, los objetivos de la calidad, los resultados de las auditorías, el análisis de datos, las acciones correctivas y preventivas y la revisión por la dirección.

**5.11 Acciones correctivas.** En cuanto a este punto remarcamos los siguientes requisitos:

El proveedor de ensayos de aptitud debe establecer una política y uno o varios procedimientos y debe asignar personal apropiado para implementar acciones correctivas cuando se identifique trabajo no conforme o desviaciones de las políticas y procedimientos del sistema de gestión o de las operaciones técnicas.

Cuando se necesite una acción correctiva, el proveedor de ensayos de aptitud debe identificar las acciones correctivas posibles. Debe seleccionar e implementar la o las acciones con mayor probabilidad de eliminar el problema y prevenir su repetición.

Las acciones correctivas deben corresponder a la magnitud del problema y sus riesgos.

**5.12 Acciones preventivas.** En cuanto a este punto remarcamos los siguientes requisitos:

Se deben identificar las áreas que requieren mejora y las potenciales fuentes del trabajo no conforme, ya sean técnicas o relativas al sistema de gestión. Cuando se identifiquen oportunidades de mejora o si se requiere una acción preventiva, se debe desarrollar, implementar y realizar el seguimiento de planes de acción, a fin de reducir la probabilidad de ocurrencia de dicho trabajo no conforme y aprovechar las oportunidades de mejora.

**5.13 Control de los registros.** En cuanto a este punto remarcamos los siguientes requisitos:

El proveedor de ensayos de aptitud debe establecer y mantener procedimientos para la identificación, recopilación, codificación, acceso, archivo, almacenamiento, mantenimiento y destino final de los registros. Los registros de la calidad deben incluir los informes de las auditorías internas y revisiones por la dirección así como los registros de las acciones correctivas y preventivas.

Todos los registros deben ser legibles y se deben almacenar y conservar de modo que se puedan recuperar fácilmente en instalaciones que provean condiciones ambientales adecuadas para prevenir daños o deterioro y pérdidas. Se deben establecer los tiempos de retención de los registros.

El proveedor de ensayos de aptitud debe seguir procedimientos documentados para proteger y hacer copias de seguridad de los registros almacenados electrónicamente con el fin de prevenir el acceso no autorizado o la modificación de estos registros.

**5.14 Auditorías internas.** En cuanto a este punto remarcamos los siguientes requisitos:

El proveedor de ensayos de aptitud debe llevar a cabo periódicamente, y de acuerdo con un calendario y procedimiento predeterminado, auditorías internas de sus actividades para verificar que sus operaciones continúan cumpliendo los requisitos del sistema de gestión y esta norma internacional. El programa de auditorías internas debe considerar todos los elementos del sistema de gestión para la operación de un programa de ensayos de aptitud, incluyendo los procedimientos técnicos y la preparación, almacenamiento y distribución de los ítems de ensayo de aptitud, así como las actividades relacionadas con la preparación de informes.

Cuando los hallazgos de auditoría pongan en duda la eficacia de las operaciones, incluyendo la adecuación y la exactitud de los ítems de ensayo de aptitud, los procedimientos, las evaluaciones estadísticas y la presentación de datos, el

proveedor de ensayos de aptitud debe tomar las acciones correctivas oportunas y notificarlo a sus clientes, a los participantes de programas de ensayos de aptitud cuyas actividades pueden haber sido afectadas o a ambos.

**5.15 Revisiones por la dirección.** En cuanto a este punto remarcamos los siguientes requisitos:

La alta dirección del proveedor de ensayos de aptitud debe realizar periódicamente, de acuerdo con un calendario y un procedimiento predeterminado, una revisión del sistema de gestión del proveedor de ensayos de aptitud y de las actividades de ensayos de aptitud para asegurarse de que se mantienen constantemente adecuados y eficaces, algunos de los puntos de la reunión deben ser:

- la adecuación de las políticas y los procedimientos;
- los informes del personal directivo y de supervisión;
- el resultado de auditorías internas recientes;
- las acciones correctivas y preventivas;
- las evaluaciones por organismos externos;
- los cambios en el volumen y tipo de trabajo;
- la retroalimentación de clientes, grupos asesores o participantes;
- las quejas y apelaciones;
- las recomendaciones para la mejora; y
- otros factores pertinentes, tales como los recursos y la formación del personal.

- **Anexo A, Informativo de tipos de programas de ensayos de aptitud**
- **Anexo B, Informativo de métodos estadísticos para ensayos de aptitud**
- **Anexo C, selección y uso de los ensayos de aptitud**

## **BIBLIOGRAFÍA**

UNE-EN ISO 17043:2010 Evaluación de la conformidad. Requisitos generales para los ensayos de aptitud.

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

[www.gscsal.com](http://www.gscsal.com)

MATERIAL NO OFICIAL

**MATERIAL PARA LA PREPARACIÓN DEL TEMA 10**

**VALIDACIÓN DE ENSAYOS DE DIAGNÓSTICO DE SANIDAD ANIMAL.  
CRITERIOS DE VALIDACIÓN Y ETAPAS.**

*Este material no tiene carácter oficial, por lo que en ningún caso vinculará al Tribunal Calificador. Constituye, únicamente, un instrumento complementario que servirá de apoyo al opositor para enfocar cada uno de los epígrafes, pero nunca de forma exclusiva ni excluyente. El Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación no se hace responsable del contenido del mismo.*

*Los materiales no serán objeto de actualización constante.*

## **ÍNDICE**

### **1. CONCEPTO DE VALIDACIÓN DE UN ENSAYO**

### **2. CRITERIOS DE VALIDACIÓN DE UN ENSAYO DE DIAGNÓSTICO**

2.1. PARÁMETROS PARA LA EVALUACIÓN DEL DESEMPEÑO ANALÍTICO

2.2. PARÁMETROS PARA LA EVALUACIÓN DEL DESEMPEÑO DIAGNÓSTICO

### **3. ETAPAS DEL PROCESO DE DESARROLLO Y VALIDACIÓN DE UN ENSAYO**

3.1. DEFINICIÓN DE LOS OBJETIVOS DE LA PRUEBA

3.2. DESARROLLO DE LA PRUEBA

3.3. FASE DE VALIDACIÓN

3.3.1. Diseño del plan de validación

3.3.2. Etapa 1: Evaluación del rendimiento analítico

3.3.3. Etapa 2: Evaluación del rendimiento diagnóstico

3.3.4. Etapa 3: Estimación de la reproducibilidad

3.3.5. Informe de validación

3.3.6. Etapa 4: Implementación del programa

3.3.7. Etapa 5: Seguimiento tras la validación inicial

### **ANEXO I. ESQUEMA DE LAS ETAPAS DEL PROCESO DE VALIDACIÓN**

## 1. CONCEPTO DE VALIDACIÓN DE UN ENSAYO

La **validación** se define, según la Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE), como el proceso a través del cual se **determina la idoneidad de una prueba** para un **propósito concreto**.

La planificación, desarrollo y realización de pruebas diagnósticas tiene una repercusión directa en la Sanidad Animal, y por tanto también en la Salud Pública, por lo que los laboratorios que lleven a cabo estos ensayos deben garantizar que estos se realizan siguiendo los **más altos estándares de calidad**, asegurando además su mantenimiento a través de la implantación de un sistema de gestión de la calidad y considerando la mejora continua en el desempeño de sus labores como un objetivo principal.

Para ello, resulta fundamental poder comprobar que los **métodos implementados por los laboratorios son adecuados** para el análisis planteado, sobre las muestras específicas a emplear y en la especie concreta de la que se trate.

En la norma ISO/IEC 17025:2017, en la que se establecen los requisitos para evaluar la competencia de los laboratorios de ensayo y calibración, **consta la validación de los métodos como un requisito clave** para poder considerar que los resultados obtenidos son significativos.

En esta norma se establece que *“el laboratorio debe utilizar métodos de ensayo que satisfagan las necesidades del cliente y sean apropiados para el uso previsto”*. Teniendo en cuenta la definición de la OIE, se comprende que precisamente para determinar **si los métodos son apropiados** y pueden **satisfacer las necesidades** del cliente **se debe realizar la validación de los mismos**. Según la ISO/IEC 17025, en su punto 7.2, se define la validación como *“la confirmación, a través del examen y el aporte de evidencias objetivas, de que se cumplen los requisitos particulares para un uso específico previsto”*.

La validación debe incluir, por tanto, estimaciones de características de **rendimiento tanto analítico como diagnóstico** del método analizado.

Un concepto relacionado es la **verificación**, que, según la misma norma ISO 17025 se define como *“la confirmación, a través del examen y el aporte de evidencias objetivas, de que se cumplen ciertos requisitos para un uso específico previsto”*. Así, este proceso de verificación permite simplificar las actuaciones a realizar por el laboratorio para poner en práctica una técnica, en lugar de tener que realizar una validación completa.

El **ajuste a propósito** se define como el *“grado en que los datos producidos por un proceso de medida permiten al usuario tomar decisiones técnica y administrativamente correctas para un propósito determinado”*.

Los laboratorios pueden emplear diferentes tipos de métodos, para los cuales la **exigencia de validación** dependerá del nivel de acuerdo con los métodos publicados, validados y aceptados por los organismos internacionales, nacionales o regionales. Los métodos han sido clasificados por ENAC (CEA-ENAC-22) en tres tipos (I, II y III). Así, se distinguen:

- Tipo I: Métodos **normalizados** publicados por organizaciones reconocidas (ya sean internacionales, nacionales o regionales), en libros o revistas científicas especializadas, o en otros medios adecuados. En la ISO 17025 se recomienda la utilización de este tipo de métodos, siempre y cuando se asegure que se está empleando la versión de la norma en vigor.
- Tipo II: Métodos **basados en métodos de referencia**. Se trata de los métodos normalizados **utilizados fuera de su alcance previsto o modificados de otra forma**.
- Tipo III: **Otros métodos**. Se incluyen los métodos **no normalizados o desarrollados por el propio laboratorio**.

En el caso de métodos **normalizados**, al tratarse de métodos cuya **adecuación al propósito** está claramente definida, no es necesaria una validación adicional por parte del laboratorio que los implemente, aunque sí deberá realizarse una **verificación interna** de su adecuación a los propósitos y las condiciones establecidas en el laboratorio.

Sin embargo, **sí se deberán validar los métodos no normalizados**, y los métodos **desarrollados por el laboratorio**.

En cuanto a los métodos normalizados que sean empleados **fuera de su alcance** previsto o modificados, la validación debe tener un alcance suficiente para garantizar el **cumplimiento** de los **requisitos establecidos** para el uso previsto, para lo cual los criterios de validación deben ser pertinentes para las necesidades del cliente y coherentes con dichos requisitos.

En caso de realizar modificaciones sobre un método validado, se debe determinar la potencial influencia de estos cambios y, en caso de considerarse necesario (si pueden afectar a la validación inicial), se debe realizar una **nueva validación**.

Así, en algunos de los casos propuestos, puede realizarse una **validación menor o verificación** para determinar la adecuación del método a nuevas circunstancias:

- Cuando se empleen métodos normalizados empleados fuera del alcance propuesto
- Al realizar ampliaciones y modificaciones menores de métodos normalizados
- Para la nueva evaluación de métodos previamente validados que hayan sufrido modificaciones significativas (por ejemplo, cambios de componentes del equipo).

En el caso particular de los ensayos de Sanidad Animal, debe tenerse en cuenta que algunos de los métodos empleados serán **métodos comerciales** (o kits de diagnóstico), para los cuales la casa comercial habrá realizado las pruebas de validación pertinentes. Por ello, pueden evaluarse como métodos normalizados, pudiendo realizarse si se considera necesario una **verificación** de la adecuación para su uso previsto.

Los laboratorios deben **conservar los registros de validación**, incluyendo los registros sobre los procedimientos utilizados, los requisitos establecidos, las características de desempeño del método, los resultados obtenidos y la declaración o informe de validez del método.

## 2. CRITERIOS DE VALIDACIÓN Y DESARROLLO DE UN ENSAYO DE DIAGNÓSTICO

Según la OIE, los **criterios de validación** de una prueba son “*los rasgos característicos de una prueba que constituyen factores decisivos, mediciones o estándares en los cuales se basa un juicio o decisión*”. Son, por tanto, ciertos **factores** que serán determinantes sobre la **aceptación de la prueba**.

Los criterios que deberán tenerse en cuenta para la validación de una prueba dependerán de las **variables que pueden afectar a su rendimiento**, las cuales pueden ser relativas a la muestra (por ejemplo, si se trata de muestras individuales o agrupadas, o la composición de la matriz), relativas al sistema analítico empleado (factores físicos, químicos, biológicos y técnicos) o relativas a la interpretación de los resultados.

Algunos de los **parámetros** cuya determinación se debe incluir para la validación son:

- Parámetros para la evaluación del **rendimiento analítico**:
  - **Linealidad**
  - **Precisión**:
    - Robustez
    - Repetibilidad
    - Reproducibilidad
  - **Exactitud**
  - **Especificidad analítica**:
    - Selectividad
    - Exclusividad
    - Inclusividad
  - **Sensibilidad analítica**:
    - Límite de detección
    - Límite de cuantificación
- Parámetros para la evaluación del **rendimiento diagnóstico**:
  - **Sensibilidad diagnóstica**
  - **Especificidad diagnóstica**

Además de la determinación de parámetros estadísticos, se deben considerar como **criterios de validación** también criterios relacionados con el **desarrollo de la prueba**, como:

- **Definición de los propósitos del análisis**, que debe ser clara y coherente
- **Optimización y estandarización** de la prueba

- **Idoneidad** de la prueba para los propósitos definidos

También es fundamental calcular como parte de la validación la **incertidumbre** asociada al método de ensayo y el **rango de trabajo** para el cual se puede garantizar el correcto desempeño de la prueba.

## 2.1. PARÁMETROS PARA LA EVALUACIÓN DEL RENDIMIENTO ANALÍTICO

Son aquellos parámetros que permitirán determinar si las **características de desempeño de la técnica** son adecuadas para cumplir los requerimientos de las aplicaciones analíticas pretendidas.

En este sentido, podrían confundirse con los parámetros de **rendimiento diagnóstico**, ya que su finalidad es muy similar. Sin embargo, debe comprenderse la diferencia entre estos, de tal manera que el rendimiento analítico hace referencia a la **capacidad de la técnica para detectar un determinado analito o cuantificarlo**, mientras que el rendimiento diagnóstico se refiere a la capacidad del método de discernir entre **muestras positivas y negativas**, por lo que contempla factores que tienen que ver con la **interpretación** de los resultados obtenidos.

- La **linealidad** es la capacidad de un método analítico de **obtener resultados proporcionales a la concentración del analito** en la muestra dentro de un intervalo determinado. Así, el estudio de este parámetro presenta dos componentes:
  - La **proporcionalidad** entre la respuesta y la concentración del analito.
  - El **rango** de concentraciones para los cuales el método es satisfactorio

La linealidad se relaciona directamente con la sensibilidad de calibrado, y se considera un criterio inicial de validación.

- La **precisión** se define como el grado de concordancia entre los valores de **una serie de ensayos** realizados sobre una **muestra homogénea**. Los resultados se expresan en términos de desviación estándar y coeficiente de variación.
  - La **robustez** es el grado de precisión de un método analítico cuando es sometido deliberadamente a **pequeñas variaciones**, con objeto de conocer su estabilidad y determinar aquellas que tienen una mayor influencia en la variabilidad de los resultados.
  - La **repetibilidad** es la precisión de un método cuando se realizan ensayos en **las mismas condiciones, sobre la misma muestra**, por un mismo analista, en el mismo laboratorio, empleando los mismos equipos y reactivos y en un corto periodo de tiempo.
  - La **reproducibilidad** es la precisión de un método cuando se realizan ensayos en condiciones diferentes y/o en un intervalo largo de tiempo, incluyendo el cambio de analistas, equipos, e incluso en diferentes laboratorios.

- La **exactitud** indica la desviación de los resultados obtenidos con respecto al **valor verdadero**. Para que un método sea exacto, debe ser presentar también cierto grado de precisión. Una falta de exactitud puede darse por **exceso o por defecto**.
- La **especificidad analítica** se define como la capacidad de un método analítico de distinguir entre el analito buscado y analitos no buscados, incluidos componentes de la matriz. En el caso de **ensayos de Sanidad Animal**, deberán incluirse los conceptos de exclusividad e inclusividad.
  - **Selectividad**: grado en que un método puede cuantificar o cualificar el analito en presencia de interferentes, productos de degradación, u otros compuestos que pueden encontrarse potencialmente en la matriz.
  - **Exclusividad**: capacidad de detectar un analito propio **del microorganismo buscado, excluyendo todos los demás microorganismos conocidos**. *Por ejemplo, una prueba PCR específica de serotipo debe presentar una alta exclusividad.*
  - **Inclusividad**: capacidad de una prueba de **detectar varias cepas o serovariedades** de una especie, **varias especies** de un género, o una **agrupación similar** de analitos (microorganismos o anticuerpos) estrechamente emparentados.
- La **sensibilidad analítica** es la capacidad de una prueba de registrar ligeras variaciones en la concentración de un analito. Se relaciona muy estrechamente con el límite de detección.
  - El **límite de detección** es la menor concentración o cantidad de analito que un determinado método puede detectar con razonable certeza.
  - El **límite de cuantificación** es la menor concentración o cantidad de analito que puede ser determinada de forma cuantitativa con aceptable precisión y exactitud.

## 2.2. PARÁMETROS PARA LA EVALUACIÓN DEL RENDIMIENTO DIAGNÓSTICO

Son aquellos parámetros que permiten determinar el desempeño de la prueba en cuanto a la diferenciación de muestras **positivas y negativas**.

Son la base para el cálculo de otros parámetros a partir de los cuales se realizan inferencias sobre los resultados de las pruebas, por lo que será muy importante que las estimaciones sobre estos parámetros sean tan exactas como sea posible.

La **sensibilidad diagnóstica** se define como la proporción de muestras de animales **infectados que dan positivo en una prueba**, mientras que la **especificidad diagnóstica** es la proporción de muestras de animales **no infectados que dan negativo en una prueba**.

Así, se pueden relacionar con los conceptos de sensibilidad y especificidad analíticas, pero no tienen por qué coincidir con estos y por tanto **no se deben confundir**.

### 3. ETAPAS DEL PROCESO DE VALIDACIÓN

#### 3.1. DEFINICIÓN DE LOS OBJETIVOS DE LA PRUEBA

El primer paso para llevar a cabo un plan de validación será **definir claramente el desarrollo de la prueba, lo cual debe comenzar con el establecimiento de los propósitos a alcanzar con la misma**. Así, se podrá establecer qué parámetros pueden afectar a su desempeño y en qué medida, pudiendo realizar la planificación de la validación.

Se debe escoger o diseñar una prueba adecuada a los objetivos planteados para ella y que pueda ser validada para el uso concreto que se le pretende dar. Algunos de los propósitos más frecuentes para los métodos de ensayo en Sanidad Animal incluyen demostrar la ausencia de infección en una población determinada, certificar la ausencia de infección en animales o productos de origen animal, confirmar el diagnóstico de casos clínicos o sospechosos, estimar la prevalencia de la infección para el análisis de riesgo, o determinar el estado inmunitario de animales o poblaciones. Estos propósitos pueden definirse posteriormente como **aplicaciones más específicas de las pruebas**, las cuales deben estar claramente definidas en el contexto de una prueba completamente validada.

Además de los propósitos a alcanzar con la prueba, también es necesario establecer la **especie o especies de destino, el agente o agentes patógenos** a detectar y el **tipo de matriz** en el que se deben encontrar las muestras para su análisis.

#### 3.2. DESARROLLO DE LA PRUEBA

Como es lógico, para poder validar una prueba esta debe haber sido previamente desarrollada, para lo cual es fundamental un conocimiento previo del método a emplear, así como una buena planificación. Las **Directrices de la OIE** sobre Validación ofrecen orientación sobre las mejores prácticas para el desarrollo y posterior validación de pruebas destinadas a la detección de diferentes analitos.

El diseño de las pruebas dependerá del analito a determinar, la matriz, y la población de destino. Se deberá establecer **las muestras a emplear como referencia para el desarrollo y validación de la prueba**, que pueden incluir sueros, otros líquidos orgánicos, tejidos o estructuras genómicas.

Algunos de los parámetros de validación comenzarán a evaluarse durante la fase de desarrollo del ensayo, ya que resultan fundamentales para la determinación de las **características básicas** de este. Estos parámetros serán fundamentalmente la **linealidad** (tanto en cuanto al intervalo de funcionamiento de la prueba como a la proporcionalidad dosis-respuesta), la **robustez y la repetibilidad** del método.

Así, como parte importante del desarrollo de la técnica, se deberá establecer la **linealidad y el intervalo de funcionamiento de la prueba**, siendo este el intervalo de concentraciones o cantidades del analito para los cuales la prueba proporciona valores óptimos de exactitud y precisión. Para ello, se seleccionarán muestras de referencia **fuertemente positivas**, que se diluirán de forma seriada hasta su extinción en la matriz sin analito. Los resultados obtenidos se reflejarán en una gráfica que represente la **curva de respuesta** enfrentando los valores de concentración del analito a los resultados obtenidos. Esto permitirá obtener datos sobre la proporcionalidad de la prueba y sobre el intervalo de concentraciones para los cuales se obtienen resultados satisfactorios.

La evaluación de la **robustez** también debe comenzar durante las etapas de desarrollo y optimización de la prueba, realizándose variaciones intencionadas en los parámetros del método para valorar la variabilidad originada por estas. Conocer si la técnica es o no robusta es un **punto crítico** para determinar si la prueba es adecuada y por tanto si se debe continuar con la validación de la misma o si bien es preferible optar por el desarrollo y validación de otros métodos que permitan obtener mejores características de precisión. El estudio de la **repetibilidad** comenzará asimismo durante estas etapas, con el mismo objetivo que la determinación de la robustez.

Durante la etapa de desarrollo de la técnica, es además fundamental realizar la **optimización de la prueba**. Esta se define como el *“proceso mediante el cual la mayor parte de **parámetros físicos, químicos y biológicos de una prueba se evalúan y ajustan para garantizar que las características de rendimiento de la prueba se adapten mejor a la aplicación pretendida**”*. Para ello, se pueden emplear muestras de referencia bien caracterizadas que contengan el analito en un amplio rango de concentraciones para evaluar el desempeño de la prueba a lo largo de todo su intervalo de funcionamiento. Este proceso de optimización es crítico para lograr un rendimiento fiable y predecible.

Además, se debe **calibrar la prueba frente a reactivos estándar**. Lo ideal es emplear **estándares de referencia** a nivel nacional o internacional, que hayan sido preparados y distribuidos por los Laboratorios de Referencia. En ausencia de este tipo de estándares, se pueden emplear estándares **internos** que hayan sido previamente calibrados frente a dichos estándares internacionales.

La utilización de estos estándares será además útil para mejorar la comparabilidad de datos obtenidos en diferentes laboratorios o en diferentes condiciones. Para ello, deberán incluirse en cada ejecución de la prueba, pudiendo así expresarse los resultados obtenidos en unidades de actividad **respecto a dichos estándares**. Este proceso de conversión se denomina **“normalización”**.

### 3.3. FASE DE VALIDACIÓN

Una vez diseñado el desarrollo de la prueba y determinados ciertos parámetros fundamentales sobre su desempeño, puede dar comienzo el proceso de validación

propriadamente dicho, realizándose **estimaciones de las características de rendimiento** de la prueba previamente mencionadas como criterios de validación.

El proceso de validación requiere de la realización de actividades de planificación o diseño, experimentación (con la determinación de parámetros estadísticos) y seguimiento posterior.

### 3.3.1. Diseño del plan de validación

Lo ideal es que los experimentos sean diseñados con ayuda de expertos tanto en estadística como en las enfermedades objeto de análisis, pudiendo así asegurar que tanto el **enfoque experimental** como el **tamaño muestral** y otros parámetros estadísticos son válidos.

Se deben establecer de forma clara **los objetivos de la validación de la prueba**, los **requisitos** para su superación satisfactoria, y la **distribución de las responsabilidades**.

En primer lugar, se deben **establecer las condiciones** en las que tendrá lugar el proceso de validación. En algunos casos, serán establecidas por el cliente o por organismos oficiales que requieran al laboratorio la realización de la validación. En caso de ser el propio laboratorio quien determine estas condiciones, se deben definir de forma coherente para asegurar que la validación aporta resultados científica y estadísticamente relevantes.

Posteriormente, se definirá **el alcance de la validación**, que dependerá fundamentalmente del tipo de método que se quiera validar (normalizados, no normalizados, o desarrollados por el laboratorio).

Además, se debe tener en cuenta la posibilidad de realizar la **validación de familias de ensayos**, de tal forma que la validación se pueda extender a varios ensayos similares siempre y cuando se mantengan ciertas características de los mismos. *Por ejemplo, se puede realizar la validación de ensayos de ELISA, de tal manera que se eliminaría la necesidad de realizar el proceso de validación completo sobre cada uno de los métodos de ELISA frente a las diferentes enfermedades que se empleen en el laboratorio.*

Se deberá definir claramente el **personal responsable de la validación** y la **duración prevista** para llevarla a cabo, estableciendo los plazos que se deben cumplir.

Una vez determinados los requisitos y condiciones del proceso de validación, y el alcance deseado para este, se pueden definir **el diseño experimental**, **los parámetros a evaluar** y el **método de análisis de los resultados**.

Así, esta **planificación o Plan de Validación** deberá definir claramente los pasos a seguir para la validación, teniendo en cuenta:

- La **preparación de muestras o materiales** que van a ser analizados, incluyendo los materiales a emplear como blancos, materiales empleados como controles, o los materiales de referencia certificados que se desea analizar. Además, se debe tener en cuenta las **matrices de las muestras**, y la posibilidad de realizar **disoluciones patrón** para permitir realizar aproximaciones cuantitativas en ciertas técnicas. Se debe tener en cuenta que se encuentren convenientemente preparados y calibrados.

- El **equipamiento necesario**, incluyendo los equipos de laboratorio a emplear, que deben estar calibrados para asegurar la fiabilidad de las medidas, así como las versiones del software a emplear (que deben estar actualizadas) y que los datos de referencia a utilizar sean correctos.
- Otros **materiales necesarios**, como los reactivos o el material de laboratorio, asegurando su adecuación (por ejemplo, que no estén caducados).
- El **personal** analista necesario, que debe estar debidamente cualificado para la manipulación de las muestras, preparación de reactivos, manejo de equipos, y el resto de pasos necesarios para la validación. El personal a cargo deberá conocer el procedimiento del método de ensayo, y el número de ensayos a realizar de acuerdo a lo establecido en el plan de validación. Además, se deberá definir la figura del **responsable de validación**, que debe tener las competencias y autorización designada para realizar el seguimiento de la validación, análisis de resultados, confirmación de aceptación de criterios, etc. Será el encargado de realizar los cálculos matemáticos, comparativos y/o estadísticos correspondientes a cada ensayo.
- Se debe **describir** la secuencia ordenada del proceso seguido para determinar cada uno de los parámetros de validación predefinidos, incluyendo el **número de repeticiones**.
- Se describirá la **programación** para el procesamiento de todas las submuestras previstas cada día, definiendo las variaciones de personal y equipos para poder realizar la evaluación en condiciones de **repetibilidad y reproducibilidad**.
- Se debe **definir** los **puntos de control** para cada etapa en función de los resultados previstos, incluyendo las características de las comprobaciones a realizar y las especificaciones a cumplir. Los controles de calidad son uno de los **puntos más importantes de la validación**, que estará relacionado con el trabajo diario que se desempeñará posteriormente.
- Se realizará la **identificación de riesgos**, tanto inherentes al método evaluado como consecuencia de errores de aplicación, así como las actuaciones en caso de producirse desviaciones.
- Se determinarán las **precauciones a tomar y las limitaciones**, relacionadas con el uso de reactivos tóxicos, de agentes biológicos zoonóticos, organismos modificados genéticamente, etc. Es indispensable cumplir con la **evaluación de riesgos y medidas de contención necesarias**. Además, se deben tener en cuenta limitaciones técnicas, de infraestructura, de disponibilidad de materiales de referencia certificados, etc.

### 3.3.2. Etapa 1: evaluación del rendimiento analítico

- Determinación de la **repetibilidad**. El número de réplicas debe determinarse previamente teniendo en cuenta el tamaño muestral necesario, consultando previamente a un estadístico. De forma general, se sugiere un **mínimo de tres muestras** que contengan el analito en concentraciones dentro del intervalo de funcionamiento de la prueba. De cada una de estas muestras se deben tomar alícuotas que se analizarán como réplicas idénticas de la muestra original. Los resultados deben obtenerse procesando la muestra de la misma forma que si se tratara de una muestra problema. La variación entre réplicas puede expresarse como **desviación estándar, coeficientes de variación** u otras opciones como el cálculo del **índice Kappa**.
- Determinación de la **exactitud** de las pruebas. Para la determinación de la exactitud, se deben emplear **muestras estándar de referencia** para comparar los valores conocidos de las mismas con los resultados obtenidos mediante la aplicación de la prueba.
- Determinación de la **especificidad analítica**. La evaluación es **cualitativa**, y la elección de los tipos de muestra y analitos (microorganismos, anticuerpos, secuencias...) deben reflejar el **propósito de la prueba y el tipo de prueba a evaluar**. Se debe tener en cuenta que en ciertos casos la reactividad cruzada puede ser aceptable en función del uso propuesto de la prueba
- Determinación de la **sensibilidad analítica**. De forma habitual, la sensibilidad analítica (en términos de límite de detección) se estima añadiendo analito en una cantidad cuantificada a la matriz problema y realizando **diluciones seriadas** hasta la extinción del analito. Cada una de las diluciones resultantes se analizará varias veces, obteniendo así múltiples resultados para cada una de ellas. En función de los intervalos de concentración del analito en las muestras, los resultados serán más o menos exactos. Para obtener una **mayor exactitud**, se deben emplear **intervalos menores entre dos diluciones consecutivas**.

*Por ejemplo, si se añaden  $10^8$  UFC a una muestra de 10g heces, se obtendrá una muestra con una concentración de  $10^7$  UFC/g. Esta muestra será diluida por diluciones seriadas decimales hasta obtener una concentración de 10 UFC/g, y cada una de las diluciones se analizará tres veces empleando la prueba a evaluar. Si se detecta la presencia del microorganismo en las tres réplicas que contienen  $10^3$  UFC/g, pero en ninguna de las que contienen  $10^2$  UFC/g, se podría estimar que el límite de detección de la prueba es de  $10^3$  UFC/g.*

Además de los parámetros estadísticos mencionados, es fundamental **calcular la incertidumbre asociada al método**.

La evaluación de la incertidumbre comprenderá el análisis de sus dos componentes:

- Incertidumbre de **tipo A**. La evaluación se realiza por el **análisis estadístico de los valores** de mediciones obtenidos en condiciones definidas.

- Incertidumbre de **tipo B**. Su identificación y evaluación está basada en **otros tipos de información** diferentes al análisis estadístico, como la experiencia o la observación.

La determinación de la incertidumbre se realiza generalmente en **cuatro pasos**. En primer lugar, se deben **determinar las fuentes de incertidumbre**. Estas fuentes se convertirán en **componentes de la incertidumbre estándar**, para posteriormente determinar la **incertidumbre combinada** y por último la **incertidumbre expandida**.

### 3.3.3. Etapa 2: evaluación del rendimiento diagnóstico

Para evaluar la **sensibilidad y especificidad diagnósticas**, se deberán emplear muestras con **resultados cualitativos** (positivo/negativo) conocidos.

El número de muestras positivas y negativas a emplear dependerá de los valores que se consideren probables para la sensibilidad y especificidad diagnósticas de la prueba, así como del nivel de confianza deseado para las estimaciones realizadas.

En el Capítulo de la OIE sobre Validación se presentan tablas con el número estimado de muestras que se deben emplear según la sensibilidad o especificidad esperada y el intervalo de confianza deseado.

Se pueden emplear **poblaciones de animales de referencia**, o **animales infectados experimentalmente**.

Para poder obtener estimaciones sobre estos parámetros, que se basan en resultados **cualitativos**, se deben en primer lugar establecer claramente los **umbrales** para la clasificación de los resultados en dos o como máximo tres categorías (positivo, intermedio o dudoso, y negativo). Los puntos de corte o umbrales deben reflejar el objetivo de la prueba, su aplicación, y ser coherentes con la sensibilidad y especificidad requeridas para la prueba.

El método más habitual para determinar la sensibilidad y especificidad diagnósticas es la representación de los resultados en **una tabla de contingencia** que enfrente el número de muestras con **resultados positivos y negativos** al número de muestras **que se sabe que son positivos o negativos**. Esto permitirá el cálculo de los verdaderos positivos (VP), verdaderos negativos (VN), falsos positivos (FP) y falsos negativos (FN), pudiendo definirse la **sensibilidad y especificidad diagnóstica** a partir de estos valores:

$$\text{Sensibilidad diagnóstica (DSe)} = \frac{VP}{(VP + FN)}$$

$$\text{Especificidad diagnóstica (DSp)} = \frac{VN}{(VN + FP)}$$

### 3.3.4. Etapa 3: estimación de la reproducibilidad

A pesar de que la estimación de la reproducibilidad es, en definitiva, la evaluación de un **parámetro analítico**, para llevarla a cabo se debe contar con la participación de **múltiples**

**laboratorios colaboradores**, por lo que se debe considerar como una etapa posterior a la determinación del resto de parámetros.

Para su determinación, se deben comparar los resultados obtenidos **por distintos laboratorios**, preferiblemente en **regiones o países distintos**, utilizando exactamente la misma prueba en cuanto al protocolo seguido y los reactivos y controles empleados. Se deben seleccionar al menos **tres laboratorios**, cada uno de los cuales debe analizar un conjunto de **al menos 20 muestras** asegurando que **las alícuotas sean idénticas para cada laboratorio**.

### 3.3.5. Informe de validación

En caso de que las tres etapas anteriores se hayan superado **satisfactoriamente en su totalidad**, la prueba puede considerarse “**validada para el propósito inicial deseado**”.

El informe de validación debe incluir información relativa a:

- Objetivo y alcance del método
- Ítem o ítems a ensayar, matrices sobre las cuales se realiza el ensayo y especies de destino
- Reactivos y controles empleados
- Equipos, instrumentos y dispositivos utilizados
- Parámetros de validación estimados y sus resultados
- Condiciones de los ensayos
- Incertidumbre asociada a las mediciones de los parámetros de validación
- Personal responsable de la validación
- Conclusiones, criterios de aceptación y rechazo, criterios de revalidación

Los registros del proceso de validación deben **conservarse en el laboratorio**.

### 3.3.6. Etapa 4: implementación del programa

La prueba definitiva de la utilidad de un método diagnóstico es **su aplicación con éxito** en la realización de ensayos rutinarios, en otros laboratorios, y su inclusión en programas regionales, nacionales y/o internacionales de control o vigilancia de enfermedades.

Además, la **prevalencia** de la enfermedad a estudiar en la población o poblaciones en las cuales se emplee la prueba es un factor fundamental a tener en cuenta, y conocerla permite el cálculo de los **valores predictivos positivo y negativo de los resultados de las pruebas**, ampliando así la información sobre parámetros diagnósticos de la prueba. Estos valores predictivos resultan de gran importancia para la interpretación de los resultados de las

pruebas por los veterinarios de campo y en especial para la implementación y gestión de programas de control o erradicación.

Por todo ello, la validación continúa con la implementación de programas en los cuales se emplee la prueba validada para realizar el diagnóstico.

### 3.3.7. Etapa 5: seguimiento del rendimiento de la prueba

Para que una prueba pueda seguir considerándose validada se debe garantizar que mantiene **las características de rendimiento** que se estimaron durante su validación.

Esto puede determinarse mediante la implementación de un **programa de garantía de calidad**, que debe caracterizarse por un seguimiento del rendimiento de la prueba en su aplicación a pruebas de rutina. Este seguimiento se hará principalmente a través del análisis de controles internos, pudiendo obtener información sobre datos atípicos y una estimación de la precisión y exactitud de la prueba. El análisis de controles internos puede realizarse empleando **gráficos de control**.

Además, puede evaluarse la reproducibilidad mediante programas de control de calidad externos, como la participación en ensayos de intercomparación.

Es posible que con el tiempo sea necesario aplicar **modificaciones** en el desarrollo del método para dar respuesta a cambios en el propósito de la prueba, los analitos estudiados o las características técnicas. El alcance de la validación que debe realizarse en estos casos será determinado según **el tipo de modificaciones llevadas a cabo y el motivo por el que se han realizado las mismas**. Generalmente, las modificaciones técnicas (como por ejemplo, los cambios de equipo) no suelen requerir una nueva validación, mientras que es más frecuente que ciertas modificaciones biológicas (como la aplicación de la prueba a un nuevo tipo de muestra) requieran una revalidación completa de la técnica.

Además, en caso de aplicarse la técnica al diagnóstico en una nueva población, especialmente cuando esta se encuentra en otra región geográfica, es recomendable realizar una validación en las nuevas condiciones, ya que existen ciertos condicionantes poblacionales que pueden afectar al rendimiento de la prueba.

La **Nota Técnica 86 de ENAC (NT-86)** recoge las acciones a tomar en caso de **revisar un método acreditado** por esta entidad, que diferirán en función del tipo de método del que se trate.

En el caso de métodos **normalizados**, el laboratorio debe ser capaz de **demostrar su capacidad** para ejecutar las actividades de acuerdo a la **revisión en vigor** del método. Para los **métodos internos basados en métodos normalizados**, el laboratorio deberá **analizar el impacto de los cambios** en los métodos normalizados en los que ha basado sus métodos internos, y modificarlos si fuese necesario. En cuanto a los **métodos desarrollados por el propio laboratorio**, el laboratorio no podrá emitir informes acreditados hasta que la **revisión del método no haya sido incluida expresamente** en el alcance de la acreditación.

Para poder asegurar, por tanto, que se mantienen unas **condiciones óptimas de calidad** de los ensayos de diagnóstico, es fundamental **realizar un seguimiento continuo**, verificando que se siguen cumpliendo los requisitos de validación establecidos inicialmente, y realizar **revalidaciones en caso de que cambien las condiciones** de aplicación de dichos ensayos.

MATERIAL NO OFICIAL

## **BIBLIOGRAFÍA**

Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE). Manual de las Pruebas Diagnósticas y de las Vacunas para los Animales Terrestres. Sección 2.2. (Validación de las pruebas de diagnóstico).

[Inicio - OMSA - Organisation Mondiale de la Santé Animale \(woah.org\)](http://www.woah.org)

Entidad Nacional de Acreditación (ENAC). CEA-ENAC-22: Laboratorio de ensayos en el ámbito de la Sanidad Animal: Directrices para la acreditación (Revisión 1, Mayo 2017).

Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE). Norma de calidad y directrices de la OIE para los laboratorios veterinarios: enfermedades infecciosas (Segunda edición, 2008).

Instituto de Salud Pública de Chile. Validación de métodos y determinación de la incertidumbre de la medición: "Aspectos generales sobre la validación de métodos". (2010)

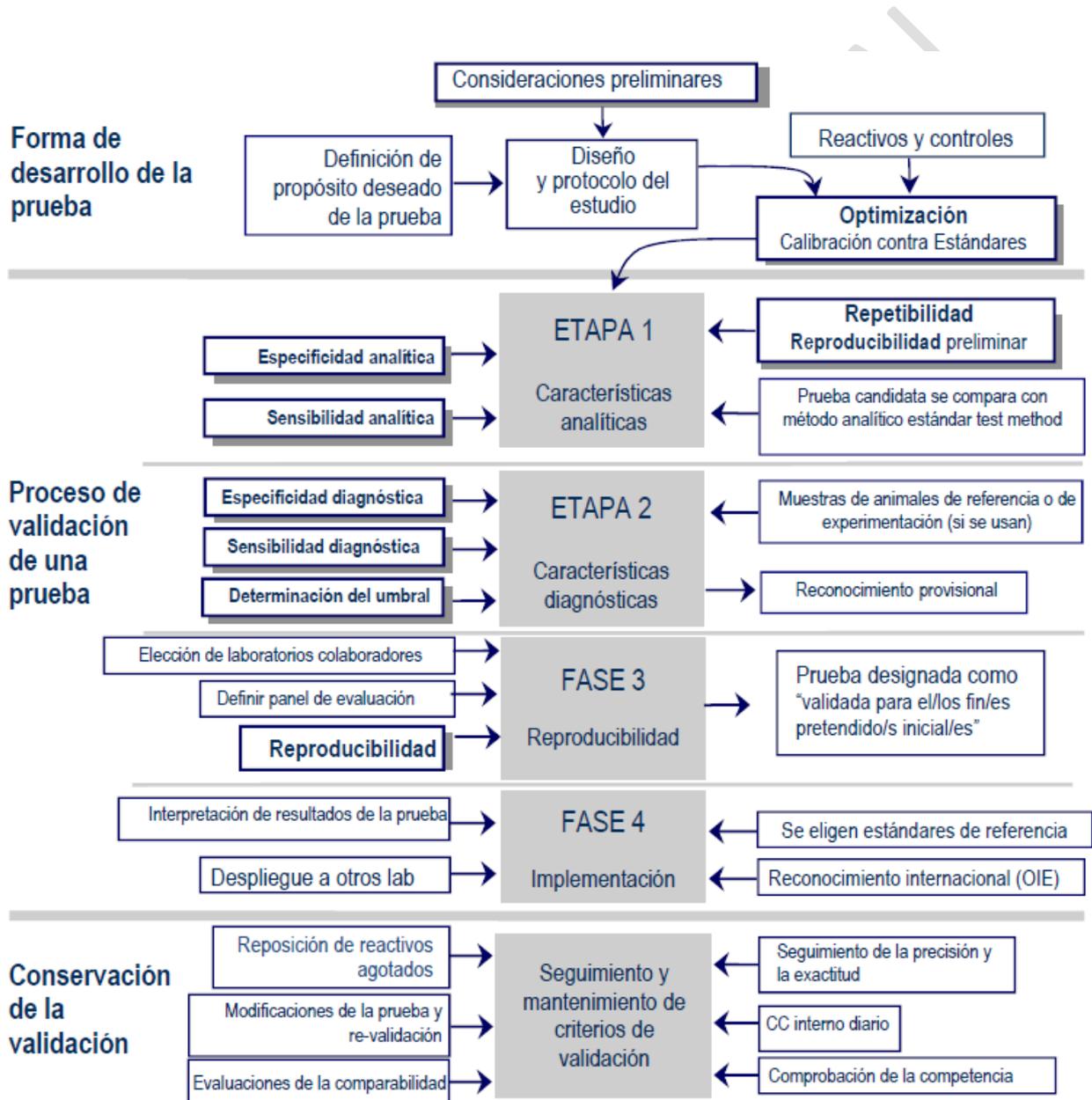
Entidad Nacional de Acreditación (ENAC). NT-86: Laboratorios de ensayo y calibración: identificación de los métodos en los alcances de acreditación y acciones a tomar en caso de ser revisados (Revisión 5, Noviembre 2020).

MATERIAL NO OFICIAL

## ANEXO I. ESQUEMA DE LAS ETAPAS DEL PROCESO DE VALIDACIÓN

Fuente: Manual de las Pruebas de Diagnóstico y de las Vacunas de los Animales Terrestres (Organización Mundial de Sanidad Animal, OIE).

Capítulo 1.1.5. Principios y métodos de validación de las pruebas de diagnóstico de las enfermedades infecciosas (Versión adoptada en mayo de 2013).



## **MATERIAL PARA LA PREPARACIÓN DEL TEMA 11**

### **VALIDACIÓN DE MÉTODOS FÍSICO-QUÍMICOS. CRITERIOS DE VALIDACIÓN Y ETAPAS.**

*Este material no tiene carácter oficial, por lo que en ningún caso vinculará al Tribunal Calificador. Constituye, únicamente, un instrumento complementario que servirá de apoyo al opositor para enfocar cada uno de los epígrafes, pero nunca de forma exclusiva ni excluyente. El Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación no se hace responsable del contenido del mismo.*

*Los materiales no serán objeto de actualización constante.*

## ÍNDICE

### **1. DEFINICIÓN DE VALIDACIÓN DE UN MÉTODO ANALÍTICO**

### **2. CARACTERÍSTICAS DE FUNCIONAMIENTO DE UN MÉTODO**

- 2.1. CARACTERÍSTICAS DE FIABILIDAD.
- 2.2. CARACTERÍSTICAS DE PRACTICABILIDAD.
- 2.3. CARACTERÍSTICAS DE IDONEIDAD.

### **3. CARACTERÍSTICAS DE FIABILIDAD DE UN MÉTODO ANALÍTICO**

### **4. CARACTERÍSTICAS DE FIABILIDAD DE UN MÉTODO ANALÍTICO. PROPORCIONALIDAD**

- 4.1. LINEALIDAD.
- 4.2. SENSIBILIDAD DEL CALIBRADO.
- 4.3. SENSIBILIDAD ANALÍTICA.
- 4.4. RANGO O INTERVALO DE APLICACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO.

### **5. CARACTERÍSTICAS DE FIABILIDAD DE UN MÉTODO ANALÍTICO. DISPERSIÓN <-> PRECISIÓN**

- 5.1. REPETIBILIDAD (R):
- 5.2. REPRODUCIBILIDAD (R):
- 5.3. ROBUSTEZ:

### **6. CARACTERÍSTICAS DE FIABILIDAD DE UN MÉTODO ANALÍTICO. VERACIDAD Y RECUPERACIÓN**

- 6.1. VERACIDAD
- 6.2. RECUPERACIÓN

### **7. CARACTERÍSTICAS DE FIABILIDAD DE UN MÉTODO ANALÍTICO. SENSIBILIDAD Y LÍMITES DE DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN**

- 7.1. SENSIBILIDAD
- 7.2. LÍMITE DE DETECCIÓN (LD)
- 7.3. LÍMITE DE CUANTIFICACIÓN (LQ)

**8. CARACTERÍSTICAS DE FIABILIDAD DE UN MÉTODO ANALÍTICO. ESPECIFICIDAD Y SELECTIVIDAD**

8.1. ESPECIFICIDAD

8.2. SELECTIVIDAD

**9. ESTABILIDAD DEL ANALITO EN SOLUCIÓN Y MATRIZ.**

**10. PLANTEAMIENTO DE LA VALIDACIÓN**

**11. ESTRATEGIA/DINÁMICA DE LA VALIDACIÓN**

**12. MATERIALES NECESARIOS PARA LLEVAR A CABO LA VALIDACIÓN**

MATERIAL NO OFICIAL

## 1. DEFINICIÓN DE VALIDACIÓN DE UN MÉTODO ANALÍTICO

Las medidas físico-químicas no producen un resultado único sino un intervalo de valores, los cuales variarán en tiempos diferentes dependiendo de diversos factores que afectan al proceso de medida como el instrumento empleado, el operador, las condiciones de medida, etc. De la misma forma la aplicación de un método analítico no genera un valor único sino un intervalo de valores; intervalo que debe ser conocido y evaluable. La validación de cualquier método o procedimiento analítico físico-químico es la última etapa tras su desarrollo previo a su aplicación en el laboratorio.

Son muchas las definiciones que se han dado del proceso de validación, alguna de ellas se recogen en la tabla 1.

<i>Tabla 1. Definiciones de validación de un método analítico.</i>	
<i>confirmación, a través de la aportación de evidencia objetiva, de que se han cumplido los requisitos para un uso o aplicación específico previsto.</i>	ISO 9000
<i>confirmación, a través del examen y aportación de evidencias objetivas, de que se cumplen los requisitos particulares para un uso específico previsto.</i>	ISO/IEC 17025
<i>verificación de que los requisitos especificados son adecuados para el uso previsto.</i>	ISO 9000
<i>el proceso por el cual se establece, mediante estudios de laboratorio, que las características de desempeño del método cumplen con los requisitos para las aplicaciones analíticas previstas.</i>	ISO 9000 / ISO 17025 / NF 26
<i>demostrar que es apto para el propósito indicado. ("Fit to purpose")</i>	ISO 9000 / IEC 60300-3-10 / IEC Guideline Q2A
<i>es el proceso por el cual se demuestra que un procedimiento analítico es apto para el uso previsto.</i>	ISO 9000 / IEC 60300-3-10 / IEC Guideline Q2A
<i>es el proceso por el cual se establece mediante un estudio en el laboratorio, que el método analítico cumple con los requerimientos para la aplicación analítica que se pretende.</i>	ISO 9000 / IEC 60300-3-10 / IEC Guideline Q2A
ISO 9000 define 'proceso de calificación', como "el proceso para demostrar la capacidad de cumplir los requisitos especificados"	
ISO 9000 define 'verificación' como "aportación de evidencia objetiva de que un elemento dado satisface los requisitos especificados"	

Mediante la validación se pretende conocer y definir cómo funciona un método analítico, es decir verificar que se ajusta al propósito *-fit to purpose*. Este proceso es de gran importancia ya que la información que proporciona será útil en la posterior toma de decisiones. Se trata de demostrar que cuando sea aplicado, el procedimiento, actuará justamente tal y como se espera que lo haga y, consecuentemente que permitirá obtener información útil de muestras desconocidas.

El proceso de validación implica documentar adecuadamente la calidad del procedimiento a través de una serie de características de funcionamiento o desempeño, de modo que pueda ser juzgado de forma objetiva y atendiendo a criterios establecidos. A grandes rasgos un criterio de

validación es una condición que debe cumplir un resultado de la determinación de un parámetro para que se evalúe como “verdadero” o “aceptable” y pase a formar parte del conjunto de resultados de la validación. Las características de funcionamiento de un método analítico comprenden todos los datos y resultados experimentales que demuestran su aptitud para el uso al que se destina. El proceso de validación ha de considerarse no como una actividad única que una vez efectuada sirve de manera indefinida sino, como algo continuado en el tiempo ya que las condiciones de utilización de un procedimiento pueden cambiar y, ocasionalmente, la comprobación de la existencia de tendencias (y en su caso, la corrección de las mismas) implicará nuevos procesos de validación.

## **2. CARACTERÍSTICAS DE FUNCIONAMIENTO DE UN MÉTODO**

La validación de un método analítico requiere la concreción o establecimiento de una serie de características del mismo que se pueden agrupar de la siguiente forma:

### **2.1. CARACTERÍSTICAS DE FIABILIDAD.**

Son las que demuestran la capacidad propiamente dicha del método y por tanto las más importantes de determinar. Comprenden cinco grupos de propiedades que se describen en los apartados 3-8.

### **2.2. CARACTERÍSTICAS DE PRACTICABILIDAD.**

Son las que deciden si el procedimiento analítico es fácil o difícilmente realizable en la práctica. Se evalúan generalmente en la fase de desarrollo del método analítico como: tiempo de ejecución del método, coste, tamaño de la muestra, cualificación del personal, tipos de equipo e instrumentación, condiciones de seguridad, etc. Hay que tener en cuenta los objetivos del método analítico; así en un laboratorio de investigación es corriente utilizar métodos laboriosos que requieren un consumo elevado de tiempo, en cambio en un laboratorio de control son otros los parámetros que tienen una importancia primordial como: el tiempo de preparación de muestra, el de utilización de aparatos, la rentabilidad de personal y equipos, etc.

### 2.3. CARACTERÍSTICAS DE IDONEIDAD.

Son el conjunto de parámetros que garantizan que el sistema responde en el momento del análisis a los requisitos fijados en la validación del método. Los parámetros de idoneidad no son de validación y deben considerarse dentro de las Buenas Prácticas del Laboratorio Analítico. Normalmente el término idoneidad se aplica al conjunto de parámetros relacionados con la verificación del buen funcionamiento de los instrumentos analíticos. Así, en un método espectroscópico sería: el control de la exactitud de la longitud de onda, el control de la absorbancia, el control de la curva de calibrado. Un sistema analítico es idóneo si responde, en el momento de su utilización, a los requisitos fijados en la validación del método. En general los instrumentos se verifican, los métodos se validan y la idoneidad confirma el buen funcionamiento del sistema instrumento-método.

### 3. CARACTERÍSTICAS DE FIABILIDAD DE UN MÉTODO ANALÍTICO

Como se ha dicho anteriormente son las características más importantes a determinar a la hora de la validación de un método analítico. Se clasifican en cinco grupos y tienen que ver con la:

- a. **Proporcionalidad entre concentración de analito y respuesta del instrumento.** Este concepto se relaciona con parámetros como linealidad, intervalo o rango y sensibilidad instrumental.
- b. **Dispersión de los resultados alrededor de un valor central.** Este concepto se relaciona con los siguientes parámetros: precisión, repetibilidad, reproducibilidad y robustez.
- c. **Desviación entre el resultado del análisis y el valor verdadero.** Concepto relacionado con los parámetros veracidad y recuperación.
- d. **Cantidad mínima de analito requerida para obtener un resultado significativo.** Concepto relacionado con los parámetros sensibilidad, límite de detección y límite de cuantificación.
- e. **Capacidad de un método para discernir el analito de otros componentes de la muestra** como interferencias de impurezas, productos de degradación, excipientes de otras sustancias presentes en la muestra, etc. Concepto relacionado con los parámetros selectividad y especificidad.

### 4. CARACTERÍSTICAS DE FIABILIDAD DE UN MÉTODO ANALÍTICO. PROPORCIONALIDAD

Con el término proporcionalidad se indica la existencia de una dependencia de la respuesta instrumental con la concentración de analito. Dicha dependencia puede ser lineal (en la inmensa mayoría de los casos), exponencial, cuadrática, etc. en el rango de concentración del analito en el que el método es satisfactorio. En los casos de dependencia no lineal se suele recurrir a trabajar en una zona de altas o bajas concentraciones de la curva donde se puede encontrar una zona de linealidad. Esto simplifica posteriormente la obtención de los parámetros de la función de calibrado (ordenada en el origen, pendiente, desviaciones estándar de ambos, etc.) y la obtención de resultados en muestras desconocidas.

**4.1. LINEALIDAD.** Se relaciona con la capacidad que posee el método de generar una respuesta proporcional a la concentración de analito presente en la muestra. Esto es, a mayor concentración de analito mayor respuesta instrumental, y viceversa.

**DETERMINACIÓN:**

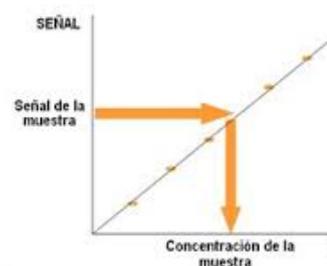
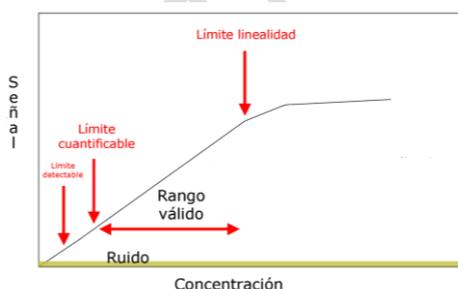
a) Preparar una serie 5-10 de patrones de analito de concentraciones crecientes dentro del intervalo de concentraciones esperadas del analito en la muestra. Debe incluirse una muestra blanco. El ensayo de linealidad puede efectuarse tanto sobre soluciones patrón del analito (curva de calibración), como sobre muestras problema que contengan concentraciones crecientes de analito (curva de adición) efectuándose posteriormente el tratamiento matemático de los resultados analíticos.

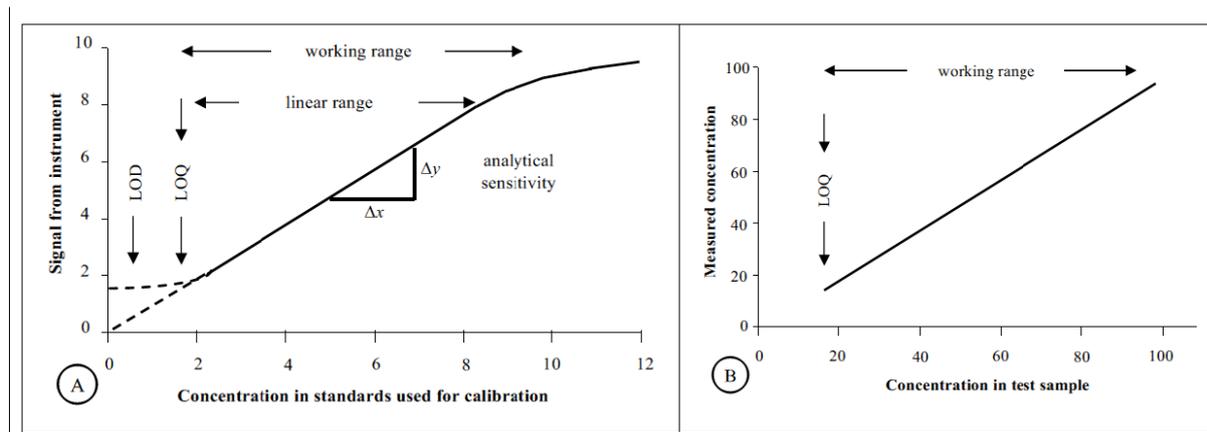
b) Efectuar la medida instrumental siguiendo exactamente el procedimiento descrito. Se debería realizar con muestras replicadas (como mínimo por triplicado).

c) Determinar la curva de calibración que relaciona respuesta (áreas, alturas, absorbancias, etc.) con la concentración o cantidad de analito. Generalmente se halla la recta de regresión por el método de ajuste de los "mínimos cuadrados". La recta de calibración es del tipo:  $y = a + bx$ , siendo  $x$  la concentración, " $y$ " la respuesta instrumental, " $b$ " el valor de la pendiente y " $a$ " el término independiente.

**EXPRESIÓN:**

La expresión de la linealidad se puede realizar mediante varios parámetros. No todos son necesarios estimar durante la validación, pero sí al menos alguno de ellos. Seguidamente se describen y se muestran criterios genéricos de aceptación y rechazo de los mismos. No obstante el propósito del método o los requerimientos normativos aplicables en cada caso establecerán los criterios de aceptación o rechazo a emplear.





i. Representación gráfica de la recta de regresión. Es el método más simple. Se suele representar en un diagrama bidimensional la respuesta en el eje de ordenadas y la concentración en el de abscisas. Si se observa una línea recta no horizontal el método posee proporcionalidad. Si la recta no pasa por el origen de coordenadas el método está afectado de un error sistemático (sesgo) por exceso o por defecto, según que la ordenada en el origen sea positiva o negativa.

ii. Coefficiente de correlación (R). Representa el grado de relación o concordancia entre las variables (x, concentración e y, respuesta instrumental). Su valor máximo es 1. Si r está cercano a la unidad significa que existe correlación con una probabilidad elevada. En análisis se aceptan valores de  $R > 0,999$  si bien en análisis de trazas se acepta hasta 0,99.

iii. Coefficiente de determinación. El cuadrado del coeficiente de correlación se denomina coeficiente de determinación ( $R^2$ ) y muestra la proporción de la varianza total que es explicada por la regresión.

Valores muy elevados de estos dos parámetros (R y  $R^2$ ) no deben tomarse como indicadores exclusivos de la linealidad, que se demuestra estadísticamente por otros procedimientos que se describen a continuación.

iv. Test de linealidad. Existen varios procedimientos para verificar la linealidad:

a. Coefficiente de variación (C.V.) de los factores respuesta ( $f_i$ ). El factor respuesta es la relación entre la respuesta instrumental y la concentración. En una calibración lineal los factores respuesta deben ser semejantes entre sí y similares al valor de la pendiente; por este motivo se puede tomar el coeficiente de variación de los factores de respuesta como una expresión de la linealidad. Se considera que coeficientes de variación superiores al 5% indican falta de linealidad. En ese caso se deberá prescindir de alguno de los niveles (superiores o inferiores) y recalcular de nuevo este C.V. El intervalo de concentraciones en el que sea  $<5\%$  establecerá el rango de aplicación del método.

b. Desviación estándar relativa o coeficiente de variación de la pendiente:

$$S_{brel} (\%) = \frac{S_b}{b} \times 100$$

Se suele aceptar  $S_{brel} (\%) < 2 \%$

c. Test de significación de la pendiente: Se tiene que comprobar estadísticamente con una prueba F que  $b \neq 0$  al nivel de significación  $\alpha < 0,01$  porque si fuera  $b = 0$  significaría que la recta es paralela al eje de abscisas y no habría dependencia de la señal instrumental con la concentración. Se evalúa mediante un análisis de la varianza (ANOVA) comparando la variación debida a la regresión a los residuales<sup>1</sup>.

d. Porcentaje de linealidad o Linealidad on-line (%). Estimada como:

$$\% \text{ Linealidad} = \left( 1 - \frac{S_b}{b} \right) \times 100$$

Para métodos de espectrometría se puede aceptar porcentajes del 98% y para cromatográficos del 95%

#### 4.2. SENSIBILIDAD DEL CALIBRADO.

Es directamente la pendiente del calibrado, b.

#### 4.3. SENSIBILIDAD ANALÍTICA.

Es el incremento mínimo de la concentración capaz de producir una respuesta instrumental distinguible. La sensibilidad indica la capacidad de respuesta del método a pequeñas variaciones en la concentración del analito. La sensibilidad de un método será mayor cuanto más semejantes sean las concentraciones discriminadas o más bajas las concentraciones que pueden determinarse. Se calcula como el cociente entre la desviación estándar del calibrado y la pendiente

$$\text{Sensibilidad analítica} = \frac{S_{residual\ xy}}{b}$$

#### 4.4. RANGO O INTERVALO DE APLICACIÓN del método analítico.

Es el intervalo de concentraciones en las que el método presenta linealidad. Se expresa como el intervalo definido por el Límite de cuantificación y el límite superior.

### 5. CARACTERÍSTICAS DE FIABILIDAD DE UN MÉTODO ANALÍTICO. DISPERSIÓN <-> PRECISIÓN

Estas características están relacionadas con el grado de dispersión de los resultados en torno a un valor central o lo que es la **precisión** del método. La precisión es el grado de concordancia

<sup>1</sup> Este test excede del objetivo de este tema. Para más ampliación remitirse a la bibliografía aportada.

entre los valores de una serie repetida de ensayos analíticos efectuados sobre una misma muestra homogénea. Hay varias formas de expresar la precisión de un método analítico:

### 5.1. REPETIBILIDAD (R)

Es la medida de la precisión de un método aplicado en las mismas condiciones, sobre la misma muestra, por un mismo analista, en el mismo laboratorio, con los mismos aparatos y reactivos y en el curso de la misma serie de análisis efectuados, en un corto intervalo de tiempo.

### 5.2. REPRODUCIBILIDAD (R)

Es la medida de la precisión de los resultados de un método analítico aplicado en condiciones de diferentes analistas, instrumentos, días, condiciones ambientales, etc. permitiendo estimarse la variabilidad *intralaboratorio* y si es entre distintos laboratorios mide la variabilidad *interlaboratorios*.

### 5.3. ROBUSTEZ

Evalúa los efectos de pequeños cambios en las condiciones operacionales del análisis sobre la fiabilidad del método analítico. El método analítico debe probarse en diversas condiciones experimentales, por ejemplo, ante cambios leves de las condiciones experimentales. La importancia de dichos cambios se puede evaluar mediante un ANOVA. Aquellos factores que resulten significativos deben ser especialmente controlados en el procedimiento analítico. Excluidos estos factores significativos, la mejor evaluación de la precisión del método analítico se puede obtener de los datos de robustez.

#### DETERMINACIÓN:

Para la determinación de la precisión se analiza una misma muestra en las condiciones descritas en las situaciones indicadas en 0-0

#### EXPRESIÓN:

i. Desviación estándar y coeficiente de variación. Se expresa matemáticamente como la desviación estándar (DE) o el coeficiente de variación (CV) (desviación estándar relativa) de los resultados obtenidos. La repetibilidad (r) y reproducibilidad (R) se expresan como las desviaciones estándar denominadas  $S_r$  (repetibilidad) y  $S_R$  (reproducibilidad).

$$CV_R \text{ } DER_R (\%) = \frac{S_R}{\bar{x}} \cdot 100$$

Como criterio de los datos de precisión se utiliza la comparación del valor experimental del CV obtenido con el valor límite establecido por la ecuación de Horwitz:

$$DER \text{ ó } CV (\%) = 2^{1-0.5\text{Log } C}$$

Donde  $C$  es la concentración expresada en tanto por uno o fracción decimal g/g (ej. 10% = 10g/100g = 0,1)

Si se obtiene un valor de DER superior al aportado por la ec. de Horwitz el método se considera como “no apropiado” debiendo realizarse la oportuna experimentación y optimización de cara a disminuir dicho CV (= aumentar la precisión) o desechar definitivamente el método.

## 6. CARACTERÍSTICAS DE FIABILIDAD DE UN MÉTODO ANALÍTICO. VERACIDAD Y RECUPERACIÓN

Establecen el grado de desviación del resultado arrojado por el método respecto de un valor verdadero o considerado como referencia.

### 6.1. VERACIDAD

Es el grado de concordancia entre el resultado arrojado por el método y el valor verdadero o valor de referencia aceptado. La falta de exactitud puede ser por exceso o por defecto. Por exceso: suele darse cuando existen interferencias analíticas y los resultados finales son superiores a los verdaderos. Por defecto: suele darse en métodos analíticos muy laboriosos que generan pérdidas de analito durante el procesado.

DETERMINACIÓN:

Se determina analizando repetidamente una muestra de concentración perfectamente conocida como un material de referencia certificado (MRC)

EXPRESIÓN:

Es el porcentaje entre la cantidad hallada (valor medio) y el valor de referencia del MRC:

$$Exactitud (\%) = \frac{\bar{x}}{V_R} \times 100$$

Estadísticamente se suele efectuar una prueba de t de Student para determinar si el valor medio hallado y el valor considerado verdadero o certificado no difieren significativamente, para un nivel de significación determinado que suele ser  $\alpha = 0,05$  ( o lo que es lo mismo  $P = 95 \%$ ).

$$t_{exp}(\text{Student}) = \frac{|V_R - \bar{x}|}{S} \cdot (\sqrt{n - 1})$$

donde:

$V_R$ : valor certificado del MR

$\bar{x}$ : media de los resultados obtenidos.

$S$ : desviación estándar de los resultados.

**6.2. RECUPERACIÓN (%).** Fracción de la masa del analito contenida en la muestra que está presente en el extracto final. Cuando no se dispone de un MRC debe determinarse la veracidad en términos de recuperación mediante experimentos con matriz en blanco enriquecida a diferentes concentraciones dentro del rango lineal del método. Numéricamente se puede obtener como el cociente de pendientes de las rectas de calibrado en matriz y en disolución expresado en %. Un cociente de pendientes 100 % significa que el método analítico recupera en la extracción la totalidad del analito presente en la muestra.

$$\% R = \frac{b_{matriz}}{b_{disolución}} \times 100$$

## **7. CARACTERÍSTICAS DE FIABILIDAD DE UN MÉTODO ANALÍTICO. SENSIBILIDAD Y LÍMITES DE DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN.**

Están relacionados con la cantidad o concentración mínima de analito que el método es susceptible de determinar.

### **7.1. SENSIBILIDAD**

Se define como la pendiente de la recta de calibrado. Ver apartado 0

### **7.2. LÍMITE DE DETECCIÓN (LD)**

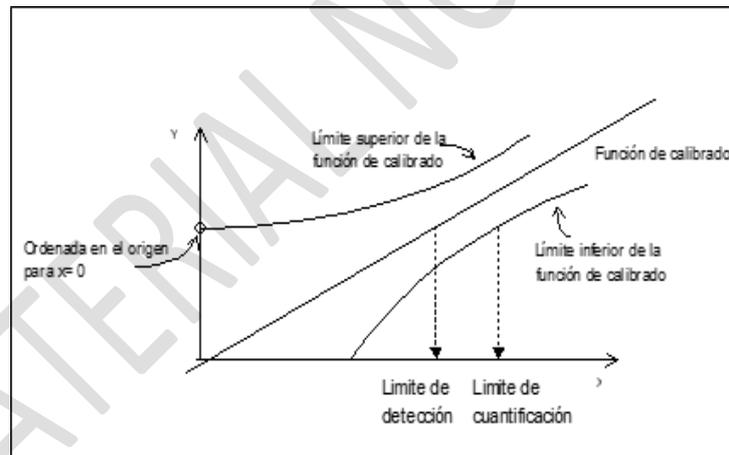
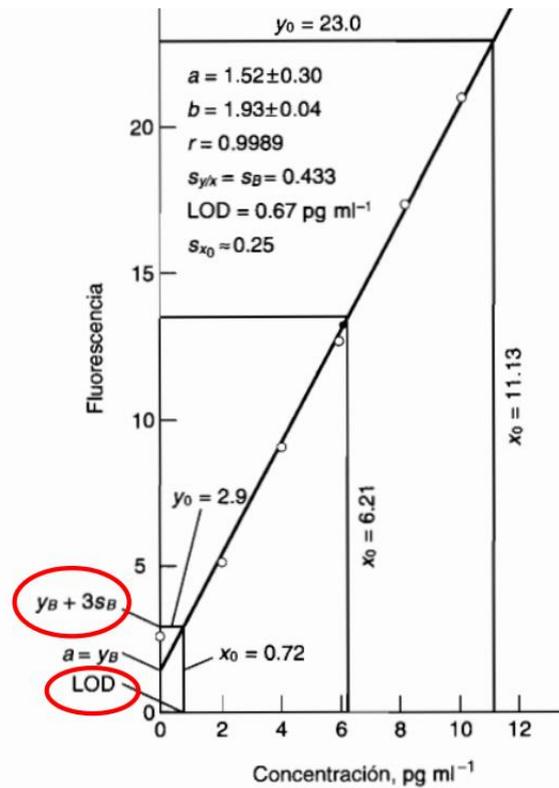
Es la es la mínima cantidad o concentración de analito que un método analítico puede determinar distinguible del ruido. El límite de detección según la IUPAC es la menor concentración del analito detectable por un procedimiento analítico dado con razonable certeza. Se trata de la concentración de analito que origina una señal que puede diferenciarse estadísticamente de la señal del blanco. Se puede determinar a partir del calibrado extrapolando en la recta una respuesta instrumental igual a  $(y_a + 3 \cdot s_a)$ .

### **7.3 LÍMITE DE CUANTIFICACIÓN (LQ)**

Es la menor concentración de analito en una muestra que puede ser determinada con aceptable precisión y exactitud. Se puede determinar a partir del calibrado como en el caso del LD extrapolando en la recta de calibrado una respuesta instrumental igual a  $(y_a + 10 \cdot s_a)$ .

DETERMINACIÓN: Pueden calcularse de varias formas:

a) Se analizan varias muestras blanco ( $n > 10$ ) y se determina el valor medio de la respuesta instrumental ( $y_a$ ) y su desviación estándar ( $s_a$ ). El límite de detección será la concentración extrapolada en la recta de calibrado para una respuesta igual a  $(y_a + 3 \cdot s_a)$ , y para el límite de cuantificación  $(y_a + 10 \cdot s_a)$



Matemáticamente si la respuesta en el límite de detección es  $y_a + 3 \cdot s_a$ ; sustituyendo en la ecuación de la recta de calibrado:

$$Y = y_a + b \cdot x \quad \Rightarrow \quad y_a + 3 \cdot s_a = y_a + b \cdot x_{LD} \quad \Rightarrow \quad y_a + 3 \cdot s_a = y_a + b \cdot x_{LD} \quad \Rightarrow \quad x_{LD} = \frac{3 \cdot s_a}{b}$$

Y en el caso del límite de cuantificación sería:  $x_{LD} = \frac{10 \cdot s_a}{b}$

b) Para las técnicas espectrofotométricas (incluso las cromatográficas) se suele emplear la metodología descrita por Meier y Zund<sup>2</sup> que hace uso de los límites de confianza de la recta de calibrado. El procedimiento es como sigue, de acuerdo con la figura anterior:

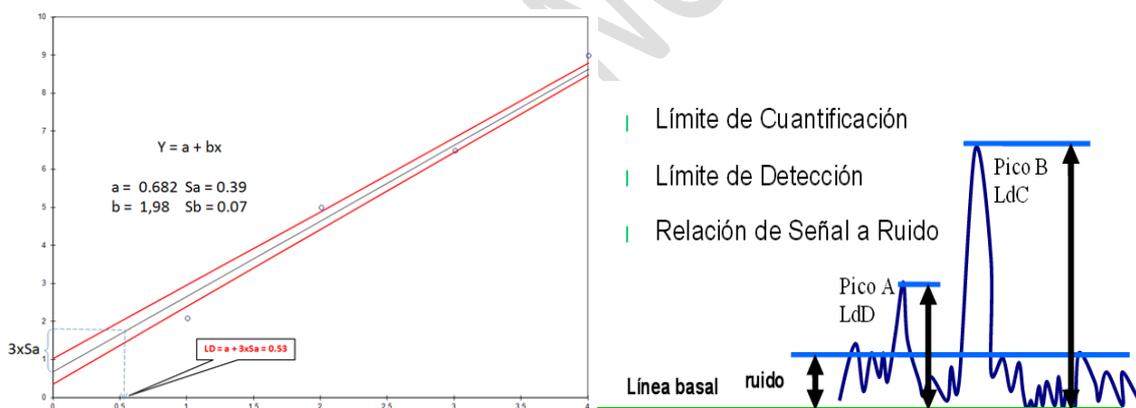
i. Se traza una línea horizontal en el punto en el que la banda de confianza de la función de calibrado corta al eje de ordenadas.

ii. El punto de corte de esta línea horizontal con la función de calibrado define el límite de detección (L.D.). Cualquier valor hallado inferior a este debe ser indicado como "inferior al límite de detección".

iii. El punto de corte de la misma línea con la banda de confianza inferior de la función de calibrado define el límite de cuantificación (L.Q.).

c) A partir de los datos del calibrado extrapolando en la recta de calibrado el valor de la ordenada en el origen + 3 veces su desviación estándar o lo que es lo mismo a partir de las bandas de confianza del calibrado (Meier y Zund).

El límite de detección puede ser también estimado a partir del calibrado, especialmente cuando las concentraciones empleadas en la construcción de la recta de calibrado son suficientemente bajas y próximas a dicho nivel. Se puede obtener como la abscisa obtenida por interpolación en la recta de calibrado de la ordenada en el origen más 3 veces su desviación estándar como se recoge en la figura:



En algunas técnicas cromatográficas la determinación del LD se realiza sobre el propio cromatograma midiendo el ruido próximo al pico cromatográfico y determinando la concentración que origina una señal superior a la media del ruido +  $3S_{\text{ruido}}$ . Análogamente el Límite de cuantificación será aquella concentración a la que la altura de pico sea mayor que la señal del ruido +  $10S_{\text{ruido}}$ .

Cualquiera de los procedimientos existentes para determinar el límite de detección conduce a resultados muy similares entre sí.

<sup>2</sup> Meier P. C., Zünd R. E., Statistical Methods in Analytical Chemistry, 1977 Ed. John Wiley & Sons Inc. Nueva York

## **8. CARACTERÍSTICAS DE FIABILIDAD DE UN MÉTODO ANALÍTICO. ESPECIFICIDAD Y SELECTIVIDAD**

Son características de un método que permiten describir la capacidad del método de determinar el analito sin interferencias de impurezas, productos de degradación, excipientes y/u otras sustancias presentes en la muestra/matriz.

### **8.1. ESPECIFICIDAD**

Capacidad de un método de distinguir entre el analito y sustancias afines (isómeros, metabolitos, productos de degradación, sustancias endógenas, constituyentes de la matriz, etc.). Se trata de una propiedad característica de la técnica empleada aunque va a depender del tipo de muestra (matriz) o compuesto empleado. En los métodos analíticos es muy importante establecer este poder de distinción, por lo que se elegirán sustancias que potencialmente interfieran y se analizarán muestras en blanco pertinentes para detectar posibles interferencias y valorar sus efectos. Asimismo, se enriquecerán muestras en blanco representativas hasta una concentración adecuada con sustancias que pueden interferir con la identificación o la cuantificación del analito. Después del análisis se estudiará si:

- a) dicha presencia puede conducir a una falsa identificación,
- b) la identificación del analito se ve dificultada por la presencia de una o más interferencias,
- c) la cuantificación sufre una influencia apreciable

### **8.2. SELECTIVIDAD**

Es la capacidad de un método analítico para originar resultados que dependan de forma exclusiva del analito para su identificación o cuantificación en la muestra. Se materializa conociendo las interferencias, que son desviaciones (generalmente positivas) de la señal analítica que afectan al resultado final originando por tanto errores sistemáticos. Las interferencias pueden tener un origen químico o instrumental. Es crucial establecer que la propiedad medida sólo se debe al analito y no a algo química o físicamente similar, o que surja como una coincidencia, causando así un sesgo en el resultado de medición. La selectividad de un método se investiga estudiando su habilidad de medir el analito de interés en muestras a la cuales se le agregaron intencionalmente interferencias específicas (aquellas que se considere probable de encontrar en las muestras).

## **9. ESTABILIDAD DEL ANALITO EN SOLUCIÓN y MATRIZ.**

La estabilidad de los analitos en diversos medios (solución / matriz) y condiciones de almacenamiento (Tª ambiente, refrigeración, congelación, con/sin luz, etc) también debe ser estimada como parte de un proceso de validación. Esta información puede obtenerse no solo por vía experimental sino que se puede recurrir a la bibliografía donde obtener información/datos publicados al respecto. El estudio de estabilidad se ha de realizar en disolución y en presencia de la matriz.

**PROCEDIMIENTO:**

Preparar un número suficiente de alícuotas ( $n > 10$ ) a partir de soluciones nuevas del analito y simultáneamente adicionar muestras blanco al nivel de interés. Medir el contenido de analito en 3-4 soluciones alícuotas recién preparadas así como en 3-4 muestras adicionadas. El resto de mantendrán conservadas en diferentes condiciones de almacenamiento (25, 4, -20 °C, con/sin luz, etc). Con los resultados obtenidos de las 3-4 réplicas se puede estimar el valor medio y la desviación del contenido de las muestras en disolución y en matriz con los que se construyen diagramas (tipo Shewart) en los que se representan dichos valores y sucesivos. A intervalos de tiempos establecidos (días, semanas, meses, etc.) se van analizando las disoluciones y muestras preparadas y se representan sobre el diagrama donde se deben distribuir los resultados en torno a la media. Con el paso del tiempo puede ir apareciendo una tendencia que indica la degradación del analito en las alícuotas conservadas. Los puntos de corte de la línea de tendencia descrita con la “bandas de confianza” definidas por el valor medio inicialmente obtenido y su desviación estándar para un nivel de probabilidad dado (95 %  $\pm 2s$  ó 99 %  $\pm 3s$ ) permiten estimar la estabilidad del analito.



**10. PLANTEAMIENTO DE LA VALIDACIÓN**

Es importante tener claro antes de iniciar la validación cuales son los requerimientos del método para establecer el alcance de la validación a realizar. Es esencial pues conocer la naturaleza del método a validar y su aplicabilidad, es decir, el analito, su concentración (nivel, límites aplicables, etc.) y la matriz (o matrices) a emplear.

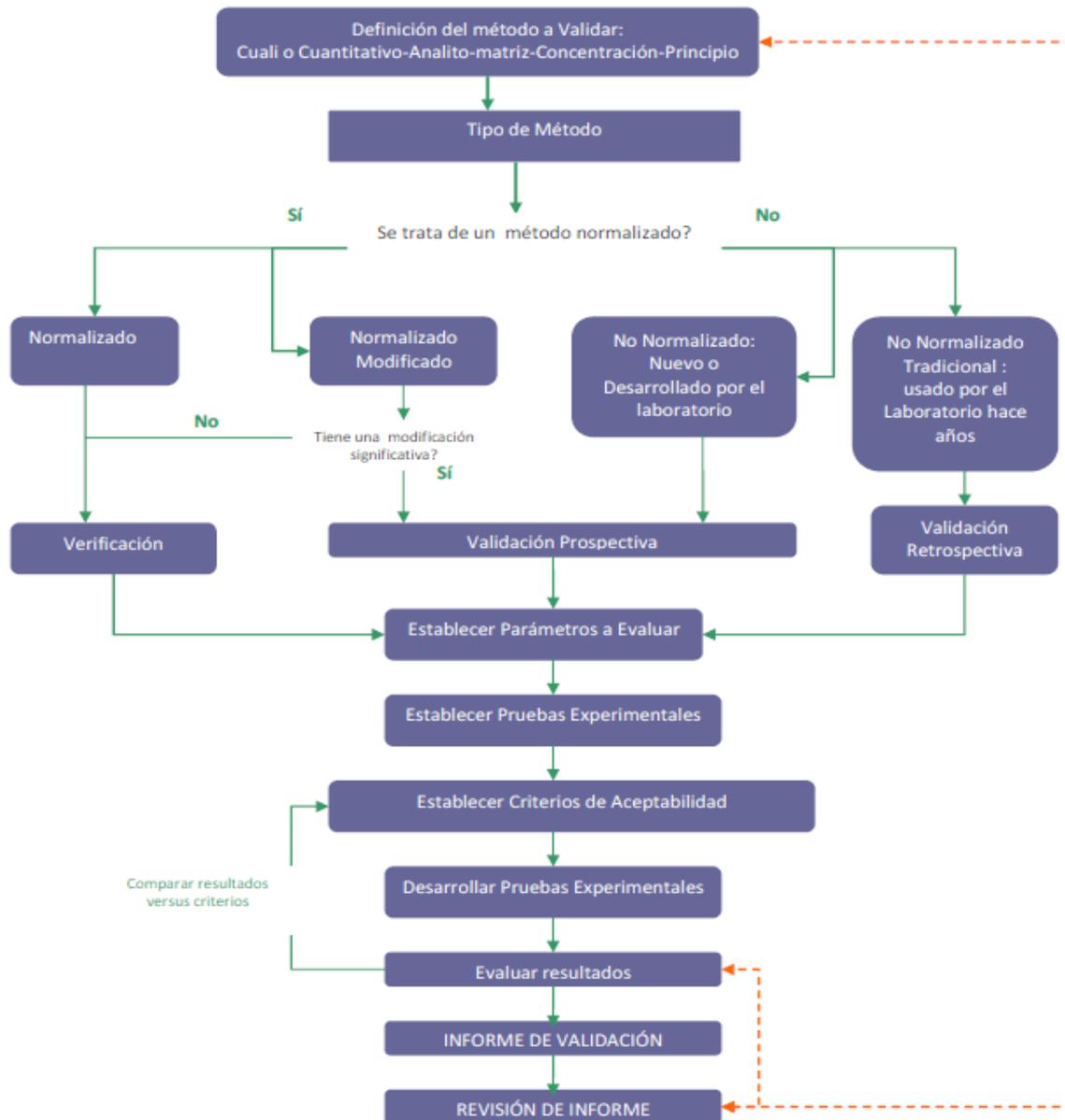
A la hora de plantear la validación hay que distinguir la naturaleza del método:

a) Métodos normalizados: se trata de aquellos sometidos a norma. Esto es, métodos descritos en la legislación aplicable, suficientemente conocidos y contrastados para los que se han determinado unas características de funcionamiento mínimas. En general los métodos normalizados no requieren una validación completa propiamente dicha sino que bastará con

**verificar** el correcto funcionamiento de los mismos. La verificación, tiene generalmente como objetivo, el comprobar que el laboratorio domina el método de ensayo normalizado y lo utiliza correctamente. Para ello se comprobará que los valores obtenidos por el laboratorio para los parámetros como función de calibrado (pendiente y/o ordenada en el origen), límite de detección y/o cuantificación, especificidad reproducibilidad, repetibilidad, etc. se ajustan a lo especificado en la norma correspondiente.

b) Métodos no normalizados: Corresponden a métodos desarrollados por el laboratorio o métodos nuevos (ejemplo: publicado en revista científica), o bien, a métodos que tradicionalmente se han utilizado en el laboratorio pero que no están normalizados. También se podrían incluir aquí métodos normalizados que van a ser utilizados fuera del ámbito normal de aplicación con una modificación significativa, por ejemplo en distinto rango, matriz, con otro instrumento de medida, etc. Este tipo de métodos se deben **validar** completamente. Cuando se trata de un método empleado tradicionalmente por el laboratorio que no esté normalizado, se puede realizar una Validación Retrospectiva, es decir, en base a los datos experimentales que el laboratorio dispone, para la cual se realizará la recopilación de la mayor cantidad de datos históricos disponibles, para luego realizar un proceso de ordenamiento y selección de los datos recopilados, estos datos pueden ser: curvas de calibración, resultados de ensayos, cartas de control, ensayos de aptitud, etc. A través de estos, se deberán determinar los parámetros de validación, y evaluar si los resultados obtenidos son aceptables para los fines a que se va a destinar. En caso de ser un método nuevo (o uno antiguo del que no se dispongan de datos suficientes) se debe realizar una Validación Prospectiva, generando datos experimentales a partir de la aplicación repetida del método a muestras de la misma naturaleza a las que se pretende posteriormente aplicar el método. La recopilación de dichos datos experimentales, su posterior tratamiento estadístico, sistematización y presentación de resultados generará los resultados de validación con los que se informará de los parámetros o características de funcionamiento:

- Linealidad
- Sensibilidad
- Límites de detección / cuantificación / superior
- Exactitud
- Precisión
- Robustez
- Aplicabilidad
- Selectividad
- Etc.



## 11. ESTRATEGIA/DINÁMICA DE LA VALIDACIÓN

La validación de un método analítico consta de una serie de etapas que en orden cronológico podrían ser:

- Identificación
- Planificación
- Tratamiento de datos
- Evaluación de los resultados
- Emisión del informe de validación

a) **Identificación:** debe identificarse el método, el momento y quién ha de realizar la validación. Se debe dar una breve información sobre el alcance y una sencilla descripción del método, así como información sobre la naturaleza del método (por ejemplo, una norma internacional, un método desarrollado internamente, etc.), el analito, el mensurando, unidad de medida, el tipo de muestra y el uso previsto.

b) **Planificación:** El responsable de la validación o verificación deberá elaborar el Plan de Validación que se va a realizar. Se entiende como Plan de Validación: un documento (tipo protocolo) en el cual se definen previamente las experiencias, las pruebas o parámetros de necesarios determinar y el diseño experimental a desarrollar. Se describirá el tipo de validación a realizar, por ejemplo, validación completa de un nuevo método, verificación del desempeño de un método normalizado, extensión del alcance del método, etc. Debe indicarse la extensión de la validación, por ejemplo, indicando las características de desempeño que van a evaluarse y los requisitos asociados así como las características de funcionamiento o desempeño del método a estudiar. Se incluirá una breve explicación de las características de desempeño del método, descripción de los experimentos a realizar y el procedimiento de evaluación de los datos a emplear. Desde el punto de vista práctico / laboratorial deberá:

- Establecer la(s) muestra(s) a ser analizada(s): testigos reactivos, blanco matriz, materiales certificados, material control, matrices, muestras sin fortificar, muestras fortificadas, etc.
- Número de análisis requeridos para la determinación de cada característica de funcionamiento y/o parámetro.
- Criterios de aceptación y rechazo para cada parámetro de validación a determinar.
- Instrumentación analítica a emplear.
- Analista(s) responsable de realizar la(s) prueba(s) analítica(s)

A modo de ejemplo en la tabla siguiente se detallan los requerimientos mínimos en cuanto a parámetros a determinar en una validación según la naturaleza del método (cualitativo, cuantitativo):

PARAMETRO A EVALUAR	CARACTERISTICA(S)	METODO CUALITATIVO	METODO CUANTITATIVO		
			NORMALIZADO	MODIFICADO	NUEVO
SELECTIVIDAD	Identificación analito Interferencia de matriz	Sí	No	Sí	Sí
LINEALIDAD	Rango lineal	No	Sí	Sí	Sí
SENSIBILIDAD	Pendiente	No	Sí o No	Sí	Sí
LIMITES	Crítico (LC) Detección (LOD) Cuantificación (LOQ)	Sí	Sí o No	Sí	Sí
PRECISION	Repetibilidad Reproducibilidad	No	Sí	Sí	Sí
VERACIDAD	Sesgo (s) Recuperación (R)	No	Sí o No	Sí o No	Sí
ROBUSTEZ	Test de Youden y Steiner	No	No	Sí o No	Sí
APLICABILIDAD	-----	Sí	Sí	Sí	Sí

- c) Tratamiento de datos y evaluación de resultados: Debe indicarse el tratamiento de datos a llevar a cabo y declararse los resultados y conclusiones derivados de los experimentos. Cada característica de desempeño se debe recoger en secciones separadas del informe.
- d) Informe de validación: Se debe recapitular todo el trabajo de validación y sus resultados. Pueden contemplarse además actuaciones relacionadas con el uso rutinario del método y con requisitos de control de calidad interno y externo. Y lo más importante, debe realizarse una declaración sobre la adecuación del uso del método (Norma ISO/UNE/17025).

## 12. MATERIALES NECESARIOS PARA LLEVAR A CABO LA VALIDACIÓN

Para llevar a cabo la validación de un método analítico se requiere, como es obvio:

- a) disponibilidad de un método analítico,
- b) instrumentación analítica (equipo de medida) y complementaria necesaria como pH-metros, agitadores, balanzas, equipos volumétricos como pipetas, matraces, etc.,
- c) personal involucrado como operadores o analistas convenientemente entrenados,
- d) muestras blanco,
- e) analitos de interés del método de análisis

Uno de los aspectos más importantes y necesarios para llevar a cabo la validación de un método son las disoluciones y muestras objeto de análisis como:

- a) Blancos de reactivos: Los reactivos utilizados durante el proceso analítico (incluyendo disolventes utilizados para extracción o disolución) se analizan para determinar si contribuyen a la señal medida. La muestra se sustituye por disolvente (habitualmente agua) y se procesa como si de una muestra real se tratase.
- b) Blancos de muestra. Se trata de muestras de matriz en ausencia de analito, por ejemplo, muestra de orina humana sin fármaco específico, o una muestra de carne sin residuo de hormonas. Los blancos de muestra pueden ser difíciles de obtener, pero son necesarios para tener una estimación más real de las interferencias que pueden aparecer en el análisis de muestras de rutina.
- c) Soluciones/material fortificado: Son materiales o disoluciones en los que el analito ha sido adicionado a concentraciones conocidas. Debe ponerse atención en los valores de concentración de modo que la adición no supere el intervalo de trabajo del método. Hay que tener en cuenta que la adición de analito puede no tener el mismo comportamiento sobre la matriz en comparación con el analito presente naturalmente. La adición no tiene que limitarse al analito de interés también se pueden adicionar otros componentes a la muestra como un interferente particular para evaluar la concentración del interferente a la cual la determinación del analito se ve afectada negativamente.
- d) Muestras de rutina. Son muestras reales similares a las que posteriormente se aplicará el método. El uso de un segundo método (de referencia) puede proporcionar una estimación

precisa sobre el contenido del analito y de esta forma sopesar la viabilidad del método objeto de validación. Estos métodos no siempre están disponibles.

e) Materiales de referencia: Hay que distinguir entre material de referencia (MR) y material de referencia certificado (MRC). Los MR pueden ser cualquier material empleado como valor de referencia, ya sean reactivos de laboratorio de pureza conocida, productos químicos industriales u otros. La propiedad o analito debe ser estable y homogénea pero no necesita contar con el alto grado de caracterización, trazabilidad metrológica, incertidumbre y documentación exigida a los MRC. La caracterización del parámetro de interés en un MRC se controla de manera más rigurosa que un MR, y el valor caracterizado se certifica con un documento que demuestra su trazabilidad metrológica y en el que se declara su incertidumbre. Conocido el valor caracterizado (concentración) del analito y su incertidumbre en el MRC se puede evaluar igualmente la viabilidad del método que se pretende validar.

MATERIAL NO OFICIAL

## **BIBLIOGRAFÍA**

La Adecuación al Uso de los Métodos Analíticos. Una Guía de Laboratorio para Validación de Métodos y Temas Relacionados. Guía Eurachem. 1ª Ed. Español

Sistemas de calidad en laboratorios de ensayo. 2005. Laboratorio Arbitral Agroalimentario. MAPA.

J. C. Miller, J. N. Miller, Statistics and chemometrics for analytical chemistry, 6th ed., Pearson, Harlow, 2010, ISBN 978-0-273730422.

ISO/IEC 17025:2005 General requirements for the competence of testing and calibration laboratories, ISO Geneva.

Commission Decision 2002/657/EC (12 August 2002) implementing Council Directive 96/23/EC concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results. SANCO/12571/2013 (19 Nov. 2013) Guidance document on analytical quality control and validation procedures for pesticide residues analysis in food and feed.

Herramientas cualimétricas para la validación de procesos analíticos. Granada 2015 2ª ed. Unidad de cualimetría y metrología química. Dpto. Química Analítica. Universidad de Granada.

M. Valcárcel, S. Cárdenas, D. Barceló et al., Metrology of qualitative chemical analysis, report EUR 20605 EN, European Commission, 2002, ISBN 92-894-5194-7.

International vocabulary of metrology – Basic and general concepts and associated terms (VIM), JCGM 200:2012, www.bipm.org. A previous version is published as ISO/IEC Guide 99:2007, ISO Geneva.

Validation of analytical procedures: Text and methodology Q2 (R1), ICH harmonised tripartite guideline, 2005.

[www.ich.org](http://www.ich.org).

Directrices para la validación de métodos analíticos y la calibración del equipo utilizado para el análisis de drogas ilícitas en materiales incautados y especímenes biológicos. Sección de laboratorio y asuntos científicos. Oficina de las Naciones Unidas contra la Droga y el Delito. Viena

**MATERIAL PARA LA PREPARACIÓN DEL TEMA 12**

**ESTADÍSTICA. PARÁMETROS ESTADÍSTICOS APLICADOS AL ANÁLISIS BIOLÓGICO. MEDIDAS DE TENDENCIA CENTRAL Y DISPERSIÓN. ANÁLISIS, ACEPTACIÓN Y RECHAZO DE RESULTADOS. PRUEBAS DE SIGNIFICACIÓN PARA COMPARACIÓN DE MEDIAS Y VARIANZAS. ANÁLISIS DE TENDENCIAS.**

*Este material no tiene carácter oficial, por lo que en ningún caso vinculará al Tribunal Calificador. Constituye, únicamente, un instrumento complementario que servirá de apoyo al opositor para enfocar cada uno de los epígrafes, pero nunca de forma exclusiva ni excluyente. El Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación no se hace responsable del contenido del mismo.*

*Los materiales no serán objeto de actualización constante.*

## **ÍNDICE**

### **1. INTRODUCCIÓN**

### **2. PARÁMETROS ESTADÍSTICOS POBLACIONALES**

2.1. PARÁMETROS DE CENTRALIZACIÓN

2.2. PARÁMETROS DE DISPERSIÓN

### **3. INTERVALOS DE CONFIANZA**

### **4. PRUEBAS DE SIGNIFICACIÓN**

4.1. EVALUACIÓN DE RESULTADOS ANÓMALOS

4.2. COMPARACIÓN DE UNA MEDIA EXPERIMENTAL CON UN VALOR TEÓRICO O CONOCIDO

4.3. COMPARACIÓN DOS CONJUNTOS DE RESULTADOS

4.4. LA PRUEBA T POR PAREJAS

4.5. PRUEBA PARA LA COMPARACIÓN DE VARIANZAS.

4.6. EL ANÁLISIS DE LA VARIANZA (ANOVA) O COMPARACIÓN DE MÁS DE DOS CONJUNTOS DE MUESTRAS

### **5. ANÁLISIS DE TENDENCIAS**

5.1. REGRESIÓN LINEAL

5.2. GRÁFICOS DE CONTROL

### **6. PARÁMETROS ESTADÍSTICOS APLICADOS AL ANÁLISIS BIOLÓGICO.**

6.1. ESPECIFICIDAD Y SENSIBILIDAD.

6.2. CARACTERÍSTICAS DE UN ENSAYO DE DIAGNÓSTICO: SENSIBILIDAD Y ESPECIFICIDAD DIAGNÓSTICAS.

## 1. INTRODUCCIÓN

La Estadística es la ciencia y el arte de dar sentido a los datos, proporcionando la teoría y los métodos para extraer información de éstos y poder resolver problemas del mundo real. La estadística consiste en métodos, procedimientos y fórmulas que permiten recolectar información para luego analizarla y extraer de ella conclusiones relevantes. Se puede decir que es **la Ciencia de los Datos** y que su principal objetivo es mejorar la comprensión de los hechos a partir de la información disponible. Con el análisis estadístico se pretende realizar un estudio de los datos disponibles de un sistema para posteriormente realizar la oportuna inferencia.

En estadística, se define **población** como la totalidad de individuos de interés del fenómeno que se estudia. Una **muestra** sería un conjunto de individuos representativos de dicha población, conjunto que permitiría estudiar el fenómeno sin pérdida significativa de información. Una **variable** es una característica que varía de individuo en individuo. Así, si se pretende analizar el contenido en sulfatos de un lago, la población sería el propio lago y la muestra sería una porción de agua representativa del mismo. De este modo, a partir del análisis de la muestra, debe ser posible conocer el contenido en sulfatos de la población. Cuando nos referimos a datos obtenidos experimentalmente en el laboratorio, la población se refiere a la totalidad de medidas posibles, mientras que la muestra sería un conjunto de estas medidas.

En la mayoría de los casos las poblaciones contienen un número tan grande de elementos que podemos considerarlas como infinitas, no en el sentido matemático del término sino porque el número de elementos es tan grande que su manejo resulta imposible. La muestra se considera como un subconjunto de la población que debe cumplir la condición de ser REPRESENTATIVA y en términos estadísticos ALEATORIA. Esto es así cuando en cada momento todos los elementos de la población tienen la misma probabilidad de formar parte de la muestra.

Una variable que teóricamente puede tomar cualquier valor entre los límites del campo de variación se dice que es de tipo CONTINUO. Si solo puede tomar valores aislados es de tipo DISCRETO.

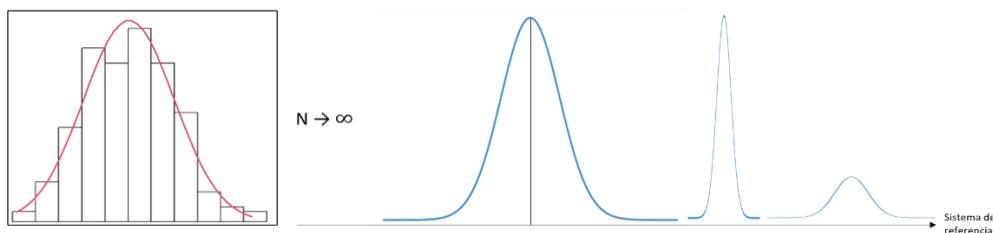
De todos es sabido que cualquier disciplina de la ciencia moderna tiene un carácter cuantitativo. Obviamente en muchos casos una respuesta cuantitativa es mucho más valiosa que una cualitativa. Para un científico tiene más valor conocer que una muestra contiene tal nivel de albúmina, anticuerpos, etc. que simplemente saber que la muestra los contiene. Para él es mucho más útil poder decir *cuanto* hay de algo en una muestra y la persona que solicitó el análisis podría, una vez que tiene esta respuesta cuantitativa, juzgar el significado del resultado. En cualquier caso, aunque el resultado sobre una muestra sea tan solo de carácter cualitativo, para su obtención se ha tenido que recurrir a métodos cuantitativos.

En todo proceso de medida son muchos los factores que pueden contribuir al resultado final, desde que el instrumento de medida no esté bien ajustado y pueda dar medidas alejadas del valor verdadero a simples variaciones u oscilaciones del propio sistema de medida que hacen que por más que se repita el proceso no se obtenga un único resultado. Cuando sobre un sistema se realizan varias medidas repetitivas aparecen dos tipos de errores:

a) Errores sistemáticos: son aquellos que provocan que un resultado se desvíe del valor verdadero en el mismo sentido, es decir que tras una serie de medidas repetidas todas ellas se desvíen hacia un lado (bien sea por encima o por debajo del valor verdadero). Este tipo de errores afectan a la exactitud, es decir a la proximidad a la que se encuentran los resultados obtenidos del valor verdadero. Estos errores pueden ser fácilmente indentificados y lo que es más importante corregidos si se conoce la magnitud de la desviación del sistema de medida. Por ejemplo, un tirador con arco que siempre desvia sus lanzamientos hacia un lado (derecho), para acertar en el blanco bastaría con que apuntase no al centro de la diana sino al lado contrario (izquierdo). De esta forma se ha eliminado este tipo de error.

b) Errores aleatorios: impiden que tras la repetición de una medida se obtenga el mismo resultado. Hacen que las medidas se desvíen unas veces hacia un lado y otras hacia el otro; es decir que los resultados individuales caigan a ambos lados del valor medio. Este tipo de errores afectan a la precisión o reproducibilidad de una medida. Como su propio nombre indica su aparición es "aleatoria" lo cual hace que en unas ocasiones el resultado de la medida caiga unas veces a un lado de la media y otras al otro lado. Su magnitud suele ser pequeña en comparación con los errores sistemáticos. Son difícilmente evitables y lo más que se puede hacer es minimizarlos, aunque siempre estarán presentes en cualquier medición.

Como estamos viendo, las mediciones que hacemos sobre cualquier sistema (muestra) no son únicas sino que se suelen realizar varias medidas con objeto de conocerlo mejor (población). Cuando se tiene un número elevado ( $n > 50$ ) de medidas se requiere su sistematización de cara a tener una idea del conjunto de datos disponible. Una de las formas más simple es ordenar los datos y comprobar cuáles se repiten y cuántas veces lo hacen (esto es, conocer su frecuencia). La representación de la frecuencia a la que aparece cada dato es lo que se conoce como histograma (figura). La altura de cada una de las barras es proporcional a las veces que se repite (frecuencia) un valor de la variable. Si el número de medidas es suficientemente elevado (tiende a infinito) esta representación suele tener forma de una curva conocida como "distribución gaussiana".



Se puede comprobar que el 50% de los datos de la distribución se encuentra a un lado de la línea central y el otro 50% al otro lado. No obstante, el conjunto de medidas realizado debe de poder caracterizarse y mostrarse de una manera más simplificada que una gráfica, esto es, cuando realizamos un conjunto de medidas no solemos mostrar como resultado todos los valores obtenidos en cada una de ellas (la tabla de medidas realizadas) sino que tendemos a simplificar esa información mediante unos parámetros de caracterización del conjunto que nos permitan conocer la disposición del conjunto de datos respecto del sistema de referencia y la amplitud o anchura de la distribución. Estos son los que se conocen como **parámetros poblacionales**.

## 2. PARÁMETROS ESTADÍSTICOS POBLACIONALES

A la hora de definir un conjunto de datos se utiliza una serie de parámetros que atendiendo al tipo de información que aportan se clasifican como:

**Parámetros de centralización:** indican la disposición de los datos respecto de un sistema de referencia.

**Parámetros de dispersión:** indican cuan extensa es la distribución. No indica si el número de datos o valores es mayor o menor sino la magnitud de su dispersión en torno a un valor central.

### 2.1. PARÁMETROS DE CENTRALIZACIÓN:

Los parámetros de tendencia central son estadísticos que pretenden resumir en un solo valor un conjunto de valores. Representan un centro en torno al cual se encuentra ubicado el conjunto de los datos. Los parámetros de tendencia central más utilizados son: media, mediana y moda.

**MEDIA:** La media de un conjunto de N números ( $x_1, x_2, x_3... X_n$ ) se define como:

$$Media = \frac{\text{sumatorio de todos los elementos}}{\text{número de elementos}} = \frac{\sum_{j=1}^n X_j}{N}$$

Se representa por la letra griega  $\mu$

**MEDIANA:** si se ordenan los valores de la muestra ascendente o descendientemente, la mediana es el valor de la variable que divide a la población en dos partes iguales, es decir, el valor que deja a la mitad de los individuos a un lado y a la otra mitad al otro.

**MODA:** es el valor que se presenta con mayor frecuencia, es decir el más repetido.

## 2.2. PARÁMETROS DE DISPERSIÓN:

Son estadísticos que indican los concentrados o dispersos que están los datos entre sí y respecto a la media. Son muchos los empleados, pero los más importantes son: varianza, desviación estándar, coeficiente de variación y rango.

**VARIANZA:** se calcula como la media cuadrática de las desviaciones de cada uno de los datos respecto de la media. Nos informa acerca de la variabilidad de los datos. Se trata de una magnitud aditiva.

$$\text{Varianza} = \frac{\sum_{j=1}^n (X_j - \mu)^2}{N}$$

**DESVIACIÓN ESTÁNDAR:** se representa por  $\sigma$ . Se define como la raíz cuadrada de la varianza:

$$\text{Desviación estándar} = \sqrt{\text{varianza}} = \sqrt{\frac{\sum_{j=1}^n (X_j - \mu)^2}{N}}$$

**COEFICIENTE DE VARIACIÓN:** se define como la desviación típica partido por la media:

$$CV (\%) = \frac{\sigma}{\mu} \cdot 100 = \frac{\text{desviación típica}}{\text{media}} \cdot 100$$

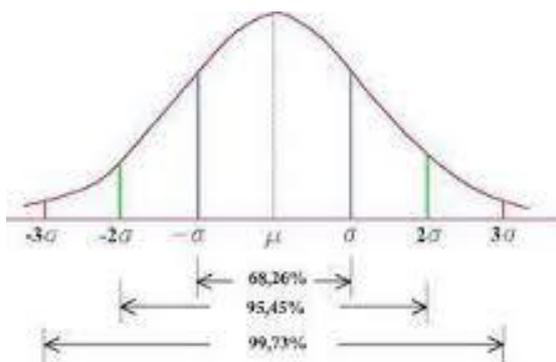
Este parámetro permite comparar la variabilidad de dos poblaciones con distintas magnitudes (medias). Al expresarse por unidad de la población permite distinguir aquella población más precisa (la de menor CV).

**RANGO:** es diferencia entre el valor máximo y mínimo del conjunto muestral.

$$\text{Rango} = x_i^{\text{máx}} - x_i^{\text{mín}}$$

## 3. INTERVALOS DE CONFIANZA

La descripción de una población se puede realizar a partir de los correspondientes parámetros poblacionales, esto es a partir de los estadísticos antes citados como media, desviación estándar, CV, etc. obtenidos del conjunto de datos disponible. Mejor aún queda definida mediante lo que se conoce como el intervalo de confianza. Se llama **intervalo de confianza** a un par o varios pares de números entre los cuales se estima que estará la



totalidad o la práctica totalidad de los datos poblacionales para un determinado nivel de confianza (% P). El verdadero valor medio de una población se encontrará en un intervalo de valores definido por la media y la desviación estándar muestrales. Dicho intervalo posee una amplitud dependiente del nivel de confianza con el

que se estima el valor verdadero. Habitualmente en la ciencia se trabaja con niveles de confianza del 95 % y 99 %. Así el intervalo de confianza de una población se define como:

$$\mu = \bar{x} \pm t \cdot \frac{S}{\sqrt{N}}$$

“t” es el valor de t de Student para el nivel de confianza asumido. Así para una probabilidad del 68 % t= 1, para un 95,45 % t=2 y para un 99 % t=3

En función del nivel de confianza considerado 95% o 99%, el intervalo que contendrá el valor verdadero de una distribución será mayor (99%,  $\pm 3S$ ) o menor (95%,  $\pm 2S$ ).

#### 4. PRUEBAS DE SIGNIFICACIÓN

En el laboratorio nos podemos encontrar con muchas situaciones, por ejemplo:

- Comparar un conjunto de datos con un valor de referencia. Por ejemplo, se analizan varias muestras de un material de referencia (MR) y se compara el valor obtenido con el valor asignado o declarado para dicho MR.
- Comparar dos conjuntos de datos. Por ejemplo, comparar dos conjuntos de medidas realizados con dos instrumentos distintos queriendo conocer si las medidas con uno y con el otro son comparables.
- Comparar más de dos conjuntos de datos. Por ejemplo, la comparación de si más de dos tratamientos afectan a un proceso o estudiar si un método funciona mejor a varios pH (1, 2, 3, etc.)

Las **pruebas de significación** son test estadísticos basados en la existencia de incertidumbre en las medidas que permiten evaluar datos/resultados para un nivel de significación o probabilidad definido. Cuando se comparan resultados o se duda de valores no se hace única y exclusivamente en base a los valores cuantitativos comparados, sino que se tiene en cuenta la incertidumbre asociada a cada uno de los valores comparados.

Las principales pruebas de significación empleadas en el laboratorio son:

- a) La evaluación de resultados anómalos.
- b) La comparación de una media experimental con un valor teórico o conocido.
- c) La comparación de los valores medios de dos conjuntos de resultados.
- d) La prueba t por parejas.
- e) La prueba para la comparación de desviaciones estándares.
- f) El análisis de la varianza o comparación de más de dos conjuntos de muestras.

#### 4.1. EVALUACIÓN DE RESULTADOS ANÓMALOS

Cuando se realizan varias medidas de algo es fácil encontrarse con que un resultado difiere del resto de manera inexplicable. Estas medidas se denominan **resultados anómalos**.

Existen varios procedimientos para examinar si un resultado o medida son anómalos:

1) Q-Dixon: consiste en comparar el cociente entre la diferencia entre el dato anómalo y el valor más próximo con el **rango o amplitud** de la distribución (diferencia entre la medida más grande y la más pequeña). Este cociente se conoce como **Q de Dixon**. Los valores máximos de Q se encuentran tabulados (para diferentes probabilidades). Si el cociente calculado supera el valor tabulado el dato anómalo se excluye del conjunto de resultados para la estimación del valor final (media). En caso contrario se mantiene. Se compara el valor de la  $Q_{Dixon}$  experimental con la  $Q_{máx}$  descrita en tablas estadísticas para un nivel de probabilidad (habitualmente el 95 %).

$$Q_{Dixon\ experimental} = \frac{|valor\ sospechoso - valor\ más\ cercano|}{valor\ máximo - valor\ mínimo}$$

Si  $Q_{Dixon\ experimental} > Q_{máx}$  el dato anómalo se rechaza y se recalculan los parámetros de la distribución

2) Regla 4-d: La serie debe tener al menos 4 o más datos. Despreciando el valor dudoso se calcula la desviación media para los restantes datos de la serie. Si el resultado dudoso difiere del nuevo promedio en más de 4 veces la desviación media de los restantes valores que permanecen en la serie, debe ser rechazado.

Si el dato anómalo no está comprendido en el intervalo  $\bar{x} \pm 4 \cdot s$  se rechaza; en caso contrario se mantiene.

3) Regla 2,5-d: ídem. anterior solo que son 2,5 veces la desviación media de los restantes valores del conjunto de datos. Este criterio es más restrictivo que el anterior, por lo que tiende a rechazar más valores anómalos.

#### 4.2. COMPARACIÓN DE UNA MEDIA EXPERIMENTAL CON UN VALOR TEÓRICO O CONOCIDO.

Teniendo un conjunto n de resultados descritos por una media ( $\bar{x}$ ) y una desviación estándar (s) se puede conocer para un nivel de probabilidad dado (P %) si dicho valor difiere estadísticamente de un valor teórico ( $\mu$ ). Para ello se calcula el estadístico  $t_{calc}$  de la siguiente forma:

$$t_{calc} = \frac{(\bar{x} - \mu) \cdot \sqrt{n}}{s}$$

Si  $t_{calc} > t_{tab}$  el valor hallado difiere al nivel de significación escogido (P%) del valor teórico.  $T_{tab}$  se puede encontrar en tablas estadísticas para varios niveles de probabilidad o significación escogidos (habitualmente 95 %).

#### 4.3. COMPARACIÓN DE DOS CONJUNTOS DE RESULTADOS.

Dos conjuntos de resultados (definidos por  $x_1, s_1, n_1$  y  $x_2, s_2, n_2$ , respectivamente) se desean comparar para ver si hay diferencia significativa entre ellos. Se calcula el estadístico  $t$  como:

$$t_{calc} = \frac{(\bar{x}_2 - \bar{x}_1)}{s \sqrt{\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2}}}$$

donde  $S$  es una combinación lineal de las varianzas de ambas distribuciones, suponiendo que  $s_1$  y  $s_2$  son similares. En caso contrario en la fórmula anterior se sustituye 1 en los numeradores de la raíz por las respectivas varianzas  $s_1^2$  y  $s_2^2$ .

Si  $t_{calc} > t_{tab}$  los dos conjuntos de resultados difieren al nivel de significación escogido (P%).  $t_{tab}$  se puede encontrar en tablas estadísticas para varios niveles de probabilidad o significación escogidos (habitualmente 95 %).

#### 4.4. LA PRUEBA T POR PAREJAS.

Se suele emplear cuando se quieren comparar dos procedimientos o métodos de análisis que se han empleado para realizar medidas sobre el mismo conjunto de muestras conteniendo cantidades diferentes del analito. En este caso se plantea la hipótesis de que no hay diferencias significativas entre los resultados aportados por los dos procedimientos que se quieren comparar. Se calcula el estadístico  $t$  a partir de las diferencias entre cada pareja de resultados. Siendo  $\bar{x}_d$  el valor medio de las diferencias y  $SD$  su desviación estándar.

$$t_{calc} = \frac{\bar{x}_d \sqrt{n}}{s_d}$$

Una vez más el  $t_{calc}$  se compara con el valor tabulado para aceptar/rechazar la hipótesis.

#### 4.5. PRUEBA PARA LA COMPARACIÓN DE VARIANZAS.

Se emplea cuando se quiere comparar si las desviaciones estándar de dos conjuntos de resultados son comparables, es decir si el componente de los errores aleatorios en ambos conjuntos de resultados es similar. En definitiva, cuando se quiere establecer cuál de los dos conjuntos de resultados es más preciso. En este caso se calcula el estadístico  $F$ -Snedecor como:

$$F = \frac{s_1^2}{s_2^2} \quad \text{Siendo } s_1^2 > s_2^2.$$

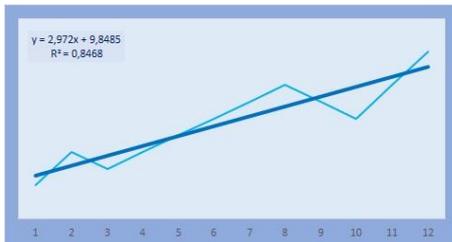
Si el valor  $F_{calc} > F_{tab}$  para el nivel de probabilidad considerado se concluye con que la precisión de ambos conjuntos de datos es diferente.

#### 4.6. EL ANÁLISIS DE LA VARIANZA O COMPARACIÓN DE MÁS DE DOS CONJUNTOS DE MUESTRAS.

Se emplea cuando se quieren comparar más de dos conjuntos de resultados por ejemplo provenientes de diferentes tratamientos, condiciones de almacenamiento, operadores, etc. Permite estudiar simultáneamente las dos fuentes de variación: a) los errores aleatorios y b) lo que se conoce como factor controlado o efecto fijo (tratamientos, condiciones de almacenamiento, operadores, Tas, etc.).

En este caso se emplea el análisis de la varianza (ANOVA) que permite separar y estimar las diferentes causas de variación entre tratamientos (errores aleatorios y factor controlado). Estos cálculos son laboriosos y complejos. No obstante, hoy día se encuentran implementados en cualquier software estadístico u hoja de cálculo.

#### 5. ANÁLISIS DE TENDENCIAS



El análisis de tendencia es una técnica estadística que permite estudiar una o más variables en un período de tiempo aportando información para la toma de decisiones. Es muy empleado para observar la evolución de variables dependientes como la respuesta de un instrumento en función de

la concentración, o la amplitud de una respuesta biológica a un tratamiento (crecimiento/inhibición bacteriana ante un tratamiento antibiótico, etc.).

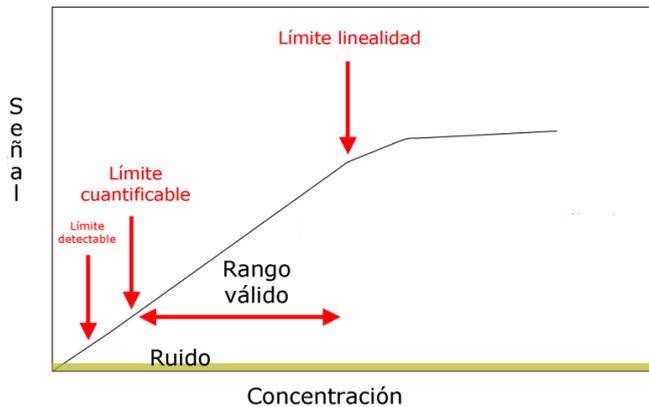
En un caso de éstos, se dispone de un conjunto de valores: una variable independiente (x) (concentración, cantidad, etc.) y una variable dependiente (y) (absorbancia, área o altura cromatográfica, etc.) cuya representación en un sistema cartesiano puede exhibir cierta tendencia o dependencia entre las dos variables.

Mediante el análisis estadístico adecuado se puede obtener una función que relaciona ambas variables que posteriormente se puede emplear para predecir un valor de la variable dependiente a partir de un valor experimental de la variable dependiente. La ecuación de tendencia es una representación algebraica de la línea ajustada. Habitualmente se pueden encontrar que los datos experimentales pueden ajustarse a varios tipos de funciones matemáticas como:

Tipo	Función matemática
a) Lineal:	$y = a + b \cdot x$
b) Cuadrático:	$y = a + b \cdot x + c \cdot x^2$
c) Exponencial:	$y = a \cdot b^x$
d) Logarítmica:	$y = a + b \cdot \text{Log}(x)$

De todas ellas la más ampliamente utilizada es la función lineal empleada en la calibración de equipos de medida y métodos analíticos. La obtención de la función matemática se hace mediante lo que se conoce como análisis de regresión.

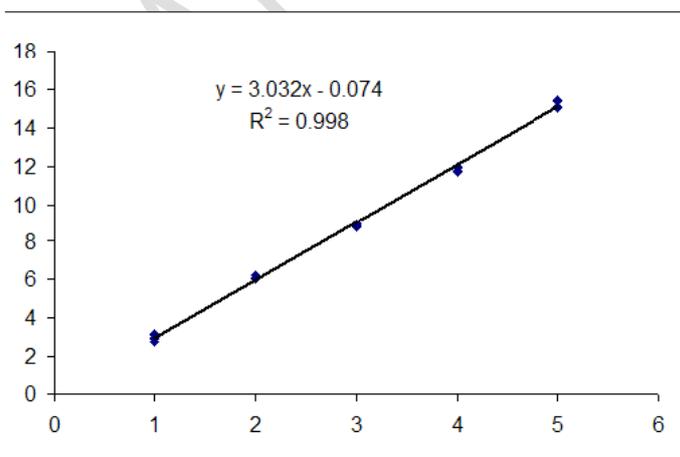
### 5.1. REGRESIÓN LINEAL



Casi el 90% de los procesos de medida en el laboratorio se llevan a cabo mediante técnicas instrumentales de análisis. En las técnicas instrumentales de análisis el procedimiento a seguir es obtener una gráfica de calibración mediante la preparación de una serie de patrones de concentración conocida y diferentes, con los

que “ajustar” el equipo o el método. Tras ser medidos se puede establecer una relación entre la señal o lectura instrumental y la concentración del analito en los patrones. Posteriormente se empleará esta relación para establecer la concentración de la muestra de interés interpolando en dicha gráfica.

Supongamos que pretendemos realizar la determinación de un determinado analito mediante un método instrumental, de modo que medimos una propiedad física de la muestra que sea proporcional a la concentración de analito. En principio, a partir de la medida de esta propiedad no podremos calcular la concentración de analito. Para poder hacer esto es preciso establecer una relación entre las señales medidas y una serie de patrones de concentración conocida. Esto es lo que se denomina realizar un calibrado. La relación señal-concentración vendrá dada por una función matemática a partir de la cual



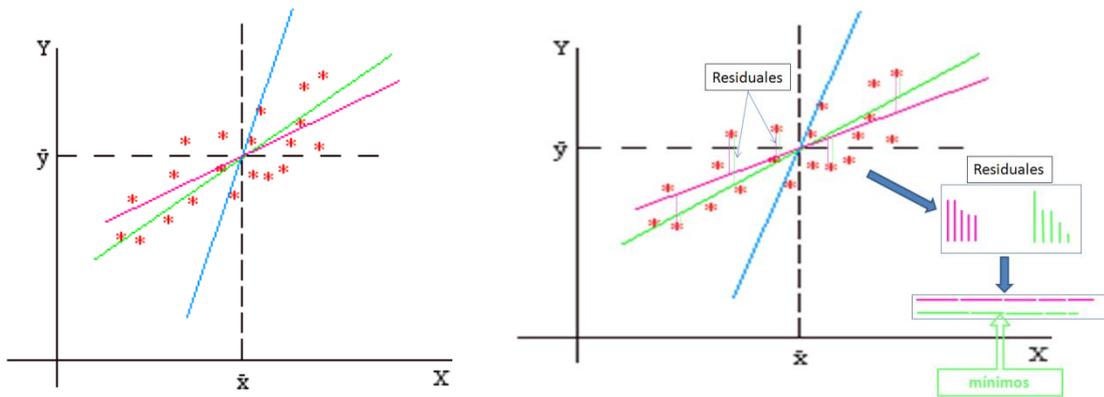
se puede interpolar el valor de señal obtenido para una muestra problema y calcular así la concentración de analito en la misma.

Supongamos que disponemos de una serie de patrones de concentración  $x_1, x_2, \dots, x_i, \dots, x_n$  que, una vez medidos por una determinada técnica presentan unas señales analíticas  $y_1, y_2, \dots, y_i, \dots, y_n$ . Si representamos las

señales frente a las concentraciones obtenemos la denominada curva de calibración o

función de calibrado. En el caso más sencillo, como ya se ha dicho, tendremos una recta de calibrado de ecuación  $y = a + bx$ , donde  $b$  es la pendiente y  $a$  la ordenada en el origen.

El método de regresión lineal busca de todas las rectas posibles (azul, verde o rosa) que se pueden ajustar a un conjunto de datos (en rojo) la recta que mejor se ajusta:



Para calcular el valor de estos dos parámetros ( $a$  y  $b$ ) se utiliza el método de los mínimos cuadrados, que consiste en estimar estos parámetros minimizando la suma cuadrática de los **residuales** (sus desviaciones respecto de la recta escogida). En el ejemplo anterior la recta que mejor ajusta los datos es la **verde** por ser mínima la suma de sus residuales.

El método de regresión lineal por mínimos cuadrados posee unas hipótesis de partida:

- Solo existe variabilidad en los datos de la respuesta instrumental ( $y$ ). O lo que es lo mismo, los datos del eje  $x$  (concentraciones de los patrones) están exentos de error.
- Los valores de " $y$ " son normales, es decir siguen una distribución normal con varianza  $S^2$ .
- Las varianzas de los valores de " $y$ " son constantes (condición de homocedasticidad).

La condición a) es fácilmente cumplida ya que los patrones de calibrado ( $x$ ) se pueden preparar con un alto grado de precisión, mientras que la lectura instrumental o respuesta ( $y$ ) posee una menor precisión, pero aun así suelen estar normalmente distribuidos (b y c).

El problema radica en encontrar aquella recta que mejor ajuste a los datos. Tradicionalmente se ha recurrido para ello al método de mínimos cuadrados, que elige como recta de regresión aquella que minimiza las distancias verticales (residuales) de las observaciones a la recta. Más concretamente, se pretende encontrar " $a$ " y " $b$ " tales que:

$$\text{Min } \sum_{i=1}^n (Y_i - a - b \cdot X_i)^2 \quad (\text{condición de mínimos})$$

Resolviendo este problema mediante un sencillo cálculo de diferenciación, se obtienen los estimadores mínimos cuadrados de los coeficientes de la recta de regresión (a y b):

$$b = \frac{\sum_{i=1}^n (X_i - \bar{X}) \cdot (Y_i - \bar{Y})}{\sum_{i=1}^n (X_i - \bar{X})^2} = \frac{S_{xy}}{S_{xx}} = \frac{S_{xy}}{S_{xx}}$$

y

$$a = \bar{Y} - b\bar{X}$$

Siendo  $S_{y,x}^2$  la varianza del error experimental total o varianza residual debida a la falta de un buen ajuste y la variación dentro de las series:

$$S_{y,x}^2 = \frac{\sum_{i=1}^n Y^2 - a \sum_{i=1}^n Y - b \sum_{i=1}^n XY}{n - 2} = \frac{\sum_{i=1}^n (Y_i - \hat{Y}_i)^2}{n - 2}$$

Donde  $\hat{Y}_i$  es el valor predicho por la recta de regresión o valor calculado esto es:

$$\hat{Y}_i = a + bX_i$$

Para los parámetros de la regresión **a** y **b** también se puede calcular su error como desviación estándar:

$$S_b = \frac{S_{y,x}}{\sqrt{\sum_{i=1}^n (X_i - \bar{X})^2}} \quad S_a = S_{y,x} \cdot \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n X_i^2}{\sum_{i=1}^n (X_i - \bar{X})^2}}$$

El coeficiente de correlación, **r**, informa de la bondad del ajuste de la curva a los datos experimentales. Su valor oscila entre 0 y |1|, valores de **r** próximos a 1 implican un mejor ajuste:

$$r = \frac{\sum_{i=1}^n \{(X_i - \bar{X}) \cdot (Y_i - \bar{Y})\}}{\sqrt{[\sum_{i=1}^n (X_i - \bar{X})^2] \cdot [\sum_{i=1}^n (Y_i - \bar{Y})^2]}}$$

Finalmente, si tenemos una muestra de respuesta instrumental  $Y_k$  se puede calcular la concentración correspondiente a la misma ( $X_k$ ) a partir de la recta de regresión como:

$$X_k = \frac{Y_k - a}{b}$$

Y el error asociado a dicha concentración viene dado por:

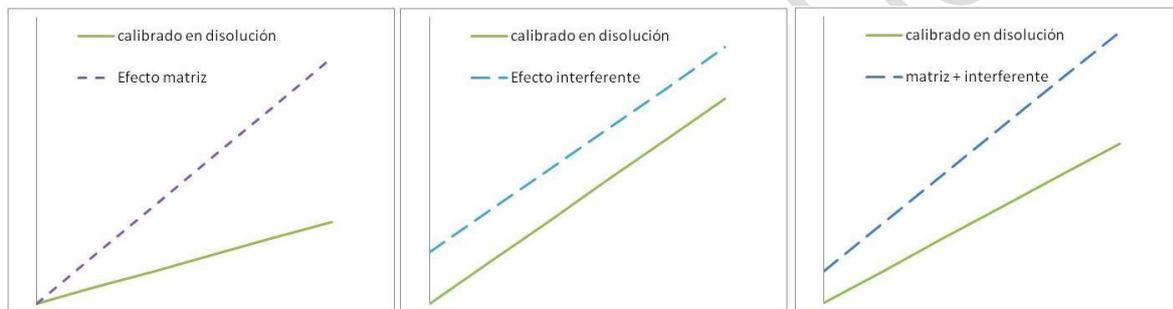
$$S_k = \frac{S_{y,x}}{b} \cdot \sqrt{1 + \frac{1}{n} + \frac{(Y_k - \bar{Y})^2}{b^2 \cdot \sum_{i=1}^n (X_i - \bar{X})^2}}$$

### 5.1.1. Otras aplicaciones de la regresión lineal

Además de la aplicación principal de la regresión lineal como es el calibrado de instrumentos o métodos, existen otras aplicaciones que permiten obtener información como son la detección de efecto matriz, efecto interferente o ambos a la vez. Si se dispone de un método de análisis para la determinación de uno o varios analitos en una matriz (ej. Fenol como conservante en vacunas) se pueden realizar estos dos tipos de calibrado:

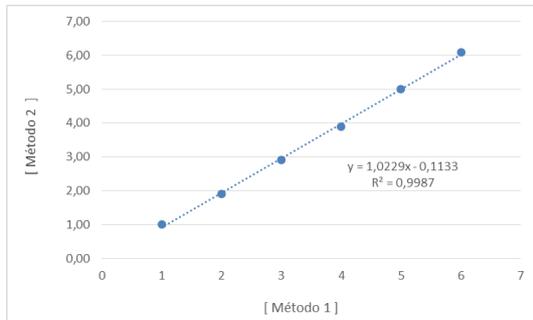
- en disolución: varias disoluciones de patrones en el disolvente de disolución
- en matriz: varias muestras de una matriz blanco (una matriz similar a la que se le aplica el método o la propia matriz objeto del método) adicionadas de patrón del analito de interés.

La posterior comparación de los parámetros de la regresión de estos “dos calibrados” nos arroja la siguiente información:



- Detección de efecto matriz: En análisis químico la muestra problema es una mezcla multicomponente compuesta por el analito problema y los restantes constituyentes de la matriz. Dicha matriz puede interferir en la respuesta proporcionada por el sistema de medida o instrumento utilizado. El efecto matriz se pone de evidencia porque la pendiente del calibrado con patrones en disolución es diferente generalmente superior (ausencia de interferente alguno) a la obtenida con el analito en presencia de la matriz. En este caso cambia la sensibilidad del método. Para ponerlo de manifiesto basta con comparar las pendientes del calibrado en ambas situaciones mediante un test de Student.
- Detección del efecto interferente: en este caso la sensibilidad no se ve alterada (la pendiente no varía) pero se produce un error sistemático por exceso o por defecto que desplaza verticalmente la recta de calibrado. Es decir, varía la ordenada en el origen del calibrado. Se pone de manifiesto por comparación de las ordenadas en el origen de los calibrados en disolución y en presencia del interferente.
- Detección simultánea de efecto matriz e interferente: Varía la pendiente y ordenada en el origen de los dos calibrados. Se pone de manifiesto por comparación mediante un test de t-Student de las pendientes y de las ordenadas en el origen de los calibrados en disolución y matriz conteniendo el supuesto interferente.

Otra aplicación de la regresión es la Comparación de métodos analíticos. Cuando se quiere comparar un método nuevo con uno de referencia se analizan una serie de muestras con diferente contenido en el analito de interés con ambos métodos y se representan sobre un sistema de coordenadas los resultados obtenidos por ambos métodos. El análisis de regresión puede indicar:



a) Pendiente = 1 y ordenada en el origen 0, => Los métodos ofrecen el mismo resultado

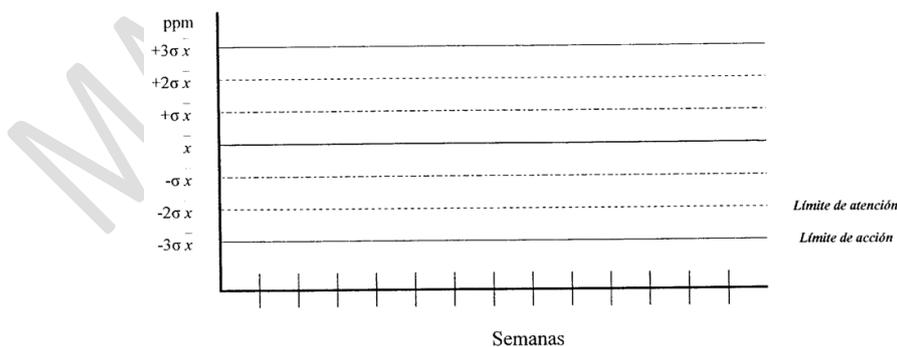
b) Pendiente  $\neq 1$  y ordenada diferente  $\neq 0$ , => Los dos métodos ofrecen resultados diferentes. Aquí habrá que analizar la pendiente (si la pendiente  $b > 1$  => el método

2 es más sensible)

## 5.2. GRÁFICOS DE CONTROL

Otra aplicación del análisis de tendencias en el laboratorio es el empleo de los gráficos de control. Un **gráfico de control** es una gráfica en la que se presentan consecutivamente en el tiempo valores de una propiedad analítica medida sobre alícuotas de una misma muestra control de manera que se pueda observar de forma clara y rápida cualquier variación significativa en un proceso (método de análisis que se realiza rutinariamente) y que permita llevar a cabo cualquier acción correctora oportuna. El gráfico más empleado es el de Shewhart.

Consiste en representar gráficamente los resultados obtenidos al analizar una muestra de manera consecutiva en el tiempo dentro de un gráfico de características determinadas.



En él se definen una serie de líneas en torno al valor teórico  $\bar{x}$  que cabe esperar para la muestra control:

Líneas de alerta o atención y de acción. Cuando el proceso, método, sistema de medida, etc. está bajo control cualquier resultado cae dentro de la línea de atención, es decir, los errores que concurren sobre una medida puntual son siempre iguales. Si en algún

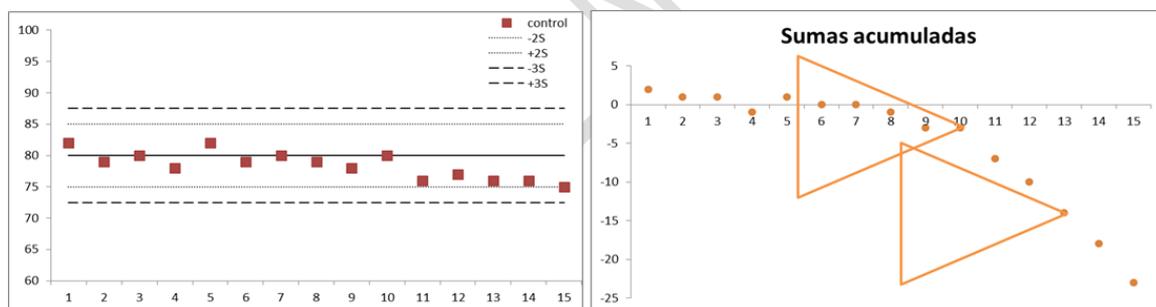
momento un resultado cae fuera de esta línea y cerca de la de acción, ello significa que el sistema está fuera de control y se debe detener e investigar las causas que conducen a esa situación.

### 5.2.1. Interpretación de los diagramas de control.

Nos encontramos en situación de alerta cuando:

1. El valor actual del control cae fuera de los límites de acción.
2. Un valor actual y su precedente caen fuera de los límites de atención, aunque dentro del límite de acción.
3. Nueve valores sucesivos caen del mismo lado de la media.

Un tipo diferente de diagrama de control es el diagrama de sumas acumuladas. Se construye con las sumas de las desviaciones de las medias muestrales del valor objetivo, acumuladas de atrás hacia delante. Básicamente, permite detectar cualquier variación en el sistema más rápidamente que empleando el diagrama de Shewhart simplemente. En estos diagramas también es interesante el empleo de lo que se conoce como un “delimitador V” que no es sino una plantilla o transportador que se coloca a determinada distancia del último punto representado sobre el diagrama con la “V” rotada  $-90^\circ$ . Se dice que el proceso está bajo control si todos los valores de sumas acumuladas caen dentro de los “brazos” de la V. En caso contrario el proceso/sistema/método se encuentra fuera de control.



## 6. PARÁMETROS ESTADÍSTICOS APLICADOS AL ANÁLISIS BIOLÓGICO.

### 6.1. ESPECIFICIDAD Y SENSIBILIDAD.

En el caso de diagnóstico de enfermedades se pueden realizar una serie de definiciones:

a) Eficiencia: “Fracción del total de experimentos en los que los resultados finales coinciden con los asignados en la inspección previa”

b) Especificidad analítica: Grado en que un método se ve afectado por los otros componentes de una muestra con múltiples componentes. Un método específico es en el que no se ve afectado por ninguno de los otros componentes. Se define la especificidad analítica como la fracción total del nº de muestras negativas asignado correctamente” es el grado en el que un ensayo no produce reacción cruzada con otros componentes. La especificidad analítica se evalúa utilizando un panel de muestras obtenidas de animales

que hayan estado expuestos a organismos relacionados que puedan estimular la reacción cruzada de los anticuerpos, o los sueros de animales con presentaciones clínicas similares

c) Sensibilidad analítica: es la cantidad más pequeña detectable del componente en cuestión. Se evalúa mediante el análisis de dilución de punto final, que indica la dilución del suero (cantidad) a la que el componente ya no es detectable, o al menos, no es distinguible de la actividad o de los sueros negativos. Esta cantidad cuantificada y conocida podría ser de un patrón interno o nacional/internacional de referencia o de una muestra de campo cuya concentración de analito se ha determinado. El momento más temprano en el que se puede detectar el anticuerpo tras la exposición a un agente infeccioso afecta a la sensibilidad analítica. Este efecto se puede deducir probando las muestras de sangre extraídas en serie de animales con exposición posterior al agente en cuestión. La sensibilidad analítica debe ser alta para conseguir la mayor probabilidad posible de detectar animales infectados. Si no se puede lograr una sensibilidad analítica muy alta, puede que el ensayo no sea apto como ensayo de análisis. Alternativamente, si el propósito del ensayo es la confirmación de otro procedimiento de diagnóstico independiente, se requiere que la especificidad analítica minimice la cantidad de reacción cruzada.

d) Desviación negativa: “Cuando el método alternativo da un resultado negativo sin confirmación y el método de referencia da un resultado positivo. Esta desviación se convierte en un resultado falso negativo cuando puede demostrarse que el resultado verdadero es positivo”.

e) Desviación positiva: “Cuando el método alternativo da un resultado positivo sin confirmación y el método de referencia da un resultado negativo. Esta desviación se convierte en un resultado falso positivo cuando puede demostrarse que el resultado verdadero es negativo”

## **6.2. CARACTERÍSTICAS DE UN ENSAYO DE DIAGNÓSTICO: SENSIBILIDAD Y ESPECIFICIDAD DIAGNÓSTICAS.**

Sensibilidad diagnóstica: Se define como “Fracción del nº total de muestras positivas correctamente asignado”.

Las pruebas diagnósticas se encuentran dentro de las categorías: positivo o negativo. La determinación de la sensibilidad y especificidad diagnósticas se realiza asociando los datos categóricos negativos/positivos con el estado infeccioso conocido de cada animal mediante una tabla (abajo) de dos direcciones ( $2 \times 2$ ). Después de establecer el corte, los resultados de las pruebas con sueros estándar se pueden clasificar como positivos verdaderos (PV) o negativos verdaderos (NV) si concuerdan con los resultados de la prueba de referencia (o con otros estándares de comparación). Alternativamente, se pueden clasificar como positivos falsos (PF) o como negativos falsos (NF) si no concuerdan con el estándar.

La sensibilidad de diagnóstico se calcula como  $VP/(VP+FN)$  mientras que la especificidad de diagnóstico es  $VN/(VN+FP)$ ; el resultado de ambos cálculos se expresa generalmente en porcentajes.

## **BIBLIOGRAFÍA**

J. C. Miller, J. N. Miller, *Statistics and chemometrics for analytical chemistry*, 6th ed., Pearson, Harlow, 2010, ISBN 978-0-273730422.

M. Valcárcel, S. Cárdenas, D. Barceló et al., *Metrology of qualitative chemical analysis*, report EUR 20605 EN, European Commission, 2002, ISBN 92-894-5194-7.

*Use of statistics to develop and evaluate analytical methods*. Grant T. Wernimont. Ed. A.O.A.C., W. Spendley ISBN: 0-935584-31-5.

*Estadística para biología y ciencias de la salud*. J. Susan Milton, Milton Tsokos, 1991 Ed. Interamericana-Mcgraw Hill, Madrid, España ISBN: 84-7605-366-5

*Análisis Químico Cuantitativo*. I.M. Kolthoff, E.B. Sandell, E.J. Meshan, Stanley Bruckenstein. Librería y Editorial Nigar S.R.L. 4ª Edición. Buenos Aires. ISBN 84-7359-042-2.

*Bioestadística amigable*. Elsevier Health Sciences, 2ª ED) Miguel Ángel Martínez González, Almudena Sánchez Villegas, Javier Faulin Fajardo Isbn: 9788491134077

**MATERIAL PARA LA PREPARACIÓN DEL TEMA 13**

**NORMATIVA DE SEGURIDAD E HIGIENE EN EL TRABAJO APLICABLE EN  
LOS LABORATORIOS DE CONTROL DE LA SANIDAD Y GENÉTICA ANIMAL.  
GESTIÓN EN PREVENCIÓN DE RIESGOS LABORALES. ISO 45001.**

*Este material no tiene carácter oficial, por lo que en ningún caso vinculará al Tribunal Calificador. Constituye, únicamente, un instrumento complementario que servirá de apoyo al opositor para enfocar cada uno de los epígrafes, pero nunca de forma exclusiva ni excluyente. El Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación no se hace responsable del contenido del mismo.*

*Los materiales no serán objeto de actualización constante.*

## ÍNDICE

### **1. INTRODUCCIÓN.**

### **2. CONCEPTOS.**

### **3. INSTRUMENTOS NORMATIVOS GENERALES QUE ACTÚAN EN EL CAMPO DE LA SEGURIDAD Y SALUD EN EL TRABAJO.**

3.1. LA CONSTITUCIÓN ESPAÑOLA DE 1978.

3.2. LA DIRECTIVA “MARCO” DE SEGURIDAD: DIRECTIVA 89/391.

3.3. EL RD LEGISLATIVO 2/2015 POR EL QUE SE APRUEBA EL TEXTO REFUNDIDO DEL ESTATUTO DE LOS TRABAJADORES.

3.4. LA LEY DE PREVENCIÓN DE RIESGOS LABORALES: LEY 31/95.

3.5. DIRECTIVAS COMUNITARIAS ESPECÍFICAS.

3.6. NORMAS REGLAMENTARIAS.

3.7. LAS GUÍAS Y NOTAS TÉCNICAS DE PREVENCIÓN DEL INSST.

### **4. RIESGOS LABORALES EN LABORATORIOS**

4.1. ELEMENTOS QUE DEFINEN EL RIESGO.

4.2. TIPOS BÁSICOS DE ACCIDENTES EN EL LABORATORIO.

### **5. GESTIÓN EN PREVENCIÓN DE RIESGOS LABORALES.**

5.1. PLAN DE PREVENCIÓN DE RIESGOS LABORALES.

5.2. EVALUACIÓN DE RIESGOS

5.3. PLANIFICACIÓN DE LA ACTIVIDAD PREVENTIVA

5.4. FORMACIÓN

5.5. INFORMACIÓN

5.6. CONSULTA Y PARTICIPACIÓN

5.7. COMUNICACIÓN INTERNA Y EXTERNA

5.8. CUMPLIMIENTO LEGAL

5.9. DOCUMENTACIÓN DEL SGPRL

5.10. CONTROL DE LAS OPERACIONES

5.11. INCIDENTES

5.12. NO CONFORMIDADES, ACCIONES CORRECTIVAS, PREVENTIVAS

5.13. Control de las emergencias

5.14. Seguimiento y medición

5.15. Auditorías

5.16. Revisión por la Dirección.

**6. NORMA ISO 45001: 2018. SISTEMAS DE GESTIÓN DE LA SEGURIDAD Y SALUD EN EL TRABAJO –REQUISITOS CON ORIENTACIÓN PARA SU USO-.**

MATERIAL NO OFICIAL

## 1. INTRODUCCIÓN.

Las actividades prácticas que se llevan a cabo en los laboratorios de sanidad y genética animal, conllevan en determinados casos un nivel de riesgo intrínseco, dependiendo del tipo de tarea que se esté desarrollando.

Los laboratorios son lugares de trabajo en los que se manipulan productos químicos o agentes biológicos peligrosos, lo que sumado a las operaciones específicas que se realizan, hace que normalmente presenten un determinado nivel de riesgo, tanto para la salud como para el medio ambiente. Son muchos los factores a tener en cuenta en el proceso de evaluación del riesgo de un laboratorio.

Hoy en día, teniendo en cuenta los diferentes sistemas de gestión ya implantados en los laboratorios, no debemos seguir trabajando con cada uno de ellos de forma independiente. Los sistemas o programas de gestión de calidad, de gestión ambiental y de Prevención de Riesgos Laborales (PRL) facilitan su implantación si se hace de forma integrada.

## 2. CONCEPTOS.

Antes de profundizar en este tema, es conveniente que tengamos claro una serie de conceptos:

**Higiene Industrial:** Es la técnica que estudiando, valorando y modificando el medio ambiente físico, químico o biológico del trabajo, previene la aparición de enfermedades laborales a los trabajadores expuestos. Es una técnica no médica de prevención de enfermedades laborales.

**Contaminante:** Es un producto químico, una energía o un ser vivo presente en el medio, que en cantidad o concentración suficiente pueden afectar la salud de las personas que entren en contacto con él.

**Riesgo:** Posibilidad de que un trabajador sufra un daño derivado del trabajo.

**Daños derivados del trabajo:** Patologías, enfermedades o lesiones sufridas con motivo del trabajo.

**Agente químico:** Sustancia orgánica o inorgánica, natural o sintética, que durante la fabricación, manejo, transporte, almacenamiento o uso, puede incorporarse al medio laboral, en forma de polvo, humo, gas o vapor, con efectos Irritantes, corrosivos, asfixiantes o tóxicos, y en cantidades que tengan probabilidad de lesionar la salud de las personas que entren en contacto con ellas.

**Agente biológico:** Los microorganismos, con inclusión de los genéticamente modificados, cultivos celulares y endoparásitos humanos, susceptibles de originar cualquier tipo de infección, alergia o toxicidad.

**Equipo de Protección Individual (EPI):** Cualquier equipo destinado a ser llevado o sujetado por el trabajador para que le proteja de uno o varios riesgos que puedan amenazar su seguridad o su salud, así como cualquier complemento o accesorio destinado a tal fin.

### **3. INSTRUMENTOS NORMATIVOS GENERALES QUE ACTÚAN EN EL CAMPO DE LA SEGURIDAD Y SALUD EN EL TRABAJO.**

La normativa e información relativa a la seguridad, salud e higiene en el trabajo es muy amplia. A continuación, pararemos a detallar los puntos más destacables de la normativa de referencia en este asunto:

#### **3.1. LA CONSTITUCIÓN ESPAÑOLA DE 1978.**

En la norma suprema del ordenamiento jurídico español se recoge en el artículo 40.2 lo siguiente: “Asimismo, los poderes públicos... velarán por la seguridad e higiene en el trabajo”.

Este mandato constitucional conlleva la necesidad de desarrollar una política de protección de la salud de los trabajadores mediante la prevención de los riesgos derivados de su trabajo, encontrando en la Ley 31/1995 de PRL su pilar fundamental.

#### **3.2. LA DIRECTIVA “MARCO” DE SEGURIDAD: DIRECTIVA 89/391/CEE, DE 12 DE JUNIO (DEL CONSEJO).**

Dicha directiva, relativa a la aplicación de medidas para promover la mejora de la seguridad y de la salud de los trabajadores en el trabajo, ha de considerarse como el eje de todo el entramado normativo en PRL dentro de la UE.

La Directiva “Marco” ha sido transpuesta a la legislación española a través de la Ley 31/1995 de P.R.L.

#### **3.3. EL RD LEGISLATIVO 2/2015 POR EL QUE SE APRUEBA EL TEXTO REFUNDIDO DEL ESTATUTO DE LOS TRABAJADORES.**

De manera similar a la Constitución española, en el Estatuto de los trabajadores se reconoce el derecho a la protección de la salud y la integridad física en el trabajo mediante el artículo 19: “Seguridad y salud en el trabajo”.

#### **3.4. LA LEY DE PREVENCIÓN DE RIESGOS LABORALES (LPRL): LEY 31/1995, DE 8 DE NOVIEMBRE.**

Como hemos comentado anteriormente, la Ley 31/1995 es la transposición al ordenamiento jurídico español de la Directiva Europea 89/391/CEE.

La presente ley tiene por objeto promover la seguridad y la salud de los trabajadores mediante la aplicación de medidas y el desarrollo de las actividades necesarias para la prevención de riesgos derivados del trabajo.

En el artículo 14 de esta ley se establece que “los trabajadores tienen derecho a una protección eficaz en materia de seguridad y salud en el trabajo”, lo cual, supone la existencia de un correlativo deber por parte del empresario de la protección de los trabajadores frente a los riesgos laborales.

La ley se basa en 3 aspectos importantes:

- **Prevención**, como indica el título de la ley, porque con ella se trata de evitar o disminuir los riesgos, y no meramente de proteger contra ellos o de reparar los daños causados.
- **Responsabilidad**, de los diferentes agentes implicados, fundamentalmente del empresario, en cuanto que es el responsable de la actividad de la que derivan los riesgos. Esta responsabilidad puede ser civil, penal o administrativa.
- **Participación**, como medio de garantizar la implicación de los trabajadores en el diseño, adopción y cumplimiento de las medidas de acción preventiva.

### **3.5. DIRECTIVAS COMUNITARIAS ESPECÍFICAS**

- Directiva 92/85/CEE del Consejo, de 19 de octubre de 1992, relativa a la aplicación de medidas para promover la mejora de la seguridad y de la salud en el trabajo de la trabajadora embarazada, que haya dado a luz o en período de lactancia (décima Directiva específica con arreglo al apartado 1 del artículo 16 de la Directiva 89/391/CEE).
- Directiva 94/33/CE del Consejo, de 22 de junio de 1994, relativa a la protección de los jóvenes en el trabajo.
- Directiva 91/383/CEE del Consejo, de 25 de junio de 1991, por la que se completan las medidas para mejorar la salud y la seguridad en el lugar de trabajo de los trabajadores temporales.

### **3.6. NORMAS REGLAMENTARIAS**

La LPRL prevé que el desarrollo de los aspectos concretos de la Seguridad y la Salud en el Trabajo se realice por medio de reglamentos, entre los cuales destacan por su importancia los siguientes:

- R.D. 485/97 sobre disposiciones mínimas en materia de señalización de seguridad y salud en el trabajo.
- R.D. 486/97 sobre disposiciones mínimas en materia de Seguridad y Salud en los lugares de trabajo.
- R.D. 487/97 sobre disposiciones mínimas de seguridad y salud relativas a la manipulación manual de cargas que entrañe riesgos, en particular dorso lumbares, para los trabajadores.
- R.D. 488/97 sobre disposiciones mínimas de seguridad y salud relativas al trabajo con equipos que incluyen pantallas de visualización.
- R.D. 664/97 sobre la protección de los trabajadores contra los riesgos relacionados con la exposición a agentes biológicos durante el trabajo.
- R.D. 665/97 sobre la protección de los trabajadores contra los riesgos relacionados con la exposición a agentes cancerígenos durante el trabajo.
- R.D. 773/97 sobre disposiciones mínimas de seguridad y salud relativas a la utilización por los trabajadores de equipos de protección individual y su modificación por el Real Decreto 1076/2021.

- R.D. 1215/97 por el que se establecen las disposiciones mínimas de seguridad y salud para la utilización por los trabajadores de los equipos de trabajo.
- R.D. 374/01 sobre la protección de la salud y seguridad de los trabajadores contra los riesgos relacionados con los agentes químicos durante el trabajo.
- R.D. 614/01 sobre disposiciones mínimas para la protección de la salud y seguridad de los trabajadores frente al riesgo eléctrico.
- R.D. 681/03 sobre la protección de la salud y la seguridad de los trabajadores expuestos a los riesgos derivados de atmósferas explosivas en el lugar de trabajo.
- R.D. 1311/05 sobre la protección de la salud y la seguridad de los trabajadores frente a los riesgos derivados o que puedan derivarse de la exposición a vibraciones mecánicas.
- R.D. 286/06 sobre la protección de la salud y la seguridad de los trabajadores contra los riesgos relacionados con la exposición al ruido.
- R.D. 396/06 por el que se establecen las disposiciones mínimas de seguridad y salud aplicables a los trabajos con riesgo de exposición al amianto.
- R.D.1879/96 por el que se regula la composición de la Comisión Nacional de Seguridad y Salud en el Trabajo.
- R.D. 39/97 por el que se aprueba el Reglamento de los Servicios de Prevención y sus modificaciones.
- RD 67/2010, de 29 de enero, de adaptación de la legislación de Prevención de Riesgos Laborales a la Administración General del Estado.

### **3.7. LAS GUÍAS Y NOTAS TÉCNICAS DE PREVENCIÓN (NTP) DEL INSTITUTO NACIONAL DE SEGURIDAD Y SALUD EN EL TRABAJO (INSST).**

El Instituto Nacional de Seguridad y Salud en el Trabajo (INSST) es el encargado de elaborar las **Guías Técnicas**, no vinculantes, para la facilitar la aplicación de los Reales Decretos que desarrollan la Ley de Prevención de Riesgos Laborales.

Entre estas Guías, aplicables en muchos de sus puntos a los laboratorios de sanidad y genética animal, destacamos las siguientes:

- Guía técnica sobre señalización de seguridad y salud en el trabajo.
- Guía técnica para la evaluación y prevención de los riesgos relacionados con agentes químicos.
- Guía técnica para la evaluación y prevención de los riesgos relacionados con la exposición a agentes biológicos.
- Guía técnica para la evaluación y prevención de los riesgos relacionados con la exposición a agentes cancerígenos o mutágenos durante el trabajo.
- Guía técnica para la evaluación y prevención del riesgo eléctrico.

- Guía técnica para la utilización por los trabajadores en el trabajo de equipos de protección individual.
- Guía técnica para la evaluación y prevención de los riesgos relativos a la utilización de los equipos de trabajo.

Por otro lado, el INSST también elabora las **Notas Técnicas de Prevención (NTP)** para ser usadas como herramientas técnicas de consulta por los profesionales de la PRL.

Estos documentos no son vinculantes, ni de obligado cumplimiento.

La empresa, en este caso, el laboratorio, está obligado a cumplir con las disposiciones normativas que le sean aplicables en cada momento, sean estatales, autonómicas o provenientes de la administración local. La colección de NTP pretende ayudar al cumplimiento de tales obligaciones, facilitando la aplicación técnica de las exigencias legales.

Destacaremos como importantes para los laboratorios de sanidad y genética animal algunas de ellas, aunque son diversas y numerosas:

- NTP 233: Cabinas de seguridad biológica.
- NTP 243: Ambientes cerrados: Calidad del aire.
- NTP 461: Seguridad en el laboratorio: características de peligrosidad de los productos químicos de uso más corriente
- NTP 376: Exposición a agentes biológicos: seguridad y buenas prácticas de laboratorio.
- NTP 398: Patógenos transmitidos por la sangre: un riesgo laboral.
- NTP 409: Contaminantes biológicos: criterios de valoración.
- NTP 411: Zoonosis de origen laboral.
- NTP 447: Actuación frente a un accidente con riesgo biológico.
- NTP 468: Trabajo con animales de experimentación.
- NTP 520: Prevención del riesgo biológico en el laboratorio: trabajo con virus.
- NTP 585: Prevención del riesgo biológico en el laboratorio: trabajo con bacterias.
- NTP 545: Prevención del riesgo biológico en el laboratorio: trabajo con parásitos.
- NTP 902: Riesgo biológico: evaluación y prevención en trabajos con cultivos celulares.
- NTP 739: Inspecciones de bioseguridad en los laboratorios
- NTP 987: Laboratorios químicos: clasificación y estimación de su peligrosidad (I)
- NTP 812: Riesgo biológico: prevención de accidentes por lesión cutánea.
- NTP 432: Prevención del riesgo en el laboratorio. Organización y recomendaciones generales.

Resulta también interesante en el entorno de los laboratorios, la presentación por parte del INSST de **DATABiO**. Se trata de una colección de fichas de los agentes biológicos potencialmente presentes en entornos laborales. Constituye una herramienta de gran utilidad para la evaluación, prevención y control del riesgo biológico en cualquier actividad laboral con dicho riesgo.

#### **4. RIESGOS LABORALES EN LABORATORIOS.**

Los riesgos existentes en un laboratorio dependen de forma general del tipo de productos, muestras a analizar e instalaciones existentes, pero, también de las tareas y operaciones desarrolladas en los mismos. De forma general, los trabajadores de un laboratorio llevan a cabo tareas rutinarias, realizan pruebas especiales o investigan en este tipo de instalaciones.

##### **4.1. ELEMENTOS QUE DEFINEN EL RIESGO**

Son muchos los factores que definen un riesgo, entre ellos:

- Naturaleza del contaminante: conjunto de características fisicoquímicas y tóxicas capaces de tener efectos nocivos para la salud. Pueden ser irritantes, asfixiantes, corrosivos, carcinógenos etc.
- Vía de entrada en el organismo: respiratoria, dérmica, digestiva y parenteral.
- Tiempo de exposición: tiempo real y efectivo durante el cual el contaminante ejerce su acción.
- Condiciones de Trabajo: sistemas de ventilación.

##### **4.2. TIPOS BÁSICOS DE ACCIDENTES EN EL LABORATORIO:**

El tipo de accidentes que se pueden dar de forma más frecuente en un laboratorio son:

###### **a) Accidentes consecuencia de las instalaciones, equipos y material de laboratorio.**

En el laboratorio, además de los riesgos intrínsecos de los productos químicos, cultivos biológicos y de los generados por las operaciones que con ellos se realizan, deben considerarse también los que tienen su origen en las instalaciones, material de laboratorio y equipos existentes en el mismo.

El laboratorio dispone de una serie de instalaciones o servicios generales de gas, agua, aire comprimido, vacío, electricidad, etc. de los cuales el responsable del laboratorio debe tener constancia que cumplen las normativas de carácter estatal, autonómico o local que les afecten, que se hallen en buen estado y estén sometidas a un mantenimiento adecuado que garantice tanto el cumplimiento de la reglamentación comentada, como un riesgo nulo o escaso de provocar daños al personal que las utiliza en su trabajo en el laboratorio.

**b) Accidentes y enfermedades como consecuencia de los productos químicos con los que se trabaja.**

Según el RD 374/2001, de 6 de abril, sobre la protección de la salud y seguridad de los trabajadores contra los riesgos relacionados con los agentes químicos durante el trabajo, el empresario está obligado a determinar si existen agentes químicos peligrosos en el lugar de trabajo; y si así fuera, a evaluar los riesgos para la salud y seguridad de los trabajadores, originados por dichos agentes y aplicar las medidas de prevención adecuadas.

El contenido que debe incluir tanto la etiqueta como la ficha de seguridad para que un producto químico pueda ser comercializado en la Unión Europea, viene definido en dos normativas: el RD 363/1995 y modificaciones posteriores, para sustancias químicas, y el RD 255/2003 para preparados peligrosos.

El RD 665/1997 sobre la protección de los trabajadores contra los riesgos relacionados con la exposición de agentes cancerígenos en el lugar de trabajo, define las medidas de prevención y protección a adoptar para evitar los efectos de la exposición a compuestos cancerígenos.

El RD 349/2003 amplía el ámbito de aplicación del RD 665/1997 de agentes cancerígenos a agentes mutagénicos.

**c) Accidentes por el uso de instalaciones de gases o botellas de gases.**

La manipulación de gases puede tener lugar, básicamente, en dos circunstancias concretas: operando directamente con las botellas de gases a presión o bien con una instalación fija. En el primer caso las precauciones a tener en cuenta son mayores ya que implica una serie de operaciones: fijación de la botella, purga, conexión, apertura del grifo, operaciones con el manorreductor, etc., y que se realizan más frecuentemente que cuando se dispone de una instalación de gases. Las instalaciones de gases sirven para disponer de gas de una forma continuada y sin interrupciones, eliminando el trasiego de botellas por el laboratorio, mejorando con ello las condiciones de seguridad.

**d) Infecciones por la manipulación de muestras biológicas.**

En laboratorios clínicos, veterinarios, de diagnóstico y de investigación, el trabajo con muestras biológicas puede implicar riesgo de infecciones por virus, bacterias, parásitos y hongos transmisores de enfermedades, así como por el contacto con animales de experimentación.

El RD 664/1997, de 12 de mayo, sobre la protección de los trabajadores contra los riesgos relacionados con la exposición a agentes biológicos durante el trabajo, establece las disposiciones mínimas aplicables a las actividades en la que los trabajadores estén o puedan estar expuestos a agentes biológicos debido a la naturaleza de la actividad laboral (entre las que se incluye los laboratorios clínicos, veterinarios, de diagnóstico y de investigación). En él se definen las obligaciones que tiene la empresa para prevenir los riesgos para la salud humana y medio ambiente.

## **5. GESTIÓN EN PREVENCIÓN DE RIESGOS LABORALES.**

Como ya hemos comentado, por sus propias características, el trabajo en el laboratorio presenta una serie de riesgos de origen y consecuencias muy variadas, relacionados básicamente con las instalaciones, los productos que se manipulan y las operaciones que se realizan con ellos. En consecuencia, la prevención de los riesgos en el laboratorio presenta unas características propias que la diferencian de otras áreas productivas.

A partir de la LPRL y más concretamente con su posterior modificación: Ley 54/2003, de reforma del marco normativo de la prevención de riesgos laborales, se concreta que “la prevención de riesgos laborales deberá integrarse en el sistema general de gestión de la empresa”. Esta necesidad de integración en la gestión de la empresa se concreta en el Reglamento de los servicios de prevención, gracias a su modificación por el RD 604/2006.

La implantación de criterios para el aseguramiento de la calidad, normalmente lleva implícita la aplicación de una política de seguridad. La experiencia demuestra que los laboratorios que han implantado una política de calidad presentan un elevado nivel de seguridad.

El **Sistema de Gestión en Prevención de Riesgos Laborales (SGPRL)** es un instrumento para organizar y diseñar procedimientos y mecanismos dirigidos al cumplimiento estructurado y sistemático de todos los requisitos establecidos en la legislación de prevención de riesgos laborales. Está compuesto por un conjunto de elementos interrelacionados o interactivos que tienen como objeto establecer unas directrices y unos objetivos en prevención de riesgos laborales.

Como en cualquier sistema de gestión, para que funcione, la organización ha de establecerlo, documentarlo, implantarlo, mantenerlo y mejorarlo de forma continua, llevando a cabo, para ello, como mínimo las siguientes acciones:

### **5.1. PLAN DE PREVENCIÓN DE RIESGOS LABORALES.**

Con la Ley 54/2003 de reforma del marco normativo de la prevención de riesgos laborales, se modifica el artículo 14.2 de la Ley 31/95 de P.R.L. para destacar que, en el marco de sus responsabilidades, el empresario realizará la prevención de riesgos laborales mediante la integración de la actividad preventiva en la empresa, que se concretará con la implantación y aplicación de un Plan de PRL.

El **Plan de Prevención de Riesgos Laborales** es el documento a través del cual las empresas van a integrar la prevención y las políticas en su sistema general de gestión, tanto en todos los niveles jerárquicos, como en las actividades que se desarrollen.

El Plan lo deberemos reflejar en un documento que ha de tenerse a disposición de la Autoridad Laboral, Sanitaria y los representantes de las personas trabajadoras (como los delegados de prevención), ha de estar aprobado por la dirección y asumido por toda su estructura organizativa, así como conocido por las personas trabajadoras.

Aunque el laboratorio disponga del comité de salud y seguridad, de un servicio de prevención, etc., es responsabilidad del director del mismo el desarrollo de la gestión de prevención de riesgos, debiendo tenerse en cuenta lo dispuesto al respecto por la Ley 31/1995 de Prevención

de Riesgos Laborales y el Reglamento de los Servicios de Prevención (RD 39/1997), tanto en lo que afecta a los trabajadores de plantilla del laboratorio, como para aquellos externos que desarrollen sus actividades en el mismo de manera esporádica, temporal o fija.

El Plan de prevención de riesgos laborales deberá incluir:

- La estructura organizativa
- Las responsabilidades.
- Las funciones
- Las prácticas.
- Los procedimientos.
- Los procesos.
- Los recursos necesarios para realizar la acción de prevención de riesgos en el laboratorio.

Será de extensión reducida y fácil comprensión, plenamente adaptado a la actividad del laboratorio.

Para la implantación del Plan y la consecución de los objetivos fijados, estableceremos un documento: **Programación Anual del Servicio de Prevención**, en el que incluiremos, al menos:

- Las actividades generales (formativas, informativas, adecuaciones de puestos y entorno, etc.) a llevar a cabo en materia de prevención de riesgos.
- La asignación de responsabilidades y autoridad para lograr los objetivos en las funciones y niveles pertinentes de la organización, así como los medios y plazos para lograr estos objetivos.

Revisaremos los programas periódicamente y de forma planificada, ajustando los mismos, según sea necesario, para asegurar que estamos alcanzando nuestros objetivos.

## **5.2. EVALUACIÓN DE RIESGOS.**

La evaluación de riesgos es el proceso dirigido a estimar la magnitud de aquellos riesgos que no hayamos podido evitar, obteniendo la información necesaria para poder saber si es necesario adoptar medidas preventivas y, en ese caso, determinar el tipo de medidas a adoptar.

A la hora de abordar el proceso de evaluación de riesgos deberemos tener en cuenta una serie de factores:

- Es recomendable que el proceso sea abordado por un equipo multidisciplinar; con técnicos de prevención de todas las disciplinas (seguridad, higiene, ergonomía y psicología y medicina del trabajo).
- Se deberá garantizar la participación y consulta de las personas trabajadoras y/o sus representantes, a través de los canales que se hayan establecido en el laboratorio.

- En el caso de emplear información relativa a diagnósticos médicos de las personas trabajadoras, ha de tratarse como información confidencial, con lo que no trascenderá más allá de los servicios médicos y autoridades sanitarias competentes, salvo que exista una autorización expresa por parte de la persona trabajadora debidamente documentada y formalizada.
- Es posible que, derivado del proceso de evaluación, se ponga de manifiesto la necesidad de un estudio más profundo de alguno de los puestos evaluados o incluso adaptaciones de los mismos con el fin de garantizar la adecuación entre puesto de trabajo/persona trabajadora. Estos procesos se deberán llevar a cabo de forma individualizada.

El laboratorio debe de haber realizado la evaluación inicial de riesgos y actualizarla cuando cambien las condiciones de trabajo, y siempre que se detecten daños para la salud. Como guía para la evaluación de los riesgos en el laboratorio se pueden considerar los siguientes factores de riesgo:

- Desconocimiento de las características de peligrosidad de las sustancias.
- Empleo de métodos y procedimientos de trabajo intrínsecamente peligrosos.
- Malos hábitos de trabajo.
- Empleo de material de laboratorio inadecuado o de mala calidad.
- Instalaciones defectuosas.
- Diseño no ergonómico y falta de espacio.
- Contaminación ambiental.

### **5.3. PLANIFICACIÓN DE LA ACTIVIDAD PREVENTIVA.**

Una vez realizada la evaluación de riesgos, si ésta pone de manifiesto situaciones de riesgo, deberemos elaborar un nuevo documento: la **planificación de la actividad preventiva**, que nos ayude a planificar la realización de las medidas que hayamos propuesto para poder eliminar, controlar y reducir dichos riesgos.

Tendremos en cuenta que, para reducir los riesgos, deberemos seguir el siguiente orden de preferencias:

- 1º Eliminar
- 2º Sustituir
- 3º Diseñar controles
- 4º Utilización de protección colectiva
- 5º Utilización de Equipos de Protección Individual.

#### **5.4. FORMACIÓN.**

Deberemos garantizar que cada persona trabajadora reciba una adecuada formación teórica y práctica, suficiente y adecuada, en materia preventiva, tanto en el momento de su contratación, cualquiera que sea la modalidad o duración de ésta, como cuando se produzcan cambios en las funciones que desempeñe o se introduzcan nuevas tecnologías o cambios en los equipos de trabajo.

Asimismo, nos aseguraremos que cualquier persona que trabaje para la organización (personal propio o contratado) y que realice tareas que puedan causar daños a terceros o en las instalaciones, sea competente. A tal efecto, nos aseguraremos que las personas trabajadoras dispongan de una adecuada educación, formación o experiencia, en función de las actividades realizadas y los riesgos presentes a los que se encuentren expuestos, debiendo quedar acreditados estos requisitos mediante registros adecuados.

#### **5.5. INFORMACIÓN**

Después de las actividades de formación, las relativas a la información se configuran como uno de los factores claves para la incorporación de las personas trabajadoras al entorno laboral, así como para garantizar el desarrollo del trabajo en condiciones aceptables de seguridad. Estas actividades van a tener la finalidad de dar a conocer a las personas trabajadoras y hacerles conscientes acerca de las circunstancias del trabajo y el entorno en el que se éste se desarrolla, focalizando en los riesgos, medidas preventivas y de protección y de emergencia asociadas.

#### **5.6. CONSULTA Y PARTICIPACIÓN.**

La Ley de Prevención, nos impone un deber de consulta, participación y representación en materia preventiva (canalizada a través de la figura de los Delegados de Prevención con sus competencias y facultades: art. 36 LPRL).

Así pues, para dar cumplimiento a este requisito, deberemos asegurar que implantamos una sistemática de trabajo (puede ser a través del diseño de uno o varios procedimientos) que nos asegure:

- La participación de las personas trabajadoras mediante su:
  - Involucración en la identificación de los peligros, la evaluación de riesgos y la determinación de los controles necesarios,
  - participación en la investigación de incidentes,
  - involucración en el desarrollo y la revisión de las políticas y objetivos del SGPRL,
  - consulta cuando haya cualquier cambio que afecte al SGPRL o
  - representación en materia de prevención de riesgos laborales.
- La consulta con los partes externas interesadas cuando haya cambios que les afecten en el SGPRL.

## **5.7. COMUNICACIÓN INTERNA Y EXTERNA.**

Debemos establecer, implementar y mantener uno o varios procedimientos que nos ayuden a gestionar:

- La comunicación interna entre los diversos niveles y funciones de nuestra empresa.
- La comunicación con los contratistas y otros visitantes de nuestra empresa.
- La recepción, documentación y respuesta a las comunicaciones externas, en relación con los riesgos para la seguridad y salud de las personas trabajadoras bajo nuestro control (propio y subcontratado) y los requisitos de nuestro SGPR.

Deberíamos comunicar de manera eficaz toda información relativa a nuestros riesgos, así como la relevante de nuestro SGPR a todas las personas involucradas o afectadas, para que de esta forma puedan apoyar o participar activamente en la aplicación efectiva del mismo.

A la hora de llevar a cabo la comunicación, tendremos en cuenta:

- Receptores (personas trabajadoras y personal externo) y sus necesidades de información.
- Métodos y medios más apropiados.
- Cultura, estilos preferidos y tecnologías disponibles.
- Complejidad, estructura y tamaño del laboratorio.
- Requisitos legales y otros requisitos suscritos por el Laboratorio.
- Eficacia de los distintos modos y flujos de comunicación entre todas las funciones y niveles.

## **5.8. CUMPLIMIENTO LEGAL**

Toda organización deber disponer de procesos que le aseguren que sea identificado cualquier requisito en PRL (tanto legales como otros requisitos de No obligado cumplimiento y adhesión voluntaria), que tengan acceso continuo y asegurado a los mismos, y que se vigile que todos se cumplan de forma adecuada.

## **5.9. DOCUMENTACIÓN DEL SGPR**

Para asegurar la trazabilidad y la adecuación de nuestro sistema en el tiempo, va a ser importante que el mismo se encuentre documentado (en formato papel y/o electrónico). Asimismo, es muy importante tener en cuenta que esta documentación ha de ser siempre proporcional al nivel de complejidad y riesgos, y que es recomendable mantenerla al mínimo requerido para alcanzar la eficacia, eficiencia y el cumplimiento legal.

La documentación de nuestro SGPR debería incluir como mínimo los siguientes documentos, asegurando siempre, la accesibilidad de los mismos (ubicación, tipología de caracteres, contrastes cromáticos, etc.):

- Política y objetivos.
- Alcance.

- Elementos principales del sistema de gestión y su interacción, así como la referencia a los documentos relacionados.
- Procedimientos documentados para dar cumplimiento a los requisitos de aplicación.
- Documentos requeridos.
- Documentos, incluyendo los registros, determinados por el laboratorio como necesarios para asegurar la eficacia de la planificación, operación y control.

Similar a un sistema de gestión de la calidad, debe existir una gestión de dichos documentos en cuanto a:

- Elaboración.
- Codificación
- Revisión.
- Aprobación.
- Distribución.
- Revisión y actualización.

#### **5.10. CONTROL DE LAS OPERACIONES**

Debemos identificar todas aquellas situaciones, entornos y actividades del laboratorio, en las que, en base a los riesgos presentes, a la complejidad de las actividades o a las características de las personas trabajadoras, sea necesario el establecimiento de controles para asegurarnos que las mismas se desarrollan sin riesgos no asumibles.

Para estas situaciones, entornos y actividades, diseñaremos una serie de medidas tendentes a controlar las mismas, tales como procedimientos documentados que establezcan las pautas a seguir, normas de trabajo seguras, etc.

#### **5.11. INCIDENTES**

Un **Incidente** es cualquier suceso o sucesos relacionados con el trabajo en el cual ocurre o podría haber ocurrido un daño, o deterioro de la salud o una fatalidad. Es importante tener en cuenta el matiz de que no es necesario que se materialice el efecto del incidente para considerarlo como tal.

Un **accidente de trabajo**, es un tipo de incidente, que legalmente (Ley General de la Seguridad Social) se puede definir como toda lesión corporal que suframos con ocasión o por consecuencia del trabajo que ejecutemos por cuenta ajena. Es decir, que, salvo prueba en contrario, serán accidente de trabajo las lesiones que sufra la persona trabajadora durante el tiempo y en el lugar del trabajo.

Hay que tener en cuenta que no sólo serán incidentes aquellos en los que se hayan producido daños personales (como una caída), sino que debemos considerar como tal, todo suceso indeseado, que haya materializado daños o no en la salud de las personas trabajadoras, como:

- Fallos en los sistemas de aviso en caso de emergencia (en el sistema acústico y/o luminoso)
- Defectos en las rampas de acceso a los edificios.
- Caídas por firme no uniforme, etc.

Es recomendable establecer, implementar y mantener un procedimiento para registrar, investigar, analizar y notificar (interna y externamente para accidentes y enfermedades profesionales) los incidentes para ayudar a:

- Investigar sobre las deficiencias del SGPR y otros factores que podrían causar o contribuir a su aparición.
- Identificar las acciones correctivas y preventivas para evitar su repetición.
- Documentar las investigaciones y registrar los incidentes de trabajos acaecidos.
- Comunicar los resultados de las investigaciones, tanto a nivel interno como externo.
- Asegurarnos que las personas trabajadoras han recibido la información básica, comprensible, sobre la actuación en caso de incidente (qué hacer, nombre de la Mutua, centros asistenciales, teléfonos de contacto, etc.).

Las investigaciones, que deben quedar documentadas, se deben hacer en el momento oportuno y por las personas necesarias en la organización (con formación y relación directa con el incidente), así como contar con la participación de los representantes de las personas trabajadoras.

#### **5.12. NO CONFORMIDADES, ACCIONES CORRECTIVAS, PREVENTIVAS**

Una **No Conformidad**, en el marco de un Sistema de Gestión, es un incumplimiento de uno o varios de los requisitos del mismo, como por ejemplo, incumplimientos en los procedimientos, normas o instrucciones de trabajo, en los requisitos legales de aplicación, etc.

Como parte de las acciones de mejora continua del SGPR, se ha de establecer, implementar y mantener un procedimiento para la gestión de las no conformidades que puedan presentarse. En este procedimiento definiremos las acciones a llevar a cabo para identificar, revisar y corregir las no conformidades (incluyendo las posibles quejas de los usuarios) acaecidas y potenciales, y tomar acciones para mitigar sus consecuencias.

Como **Acción Correctiva y Preventiva**, podemos entender toda aquella acción implantada para eliminar la causa de una no conformidad detectada u otra situación indeseable o, para prevenir que algo vuelva a producirse o suceda, respectivamente.

Como parte de las acciones de mejora continua del SGPR, se ha de establecer, implementar y mantener un procedimiento para la gestión de las acciones correctivas y preventivas diseñadas para el tratamiento de las no conformidades.

En este procedimiento definiremos las acciones a llevar a cabo para:

- Eliminar las causas de las no conformidades del SGPRL acaecidas con el objeto de prevenir que vuelvan a ocurrir.
- Determinar acciones para eliminar las causas de las no conformidades potenciales para prevenir su ocurrencia.
- Implantar las acciones necesarias.
- Registrar y comunicar los resultados de las acciones correctivas y preventivas tomadas.
- Revisar la eficacia de las acciones correctivas y preventivas tomadas y evaluar su eficacia.

### **5.13. CONTROL DE LAS EMERGENCIAS**

Toda empresa, teniendo en cuenta su tamaño y actividad, así como la posible presencia de personas ajenas a la misma, deberá analizar las posibles situaciones de emergencia y adoptar las medidas necesarias en materia de primeros auxilios, lucha contra incendios y evacuación de las personas trabajadoras, designando para ello al personal encargado de poner en práctica estas medidas y comprobando periódicamente, en su caso, su correcto funcionamiento.

Para poder ejecutar esta serie de acciones de forma adecuada, es recomendable, dentro de nuestro SGPRL, establecer, implementar y mantener un procedimiento que nos ayude a:

- Identificar las posibles situaciones de emergencia a las que se pueda enfrentar la empresa (incendios, inundaciones, etc.).
- Diseñar medidas de actuación para combatir las situaciones de emergencia identificadas (secuencia de actuaciones, medios humanos y materiales, etc.). Nos aseguraremos que la sistemática diseñada alcance a todas las personas trabajadoras que prestan servicios en la empresa o sus centros de trabajo y cualquier persona u organización externa a la empresa (vecinos, visitas, servicios de emergencia, contratistas, etc.) independientemente de su edad o posible discapacidad.
- Asegurar que el personal designado para las emergencias posea formación, sea suficiente en número y disponga del material adecuado.
- Dar a conocer a las personas trabajadoras de la empresa, así como a visitas o subcontratas, las pautas de actuación diseñadas (evacuación, señalización...).
- Organizar las relaciones que sean necesarias con servicios externos al laboratorio, en particular en materia de primeros auxilios, asistencia médica de urgencia, salvamento y lucha contra incendios, de forma que quede garantizada la rapidez y eficacia de las mismas.
- Comprobar periódicamente la eficacia de las medidas diseñadas (cuando sea factible, implicando a las partes interesadas pertinentes), en especial, si se han producido situaciones reales y las medidas diseñadas no han sido efectivas.
- Responder a las situaciones reales de emergencia previniendo y mitigando las consecuencias adversas asociadas.

#### **5.14. SEGUIMIENTO Y MEDICIÓN**

Las actividades de seguimiento y medición son todas aquellas que nos van a permitir obtener información periódica de la correcta aplicación y funcionamiento del SGPRL, así como de la percepción de los usuarios del entorno con respecto al cumplimiento de sus necesidades por parte de la organización.

Mediante el seguimiento y la medición sabremos si se están cumpliendo los objetivos, si nuestros usuarios perciben como accesibles los procesos y el entorno, si los procedimientos definidos son adecuados, etc., de forma que su análisis nos facilite la toma de decisiones en relación al establecimiento de cambios, diseño e impulso de acciones correctivas y acciones preventivas para adecuar nuestro SGPRL a los requisitos de diseño.

#### **5.15. AUDITORÍA**

La auditoría es un instrumento de gestión que persigue reflejar la imagen fiel del sistema de prevención de riesgos laborales del laboratorio, valorando su eficacia y detectando las deficiencias que puedan dar lugar a incumplimientos de la normativa vigente, para permitir la adopción de decisiones dirigidas a su perfeccionamiento y mejora. Se van a tener que implantar dos tipos de auditoría:

- Externa o reglamentaria: que aplica a los requisitos en materia de PRL. Se podrá extender también a todo en SGPRL en base a los requisitos de las Normas en las que hayamos basado nuestro SGPRL.
- Interna: que se extendería a todo el SGPRL.

La realización de las auditorías externas en materia de prevención de riesgos laborales está regulada por el Reglamento (RD 39/1997) de los servicios de prevención.

Se deberán llevar a cabo auditorías internas periódicas con el objeto de determinar si el SGPRL es conforme a las disposiciones planificadas, así como para poder saber si es adecuado y eficaz para cumplir la política y los objetivos establecidos.

Para ello:

- Se establecerá un procedimiento documentado que incluya la sistemática a aplicar, las responsabilidades, las competencias y requisitos para la planificación y la realización de las auditorías, para informar de los resultados y para mantener los registros.
- Se diseñará un programa periódico de auditorías (p. ej. anuales) tomando en consideración, como mínimo, el estado y la importancia de las limitaciones de accesibilidad que presente la empresa, su entorno y los trabajos desarrollados, así como los resultados de las evaluaciones de riesgos de las actividades y de auditorías previas realizadas.
- Se definirán los criterios de la auditoría, el alcance, la frecuencia y la metodología.
- Se llevará a cabo la selección de los auditores, que podrán ser personal interno o externo, de forma que se asegure siempre la objetividad e imparcialidad del proceso, teniendo en cuenta que los auditores no podrán tener responsabilidad directa sobre las áreas auditadas.

- El resultado del proceso se plasmará en un informe y se generará un plan de acciones correctoras para eliminar las no conformidades detectadas y sus causas. La Dirección del área auditada, o la persona responsable en base a la asignación interna, se asegurará que las acciones se tomen sin demora injustificada.
- Las actividades de seguimiento deberán incluir la verificación de las acciones tomadas y el informe de los resultados de la verificación.
- Se proporcionará a la Dirección información sobre los resultados de las auditorias.
- El informe establecerá conclusiones acerca de si el SGPRLI es conforme a las disposiciones planificadas, se ha implantado adecuadamente y se mantiene eficazmente, y si es adecuado y eficaz para cumplir la política y los objetivos establecidos.

#### **5.16. REVISIÓN POR LA DIRECCIÓN**

Nuestro SGPRL debe incluir una revisión periódica, a intervalos planificados, por la Alta Dirección de nuestra organización (p. ej. anualmente) para asegurar su conveniencia, adecuación, eficacia y mejora continua.

### **6. NORMA ISO 45001: 2018. SISTEMAS DE GESTIÓN DE LA SEGURIDAD Y SALUD EN EL TRABAJO: REQUISITOS CON ORIENTACIÓN PARA SU USO**

La Norma ISO 45001 es la primera norma internacional que determina los requisitos básicos para implementar un Sistema de Gestión de Seguridad y Salud en el Trabajo (SST). La Norma se ha desarrollado con objeto de ayudar a las organizaciones a proporcionar lugares de trabajo seguros y saludables, previniendo las lesiones y el deterioro de la salud relacionados con el trabajo, así como para contribuir a una mejora continua en el desempeño de la SST.

Esta Norma es aplicable a cualquier organización que desee establecer, implementar y mantener un sistema de gestión de la SST para mejorar la seguridad y salud en el trabajo, eliminar los peligros y minimizar los riesgos para la SST (incluyendo las deficiencias del sistema), aprovechar las oportunidades para la SST y abordar las no conformidades del sistema de gestión de la SST asociadas a sus actividades.

Este documento ayuda a una organización a alcanzar los resultados previstos de su sistema de gestión de la SST. En coherencia con la política de la SST de la organización, los resultados previstos de un sistema de gestión de la SST incluyen:

- a) la mejora continua del desempeño de la SST;
- b) el cumplimiento de los requisitos legales y otros requisitos;
- c) el logro de los objetivos de la SST.

La Norma es aplicable a los riesgos para la SST bajo el control de la organización, teniendo en cuenta factores tales como el contexto en el que opera la organización y las necesidades y expectativas de sus trabajadores y otras partes interesadas.

Este documento no establece criterios específicos para el desempeño de la SST, ni para el diseño de un sistema de gestión de la SST, tampoco aborda cuestiones tales como la seguridad del producto, los daños a la propiedad o los impactos ambientales, más allá de los riesgos para los trabajadores y para otras partes interesadas pertinentes.

La Norma 45001 permite a las empresas desarrollarla de forma integrada con los requisitos establecidos en otras normas como la Norma ISO 9001 y la Norma ISO 14001.

El enfoque del sistema de gestión de la SST aplicado en este documento se basa en el concepto de Planificar-Hacer-Verificar-Actuar (PHVA). El concepto PHVA es un proceso iterativo utilizado por las organizaciones para lograr la mejora continua.

Los Capítulos 1 a 3 de la presente Norma, presentan el objeto y campo de aplicación, las referencias normativas y los términos y definiciones que se aplican para el uso de este documento, mientras que los Capítulos 4 a 10 contienen los requisitos a utilizar para evaluar la conformidad con este documento. El Anexo A proporciona explicaciones informativas relativas a estos requisitos.

Pasaremos a comentar brevemente, los aspectos más destacables de los Capítulos del 4 al 10:

#### **Capítulo 4: Contexto de la Organización.**

La Norma considera que los resultados de seguridad y salud en el trabajo se ven afectados por diversos factores internos y externos (que pueden ser de carácter positivo, negativo o ambos), tales como: las expectativas de los trabajadores, las instalaciones, las contratistas, los proveedores, la normativa que afecta a la actividad, etc.

#### **Capítulo 5: Liderazgo y participación de los trabajadores.**

Destaca como aspectos claves el liderazgo de la Dirección y la participación de los trabajadores. Los considera imprescindibles para gestionar el sistema de modo adecuado y para poder optimizar los resultados en seguridad y salud.

#### **Capítulo 6: Planificación.**

Comprende las acciones previstas para abordar riesgos y oportunidades. Alcanzarán las relativas a la seguridad y salud, y al propio sistema de gestión. Asimismo, para la consecución de estas acciones deberán de definirse objetivos y medios para lograrlas.

#### **Capítulo 7: Apoyo.**

Establece la necesidad de determinar los medios necesarios para conseguir la planificación mediante recursos, competencia, toma de conciencia y comunicación. El resultado de este requerimiento debe estar soportado de forma documental.

#### **Capítulo 8: Operación**

En función de lo planificado, se ejecutarán las medidas previstas, para lo cual se deberá adoptar una visión proactiva, en la que entre otros, se tendrá en cuenta la gestión del cambio (modificaciones de los procesos, novedades...) y otros factores como el recurso a contratación externa, compras, etc.

**Capítulo 9: Evaluación del desempeño**

Verifica la implantación del sistema de gestión de seguridad y salud. Para ello, requiere auditorías internas y la revisión de la Dirección, entre otras.

**Capítulo 10: Mejora**

Su consecución es el objetivo final del sistema y el fundamento del ciclo PDCA.

MATERIAL NO OFICIAL

## **BIBLIOGRAFÍA.**

Ley 31/1995, de 8 de noviembre, de prevención de Riesgos Laborales.

Directiva del Consejo, de 12 de junio de 1989, relativa a la aplicación de medidas para promover la mejora de la seguridad y de la salud de los trabajadores en el trabajo.

Real Decreto 39/1997, de 17 de enero, por el que se aprueba el Reglamento de los Servicios de Prevención.

Real Decreto 374/2001, de 6 de abril, sobre la protección de la salud y seguridad de los trabajadores contra los riesgos relacionados con los agentes químicos durante el trabajo.

Real Decreto 665/1997, de 12 de mayo, sobre la protección de los trabajadores contra los riesgos relacionados con la exposición a agentes cancerígenos durante el trabajo.

Real Decreto 773/1997, de 30 de mayo, sobre disposiciones mínimas de seguridad y salud relativas a la utilización por los trabajadores de equipos de protección individual.

Real Decreto Legislativo 2/2015, de 23 de octubre, por el que se aprueba el texto refundido de la Ley del Estatuto de los Trabajadores.

Ley 54/2003, de 12 de diciembre, de reforma del marco normativo de la prevención de riesgos laborales.

Real Decreto 664/1997, de 12 de mayo, sobre la protección de los trabajadores contra los riesgos relacionados con la exposición a agentes biológicos durante el trabajo.

Guía para conseguir una prevención de riesgos laborales inclusiva en las organizaciones, publicada por la Comunidad de Madrid.

Norma ISO 45001: 2018. Sistemas de Gestión de la Seguridad y Salud en el trabajo -Requisitos con orientación para su uso-.

## **MATERIAL PARA LA PREPARACIÓN DEL TEMA 14**

### **TRANSPORTE DE MATERIAL BIOLÓGICO: CONDICIONES Y LEGISLACIÓN APLICABLE.**

*Este material no tiene carácter oficial, por lo que en ningún caso vinculará al Tribunal Calificador. Constituye, únicamente, un instrumento complementario que servirá de apoyo al opositor para enfocar cada uno de los epígrafes, pero nunca de forma exclusiva ni excluyente. El Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación no se hace responsable del contenido del mismo.*

*Los materiales no serán objeto de actualización constante.*

## **ÍNDICE**

### **1. TRANSPORTE DE MATERIAL BIOLÓGICO**

1.1. INTRODUCCIÓN

1.2. RESPONSABILIDADES

### **2. CONDICIONES DE TRANSPORTE**

2.1. DEFINICIONES

2.2. CLASIFICAR Y CATEGORIZAR

2.3. PREPARACIÓN DE ENVÍO PARA SU TRANSPORTE

2.3.1. EMBALAJE

2.3.2. EMBALAJE CATEGORÍA A

2.3.3. EMBALAJE CATEGORÍA B

2.3.4. EMBALAJE SUSTANCIAS EXENTAS

2.3.5. TRANSPORTE CON CADENA DE FRÍO

### **3. LEGISLACIÓN APLICABLE**

3.1. NORMATIVA INTERNACIONAL

3.2. OMGs

3.3. NORMATIVA NACIONAL

## **1. TRANSPORTE DE MATERIAL BIOLÓGICO.**

### **1.1. INTRODUCCIÓN**

El trabajo con agentes biológicos desempeña un papel clave en la detección y prevención de brotes de enfermedades emergentes y altamente infecciosas, así como en la reducción de otros riesgos para la seguridad sanitaria internacional. Este trabajo incluye actividades de diagnóstico, investigación biomédica y fabricación de productos farmacéuticos. Las instalaciones que manipulan agentes biológicos tienen la responsabilidad de garantizar que los agentes biológicos sean identificados, almacenados y se controlen de forma segura en instalaciones adecuadamente equipadas, de acuerdo con las buenas prácticas. Mientras se transportan materiales que contengan agentes biológicos, existe la posibilidad de exposición para las personas y el medio ambiente por el que pasa el material, por eso, para controlar y reducir adecuadamente este riesgo, varios grupos internacionales han desarrollado recomendaciones o reglamentaciones (o ambas) que describen la forma en que las sustancias infecciosas deben ser envasadas, marcadas, etiquetadas y documentadas, para garantizar la seguridad y su contención durante todo el proceso de transporte.

### **1.2 RESPONSABILIDADES.**

Todas las personas que participen de algún modo en la gestión del transporte deben conocer la normativa que a diferentes escalas afecta a ese transporte, y estarán capacitados y acreditados para llevarlo a cabo. Esto incluye al personal involucrado en el embalaje, etiquetado y envío de material biológico. Dicho transporte debe realizarse garantizando un sistema rápido y fiable para la entrega al destinatario, con la ayuda de personal tal como proveedores de servicios logísticos profesionales que estén capacitados y sean competentes en el proceso de envío y transporte.

El transporte y la transferencia eficientes de materiales biológicos requiere la coordinación entre el remitente (expedidor, consignador), los proveedores de la logística, el transportista y el destinatario (consignatario) para garantizar el transporte y la llegada a tiempo y en condiciones adecuadas.

Es conveniente tener en cuenta que las **personas encargadas de gestionar y transportar este tipo de mercancías peligrosas asumen ciertos riesgos.**

#### **REMITENTE (EXPEDIDOR, CONSIGNADOR)**

El remitente (expedidor, consignador) es responsable de proporcionar la documentación correspondiente (por ejemplo, certificados o permisos) requerida por las autoridades nacionales de los países de exportación, transbordo e importación, así como de garantizar que el envío también cumpla con todas las demás normas aplicables.

- **ANTES** de realizar el envío de materiales biológicos, el remitente debe:

a) Identificar y clasificar, embalar (con control de temperatura), garantizar los límites de cantidad, marcar y etiquetar el paquete de materiales biológicos

- b) Asegurar la correcta documentación de todos los materiales biológicos a transportar
- c) Completar y elaborar una Declaración del Remitente para Mercancías Peligrosas (DGD), cuando sea necesario
- d) Asegurarse de que no está prohibido el transporte de ese material biológico
  - El remitente debe preparar la documentación necesaria, incluidos los permisos, el envío y los documentos de envío si es necesario.
  - El remitente debe notificar al destinatario las condiciones del transporte una vez que se hayan concretado, con bastante antelación a la hora prevista de llegada.
  - El documento de embarque aéreo (AWB) es el documento de envío estándar para el envío de mercancías por vía aérea. Si bien es una práctica común que la compañía aérea o el agente de carga complete el documento de embarque aéreo, se le puede solicitar al remitente que lo proporcione.
  - El remitente debe concretar las condiciones con el destinatario, incluso si necesita permisos de importación/exportación.
  - El remitente debe concretar condiciones por adelantado con el operador para asegurarse que el envío será aceptado para transporte y que se llevará a cabo por la ruta más directa posible.

#### TRANSPORTISTA

- El transportista debe tomar las siguientes medidas respecto a la RUTA:
  - a) Que sea **la más adecuada** (ej: la más corta, la más segura...).
  - b) Si es necesario realizar **Transbordo**, tomará las precauciones necesarias para asegurar cuidados especiales, un manejo diligente y un seguimiento de las sustancias en tránsito para garantizar su seguridad y protección.
    - Para el transporte aéreo, la normativa requiere que el transportista utilice, cuando corresponda, una lista de verificación para verificar que el envío cumple con los requisitos de identificación y etiquetado y con los requisitos de documentación.
    - El transportista debe proporcionar al remitente asesoramiento y asistencia con respecto a los documentos de envío necesarios y las instrucciones para su finalización, así como al tipo de embalaje.
    - El transportista debe ayudar al remitente a organizar la ruta más apropiada y confirmarla, y proporcionar, si es posible, formas de rastrear el envío
    - El transportista debe mantener y archivar la documentación para el envío y el transporte.

## DESTINATARIO

Tiene las siguientes obligaciones:

- Obtener las autorizaciones necesarias de las autoridades nacionales para la importación del material
- Proporcionar al remitente los permisos de importación requeridos, carta(s) de autorización u otro(s) documento(s) requerido(s) por las autoridades nacionales
- Organizar la recepción más oportuna y eficiente al llegar
- Acusar recibo al remitente

**No se debe realizar el envío hasta que se hayan concretado todos los detalles necesarios entre el remitente, el transportista y el destinatario.<sup>1</sup>**

Además, deben tenerse en cuenta los acuerdos de transferencia de material (ATM) porque estos protegen los intereses de todas las partes involucradas en relación con:

- a) La propiedad intelectual
- b) Posibles usos alternativos
- c) Aspectos comerciales
- d) Responsabilidad ante terceros
- e) Posibles transferencias/usos adicionales

Además, ayudan a evitar malentendidos sobre el uso de materiales y aclaran la tenencia de propiedad.

## OTRAS RESPONSABILIDADES

Es responsabilidad del proveedor del embalaje/envasado de la sustancia infecciosa:

- fabricar y verificar líneas de materiales de embalaje/envasado, de acuerdo con la reglamentación aplicable;
- poner a disposición de los usuarios de sus embalajes/envases y de las autoridades nacionales competentes, con previa solicitud, los informes de los ensayos y los resultados de los mismos;
- proporcionar instrucciones a los usuarios sobre los procedimientos que deben seguirse y los componentes adicionales necesarios para garantizar que los materiales de embalaje/envasado cumplan los requisitos de prestaciones;
- en caso necesario, estar registrado en un programa de garantía de calidad, según lo estipulen las autoridades nacionales competentes.

---

<sup>1</sup> La cadena de transporte involucra a muchas más partes interesadas con funciones y responsabilidades específicas, explicado con más detalle en el siguiente enlace:  
<http://www.wcoomd.org/en/topics/facilitation/instrument-andtools/tools/~media/4B167884A3064E78BCF5D29E29F4E57E.ashx>.

## 2.1. DEFINICIONES

Antes de enviar un material, debemos conocer qué definición le correspondería, para poder después clasificarlo y categorizarlo, y poder emplear un término conocido por todos los involucrados en el transporte.

- **Sustancias infecciosas (o materiales infecciosos):** Para los fines de su transporte, se entiende por sustancias infecciosas las sustancias respecto de las cuales se sabe o se cree fundadamente que contienen agentes patógenos. Los agentes patógenos son microorganismos (tales como bacterias, virus, rickettsias, parásitos y hongos) y otros agentes tales como priones, que pueden causar enfermedades en los animales o en los seres humanos. **☞ No incluye vegetales.** Las sustancias infecciosas se dividen en dos categorías: categoría A y categoría B, como veremos.
- **Cultivos:** resultado de un proceso cuyo objeto es la reproducción de agentes patógenos (no incluye muestras de pacientes humanos o animales).
- **Muestras de pacientes:** sustancias de origen humano o animal, transportadas para estudio, diagnóstico, investigación, tratamiento y prevención de enfermedades. Incluye excreciones, secreciones, sangre y sus componentes, tejidos y fluidos tisulares y partes del cuerpo.
- **Productos biológicos:** sustancias o materiales que se derivan de organismos vivos (por ejemplo, bacterias, hongos, virus, animales y seres humanos) y se extraen o purifican para su uso como instrumento preventivo, terapéutico o de diagnóstico. Ejemplos: antitoxinas, vacunas y los componentes de las vacunas. Es preciso señalar que, debido a su importancia en el tratamiento y la prevención de enfermedades, algunos productos biológicos pueden estar sujetos a requisitos especiales o a acuerdos de licencia establecidos por las autoridades nacionales. En este caso, su fabricación y distribución podría estar sujeta a una reglamentación diferente o complementaria a la establecida para las sustancias infecciosas.
- **Organismos Modificados genéticamente:** son animales, plantas, agentes biológicos o materiales celulares que han sido objeto de una modificación genética diferente de su estado natural. Si, tras esta modificación, el organismo o microorganismo es capaz de causar enfermedades en seres humanos o animales, entonces él mismo o cualquier material contaminado con él, se clasificará como sustancia infecciosa. Si no se ajusta a la definición de sustancia infecciosa, quedará incluido en la clase 9 de mercancías peligrosas y se le asigna un número UN (**UN 3245**).
- **Exenciones:** Debido al escaso peligro que presentan, las siguientes sustancias de origen biológico están exentas de cumplir las normas y requisitos aplicables a las mercancías peligrosas:
  - Sustancias que no contengan sustancias infecciosas o que no es probable que causen enfermedades en seres humanos o animales
  - Sustancias que contengan microorganismos que no son patógenos para los seres humanos o animales
  - Sustancias que se encuentren en una forma en la que cualquier patógeno haya sido neutralizado o inactivado y ya no supongan un riesgo para la salud

- Muestras medioambientales (incluidos alimentos y agua) que no se considera que supongan un riesgo significativo de infección
- Sangre o sus componentes recogidos y enviados para transfusiones o transplantes
- Muestras de sangre seca sobre papel de filtro y muestras fecales para el diagnóstico sistemático de hemorragia digestiva inadvertida
- Desechos médicos o clínicos descontaminados.
- Muestras que contienen ADN, ARN o plásmidos

## 2.2. CLASIFICACIÓN Y CATEGORIZACIÓN

Al transportar materiales biológicos, el remitente debe determinar si el material debe clasificarse como mercancía peligrosa o no. Los productos peligrosos son materiales que pueden dañar a humanos, animales y otros organismos vivos, a propiedades o al medio ambiente, y su transporte está regulado por las normas de las Naciones Unidas (ONU, de manera que a las mercancías peligrosas se les asigna un número ONU y una designación oficial de transporte en función de la clasificación.

Para garantizar que estas mercancías peligrosas no representen un peligro durante su transporte, las normas de transporte asignan una instrucción de embalaje en función del número ONU y la designación oficial de transporte.

Así, las sustancias infecciosas se clasifican como mercancías peligrosas y se asignan a **ONU2814**, **ONU2900**, **ONU3373** u **ONU3291**, según corresponda. Además, los Microorganismos Genéticamente Modificados (GMMO) y los Organismos Genéticamente Modificados (GMO) están clasificados como Clase 9 y asignados a ONU3245 si no están clasificados como Categoría A o Categoría B.

*Tabla 1. Resumen de la clasificación, categorización, identificación y embalaje de las sustancias infecciosas*

Clasificaciones de mercancías peligrosas	Categorización	Designación oficial de transporte <sup>2</sup>	Número ONU <sup>2</sup>	Instrucción de embalaje/envasado
Clase 6, División 6.2	Categoría A	Sustancia infecciosa que afecta al ser humano	UN 2814	P620
		Sustancia infecciosa que afecta a animales	UN 2900	
Clase 6, División 6.2	Categoría B	Sustancia biológica, Categoría B	UN 3373	P650
Clase 6, División 6.2	Excepto muestras humanas/animales	Muestras humanas/animales exentas	N/A	Embalaje triple
No sujeto a la normativa sobre mercancías peligrosas	Materiales biológicos no sujetos a la normativa sobre mercancías peligrosas	N/A	N/A	N/A
Clase 9	GMMO y GMO que no se clasifican como sustancias infecciosas de la Categoría A o B	Microorganismos modificados genéticamente; organismos modificados genéticamente	UN 3245	P904 (ICAO/IATA PI 959), IBC99

Si es probable que los microorganismos que están presentes en los materiales biológicos puedan causar daño a humanos o animales, deben asignarse a la Categoría A o B.

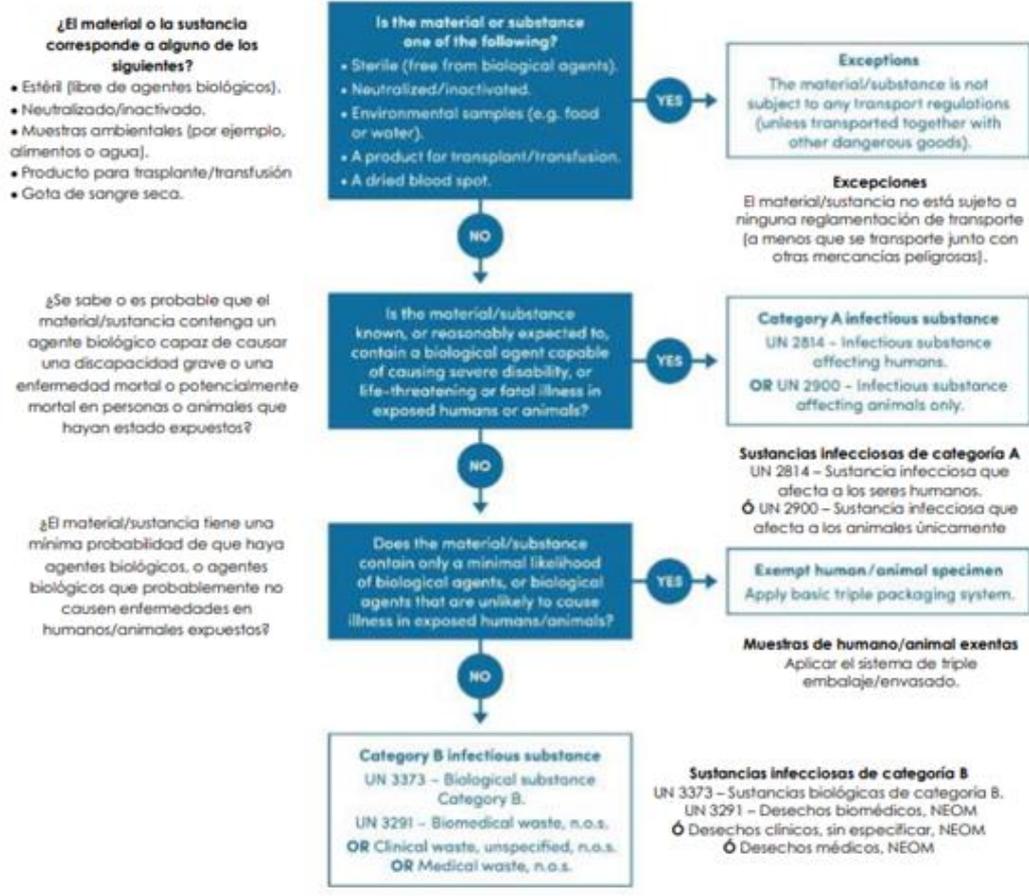


Figura 1 Resumen del proceso de definición y clasificación de las sustancias infecciosas.

Fuente: ilustración creada para la 4ª edición del Manual de Bioseguridad en el Laboratorio de la WHO.

### 2.2.1. CATEGORIZACIÓN

Una vez clasificado como mercancía peligrosa en la clase 6, división 6.2, el material debe subclasificarse en función de su composición, del tipo de agente biológico presente y de la gravedad o el daño que pueda causar dicho agente biológico. En esta sección se presenta una visión general de las diversas subclasificaciones de sustancias infecciosas, incluida la nomenclatura oficial (es decir, designación oficial y número UN) que deben ser asignados para fines de transporte.

<sup>2</sup> Fuente imagen: Guía sobre la reglamentación relativa al transporte de sustancias infecciosas 2019–2020

## CATEGORÍA A

Una sustancia infecciosa se clasifica en la categoría A cuando se transporta en una forma que, en el caso de exposición a ella, podría causar una discapacidad permanente o una enfermedad mortal o potencialmente mortal en seres humanos o animales sanos. En otras palabras, si la sustancia sale de la embarcación que la transporta o del embalaje/envase protector utilizado durante el transporte, podría tener graves consecuencias para la salud de cualquier ser humano o animal que haya estado en contacto con ella. Tanto cultivos, muestras de pacientes, productos biológicos como desechos médicos o clínicos pueden subclasificarse como categoría A si se sabe que el material contiene, o es probable que contenga, un agente biológico que cumpla con los criterios indicados anteriormente.

En muchas reglamentaciones de transporte y acuerdos modales se incluyen listas indicativas de los agentes biológicos que pueden cumplir los criterios de una sustancia infecciosa de categoría A. Pero muchos de los agentes biológicos de esa lista sólo cumplirán la definición de sustancia infecciosa de categoría A cuando se transporten como cultivos. Dos números UN y algunas designaciones oficiales de transporte están asociados a las sustancias infecciosas de categoría A:

- Las sustancias infecciosas que pueden causar enfermedades en los seres humanos, o tanto en los seres humanos como en los animales, se les asigna el N° **UN 2814**, así como, la designación oficial de transporte: **“sustancia infecciosa que afecta a los seres humanos”**.

No todas las "formas" de una sustancia infecciosa son capaces de causar infección en los individuos expuestos, incluso cuando el mismo agente biológico está presente. Por ejemplo, la Mycobacterium tuberculosis sólo se considera capaz de causar daños graves a las personas expuestas si se transporta en forma de cultivos.

- Las sustancias infecciosas que sólo pueden causar enfermedades en los animales se les asigna el N° **UN 2900** y la designación oficial de transporte: **“sustancia infecciosa que afecta a los animales únicamente”**.

En el caso de los materiales pertenecientes a la categoría UN 2814, si se conoce el nombre técnico del agente biológico peligroso presente en la sustancia infecciosa, podrá incluirse entre paréntesis después de la designación oficial de transporte; por ejemplo: • UN 2814, sustancia infecciosa que afecta a los seres humanos (cultivos de Mycobacterium tuberculosis).

Si se desconoce el agente biológico, pero se considera que corresponde a la definición de sustancia infecciosa de categoría A, deberá indicarse entre paréntesis la descripción: **“sustancia infecciosa de la que se sospecha que pertenece a la categoría A”**, después de la designación oficial de transporte. En última instancia, para asignar adecuadamente la subclasificación precisa de una sustancia infecciosa en la categoría A, así como la asignación del número UN y de la designación oficial de transporte, se requiere de una opinión profesional sólida. Los patógenos nuevos o emergentes pueden no aparecer en las listas indicativas, aunque sus características biológicas sean similares a las de los patógenos asociados a la categoría A. Se debe realizar una evaluación del riesgo de patógenos para

determinar si los agentes biológicos desconocidos dentro de la sustancia infecciosa son capaces de causar daño muy grave a los seres humanos o a los animales (o a ambos), basándose en los antecedentes médicos, los síntomas, las condiciones locales endémicas y la fuente u orígenes de la sustancia infecciosa. Si existe alguna incertidumbre en cuanto a si la sustancia infecciosa cumple los criterios de la categoría A, debe aplicarse un enfoque precavido y aun así asignarse a la categoría A.

## **CATEGORÍA B**

Las sustancias infecciosas se subclasifican en la categoría B cuando contienen agentes biológicos capaces de causar infección en seres humanos o animales, pero que NO cumplen los criterios de la categoría A; es decir, las consecuencias de una infección no se consideran gravemente discapacitantes o potencialmente mortales. La mayoría de los envíos de sustancias infecciosas pueden transportarse de conformidad con la categoría B:

- La designación oficial de transporte que corresponde al N° **UN 3373** para la mayoría de los envíos de sustancias infecciosas de categoría B, es **“Sustancia biológica, de categoría B”**.
- Si las sustancias infecciosas se definen como desechos clínicos o médicos y contienen un agente biológico infeccioso (o existe incluso una probabilidad mínima de que lo contengan) y que no se ajusta a los criterios de la categoría A, se les debe asignar el N° **UN 3291** y una designación oficial de transporte que refleje su contenido o su origen (o ambos). De acuerdo con la Reglamentación Modelo de las Naciones Unidas, las designaciones oficiales de transporte pueden incluir:
  - o Desechos clínicos, sin especificar
  - o Desechos biomédicos
  - o Desechos médicos regulados

Lo habitual es que una muestra con una alta probabilidad de contener microorganismos patógenos y que vaya a enviarse para el diagnóstico de una enfermedad (por ejemplo, diagnóstico confirmatorio de casos sospechosos o clínicos, o muestras para diagnóstico diferencial, como muestras de sangre para la detección de peste porcina clásica o viruela o muestras de garganta de pollos para el diagnóstico de la influenza aviar) se pueda asignar a la Categoría B.<sup>3</sup>

Los envíos de cultivos de agentes que no pertenecen a la categoría A pueden asignarse a la Categoría B. Los desechos médicos o clínicos que contengan sustancias infecciosas de la Categoría B se asignarán a ONU3291.

---

<sup>3</sup> Para ver ejemplos prácticos, consultar el capítulo on line del Manual Terrestre de la OIE.

## **MUESTRAS EXENTAS**

Las muestras de animales para las cuales existe una probabilidad muy baja de que contengan agentes patógenos se pueden transportar clasificadas como muestras exentas. Ejemplos: muestras de estudios de vigilancia, de controles de exportación de animales sanos o las de determinación del estado inmunitario de animales o poblaciones (post-vacunación).

Estas muestras no están sujetas a la normativa relativa a las mercancías peligrosas si se transportan en un embalaje que evite fugas y que esté debidamente identificado.

## **MATERIALES BIOLÓGICOS NO SUJETOS A REGLAMENTACIÓN DE MERCANCÍAS PELIGROSAS**

Teniendo en cuenta el historial sanitario de los animales, los signos y las circunstancias individuales de origen de los materiales biológicos y las enfermedades endémicas locales, los siguientes materiales no están sujetos a la reglamentación relativa a las mercancías peligrosas, a menos que cumplan los criterios para su inclusión en otra clase (como la Clase 9):

- materiales biológicos que no contienen sustancias infecciosas
- materiales biológicos que contienen microorganismos que no son patógenos para humanos o animales;
- materiales biológicos en una forma tal que los agentes patógenos presentes han sido neutralizados o inactivados de modo que ya no representan un riesgo para la salud;
- muestras ambientales (incluidas muestras de alimentos y agua) que no se considera que planteen un riesgo significativo de infección;
- gotas de sangre seca recogidas al aplicar una gota de sangre sobre material absorbente.

Nota: Puede haber reglamentación específica en algunos países en cuanto al envío, exportación o importación de ácidos nucleicos. Los siguientes listados también están incluidos en las sustancias infecciosas según la reglamentación internacional relativa al transporte de mercancías peligrosas, sin embargo, los detalles no se tratan en este capítulo. Para más información, véase la Reglamentación Modelo de la ONU

## **2.3. PREPARACIÓN DE ENVÍOS PARA SU TRANSPORTE**

Cuando un paquete de sustancias infecciosas se transporta entre el punto de origen, las unidades de transporte de carga, los almacenes y su destino, puede estar sujeto a desafíos, entre las que se incluyen son: el movimiento, las vibraciones, los cambios de temperatura, la humedad y la presión. Por lo tanto, es esencial que el embalaje/envasado utilizado para el envío de sustancias infecciosas sea de buena calidad y lo suficientemente resistente como para soportar los distintos problemas a los que se puede enfrentar. Por lo tanto, las sustancias infecciosas deben estar dentro de un sistema de embalaje/envasado de tres capas, en el que se puedan utilizar capas redundantes de embalaje/envasado y cantidades suficientes de material absorbente para controlar las fugas o las filtraciones de la contención.

### **2.3.1. EMBALAJE**

Todos los materiales biológicos deben ser embalados y transportados de acuerdo con la normativa local, nacional e internacional. Los procedimientos deben minimizar el riesgo de exposición del personal involucrado en el transporte y deben proteger el medio ambiente y las poblaciones de animales susceptibles de posibles exposiciones. Además, un embalaje ineficaz que no proteja las muestras o los conservantes (por ejemplo, hielo) del daño o evite fugas, probablemente retrasará la entrega del envío al laboratorio, retrasando o evitando que se realicen análisis de laboratorio cruciales. Los materiales biológicos siempre se deben embalar y transportar de tal forma que se proteja la integridad de las muestras y se evite la contaminación cruzada de otras muestras y la contaminación ambiental. Los requisitos mínimos para el transporte de muestras siguen el principio del embalaje triple, que consta de tres capas, tal como se describe a continuación:

- un recipiente primario;
- un envase secundario;
- un embalaje exterior;

**teniendo en cuenta que el envase secundario o bien el embalaje exterior deben ser rígidos.**

#### RECIPIENTE PRIMARIO

Un recipiente primario, a prueba de fugas para líquidos o a prueba de filtraciones para sólidos que contengan la muestra. El(los) recipiente(s) primario(s) deben embalarse en el envase secundario con suficiente material absorbente (por ejemplo, guata de celulosa, papel de cocina o bolas de algodón) para absorber todo el líquido en caso de rotura. Aunque la normativa no prohíbe el vidrio, los recipientes primarios deberían ser preferiblemente irrompibles. Además, no deben contener ningún objeto cortopunzante (por ejemplo, aguja), sobre todo cuando se usan contenedores secundarios o exteriores blandos. Si se utilizan viales con tapón de rosca, deberán asegurarse, por ejemplo, con cinta. No se deben usar viales de vidrio con tapón de caucho y provistos de precinto metálico.

#### ENVASE SECUNDARIO

Un segundo embalaje duradero, a prueba de fugas, para encerrar y proteger el (los) recipiente(s) primario(s) (por ejemplo, bolsa de plástico, recipiente de plástico o tapa de rosca,

todo ello sellado). El recipiente primario o bien el envase secundario deben ser capaces de soportar, sin fugas, una presión interna de 95 kPa (0,95 bar) en el rango de  $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$  a  $+55\text{ }^{\circ}\text{C}$  ( $-40\text{ }^{\circ}\text{F}$  a  $+130\text{ }^{\circ}\text{F}$ ).

### EMBALAJE EXTERIOR

El envase secundario se coloca en un embalaje exterior para envío (por ejemplo, una caja de cartón de fibra con aislamiento resistente) hecho de un material de amortiguación adecuado. El embalaje exterior protege el contenido de influencias externas, como daños físicos, durante el transporte.

### **2.3.2. EMBALAJE CATEGORÍA A**

Debido a la naturaleza altamente peligrosa de las muestras de la Categoría A, el embalaje debe cumplir con requisitos especiales. **El principio de embalaje triple es aplicable**, y los contenedores de transporte y el embalaje exterior deben cumplir con los criterios definidos en la normativa correspondiente. La Categoría A solo se debe transportar en un embalaje que **cumpla con las especificaciones de clase 6.2** de las Naciones Unidas y con la Instrucción de embalaje P620, que haya superado pruebas específicas y que cuente con la marca de especificación de la ONU P620. Esto asegura que se cumplan estrictos criterios de rendimiento; las pruebas de cumplimiento de estos criterios incluyen una prueba de caída desde una altura de 9 metros, una prueba de punción, una prueba de presión y una prueba de apilado. Los embalajes estarán etiquetados para proporcionar información sobre el contenido del paquete, la naturaleza del peligro y los estándares de embalaje aplicados.

La identificación y el etiquetado son los siguientes:

- La dirección de envío (destinatario) y los datos del remitente, así como los datos de contacto en caso de emergencia para las 24 horas del día, los 7 días de la semana, que incluyan los nombres de las personas y los números de teléfono para garantizar una entrega segura.
- La designación oficial de transporte y el número ONU.

<i>Designación oficial de transporte</i>	<i>Número ONU</i>
<i>SUSTANCIA INFECCIOSA PARA EL SER HUMANO</i>	<i>ONU2814</i>
<i>SUSTANCIA INFECCIOSA SOLO PARA LOS ANIMALES</i>	<i>ONU2900</i>

- La etiqueta de Sustancia Infecciosa.
- Marca de especificación de la ONU para embalajes P620 (impresa en la caja).
- Etiqueta de orientación, etiqueta para medios de transporte “solo de carga”, si es necesaria.



Figura 2. Etiquetado riesgo biológico

### Para el transporte aéreo:

- el recipiente primario o bien el envase secundario deben ser capaces de soportar, sin fugas, una presión interna de 95 kPa. El recipiente primario o bien el envase secundario también deben ser capaces de soportar temperaturas de entre -40°C y +55°C;
- en el caso de transportar líquidos: la cantidad neta de sustancias infecciosas por cada caja P620 no debe exceder los 50 ml para el transporte en el espacio de carga de una aeronave de pasajeros; y no debe contener más de 4 litros (aunque contenga múltiples recipientes primarios, el total no deberá superar los 4 litros) para el transporte en una aeronave solo de carga;
- en el caso de transportar sólidos: la cantidad neta de sustancias infecciosas por una caja P620 no deberá exceder los 50 g para el transporte en el espacio de carga de una aeronave de pasajeros, y no deberá contener más de 4 kg (aunque contenga múltiples recipientes primarios, el total no deberá superar los 4 kg) para el transporte en una aeronave solo de carga. Esta restricción en cuanto al límite de cantidad no se aplica a partes, órganos y canales enteras de animales.
- el principio de embalaje triple debe adoptarse en consecuencia utilizando los sistemas de embalaje apropiados;
- el embalaje completo debe haber sido probado y cumplir con la instrucción de embalaje P620.

Ejemplo del sistema de embalaje triple para el embalaje y etiquetado de sustancias infecciosas de la Categoría A: UN2814 y UN2900  
(por cortesía de la IATA, Montreal, Canadá).

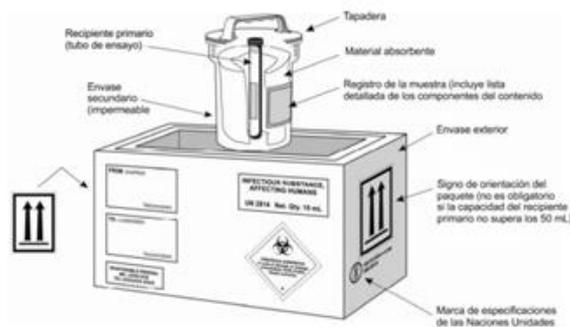


Figura 3. Ejemplo triple embalaje

### 2.3.3. EMBALAJE CATEGORÍA B

La Categoría B debe transportarse en un embalaje que cumpla con los requisitos de la instrucción de embalaje P650. No se requiere la aprobación de la caja por parte del gobierno, por lo que no se requiere la marca de especificación de la ONU.

La marca es la siguiente:

- Los embalajes deben estar claramente etiquetados con la dirección de envío y los datos del remitente para garantizar la entrega segura y a tiempo en el destino correcto.
- Deben incluir una etiqueta con la designación oficial de transporte en letras de al menos 6 mm de altura: “SUSTANCIA BIOLÓGICA, CATEGORÍA B”.
- Además de la designación oficial de transporte, la marca que se muestra a continuación (ONU3373 en forma de rombo) se utiliza para envíos de sustancias de la Categoría B. La marca ONU3373 siempre debe estar visible en el embalaje exterior.

Se aplican requisitos adicionales en cuanto a la categoría A para envíos internacionales y transporte aéreo. Una de las principales diferencias entre P650 y P620 es la de la prueba de caída, que se reduce a 1,2 metros (4 pies).

#### Para el transporte aéreo:

- El recipiente primario o bien el envase secundario deben ser capaces de soportar, sin fugas, una presión interna de 95 kPa. El recipiente primario o bien el envase secundario también deben ser capaces de soportar temperaturas de entre  $-40^{\circ}\text{C}$  y  $+55^{\circ}\text{C}$ ;
- En el caso de transportar líquidos: ningún recipiente primario debe superar 1 litro y el embalaje exterior no debe contener más de 4 litros (aunque contenga múltiples recipientes primarios, el total no deberá superar los 4 litros);
- En el caso de transportar sólidos: el embalaje exterior no debe contener más de 4 kg. Esta restricción no se aplica a partes, órganos ni cadáveres enteros de animales.

### 2.3.4. EMBALAJE MUESTRAS EXENTAS

Los materiales biológicos para los cuales existe una probabilidad muy baja de que contengan agentes patógenos no están sujetos a regulación si la muestra se transporta en un envase que evite toda posible fuga y que esté identificado con la frase “muestras de origen animal exentas”, según corresponda. El sistema de embalaje triple sí debe aplicarse.

### 2.3.5. TRANSPORTE CON CADENA DE FRÍO

Si para estabilizar las muestras durante el transporte se usan refrigerantes (hielo, bolsas de hielo o hielo seco), serán colocados fuera del recipiente secundario.

El hielo mojado debe colocarse en un recipiente a prueba de fugas; el embalaje exterior o el sobreembalaje también deberán ser a prueba de fugas.

El hielo seco (dióxido de carbono sólido) no debe colocarse dentro del recipiente primario o secundario debido al riesgo de explosión. Se puede usar un embalaje aislante especialmente

diseñado para contener hielo seco, generalmente una caja de poliestireno o cartón tratado con cera para evitar fugas y mantener la temperatura. El embalaje debe permitir la liberación de gas dióxido de carbono si se usa hielo seco y el paquete (el embalaje exterior o el sobreembalaje) debe estar identificado como “**ONU 1845**” y “Dióxido de carbono sólido como refrigerante” o “Hielo seco como refrigerante”, y el peso del hielo seco en kilogramos también debe indicarse en el etiquetado. El paquete también debe llevar una etiqueta que indique **Clase 9** – sustancias y materiales peligrosos diversos. El recipiente secundario debe estar asegurado dentro del embalaje exterior para mantener la orientación original de los paquetes interiores una vez el refrigerante se haya derretido o disipado.

Si se utiliza nitrógeno líquido como refrigerante, se deben cumplir más requisitos de acuerdo con las reglamentaciones pertinentes para mercancías peligrosas (División 2.2, ONU 1977).

### **3. LEGISLACIÓN APLICABLE**

#### **3.1. NIVEL INTERNACIONAL**

La Reglamentación Modelo de las Naciones Unidas proporciona un conjunto de disposiciones mínimas a seguir para transportar de forma segura cualquier mercancía peligrosa, incluidas las sustancias infecciosas. El objetivo de utilizar este conjunto de disposiciones como base para las diversas reglamentaciones nacionales e internacionales es lograr la conformidad y armonización de todas ellas. Sin embargo, la Reglamentación Modelo de las Naciones Unidas ofrece cierto grado de flexibilidad, de modo que las reglamentaciones básicas puedan adaptarse a las necesidades locales y a los requisitos especiales para abordar los desafíos en el transporte. Los gobiernos o las organizaciones internacionales pueden aplicar versiones adaptadas en calidad de reglamentaciones obligatorias o jurídicamente vinculantes para el transporte de mercancías peligrosas. La aplicación y el cumplimiento subsiguientes de las reglamentaciones aprobadas pueden ser supervisadas por órganos independientes o autoridades nacionales, según lo designe el órgano rector pertinente.

Aunque la Reglamentación Modelo de las Naciones Unidas es lo suficientemente general como para abarcar todos los modos de transporte, se aplica con mayor frecuencia en el derecho internacional mediante acuerdos modales internacionales, los cuales adaptan y publican directrices o reglamentaciones especializadas según el modo de transporte específico. Algunos de los acuerdos modales más comunes para el transporte de mercancías peligrosas se describen a continuación:

#### **TRANSPORTE AÉREO:**

Las instrucciones técnicas para el transporte seguro de mercancías peligrosas por vía aérea (en lo sucesivo denominadas "Instrucciones técnicas de la ICAO<sup>4</sup>") son un conjunto de instrucciones detalladas que se consideran necesarias para la seguridad del transporte internacional de mercancías peligrosas por vía aérea. Estas reglamentaciones internacionales jurídicamente vinculantes son publicadas por la ICAO y se aplican a todos los vuelos

---

<sup>4</sup> siendo la ICAO, por sus siglas en inglés, la Organización de Aviación Civil Internacional

internacionales. Dichas reglamentaciones se revisan y actualizan periódicamente con base en los comentarios recibidos de los estados y de las organizaciones internacionales interesadas, incluida la WHO, o de acuerdo a las recomendaciones del UNCETDG o del Organismo Internacional de Energía Atómica (IAEA, por sus siglas en inglés). La Asociación Internacional de Transporte Aéreo (IATA, por sus siglas en inglés) también publica Reglamentaciones relativas a Mercancías Peligrosas (DGR<sup>5</sup>) que comprenden las disposiciones de la ICAO, y pueden incluir otras restricciones derivadas de consideraciones operacionales. Las DGR también contienen variaciones de estado y de operador/transportista. Las DGR de la IATA son aplicables a sus miembros y a algunas otras aerolíneas, así como a todos los expedidores y agentes que ofrecen envíos de mercancías peligrosas a estos operadores. Para los vuelos nacionales (es decir, los vuelos dentro de un país), las autoridades nacionales de aviación civil pueden aplicar la legislación nacional. La cual, normalmente se basa en las disposiciones de la ICAO, pero puede contener variaciones. Las variaciones de estado y de operador se publican tanto en las instrucciones técnicas de la ICAO como en las DGR de la IATA.

#### TRANSPORTE POR FERROCARRIL:

El transporte internacional de mercancías peligrosas por ferrocarril (RID) es un conjunto de reglamentaciones creadas por la Organización Intergubernamental para el Transporte Internacional por Ferrocarril (OTIF). Estas reglamentaciones se aplican a los países de Europa, Oriente Medio y África del Norte, y al transporte nacional en la Unión Europea a través de la Directiva 2008/68/EC del Consejo.

#### TRANSPORTE POR CARRETERA:

El acuerdo europeo relativo al transporte internacional de mercancías peligrosas por carretera (ADR) se aplica a 49 países. Además, los países de América del Sur y Asia sudoriental están utilizando versiones modificadas de dicho acuerdo. El ADR también se aplica al transporte nacional en la Unión Europea a través de la Directiva 2008/68/EC del Consejo.

#### TRANSPORTE MARÍTIMO

El Código Internacional de Mercancías Peligrosas Marítimas es publicado por la Organización Marítima Internacional (IMO, por sus siglas en inglés). Se aplica obligatoriamente a todas las partes firmantes del Convenio Internacional para la Seguridad de la Vida Humana en el Mar (SOLAS, por sus siglas en inglés).

#### CORREO POSTAL

El Manual de cartas postales, publicado por la Unión Postal Universal (UPU), refleja la Reglamentación Modelo de las Naciones Unidas utilizando las instrucciones técnicas de la ICAO como base para los envíos. Algunas sustancias infecciosas consideradas de alto riesgo (conocidas como 9 "sustancias infecciosas de categoría A") no serán aceptadas en envíos a través de los servicios postales. Algunas sustancias infecciosas de categorías de menor riesgo (por ejemplo, las "sustancias infecciosas de categoría B" y las "muestras de humanos o

---

<sup>5</sup> DGR= Dangerous Goods Regulations

animales exentas") pueden enviarse por correo aéreo certificado. También pueden estar vigentes restricciones locales e internacionales. Por lo tanto, es preciso ponerse en contacto previamente con los operadores públicos nacionales del correo certificado para determinar si el servicio postal en cuestión aceptará el material envasado.

### **3.2. ORGANISMOS MODIFICADOS GENÉTICAMENTE**

El transporte de OMG tiene asignada una regulación internacional específica que debe coordinarse con la normativa internacional mencionada en el apartado anterior. El "Protocolo de Cartagena<sup>6</sup>" es un instrumento internacional encargado de regular el movimiento transfronterizo de los OMGs producto de la biotecnología, estableciendo normas que promueven una transferencia, manipulación y uso seguro de los OMGs.

Este convenio fue adoptado en Montreal en el 2000 por la mayoría de países. Sus principales requisitos fueron recogidos en el Rglto (CE) 1946/2003 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 15 de julio de 2003, relativo al movimiento transfronterizo de organismos modificados genéticamente.

### **3.3. NIVEL NACIONAL**

Muchos países adoptan la Reglamentación Modelo de las Naciones Unidas en su totalidad, como su legislación nacional sobre las mercancías peligrosas, mientras que otros países aplican variaciones adaptadas a las condiciones y requisitos locales. Las autoridades nacionales deben poder proporcionar detalles de sus propios requisitos nacionales a los usuarios interesados. En los casos en que no existan reglamentaciones nacionales, deberán respetarse los acuerdos internacionales relativos a los modos de transporte descritos anteriormente. En caso de que se apliquen varias reglamentaciones a un mismo envío de sustancias infecciosas, deberán aplicarse las más estrictas. El ADR regula el embalaje, documentación y demás aspectos del transporte por carretera de las mercancías peligrosas, incluyendo la carga, descarga y almacenamiento de las mismas, sea el transporte internacional o no.

Junto al Acuerdo, la legislación nacional está muy influida por la europea (siendo algunas de ellas fruto de transposiciones):

- Ley 16/1987 de 30 de julio, de ordenación de los transportes terrestres (LOTT).
- Real Decreto 1211/1990 de 28 de septiembre, por el que se aprueba el Reglamento de la Ley de Ordenación de los Transportes Terrestres.
- Real Decreto 97/2014 de 14 de febrero, por el que se regulan las operaciones de transporte de mercancías peligrosas por carretera en territorio español.
- Real Decreto 1566/1999 de 8 de octubre, sobre los consejeros de seguridad para el transporte de mercancías peligrosas por carretera, por ferrocarril o por vía navegable.

---

<sup>6</sup> Su nombre completo es "Protocolo de Cartagena sobre Seguridad de la Biotecnología del Convenio sobre la Diversidad Biológica"

Hay que destacar el **Real Decreto 65/2006, de 30 de enero, por el que se establecen requisitos para la importación y exportación de muestras biológicas**, que establece los requisitos para la importación y exportación de muestras biológicas para el diagnóstico o la investigación en seres humanos y crea un registro voluntario de importadores y exportadores de este tipo de muestras. Resulta conveniente resaltar dentro de la norma:

- Establece que cuando se realice el transporte de muestras biológicas, se hará de acuerdo con las recomendaciones de la OMS.
- Facilita una serie de puntos habilitados dentro del territorio nacional para realizar la entrada y salida de muestras (especificados en su Anexo I).
- Fija los requisitos para obtener el permiso de importación/exportación de muestras.
- Crea un registro voluntario de importadores y exportadores de muestras biológicas (incluyendo los requisitos de inscripción y la validez de la misma).

MATERIAL NO OFICIAL

## **BIBLIOGRAFÍA**

Manual Terrestre de la OIE (Acceso en línea)

[https://www.oie.int/fileadmin/Home/esp/Health\\_standards/tahm/1.01.03\\_TRANSPORT.pdf](https://www.oie.int/fileadmin/Home/esp/Health_standards/tahm/1.01.03_TRANSPORT.pdf)

NTP 628: Riesgo biológico en el transporte de muestras y materiales infecciosos

[https://www.insst.es/documents/94886/326775/ntp\\_628.pdf/a5eca666-d41c-470c-96df-f94762111d8c](https://www.insst.es/documents/94886/326775/ntp_628.pdf/a5eca666-d41c-470c-96df-f94762111d8c)

<https://ibercondor.com/transporte-de-mercancias/transporte-de-mercancias-peligrosas/>

Guía sobre la reglamentación relativa al transporte de sustancias infecciosas 2019–2020  
Aplicable a partir del 1 de enero de 2019 (OMS)

MATERIAL NO OFICIAL

**MATERIAL PARA LA PREPARACIÓN DEL TEMA 15**

**BIOCONTENCIÓN, BIOSEGURIDAD Y BIOPROTECCIÓN EN UN LABORATORIO DE CONTROL DE ENFERMEDADES INFECCIOSAS. GESTIÓN DEL RIESGO BIOLÓGICO. REQUISITOS PARA EL TRABAJO CON AGENTES BIOLÓGICOS DE ACUERDO A SU CLASIFICACIÓN POR «GRUPO DE RIESGO».**

*Este material no tiene carácter oficial, por lo que en ningún caso vinculará al Tribunal Calificador. Constituye, únicamente, un instrumento complementario que servirá de apoyo al opositor para enfocar cada uno de los epígrafes, pero nunca de forma exclusiva ni excluyente. El Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación no se hace responsable del contenido del mismo.*

*Los materiales no serán objeto de actualización constante.*

## **ÍNDICE**

### **1. INTRODUCCIÓN**

### **2. BIOCONTENCIÓN, BIOSEGURIDAD Y BIOPROTECCIÓN EN UN LABORATORIO**

2.1. BIOCONTENCIÓN

2.2. BIOSEGURIDAD

2.3. BIOPROTECCIÓN

### **3. GESTIÓN DEL RIESGO BIOLÓGICO**

### **4. REQUISITOS PARA EL TRABAJO CON AGENTES BIOLÓGICOS DE ACUERDO CON SU CLASIFICACIÓN POR “GRUPO DE RIESGO”.**

4.1. LABORATORIOS DE NIVEL DE CONTENCIÓN 1

4.2. LABORATORIOS DE NIVEL DE CONTENCIÓN 2

4.3. LABORATORIOS DE NIVEL DE CONTENCIÓN 3

4.4. LABORATORIOS DE NIVEL DE CONTENCIÓN 4

## 1. INTRODUCCIÓN

Los laboratorios veterinarios deben hacerse responsables de varios aspectos al margen de la prestación de los servicios básicos de diagnóstico. Estos aspectos son la salud y seguridad; la bioseguridad, la biocontención y la bioprotección; el bienestar animal y la ética en el trato con los animales; la contaminación medioambiental; las manipulaciones genéticas y la garantía de calidad. Es fundamental que se establezcan procesos para gestionar e informar de estos aspectos y que cada miembro del personal se haga cargo de sus responsabilidades, que se habrán delegado formalmente.

De todos estos aspectos, este tema trata los relacionados con la bioseguridad, bioprotección y biocontención.

## 2. BIOCONTENCIÓN, BIOSEGURIDAD Y BIOPROTECCIÓN EN UN LABORATORIO DE CONTROL DE ENFERMEDADES INFECCIOSAS.

El aumento en las últimas décadas de la aparición de enfermedades emergentes y reemergentes, muchas de ellas zoonóticas, causadas tanto por bacterias como por virus (coronavirus del SARS, influenza aviar altamente patógena, virus de la gripe A (H1N5) y la preocupación que esta situación crea, ha contribuido a la puesta en marcha de nuevas instalaciones y laboratorios que aplican los conceptos de bioseguridad, biocontención y bioprotección o biocustodia.

### 2.1. BIOCONTENCIÓN

Según la norma UNE 171400-1:2019 de Diseño de instalaciones de nivel 3 de contención biológica, **la biocontención es el conjunto de medidas estructurales** asociadas al diseño y construcción, a la ingeniería y al equipamiento, destinadas a reducir o prevenir la dispersión de agentes biológicos viables en el interior y hacia el exterior de la instalación que albergue o donde se manipulen agentes biológicos de riesgo para humanos, animales o plantas.

El objetivo de la contención es reducir o eliminar la exposición a agentes potencialmente peligrosos del personal que trabaje en estas instalaciones o puedan estar afectadas por ellas, y del medio ambiente externo.

Dentro del término de biocontención debemos hablar del concepto de **barrera de contención biológica**, como los límites físicos que complementados con las prácticas operacionales limitan la dispersión del patógeno y la posibilidad de que éste infecte a los operarios o sea liberado al medio ambiente. Las barreras de contención biológica se pueden dividir en:

- **Barreras de contención primaria**, que hace referencia a la protección del personal y del medio ambiente inmediato del laboratorio frente a la exposición a agentes infecciosos, y se consigue tanto mediante buenas prácticas y técnicas de laboratorio como a través del uso de equipos de seguridad adecuados. Este tipo de barrera primaria es considerada como la primera frontera que se interpone entre el patógeno y el operador que lo maneja

- **Barreras de contención secundaria**, que son aquellas barreras complementarias a las barreras de contención primarias que impiden el escape de material biológico entre zonas de diferente riesgo biológico, dentro y fuera de la instalación y que están definidas por las características de diseño constructivo y de las instalaciones de contención (sistema de tratamiento de aire, inactivación de efluentes, airlocks, etc.).
- **Barreras de contención terciaria** están relacionadas con las medidas preventivas instauradas para evitar el posible contacto entre los agentes biológicos y las especies animales susceptibles localizadas fuera de las instalaciones de contención (por ejemplo, el cercado del recinto o instaurar medidas de cuarentena al personal que visite o trabaje en un instalación de estas características, de forma que se comprometa a no visitar ninguna explotación ganadera en un periodo de tiempo estimado)

Tipo de contención	Objetivo	Medidas
Primaria	Prevenir la exposición del personal	Normas de trabajo seguro EPIs Equipos de protección colectiva
Secundaria	Prevenir el escape del material biológico	Gestión general de la prevención y la protección Diseño de las instalaciones Y sistemas asociados
Terciaria	Biocustodia	Parámetro de seguridad Seguridad física y sistemas de control de acceso. Inventario de material biológico. Custodia de datos críticos

## 2.2. BIOSEGURIDAD

Según la Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE) la bioseguridad del *laboratorio es el conjunto de principios y prácticas destinados a prevenir el escape no intencionado o la exposición accidental a agentes o toxinas biológicos.*

Según la Norma UNE 171400-1:2019 de Diseño de instalaciones de nivel 3 de contención biológica, *la bioseguridad en el laboratorio describe los principios de contención, las tecnologías y procedimientos que se aplican para prevenir la exposición no intencionada a agentes biológicos y toxinas o su liberación accidental.*

La bioseguridad es objeto de la preocupación y de trabajo del personal científico en tareas de gestión, con la asistencia de personal investigador y técnico.

Está relacionada con el establecimiento y ejecución de procedimientos para minimizar el riesgo (el riesgo cero es inalcanzable) en el uso, manipulación y propagación de microorganismos patógenos (de animales, plantas o seres humanos), y está asociado a las actividades internas del laboratorio. Los procedimientos y prácticas de bioseguridad dependerán del agente (patogenicidad, rango de huéspedes, ruta de transmisión, etc.) y de la actividad a realizar (volumen de material infeccioso, concentración del mismo, si hay experimentación animal asociada, etc.)

Dentro de la definición de bioseguridad, el concepto de **Nivel de Bioseguridad** (Biosafety Level, BSL) de una instalación hace mención a las condiciones bajo las cuales una determinada actividad con un agente biológico puede realizarse de forma segura.

Se pueden describir cuatro niveles de bioseguridad. Las designaciones del nivel de bioseguridad se basan en una combinación de las características de diseño, construcción, medios de contención, equipo, prácticas y procedimientos de operación necesarios para trabajar con agentes patógenos de los distintos grupos de riesgo (como veremos más adelante los microorganismos los podemos clasificar en 4 grupos de riesgo).

Cada combinación es específicamente apropiada para las operaciones llevadas a cabo, las vías de transmisión documentadas o sospechadas de los agentes infecciosos, y la función o la actividad de la instalación.

*Aunque anteriormente los niveles de bioseguridad estaban asociadas a los grupos de riesgo de los agentes biológicos conforme a la normativa existente hasta la fecha, actualmente La asignación de una actividad con un agente biológico a un nivel de bioseguridad, debe basarse siempre en una evaluación completa y rigurosa del riesgo.*

De este modo, la asignación de un nivel de bioseguridad tiene en consideración el microorganismo (agente patógeno) utilizado, las instalaciones disponibles y el equipo, las prácticas y los procedimientos necesarios para trabajar con seguridad en el laboratorio.

Los niveles de bioseguridad son los siguientes:

- Nivel de Bioseguridad 1 (BSL-1)

Las prácticas, los equipos de seguridad, el diseño y la construcción de la instalación del Nivel de Bioseguridad 1 son adecuados para la educación o capacitación secundaria o universitaria, y para aquellas instalaciones en las que se trabaja con cepas definidas y caracterizadas de microorganismos viables que no se conocen como generadores de enfermedad sistémica en humanos adultos sanos.

El BSL-1 representa un nivel básico que se fundamenta en prácticas microbiológicas estándar sin ninguna barrera primaria o secundaria especialmente recomendada, salvo una pileta para lavado de manos.

- Nivel de Bioseguridad 2 (BSL-2)

Las prácticas, los equipos, el diseño y la construcción de instalaciones del Nivel de Bioseguridad 2 son aplicables a laboratorios educativos, de diagnóstico, clínicos u otros laboratorios donde se trabaja con un amplio espectro de agentes de riesgo moderado que se encuentran presentes en la comunidad y que están asociados con enfermedad humana de variada gravedad.

Con buenas técnicas microbiológicas, estos agentes se pueden utilizar de forma segura, siempre que no se produzcan salpicaduras o aerosoles en cuyo caso se utilizarán Cabinas de Seguridad Biológica (CSB).

Junto con los equipos de protección colectiva se deben utilizar los equipos de protección individual definidos en la evaluación del riesgo para la realización de las actividades con el agente infeccioso, por ejemplo máscaras completas frente a salpicaduras, protección corporal y guantes, y contar con barreras secundarias, como pueden ser los equipos de descontaminación de desechos, a fin de reducir la contaminación potencial del medio ambiente.

- Nivel de Bioseguridad 3 (BSL-3)

Las prácticas, equipos de seguridad y el diseño y la construcción de las instalaciones del Nivel de Bioseguridad 3 pueden aplicarse a instalaciones clínicas, de producción, investigación, educación o diagnóstico, donde se trabaja con agentes exóticos o indígenas normalmente con potencial de transmisión respiratoria, y que pueden provocar una infección grave y potencialmente letal.

Al manipular agentes en instalaciones de Nivel de Bioseguridad 3 se pone mayor énfasis en las barreras primarias y secundarias para proteger al personal en áreas contiguas, a la comunidad y al medio ambiente, de la exposición a aerosoles potencialmente infecciosos.

Por ejemplo, todas las manipulaciones de laboratorio se deben llevar a cabo en CSB de tipo II u otros dispositivos cerrados. Las barreras secundarias para este nivel incluyen el acceso controlado al laboratorio, filtración del aire de la instalación mediante dispositivos de retención de alta eficacia (por ejemplo, filtros HEPA) o el mantenimiento en presión negativa o depresión del área contenida respecto al exterior para favorecer un flujo de aire unidireccional dirigido hacia el interior de la instalación

- Nivel de Bioseguridad 4 (BSL-4)

Las prácticas, equipos de seguridad, y el diseño y la construcción de instalaciones del Nivel de Bioseguridad 4 son aplicables al trabajo con agentes peligrosos o tóxicos que representan un alto riesgo individual de enfermedades que ponen en peligro la vida, que pueden transmitirse a través de aerosoles y para las cuales no existen vacunas o terapias disponibles.

En los Niveles de Bioseguridad 4 el aislamiento completo del personal de laboratorio de los materiales infecciosos en aerosol se logra principalmente trabajando en un CSB Clase III o en sistemas de respiración autónoma con presión positiva que reduce el riesgo de exposición directa del operario al ambiente donde trabaja.

Por lo general, la instalación del Nivel de Bioseguridad 4 debe ser un edificio separado o una zona totalmente aislada con sistemas de gestión de desechos y requisitos de ventilación especializados y complejos para prevenir la liberación de agentes viables al medio ambiente.

El sistema de clasificación en estos niveles de bioseguridad se ha cuestionado porque no se emplean normas ni definiciones internacionalmente válidas y, por lo tanto, la comparación entre laboratorios con los sistemas de clasificación numéricos propios de cada país no puede ser equivalente ni representativa.

Como ya hemos comentado y veremos más detenidamente en apartados posteriores, los microorganismos se han clasificado en 4 grupos de riesgo.

### **2.3. BIOPROTECCIÓN**

Según la OIE, la bioprotección o biocustodia es el control físico de los agentes o toxinas biológicos dentro del laboratorio, que tiene por objeto prevenir su pérdida, robo, uso indebido, acceso no autorizado o liberación intencionada no autorizada.

Está relacionado con la toma de medidas para prevenir las actividades externas (pero también internas) de algunas personas, a través del robo o uso ilícito, que puedan comprometer la contención de los patógenos. La bioprotección o biocustodia atañe a las medidas físicas y administrativas encaminadas a asegurar el control del material biológico y de la información que podrían poner en peligro la salud pública, o provocar pérdidas económicas cuantiosas como resultado de una liberación intencionada, robo, etc.

En la gestión del riesgo biológico de los laboratorios se debe incluir específicamente la posibilidad de amenazas bioterroristas, incluido el concepto de la amenaza infiltrada (por ejemplo, la amenaza bioterrorista que supone un miembro del personal). Debe desarrollarse un proceso mediante el cual pueda abordarse esta amenaza. En tales circunstancias, el requisito mínimo sería realizar una evaluación anual del personal para detectar posibles amenazas. Además, deberán implementarse medidas para controlar el acceso de científicos visitantes a instalaciones en las que se trabaje con esta clase de agentes patógenos.

Las medidas para el aseguramiento de la biocustodia en una instalación de contención biológica deben incluir aspectos sobre:

- La propia instalación (como la estructura del edificio, enclavamiento de puertas mediante dispositivos mecánicos o automáticos de control);
- El personal (como los pasos que se emprenden para garantizar que los empleados no supongan un riesgo ni para la seguridad ni para la protección);
- El material infeccioso manipulado o almacenado (control con inventarios y registros de almacenamiento);
- La información y de la tecnología de la información (Ciberseguridad);
- Protección del material infeccioso durante el transporte bien en el interior de la propia instalación o bien hacia otras instalaciones de contención biológica.

### **3. GESTIÓN DEL RIESGO BIOLÓGICO**

El análisis del riesgo biológico que debe de realizarse de forma previa a toda actividad con agentes biológicos en un laboratorio incluye: la detección de peligros biológicos, una evaluación del laboratorio seguida de la gestión de los riesgos biológicos relacionados, y una comunicación del riesgo biológico.

En el caso de los laboratorios veterinarios, los análisis del riesgo biológico se centran en determinar la posibilidad de exposiciones de los animales, las personas y el medio ambiente, incluidos los escapes o liberaciones intencionadas de agentes y toxinas biológicos procedentes del laboratorio. Es el sistema de gestión del riesgo biológico del laboratorio el que, en último término, proporciona a la dirección del laboratorio, así como a las autoridades veterinarias de un país o jurisdicción, un proceso estructurado para la evaluación, la revisión y el control de los riesgos biológicos.

Brevemente indicaremos las funciones clave del análisis del riesgo biológico:

1. Detección del peligro biológico (es decir, ¿qué puede ir mal?). El primer paso del proceso de análisis del riesgo es determinar y documentar los posibles peligros biológicos del laboratorio. Un peligro biológico puede ser cualquier agente o toxina, o cualquier procedimiento del laboratorio o de las instalaciones de los animales que pueda causar daños o perjuicios. El sistema de gestión del riesgo de un laboratorio debe servir para determinar y gestionar todos los peligros, que son los que se describen a continuación:

- Inventario de los materiales biológicos existentes y/o con los que se trabaja en el laboratorio.
- Muestras para el diagnóstico.
- Transporte y almacenamiento de agentes patógenos.
- Peligros de tipo físico o químico.
- Animales de laboratorio.

2. Evaluación del riesgo biológico (es decir, ¿qué probabilidad hay de que el episodio peligroso tenga lugar y qué gravedad tendrían sus consecuencias?).

Al detectar un peligro, el siguiente paso en el proceso de evaluación del riesgo biológico es determinar la probabilidad de efectos o daños relacionados con dicho peligro, y sus consecuencias.

Para que una evaluación del riesgo biológico sea exhaustiva, debe incluir una evaluación tanto de las prácticas de bioseguridad como de las de bioprotección del laboratorio.

3. Gestión del riesgo (es decir, ¿cómo pueden esos riesgos prevenirse o minimizarse hasta niveles aceptables?). Al ser uno de los puntos a tratar en este tema, nos centraremos más detenidamente posteriormente.

4. Comunicación del riesgo (es decir, ¿cómo se ha detectado, caracterizado y controlado el riesgo?),

La comunicación del riesgo del laboratorio es la continuación de los procesos de identificación, evaluación y gestión del riesgo, y forma parte del plan de preparación y respuesta ante incidentes y brotes.

Teniendo en cuenta que las partes interesadas en el laboratorio y el público en general tienen derecho a la información que tenga que ver con su salud y la de sus animales, las comunicaciones del riesgo están pensadas para informar a dichas partes interesadas acerca de las prácticas y decisiones técnicas que se utilicen para manipular los peligros biológicos y para responder a incidentes que puedan surgir debido a la liberación de estos peligros biológicos o a la exposición a los mismos.

5. Verificación con mejora continua (es decir, ¿existen medidas de bioseguridad y bioprotección del laboratorio efectivas para el control del riesgo biológico y pueden mejorarse?).

Las evaluaciones del riesgo deben ser efectuadas por las personas que mejor conozcan las características peculiares de los organismos con los que se va a trabajar, el equipo y los procedimientos que van a emplearse, los modelos animales que pueden utilizarse y el equipo y los medios de contención disponibles.

Una vez terminadas, las evaluaciones del riesgo deben ser consultadas periódicamente y revisadas cada vez que sea preciso, teniendo en cuenta la obtención de nuevos datos que tengan alguna influencia en el grado de riesgo

La disciplina del análisis del riesgo biológico, junto con un sistema exhaustivo de gestión del riesgo biológico, permite a los responsables evaluar y documentar las prácticas de bioseguridad y de bioprotección del laboratorio que se emplean para proporcionar los controles adecuados, asegurando así una bioseguridad y bioprotección del laboratorio adecuadas. Si el sistema de gestión del riesgo biológico del laboratorio es completo y funciona bien, contribuirá a garantizar que el laboratorio cumpla con las normas locales, nacionales, regionales e internacionales aplicables, así como con los requisitos de bioseguridad y de bioprotección del laboratorio.

A continuación nos centraremos en tratar la **gestión del riesgo**, acorde a lo establecido en la OIE.

Como ya hemos comentado anteriormente, la gestión del riesgo trata de prevenir o minimizar los posibles riesgos biológicos hasta niveles aceptables.

Cuando la evaluación del riesgo biológico halle riesgos biológicos inaceptables, el laboratorio se hará responsable de no manipular ni guardar el agente en cuestión en sus instalaciones (eliminación del peligro), de utilizar procedimientos técnicos alternativos (sustitución) o de determinar, implementar y mantener unas medidas de bioseguridad y de bioprotección del laboratorio adecuadas.

La respuesta a una evaluación del riesgo biológico requiere documentar los plazos de acción, asignar responsables y llevar a cabo la comunicación a las autorizaciones correspondientes.

En función del resultado de la evaluación del riesgo biológico (probabilidad y consecuencia del peligro), los responsables de la gestión del laboratorio, que trabajarán junto con el responsable de bioseguridad de la instalación en materia de gestión del riesgo biológico, determinarán qué medida(s) de bioseguridad y biocontención es (son) la(s) más adecuada(s) y factible(s) en el laboratorio o en las instalaciones para animales para prevenir el escape del peligro biológico y la exposición al mismo.

En ausencia de eliminación o sustitución como posible estrategia de control del riesgo, se emplea una estrategia que incluya controles administrativos, operativos y de ingeniería, así como el uso de equipos de protección personal (EPIs) para prevenir exposiciones y escapes accidentales o liberaciones intencionadas. Las estrategias de control se complementan entre ellas y se utilizan de manera combinada para lograr reducir el riesgo hasta los niveles deseados. En último término, un programa más básico de bioseguridad y bioprotección requerirá la implementación, a distintos niveles, de todas las estrategias de control:

- Controles administrativos: personal cualificado y apropiado; formación y verificación de la competencia del personal en la manipulación inocua y segura de agentes y toxinas biológicos, en los procedimientos técnicos aplicables y en el uso de EPI y del equipo; programas de salud y seguridad; atención sanitaria profiláctica, incluida la vacunación; planes de respuesta a emergencias y de contingencia; programas de investigación de incidentes y de accidentes; inventariado de los agentes y toxinas biológicos de cada momento e inventariado de los requisitos de gestión, como accesos, almacenamiento, transferencias, destrucciones y auditorías; normas de gestión de residuos; y normas de protección, como la protección de las instalaciones y del acceso de visitantes, la protección del personal y del acceso a agentes y toxinas biológicos, y la protección de la información.
- Controles operativos: Procedimientos Normalizados de Trabajo para todos los procesos del laboratorio relativos a la bioprotección, incluyéndose las Buenas Prácticas de Microbiología (BPM) en todos ellos; prácticas de desinfección y descontaminación; procedimientos de transporte; seguridad general del laboratorio; prácticas de manipulación y almacenamiento de muestras y reactivos; prácticas de gestión de residuos, como la desinfección y la inactivación; ejercicios de simulacro de emergencia; y protocolos de comunicación de accidentes/incidentes, así como de la respuesta a los mismos, y de su revisión.
- Controles de ingeniería: las características físicas de la instalación, como el sistema de ventilación y el flujo de aire, las paredes y las protecciones con efecto barrera, y la separación de actividades incompatibles; el equipo y su mantenimiento, calibración y certificación; y la protección física, como las restricciones al acceso, el vallado del perímetro, el cierre con llave de instalaciones y equipos, accesos restringidos mediante tarjetas de identificación o mediante parámetros biométricos (iris o huella dactilar). El laboratorio debe disponer de medidas para garantizar que todos los cambios que tengan lugar en las instalaciones y que estén relacionados con el diseño, el funcionamiento o el mantenimiento se documenten, y que dicha documentación se utilice para actualizar las evaluaciones previas del riesgo biológico que puedan resultar afectadas por dichos cambios. Los controles de ingeniería incluyen los principios de contención citados en el punto 2.1 (barreras primarias, secundarias y terciarias).

- **Equipos de Protección Individual:** protección del cuerpo (es decir, ropa), protección de las manos (guantes), protección ocular y protección respiratoria.

En el caso particular de **los Laboratorios de Diagnóstico en Sanidad Animal**, pueden implementar su sistema de gestión del riesgo biológico (siguiendo la denominada Estructura de Alto Nivel de ISO) de manera similar a otros sistemas de gestión que tengan incorporados (sistemas de gestión de la calidad, sistemas de gestión medioambiental o sistemas de gestión de Prevención de Riesgos Laborales) o de manera agrupada en un único Sistema Integrado de Gestión (SIG).

El sistema de gestión del riesgo biológico, que sigue esta estructura, está basado en la norma **ISO 35001:2019. “Gestión del riesgo biológico en laboratorios y otras organizaciones relacionadas”**. Esta norma:

- establece los principios de gestión del riesgo biológico que permiten a los laboratorios y a las instalaciones relacionadas lograr sus objetivos de bioseguridad y bioprotección;
- define los componentes esenciales de un marco de referencia del sistema de gestión del riesgo biológico para integrarlos en la gobernanza, la estrategia, la planificación, la gestión, los procesos de información, las políticas, los valores y la cultura de laboratorios u otras organizaciones relacionadas;
- describe un proceso integral de gestión del riesgo biológico que mitiga los riesgos biológicos (riesgos de bioseguridad y bioprotección); y
- proporciona orientación sobre la implementación y el uso de la norma, cuando sea apropiado.

El sistema de gestión del riesgo biológico se basa en un enfoque de sistema de gestión, que permite a una organización identificar, evaluar, controlar y valorar de manera efectiva los riesgos de bioseguridad y de bioprotección inherentes a sus actividades.

El sistema de gestión del riesgo biológico se basa en el concepto de mejora continua a través de un ciclo de planificación, implementación, revisión y mejora de los procesos y acciones que una organización emprende para cumplir sus objetivos. Esto se conoce como el principio de Planificar, Hacer, Verificar, Actuar (PHVA).

#### **4. REQUISITOS PARA EL TRABAJO CON AGENTES BIOLÓGICOS DE ACUERDO A SU CLASIFICACIÓN POR GRUPO DE RIESGO.**

La Organización Mundial para la Salud (OMS) clasifica los microorganismos infecciosos en cuatro grupos en función del riesgo intrínseco que suponen. Las siguientes definiciones han sido establecidas para su utilización en trabajo de laboratorio.

Los cuatro grupos de riesgo son:

- Grupo de riesgo 1: Presentan riesgo individual y poblacional escaso o nulo. Microorganismos que tienen pocas probabilidades de provocar enfermedades en el ser humano o los animales.
- Grupo de riesgo 2: El riesgo individual es moderado y el riesgo poblacional bajo. Son agentes patógenos que pueden provocar enfermedades humanas o animales pero que tienen pocas probabilidades de entrañar un riesgo grave para el personal de laboratorio, la población, el ganado o el medio ambiente. La exposición en el laboratorio puede provocar una infección grave, pero existen medidas preventivas y terapéuticas eficaces y el riesgo de propagación es limitado
- Grupo de riesgo 3: El riesgo individual es elevado y el riesgo poblacional bajo. Son agentes patógenos que suelen provocar enfermedades humanas o animales graves, pero que de ordinario no se propagan de un individuo a otro. Existen medidas preventivas y terapéuticas eficaces
- Grupo de riesgo 4: El riesgo individual y poblacional son elevados. Son agentes patógenos que suelen provocar enfermedades graves en el ser humano o los animales y que se transmiten fácilmente de un individuo a otro, directa o indirectamente. Normalmente no existen medidas preventivas y terapéuticas eficaces.

Esta clasificación de los agentes en 4 grupos de riesgo, queda recogida también en el Real Decreto 664/1997, de 12 de Mayo, sobre la protección de los trabajadores contra los riesgos relacionados con la exposición a agentes biológicos durante el trabajo. Este Real Decreto tiene por objeto la protección de la salud y la seguridad de los trabajadores contra los riesgos derivados de la exposición a agentes biológicos durante el trabajo.

Según el RD 664/1997, las actividades que supongan la manipulación de un agente biológico se ejecutarán:

- Únicamente en zonas de trabajo que correspondan por lo menos al nivel 2 de contención, para un agente biológico del grupo 2.
- Únicamente en zonas de trabajo que correspondan por lo menos al nivel 3 de contención, para un agente biológico, del grupo 3.
- Únicamente en zonas de trabajo que correspondan por lo menos al nivel 4 de contención, para un agente biológico del grupo 4.

Como ya dijimos, los laboratorios se clasifican en cuatro niveles de seguridad biológica que se estructuran siguiendo una combinación tanto de técnicas de laboratorio como de equipos de seguridad e instalaciones

Atendiendo al Anexo IV del RD 664/1997, en función del resultado de la evaluación de riesgos, se deberán tomar las siguientes medidas de contención para cada nivel de contención establecido<sup>1</sup>:

A. Medidas de Contención	B. Niveles de Contención		
	2	3	4
<b>Lugar de Trabajo</b>			
1. El lugar de trabajo se encontrará separado de toda actividad que se desarrolle en el mismo edificio	No	Aconsejable	Sí
2. El lugar de trabajo deberá poder precintarse para permitir su desinfección	No	Aconsejable	Sí
<b>Instalaciones</b>			
3. El material infectado, animales incluidos, deberá manejarse en una cabina de seguridad biológica o en un aislador u otra contención apropiada	Cuando proceda	Sí, cuando la infección se propague por el aire	Sí
<b>Equipos</b>			
4. El aire introducido y extraído del lugar de trabajo se filtrará mediante la utilización de filtros absolutos HEPA (1) o similares	No	Sí, para la salida de aire	Sí, para la entrada y la salida de aire
5. El lugar de trabajo se mantendrá con una presión negativa respecto a la presión atmosférica	No	Aconsejable	Sí
6. Superficies impermeables al agua y de fácil limpieza	Sí, para el banco de pruebas o mesa de trabajo y el suelo	Sí, para el banco de pruebas o mesa de trabajo, el suelo y otras superficies determinadas mediante una evaluación de riesgo	Sí, para el banco de pruebas o mesa de trabajo, las paredes, el suelo y los techos
7. Superficies resistentes a ácidos, álcalis, disolventes, desinfectantes	Aconsejable	Sí	Sí
<b>Normas de Trabajo</b>			
8. Solamente se permitirá el acceso al personal designado	Aconsejable	Sí	Sí, mediante esclusa (2)
9. Control eficaz de los vectores (por ejemplo, roedores e insectos)	Aconsejable	Sí	Sí
10. Procedimientos de desinfección Especificados	Sí	Sí	Sí
11. Almacenamiento de seguridad para agentes biológicos	Sí	Sí	Sí, almacenamiento seguro
12. El personal deberá ducharse antes de abandonar la zona de contención	No	Aconsejable	Aconsejable
<b>Residuos</b>			

<sup>1</sup> Orden TES/1180/2020, de 4 de diciembre, por la que se adapta en función del progreso técnico el Real Decreto 664/1997, de 12 de mayo, sobre la protección de los trabajadores contra los riesgos relacionados con la exposición a agentes biológicos durante el trabajo aclara el término "Aconsejable" que significa que, en principio, las medidas deben aplicarse, excepto si los resultados de la evaluación de riesgo indiquen lo contrario.

13. Proceso de inactivación validado para la eliminación segura de las canales de animales	Aconsejable	Sí, dentro o fuera de las instalaciones	Sí, en las instalaciones
<b>Otras medidas</b>			
14. Laboratorio con equipo propio	No	Aconsejable	Sí
15. Se instalará una ventanilla de observación, o un dispositivo alternativo, que permita ver a sus ocupantes	Aconsejable	Aconsejable	Sí

(1) Filtro HEPA (High efficiency particulate air): Filtro para partículas en aire de alta eficacia.

(2) Esclusa: La entrada debe efectuarse a través de una esclusa, una cámara aislada del laboratorio. El lado limpio de la esclusa ha de estar separado del lado restringido mediante unas instalaciones con vestuarios o duchas y preferiblemente con puertas enclavadas entre sí.

En el cuadro, "Aconsejable" significa que, en principio, las medidas deben aplicarse, excepto si los resultados de la evaluación de riesgos indiquen lo contrario.

A continuación detallaremos a grandes rasgos, teniendo en cuenta lo establecido en la Guía Técnica para la evaluación y la prevención de los riesgos relacionados con la exposición a agentes biológicos, los requerimientos de los laboratorios en función de su nivel de contención:

#### **4.1. LABORATORIOS DE NIVEL DE CONTENCIÓN 1**

El trabajo que se lleva a cabo en él no supone riesgo significativo de enfermedad para un trabajador sano. No obstante, las recomendaciones serían:

##### **4.1.1. Prácticas de laboratorio**

- El acceso al laboratorio estará limitado, a juicio del responsable del mismo, cuando los experimentos se hallen en marcha.
- Las superficies donde se trabaja deberían ser descontaminadas una vez al día y después del derramamiento de cualquier material infeccioso.
- Está prohibido pipetear con la boca.
- No está permitido comer, beber, fumar o maquillarse en el laboratorio.
- La comida se almacenará en armarios o refrigeradores destinados a tal fin y situados fuera de la zona de trabajo.
- Antes de dejar el laboratorio, el personal que haya manejado materiales o animales contaminados debe lavarse las manos.
- Cualquier técnica o manipulación debe ser efectuada de manera que minimice la creación de aerosoles.
- Se recomienda el empleo de batas u otro tipo de equipamiento que prevenga la contaminación de la ropa de calle.

##### **4.1.2. Prácticas especiales**

- Los materiales contaminados se irán depositando en contenedores apropiados, que se podrán cerrar para su traslado.
- Debería existir un programa de desinsectación y desratización.

#### **4.1.3. Equipo de seguridad**

- Normalmente no es necesario.

#### **4.1.4. Instalaciones**

- El laboratorio estará diseñado de manera que su limpieza resulte cómoda y accesible.
- Las mesas serán impermeables y resistentes a ácidos, álcalis, disolventes orgánicos y al calor moderado.
- El mobiliario será robusto. Entre mesas, estanterías, armarios, cabinas y otros equipos deberá existir espacio suficiente para permitir la fácil limpieza del laboratorio.
- El laboratorio estará provisto de un lavabo donde lavarse las manos.
- Si el laboratorio dispusiera de ventanas que se pudieran abrir, éstas deberían llevar protección frente a la entrada de insectos.

### **4.2. LABORATORIOS DE NIVEL DE CONTENCIÓN 2**

Incluyen las prácticas e instalaciones establecidas para los laboratorios de contención biológica de tipo 1 más las específicas para los laboratorios de contención biológica de tipo 2

#### **4.2.1. Prácticas de laboratorio**

- El responsable de seguridad e higiene podrá limitar o restringir el acceso al laboratorio cuando el trabajo esté en marcha.
- Todos los residuos, tanto líquidos como sólidos, deberían descontaminarse antes de su eliminación.

#### **4.2.2. Prácticas especiales**

- Los materiales contaminados que han de ser descontaminados fuera del laboratorio se irán depositando en contenedores apropiados que podrán cerrarse para ser trasladados desde el laboratorio.
- El responsable de seguridad e higiene limitará el acceso al mismo. De esta manera, personas con riesgo de adquirir infecciones o para las que una infección pueda resultar especialmente peligrosa no tendrán permitida la entrada al laboratorio.
- Cuando los agentes infecciosos que se manejen requieran el empleo de medidas de seguridad adicionales (por ejemplo, estar vacunado), en la puerta de acceso al laboratorio deberá colocarse un cartel que lo indique claramente, junto con el símbolo de “peligro o riesgo biológico”.
- Se llevarán a cabo programas de desinsectación y desratización de la instalación.
- Siempre que se esté en el laboratorio, el personal llevará una bata o protección similar.

- Cuando se abandone el laboratorio para acceder a otras dependencias (cafetería, biblioteca,...), esta bata deberá dejarse siempre en el laboratorio.
- En el lugar de trabajo no se permitirá la presencia de animales no relacionados con el trabajo en marcha.
- Se prestará especial atención para evitar la contaminación a través de la piel, por lo que se deberán de llevar guantes cuando se manipule material infeccioso.
- Todos los residuos del laboratorio deben ser descontaminados adecuadamente antes de su eliminación.
- Las agujas hipodérmicas y jeringuillas que se empleen para la inoculación parenteral o extracción de fluidos de los animales o de contenedores irán provistas de diafragma.
- Será necesario prestar especial atención a la autoinoculación y a la creación de aerosoles. Las agujas y jeringuillas se desecharán en contenedores destinados a tal fin, que se descontaminarán en autoclave antes de su eliminación.
- Los derramamientos y otros accidentes que tengan como consecuencia la sobreexposición del personal a materiales infectados deberán ser comunicados al responsable de seguridad e higiene.

#### **4.2.3. Equipos de seguridad**

- Cabinas de seguridad de clase I o II u otros sistemas de protección física del personal, que se emplearán cuando se lleven a cabo técnicas con un alto riesgo de formación de aerosoles o se utilicen grandes volúmenes o altas concentraciones de agentes infecciosos.

#### **4.2.4. Instalaciones**

- Se dispondrá de un autoclave para descontaminar los residuos que genere el laboratorio.
- Es aconsejable la instalación de una ventanilla de observación o un dispositivo alternativo (por ejemplo, cámaras) en la zona de trabajo, de manera que puedan verse sus ocupantes, así como poner de manifiesto los accidentes e incidentes que puedan producirse.

### **4.3. LABORATORIOS DE NIVEL DE CONTENCIÓN 3**

Incluyen las prácticas e instalaciones establecidas para los laboratorios de contención biológica de tipo 2 más las específicas para los laboratorios de contención biológica de tipo 3

#### **4.3.1. Prácticas especiales**

- Cuando se estén llevando a cabo ensayos, las puertas deben permanecer siempre cerradas.
- El responsable de seguridad e higiene del laboratorio será quien controle el acceso al mismo y quien restrinja, a su criterio, la entrada a personas cuya presencia sea requerida por razones ajenas al trabajo que se realiza (personal de mantenimiento, visitantes,...).

- Cuando en el laboratorio se encuentre material infeccioso o animales infectados, en todas las puertas de acceso al mismo se colocará el signo de “peligro biológico” junto con cualquier requisito especial que, para acceder al laboratorio, sea necesario (inmunizaciones, respiradores, etc.).
- Todas las actividades que estén relacionadas con la manipulación de materiales infecciosos serán realizadas en cabinas de bioseguridad adecuada o mediante el empleo de cualquier otro equipo sustitutorio.
- Las superficies de trabajo de las cabinas y otros equipos de seguridad se descontaminarán una vez que el trabajo con el material infectado haya concluido. Puede ser de utilidad el empleo de materiales desechables especiales para cubrir determinadas superficies.
- Deberá llevarse ropa de uso exclusivo en el laboratorio y nunca la ropa de calle. Esta ropa de trabajo será esterilizada antes de ser lavada.
- Las tomas de vacío deberán estar protegidas con filtros HEPA y los sifones deberán descontaminarse.
- Las jeringuillas y agujas hipodérmicas, que se empleen para la inoculación parenteral y aspiración de fluidos de animales así como para la aspiración de contenedores, deberán ir provistas de diafragma. Es preferible el empleo de jeringuillas que lleven la aguja incorporada. Al manejar estos elementos se pondrá un cuidado especial en evitar la autoinoculación así como la producción de aerosoles.
- Las jeringuillas usadas se desecharán en envases apropiados que serán descontaminados en autoclave.
- Los derramamientos o accidentes que traigan como consecuencia una potencial exposición al material infectado deberán ser inmediatamente comunicados al responsable de seguridad e higiene.
- Todo el personal que trabaje en el laboratorio se deberá hacer una vigilancia de la salud periódica.
- Se dispondrá de un Manual de Seguridad Biológica.

#### **4.3.2. Equipo de seguridad**

- En todas las actividades que impliquen manejo de material infectado, con peligro de producción de aerosoles, se deberán emplear cabinas de seguridad biológica u otros equipos de seguridad apropiados.
- El laboratorio deberá estar separado de las zonas donde no exista restricción a la entrada de personal. Para acceder al mismo desde los pasillos u otras zonas contiguas es conveniente el paso a través de una doble puerta. La separación del laboratorio del resto de instalaciones también puede efectuarse mediante salas, como vestuarios, que contengan duchas, esclusas,...

- Las superficies de paredes, suelos y techos deben ser impermeables y de fácil limpieza.
- Cualquier canalización o entrada de tuberías a través de cualquiera de estas superficies irá cubierta de manera que se pueda efectuar la descontaminación del laboratorio en las condiciones adecuadas.
- El mobiliario será robusto. Entre mesas, estanterías, armarios, cabinas y otros equipos deberá existir espacio suficiente para permitir la fácil limpieza del laboratorio.
- Cada laboratorio dispondrá de un lavabo para lavarse las manos. Este lavabo deberá ponerse en funcionamiento con un pedal, con el codo o automáticamente, y estará situado cerca de la puerta de salida del laboratorio.
- Las ventanas permanecerán siempre cerradas y selladas.
- Las puertas de acceso al laboratorio deberán ser de cierre automático.

#### **4.3.3. Instalaciones**

- La entrada y salida del aire estará canalizado, de manera que el sistema cree una corriente de aire que haga que éste entre al laboratorio desde las zonas de acceso al interior, y que el aire de salida vaya directamente al exterior sin recircularse. El personal deberá verificar si la dirección del aire dentro del laboratorio es en todo momento la correcta. El aire de salida se filtrará mediante filtros HEPA antes de llegar al exterior.
- La zona de contención se mantendrá en presión negativa respecto a las áreas circundantes, en gradiente diferencial unidireccional controlado, de manera que la depresión sea menor en las zonas potencialmente menos contaminadas y mayor en las zonas potencialmente más contaminadas.
- Es aconsejable la instalación de una ventanilla de observación o un dispositivo alternativo (por ejemplo, cámaras) en la zona de trabajo, de manera que puedan verse sus ocupantes, así como poner de manifiesto los accidentes e incidentes que puedan producirse.

#### **4.4. LABORATORIOS DE NIVEL DE CONTENCIÓN 4**

Incluyen las prácticas e instalaciones establecidas para los laboratorios de contención biológica de tipo 3 más las específicas para los laboratorios de contención biológica de tipo 4.

##### **4.4.1. Prácticas especiales**

- Los materiales biológicos que tengan que salir del laboratorio o de las cabinas de Clase III lo harán en un contenedor irrompible, el cual irá a su vez en un segundo contenedor hermético y de fácil descontaminación. Para permitir la salida de este material, el segundo contenedor se pasará por un producto descontaminante.
- Ningún material, excepto el biológico que deba permanecer intacto, saldrá del laboratorio sin ser descontaminado en autoclave. El equipo o material que pueda resultar dañado por las

condiciones de la esterilización se descontaminará de manera similar a como se hace con el biológico.

- La entrada al laboratorio estará limitada mediante medidas de seguridad adicionales.
- El personal que entra en el laboratorio sólo podrá salir a través de un vestuario con ducha; cada vez que abandone el laboratorio obligatoriamente deberá tomar una ducha.
- La ropa de calle se dejará en el vestuario y se la cambiará por otra de uso exclusivo para el laboratorio de nivel 4. Cuando se vaya a salir del laboratorio, esta ropa se introducirá en una caja hermética de transporte que se descontaminará antes de ser llevada al exterior.
- El símbolo universal de “peligro biológico” estará situado en la puerta de entrada. En los casos necesarios, se indicará además el tipo de agente biológico que se maneja, así como la identificación y modo de localización del responsable de seguridad e higiene, y también la necesidad de emplear determinados equipos de seguridad adicionales.
- El suministro de materiales se realizará a través de un autoclave de doble puerta, esclusa o cámara de descontaminación superficial.

#### **4.4.2. Equipos de seguridad**

- Todas las manipulaciones que se lleven a cabo en el laboratorio se efectuarán en cabinas de clase III o en cabinas de clase II en combinación con trajes autónomos de respiración asistida y presión positiva en el interior.

#### **4.4.3. Instalaciones**

- Un laboratorio de máxima seguridad o de nivel de contención 4, puede considerarse tanto una instalación independiente como parte de una zona claramente demarcada dentro del edificio general. Se requieren vestuario de entrada y de salida con duchas. Para aquellos materiales que no puedan pasar a través de los vestuarios, es imprescindible contar con un autoclave con doble puerta, o una esclusa o cámara de descontaminación superficial.
- Las paredes, techos y suelos estarán contruidos de manera que formen una “cámara” sellada que facilite la descontaminación y no permita la entrada de insectos o roedores. Las superficies internas de esta cámara serán resistentes a los productos químicos, de manera que sea posible la limpieza y descontaminación por la vía más conveniente para cada caso. Todas las conducciones que penetren en el laboratorio irán cubiertas.
- Todos los desagües estarán conectados directamente con el sistema de descontaminación de desechos. La salida del aire debe ser a través de un filtro HEPA.
- Cualquier ventana que exista llevará cristal irrompible.
- Para pasar materiales dentro del laboratorio existirá un autoclave de doble puerta. La puerta que da a la parte exterior del laboratorio estará controlada automáticamente, de manera que sólo se pueda abrir cuando el ciclo de esterilización haya finalizado.

- Para los equipos que no puedan ser introducidos en el autoclave existirá un contenedor con líquido descontaminante o algún sistema similar.
- Los efluentes de las pilas de lavado, de los suelos y autoclaves se tratarán con calor antes de salir del laboratorio.
- La entrada y salida del aire estarán individualizadas del resto del edificio.
- El aire de salida se filtrará a través de un filtro HEPA, que se situará lo más cerca posible del laboratorio, con el fin de reducir al máximo la contaminación de las conducciones.
- Incluye alarmas y bombonas de oxígeno de emergencia.
- Para entrar a este laboratorio se hará a través de una esclusa. Antes de abandonar por completo la zona, el personal que lleve este tipo de traje tomará, para su descontaminación, una ducha química.

Al igual que los laboratorios, **los animalarios pueden clasificarse** en cuatro niveles de bioseguridad. Las indicaciones relativas a las medidas de contención para cada uno de los niveles se resumen en el Apéndice 12 de la Guía Técnica para la evaluación y la prevención de los riesgos relacionados con la exposición a agentes biológicos.

### **BIBLIOGRAFÍA.**

Capítulo 1.1.4 del Manual de las Pruebas de Diagnóstico y de las Vacunas para los Animales Terrestres de la OIE. Bioseguridad y bioprotección: Norma para la gestión del riesgo biológico en el laboratorio veterinario y en las instalaciones de los animales. Edición vigente en el manual on-line.

Abad, Xavier. 2010. Bioseguridad y biocontención: reflexiones. Actualidad SEM 49: 20-26.

Organización Mundial de la salud: [www.who.int/en/](http://www.who.int/en/)

U.S. Department of Health and Human Services. Public Health Service Centers for Disease Control and Prevention National Institutes of Health (CDC). Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories. Sexta edición

Real Decreto 664/1997, de 12 de mayo, sobre la protección de los trabajadores contra los riesgos relacionados con la exposición a agentes biológicos durante el trabajo.

Guía Técnica para la evaluación y la prevención de los riesgos relacionados con la exposición a agentes biológicos, elaborada por el Instituto Nacional de Seguridad e Higiene en el Trabajo.

Norma UNE 171400-1:2019 de Diseño de instalaciones de nivel 3 de contención biológica (NCB3).

Norma UNE-ISO 35001 Gestión del riesgo biológico en laboratorios y otras organizaciones relacionadas. Manual de bioseguridad de laboratorios de la OMS. Cuarta edición. 2021.

Versión en Inglés. <https://www.who.int/publications/i/item/9789240011311>

MATERIAL NO OFICIAL

**MATERIAL PARA LA PREPARACIÓN DEL TEMA 16**

**PRODUCTOS QUÍMICOS UTILIZADOS EN LOS LABORATORIOS:  
CLASIFICACIÓN POR SU RIESGO, MANIPULACIÓN Y ALMACENAMIENTO.  
FICHAS DE SEGURIDAD. ACTUACIONES EN INCIDENTES/ACCIDENTES  
POR PRODUCTOS QUÍMICOS.**

*Este material no tiene carácter oficial, por lo que en ningún caso vinculará al Tribunal Calificador. Constituye, únicamente, un instrumento complementario que servirá de apoyo al opositor para enfocar cada uno de los epígrafes, pero nunca de forma exclusiva ni excluyente. El Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación no se hace responsable del contenido del mismo.*

*Los materiales no serán objeto de actualización constante.*

## **ÍNDICE**

### **1. PRODUCTOS QUÍMICOS UTILIZADOS EN LOS LABORATORIOS**

1.1. INTRODUCCIÓN

1.2. CONCEPTOS

1.3. LEGISLACIÓN DE PRODUCTOS QUÍMICOS

1.3.1. Normativa Europea

1.3.2. Normativa Nacional

### **2. CLASIFICACIÓN DE PRODUCTOS QUÍMICOS**

### **3. MANIPULACIÓN DE PRODUCTOS QUÍMICOS**

### **4. ALMACENAMIENTO DE PRODUCTOS QUÍMICOS**

### **5. FICHAS DE SEGURIDAD**

### **6. ACTUACIONES EN INCIDENTES/ACCIDENTES POR PRODUCTOS QUÍMICOS**

6.1. CONCEPTO

6.2. GESTIÓN DEL RIESGO

6.3. GESTIÓN DE INCIDENTES Y ACCIDENTES

6.4. RESPUESTA ANTE INCIDENTES/ACCIDENTES

6.5. INVESTIGACIÓN DEL INCIDENTE/ACCIDENTE

## 1. PRODUCTOS QUIMICOS UTILIZADOS EN LOS LABORATORIOS

### 1.1. INTRODUCCIÓN

La manipulación de productos químicos es una actividad muy extendida en los laboratorios de ensayo. El procesamiento, almacenamiento, transporte y uso pueden tener efectos adversos sobre la salud y la seguridad de los trabajadores que los manejan o sobre las instalaciones que los contienen, generando enfermedades profesionales, accidentes o incidentes de trabajo.

La realización de este tipo de tareas en condiciones adecuadas de seguridad está condicionada, por un lado, por la utilización de sustancias que cumplan con los requisitos de comercialización, y por otro lado por el cumplimiento de la normativa de prevención de riesgos laborales.

Estos dos conceptos están cubiertos por una extensa normativa.

En cuanto a **la comercialización**, la normativa existente establece criterios que el responsable de la puesta en el mercado debe cumplir referente a:

- Clasificación.
- Envasado y etiquetado.
- Fichas de datos de seguridad.
- Limitación y prohibición de comercialización.

En cambio, en cuanto a la **Prevención de Riesgo Laborales** la normativa está dirigida a la adecuada gestión del riesgo frente a los productos químicos relacionada directamente con:

- **La peligrosidad** del agente químico derivadas de sus propiedades físico-químicas o toxicológicas.
- **El manejo** en sí de los agentes químicos en el laboratorio.

### 1.2. CONCEPTOS

Podemos definir **agente químico** como todo elemento o compuesto químico, por sí solo o mezclado tal como se presenta en estado natural o producido, utilizado o vertido en una actividad laboral, se haya o no elaborado de manera intencional y se haya comercializado o no.

Aquel agente químico que pueda representar un riesgo para la seguridad y salud de los trabajadores debido a sus características físico-químicas o toxicológicas en el lugar de trabajo es definido como **agente químico peligroso**.

Todo trabajo en el que se utilicen agentes químicos o esté previsto utilizarlo, en cualquier proceso, incluidos la producción, la manipulación, el almacenamiento, el transporte o la evacuación y el tratamiento o que se produzcan como resultado de dicho trabajo es considerada como **actividad con agente químicos**.

Se considera **exposición a un agente químico**: presencia de un agente químico en el lugar de trabajo que implica el contacto de éste con el trabajador, normalmente, por inhalación o por vía dérmica.

En cualquier tipo de laboratorio si se va a trabajar con un agente químico peligrosos se debe valorar si es posible la sustitución del agente. En caso de que esto no sea posible se deberá establecer las medidas técnicas y organizativas, siguiendo un orden de prioridad, encaminadas a reducir al mínimo el riesgo relacionado con su manipulación. Estas medidas deberán ser adecuadas a la naturaleza y a las condiciones de la operación, incluidos la manipulación y el almacenamiento y el transporte de los agentes químicos en el lugar de trabajo, y en su lugar la separación de los agentes químicos incompatibles.

Por eso, todos los trabajadores que tengan que manipular productos químicos peligrosos, deberán estar capacitados para interpretar la información que se le suministra con el producto químico, con el objeto de tomar las medidas necesarias para la protección de la salud y la seguridad en el lugar de trabajo, así como la protección del medio ambiente.

### 1.3. LEGISLACIÓN DE PRODUCTOS QUÍMICOS

#### 1.3.1. Normativa Europea

En el ámbito de la Unión Europea la política de prevención y control de los productos químicos está regulada principalmente por los siguientes reglamentos:

- **El Reglamento (CE) 1907/2006 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 18 de diciembre de 2006, relativo al registro, la evaluación, la autorización y la restricción de las sustancias y preparados químicos (REACH)**, por el que se crea la Agencia Europea de Sustancias y Preparados Químicos, se modifica la Directiva 1999/45/CE y se derogan el Reglamento (CEE) nº 793/93 del Consejo y el Reglamento (CE) nº 1488/94 de la Comisión así como la Directiva 76/769/CEE del Consejo y las Directivas 91/155/CEE, 93/67/CEE, 93/105/CE y 2000/21/CE de la Comisión.

Entró en vigor el 1 de junio de 2007 y tiene como objetivo principal mejorar la protección para la salud humana y el medio ambiente frente al riesgo que puede conllevar la fabricación, comercialización y uso de las sustancias y mezclas químicas.

En principio el REACH es de aplicación para todas las sustancias químicas presentes en la vida diaria ya sea como tales, en forma de mezclas o contenidas en artículos, siendo, por tanto, de aplicación en sectores económicos de índole diversa.

Para cumplir con las disposiciones del REACH las empresas deben identificar y gestionar los riesgos asociados a las sustancias que fabrican y comercializan en la Unión Europea. Deben demostrar cómo usar dichas sustancias de manera segura y comunicar toda aquella información relativa a las medidas de gestión de riesgos a las partes implicadas.

Para cumplir con estos objetivos, el Reglamento REACH contempla los siguientes procesos:

- Registro (título II): se tendrá que registrar toda aquella sustancia fabricada/importada en cantidades iguales o superiores a 1 tonelada/año.
- Evaluación (título VI): se evaluarán los riesgos para la salud y el medio ambiente de toda aquella sustancia que suponga un riesgo conforme a los criterios establecidos para la asignación de prioridades.

- Autorización (título VII): se deberá solicitar una autorización de uso para toda aquella sustancia considerada altamente preocupante conforme al Reglamento REACH.
- Restricción (título VIII): determinados usos de las sustancias estarán prohibidos o restringidos cuando supongan un riesgo inaceptable para la salud humana y el medio ambiente.
- **El Reglamento (CE) 1272/2008 del Parlamento Europeo y del Consejo de 16 de diciembre de 2008, sobre clasificación, etiquetado y envasado de sustancias y mezclas, y por el que se modifican y derogan las Directivas 67/548/CEE y 1999/45/CE y se modifica el Reglamento (CE) nº 1907/2006.**

Entró en vigor el 20 de enero de 2009 debido a la necesidad de incorporar a la legislación comunitaria los criterios del Sistema Globalmente Armonizado (SGA) de las Naciones Unidas sobre clasificación, etiquetado y envasado de sustancias y mezclas químicas para lograr una armonización a nivel internacional.

El Reglamento CLP ha sustituido progresivamente a dos actos legislativos anteriores, la Directiva de «Sustancias peligrosas» (DSD) y la Directiva de «Preparados peligrosos» (DPD), que han quedado totalmente derogadas el 1 de junio de 2015, fecha en la que finalizó el periodo transitorio con la entrada en vigor del reglamento CLP para mezclas.

**El CLP tiene entre sus principales objetivos determinar si una sustancia o mezcla presenta propiedades que deban ser clasificadas como peligrosas.** Una vez identificadas dichas propiedades y clasificada la sustancia o mezcla en consecuencia, deberán comunicarse los peligros detectados a través del etiquetado. Así mismo, para velar por el suministro seguro de las sustancias y mezclas peligrosas se establecen disposiciones relativas al envasado.

Además, obliga a notificar a la Agencia Europea de Sustancias y Mezclas Químicas (ECHA) la clasificación y etiquetado de las sustancias fabricadas o importadas en el Espacio Económico Europeo y comercializadas cuando estén sujetas a registro conforme a REACH o estén clasificadas como peligrosas. Esta información formará parte del Catálogo de Clasificación y Etiquetado que la ECHA ha publicado en su página Web, junto con la información relativa a la clasificación y etiquetado presentada como parte de un expediente de registro conforme a REACH.

Para entender el reglamento CLP y las obligaciones que conlleva, es preciso conocer cómo define el propio reglamento sustancia, mezcla y artículo (Art. 3):

- **Por sustancia** se entiende un elemento químico y sus compuestos naturales o los obtenidos por algún proceso industrial, incluidos los aditivos necesarios para conservar su estabilidad y las impurezas que inevitablemente produzca el procedimiento, con exclusión de todos los disolventes que puedan separarse sin afectar a la estabilidad de la sustancia ni modificar su composición.
- **Por mezcla** se entiende la mezcla o solución de dos o más sustancias, que no reaccionan entre sí.
- **Por artículo** se entiende un objeto que, durante su fabricación, recibe una forma, superficie o diseño especiales que determinan su función en mayor medida que su composición química. Los artículos (excepto en el caso de artículos explosivos descritos

en el apartado 2.1 del anexo I del CLP) no se clasifican, etiquetan y envasan en base al reglamento CLP.

Existe legislación en este ámbito desde 1967, fecha en que se reconoció que las disposiciones sobre clasificación, envasado y etiquetado de sustancias en el mercado, especialmente de los productos químicos industriales peligrosos, debía armonizarse en la Comunidad para eliminar las barreras comerciales que podían suponer las disposiciones nacionales de los Estados Miembros. Desde entonces se ha adoptado una serie de instrumentos legislativos comunitarios para alcanzar y mantener un alto nivel de protección de la salud humana y del medio ambiente en el contexto del mercado interior.

### 1.3.2. Normativa Nacional

A los citados Reglamentos Europeos se añade también la siguiente legislación a nivel nacional:

- **Ley 8/2010, de 31 de marzo**, por la que se establece el régimen sancionador previsto en los Reglamentos (CE) relativos al registro, a la evaluación, a la autorización y a la restricción de las sustancias y mezclas químicas (REACH) y sobre la clasificación, el etiquetado y el envasado de sustancias y mezclas (CLP), que lo modifica.
- **Real Decreto 1802/2008, de 3 de noviembre, por el que se modifica el Reglamento sobre notificación de sustancias nuevas y clasificación, envasado y etiquetado de sustancias peligrosas**, aprobado por Real Decreto 363/1995, de 10 de marzo, con la finalidad de adaptar sus disposiciones al Reglamento (CE) 1907/2006 del Parlamento Europeo y del Consejo (Reglamento REACH).
- **Real Decreto 717/2010, de 28 de mayo**, por el que se modifican el Real Decreto 363/1995, de 10 de marzo, por el que se aprueba el Reglamento sobre clasificación, envasado y etiquetado de sustancias peligrosas y el Real Decreto 255/2003, de 28 de febrero, por el que se aprueba el Reglamento sobre clasificación, envasado y etiquetado de preparados peligrosos.
- **Real Decreto 1436/2010, de 5 de noviembre**, por el que se modifican diversos reales decretos para su adaptación a la Directiva 2008/112/CE del Parlamento Europeo y del Consejo, que modifica varias directivas para adaptarlas al Reglamento CLP
- **Real Decreto 1369/2000, de 19 de julio, por el que se modifica el Real Decreto 822/1993, de 28 de mayo**, por el que se establecen los principios de buenas prácticas de laboratorio y su aplicación en la realización de estudios no clínicos sobre sustancias y productos químicos.
- En cuanto a la protección de los trabajadores, **la normativa a aplicar es el RD 374/2001 (y su modificación por el RD 598/2015, de 3 de julio)** sobre la protección de la salud y seguridad de los trabajadores contra los riesgos relacionados con los agentes químicos durante el trabajo.
- **Real Decreto 665/1997, de 12 de mayo**, sobre la protección de los trabajadores contra los riesgos relacionados con la exposición a agentes cancerígenos durante el trabajo.
- **Real Decreto 427/2021, de 15 de junio**, por el que se modifica el Real Decreto 665/1997, de 12 de mayo, sobre la protección de los trabajadores contra los riesgos relacionados con la exposición a agentes cancerígenos durante el trabajo.

- **Real Decreto 656/2017, de 23 de junio**, por el que se aprueba el Reglamento de Almacenamiento de Productos Químicos y sus Instrucciones Técnicas Complementarias MIE APQ 0 a 10.

En España, de acuerdo con el Real Decreto 1802/2008, las Autoridades Competentes para la aplicación de esta legislación en el ámbito de la Administración General del Estado, son el Ministerio de Sanidad en lo que se refiere a salud humana y el Ministerio para la Transición Ecológica y el Reto Demográfico en lo que se refiere a los aspectos medioambientales.

## 2. CLASIFICACIÓN DE PRODUCTOS QUÍMICOS

Una de las primeras cuestiones importantes para el trabajo con agentes químicos y dentro de éstos, con agentes químicos peligrosos, es su clasificación. **La clasificación es el procedimiento por el que se le asigna una o varias categorías de peligrosidad.** Las clases de peligro definen la naturaleza del peligro que se derivan o pueden derivar del uso de productos químicos. Esta clasificación está realizada conforme al reglamento CLP 1272/2008 que se ha comentado con anterioridad.

Se divide en tres grandes bloques:

- **Según su Peligro físico**, debido a sus propiedades físico-químicas:
  - Explosivos: la sustancias y preparados que, incluso en ausencia de oxígeno del aire, pueden reaccionar de forma exotérmica.
  - Inflamables: (gases, líquidos, sólidos y aerosoles) son aquellas sustancias que tienen la capacidad de entrar en combustión, es decir, de arder.
  - Comburente: (gases, líquidos y sólidos) las sustancias y preparados que, en contacto con otras sustancias, en especial con sustancias inflamables, produzcan una reacción fuertemente exotérmica.
  - Gases a presión: incluye una gran variedad de gases con riesgos muy diversos, inflamables, tóxicos, reactivos, comprimidos, licuados, disueltos a presión o criogénicos.
  - Corrosivos para los metales.
  - Peróxidos orgánicos.
  - Sustancias y mezclas que experimentan calentamiento espontáneo.
  - Sustancias y mezclas que, en contacto con el agua, desprenden gases inflamables.
  - Pirofóricos (líquidos y sólidos).
- **Según su peligro sobre la salud**, debido a sus propiedades toxicológicas:
  - Toxicidad aguda.
  - Corrosivo o irritación cutánea.
  - Lesiones oculares graves o irritación ocular.
  - Sensibilización respiratoria o cutánea.
  - Mutagenicidad.
  - Carcinogenicidad.
  - Toxicidad para la reproducción y la lactancia.

- Toxicidad específica a exposición única.
  - Toxicidad específica a exposiciones repetidas.
  - Peligro por aspiración.
- **Según su peligro sobre el medio ambiente:**
- Peligrosos para el medio ambiente acuático.
  - Peligrosos para la capa de ozono.

PELIGROS FÍSICOS (SERIE H 200)			
Explosivos			
Inflamables	Gases		
	Líquidos		
	Sólidos		
	aerosoles		
Comburentes	Gases	 	
	Líquidos		
	Sólidos		
Gases a presión		 	
Reacción espontánea			
Pirofóricos	Líquidos	 	
	Sólidos		
Calentamiento espontáneo		 	
Con agua desprenden gases inflamables			
Peróxidos orgánicos			
Corrosivos para los metales			
PELIGROS PARA LA SALUD (SERIE H 300)			
Toxicidad aguda		 	
Corrosión/irritación cutánea			
Lesiones oculares graves/irritación ocular			
Sensibilización respiratoria y cutánea			
Mutagenicidad		 	
Carcinogenicidad			
Toxicidad para la reproducción y la lactancia			
Toxicidad específica (exposición única)			
Toxicidad específica (exposiciones repetidas)		 	
Peligro por aspiración			
PELIGROS PARA EL MEDIO AMBIENTE (SERIE H 400)			
Peligroso para el medio ambiente acuático			
Peligroso para la capa de ozono			

Estas clases de peligros se dividen en categorías (categorías de peligros) que especifican la gravedad de los peligros dentro de cada clase. Las categorías o subcategorías de peligro llevan asociadas:

- **Un símbolo de peligro**, en forma de pictograma de peligro.
- **Indicaciones de peligro o frases H**, que describen la naturaleza de los peligros y su grado:
  - los peligros físicos vienen agrupados desde la H200 hasta la H300,
  - los peligros para la salud se engloban a partir de la H300,
  - los peligros para el medio ambiente se engloban a partir de la H400.
- **Consejos de prudencia o frases P**, que describen la medida o medidas recomendadas para minimizar o evitar los efectos adversos causados por la exposición a una sustancia o mezcla peligrosa durante su uso o eliminación. Comienzan en la P100 y serán de cinco tipos:
  - Unas generales, a partir de P100.
  - De prevención, a partir de P200,
  - De respuesta, a partir de P300,
  - De almacenamiento, a partir de P400,
  - Y de eliminación, a partir de P500.

### 3. MANIPULACIÓN DE PRODUCTOS QUÍMICOS

La segunda cuestión fundamental cuando se trabaja con agentes químicos es la manipulación. Toda manipulación de productos químicos conlleva un riesgo por lo que es conveniente estar debidamente informado y formado para evitar que dichos riesgos se materialicen en accidentes. Por eso las medidas que hay que tomar ante cualquier producto químico es:

- Leer la Fichas de Datos de Seguridad (FDS) antes de manipular un producto nuevo y actúe conforme a sus indicaciones.
- Planificar las tareas a partir de la información suministrada por el fabricante del producto.
- Disponer de procedimientos por escrito con avisos e instrucciones de manejo seguro.
- Utilizar cabinas de seguridad química cuando así se indique.
- Mantener los recipientes que contienen sustancias químicas cerrados sino se están utilizando.
- No comer ni beber en el lugar donde se manejen productos químicos.
- No reutilizar envases vacíos contaminados con agentes químicos.
- No realizar trasvase de productos químicos de un recipiente a otro sin procedimientos seguros de cómo realizarlo (embudos, sistemas fijos...). En caso de realizarlo, etiquetar debidamente el nuevo recipiente. Se debe trasvasar pequeñas cantidades.
- Evitar trabajar solo cuando se manipulan agentes químicos.
- Limpiar las superficies de trabajo cuando se produzca un derrame y siempre siguiendo las indicaciones de la FDS.
- Comunicar a los responsables cualquier incidente/accidente en el manejo de agentes químicos.
- Utilizar los Equipos de Protección Individual necesarios para cada tipo de producto químico a partir de la evaluación de riesgo realizada y las FDS.
- Evitar en la medida de lo posible el transporte interno de agentes químicos peligrosos.

#### 4. ALMACENAMIENTO DE PRODUCTOS QUÍMICOS

El tercer aspecto importante a la hora de trabajar con agentes químicos peligrosos es su almacenamiento. **Las instalaciones de almacenamiento de productos químicos están sujetas a normativa específica de seguridad**, sin embargo, existen gran variedad de tipos de almacenamiento, a alguno de los cuales no se les aplica la mencionada normativa por lo que deben siempre complementarse con las medidas necesarias derivadas de la preceptiva evaluación de riesgos laborales, teniendo en cuenta las técnicas disponibles en el mercado que favorezcan una mayor seguridad en los almacenamientos.

El RD 656/2017 mencionado en el punto 1.3 de legislación de los productos químicos, aprueba el Reglamento de almacenamiento de productos químicos que faculta al Ministerio de Ciencia y Tecnología a elaborar instrucciones técnicas en las que se reflejan los requisitos que deben cumplir distintos tipos de almacenamientos en función del tipo de productos que contengan. Igualmente, este RD aprueba las llamadas **instrucciones Técnicas Complementarias (ITC)** de Almacenamiento de Productos Químicos por la que se regulan la forma de almacenar determinados productos, como líquidos inflamables y combustibles, óxido de etileno o de cloro...

El hecho de que los almacenamientos de productos químicos estén sujetos a una normativa específica de seguridad exige que sean examinados tras su instalación y/o revisados por entidades o técnicos competentes para ello, aunque no implica que estas instalaciones queden fuera de la evaluación de riesgos laborales y de la consiguiente planificación preventiva.

La peligrosidad de un almacenamiento se determina principalmente a partir de **la peligrosidad de los productos químicos almacenados y de su cantidad**.

Para determinar la peligrosidad de los productos químicos es fundamental, como paso previo, disponer de la FDS de los productos químicos peligrosos almacenados, de conformidad con lo establecido en el título IV del Reglamento (CE) 1907/ 2006 relativo al registro, la evaluación, la autorización y la restricción de las sustancias y preparados químicos (Reglamento REACH). Para aquellos productos que no disponen de FDS (por no serles de aplicación el Reglamento REACH, en su totalidad o en su título IV), se debe recabar la información necesaria (en cuanto a parámetros físicos y químicos, toxicológicos y medioambientales; reactividad; reacciones con el agua, los ácidos, la luz y el calor; polimerización, etc.) para poder estimar la peligrosidad de los mismos.

Una vez determinada la peligrosidad de los productos almacenados, se debe conocer la cantidad de productos químicos almacenados, ya que en función de ello las instalaciones de almacenamiento deberán cumplir distintos requisitos. Por lo tanto, es importante disponer de **un registro** de las cantidades de todos los productos químicos almacenados según su clase de peligro y mantenerla actualizada a medida que entran y salen productos del almacén.

En líneas generales son tres las actuaciones básicas de cara a conseguir un almacenamiento seguro y adecuado de productos:

- **Reducción al mínimo del stock:** se debe plantear un sistema ágil de control del stock con el objeto de evitar las acumulaciones de productos. Se hace necesaria una planificación que garantice las existencias durante periodos cortos de tiempo, aunque requiera una mayor frecuencia de pedidos, sobre todo cuando hablamos de productos químicos inflamables.
- **Separación de productos.** Una vez reducidas las cantidades almacenadas, hay que plantearse la separación de los productos en función de las incompatibilidades que puedan darse entre familias. Se trata de separar ácidos de bases, oxidantes de inflamables...las separaciones pueden efectuarse dedicando una serie de estanterías a una familia determinada, de forma que a su alrededor queden pasillos. Se puede intercalar entre familias de reactivos incompatibles con estanterías de reactivos inertes. También se pueden colocar los recipientes de mayor tamaño y/o los ácidos o bases fuertes en las baldas inferiores.
- **Aislamiento o confinamiento** cuando se requiera por sus propiedades fisicoquímicas. Éste es el caso de los productos cancerígenos en particular y de los productos de alta toxicidad en general. Deben almacenarse en armarios convenientemente identificados y cerrados bajo llave, con control de acceso y consumos y vigilando el estado de los envases para evitar accidentes. Estas sustancias deben contenerse en un doble recipiente que evite dispersiones o derrames en caso de rotura o manipulaciones incorrectas. En el caso de sustancias cuya emisión al ambiente provoque olores muy molestos, se recomienda su confinamiento en recintos pequeños o armarios que puedan ir equipados con un pequeño sistema de extracción.

MATRIZ QUÍMICA DE ALMACENAMIENTO QUÍMICO MIXTO

EXPLOSIVOS	1									
GASES INFLAMABLES										
GASES A PRESIÓN										
LÍQUIDOS Y SÓLIDOS INFLAMABLES										
SUSTANCIAS COMBURENTES										
SUSTANCIAS PERJUDICIALES PARA LA SALUD (DAÑINAS)										
SUSTANCIAS CORROSIVAS										
SUSTANCIAS NOCIVAS										
SUSTANCIAS TÓXICAS										
SUSTANCIAS PELIGROSAS PARA EL MEDIO AMBIENTE										
1. El almacenamiento mixto de explosivos depende de incompatibilidades específicas corrosivos en envases quebradizos no deben almacenarse junto con los líquidos inflamables, excepto que se encuentren separados por gabinetes de seguridad o cualquier medio efectivo para evitar el contacto en caso de incidente										
2. Líquidos corrosivos en envases quebradizos no deben almacenarse junto con los líquidos inflamables, excepto que se encuentren separados por gabinetes de seguridad o cualquier medio efectivo para evitar el contacto en caso de incidente										
	Pueden almacenarse juntos, verificar la reactividad individual con la hoja de seguridad									
	Precaución, posibles restricciones, Revisar incompatibilidades individuales utilizando la hoja de seguridad, pueden ser incompatibles y pueden requerirse condiciones específicas									
	Se requiere almacenar por separado, son incompatibles									

## 5. FICHAS DE SEGURIDAD

Con el fin de adoptar un sistema de información dirigido principalmente a los usuarios que les permita tomar las medidas necesarias para la protección de la salud y de seguridad en el lugar de trabajo y a la protección del medio ambiente, el responsable de la comercialización del producto deberá facilitar al consumidor una ficha de datos de seguridad, de forma gratuita, en castellano y con la primera entrega del producto en papel o en formato electrónico. Se debe proporcionar cuando la sustancia esté clasificada como peligrosa, sea persistente, bioacumulable y tóxica.

Los requisitos de contenido y formato de una ficha de datos de seguridad están actualmente definidos por el Reglamento (UE) 2020/878. El reglamento que entró en vigor el 1 de enero de 2021 sustituye al Reglamento (UE) 2015/830 que contenía los requisitos sustantivos y formales de las fichas de datos de seguridad. Después del 1 de enero de 2023, las fichas de datos de seguridad de todos los productos disponibles en el mercado deben cumplir con este reglamento, lo que significa que todas las fichas de datos de seguridad deben revisarse hasta el 31 de diciembre de 2022.

Los nuevos requisitos para la elaboración de las fichas de datos de seguridad exigen, entre otras cosas, señalar **el identificador único de fórmula (UFI)**<sup>1</sup> que vincula la composición de una mezcla peligrosa con la información presentada a la Administración.

Por otro lado, debe indicarse si se trata de una sustancia con propiedades de alteración endocrina o bien, si se trata de una mezcla, debe indicarse esa información para cada una de las sustancias presentes en ella en una concentración igual o superior al 0,1 % en peso.

Por último, también se facilitarán los límites de concentración específicos, los factores multiplicadores y las estimaciones de toxicidad aguda establecidos de conformidad con el Reglamento CE 1272/2008, para el uso seguro de las sustancias y mezclas.

Estas fichas de seguridad deberán incluir obligatoriamente los siguientes **16 epígrafes o secciones**:

### 1. Identificación de la sustancia o preparado y de la sociedad o empresa.

- Identificador de producto
- Si una mezcla tiene un identificador único de fórmula (UFI) con arreglo al anexo VIII, parte A, sección 5, del Reglamento (CE) 1272/2008 y si dicho UFI se indica en la ficha de datos de seguridad, deberá figurar también en el presente epígrafe.

---

<sup>1</sup> El identificador único de fórmula (UFI) es un código de 16 caracteres que se indicará en la etiqueta de las mezclas para la presentación de mezclas peligrosas que debe realizarse en forma armonizada (PCN). Como resultado de la presentación, el personal médico dispondrá de datos unificados en los estados miembros de la UE. La aplicación del código hace posible que los centros de toxicológicos proporcionen información sobre la mezcla peligrosa durante situaciones de emergencia. El objetivo, por tanto, del código UFI es identificar la composición de una determinada mezcla claramente y proporcionar una respuesta rápida durante una emergencia.

En el Reglamento (UE) 2017/542, que modifica el Reglamento (CE) 1272/2008 (CLP) añadiéndole un nuevo anexo (VIII), se han anunciado disposiciones – obligatorias en todos los estados miembros del EEE – sobre la aplicación del UFI y el etiquetado de mezclas.

- Usos pertinentes identificados de la sustancia o de la mezcla y usos desaconsejados
  - Datos del proveedor de la ficha de datos de seguridad
  - Teléfono de emergencia
2. Identificación de los peligros.
    - Clasificación de la sustancia o de la mezcla
    - Elementos de la etiqueta
    - Otros peligros
  3. Composición /información sobre los componentes, que incluya los números de identificación CAS<sup>2</sup> de cada sustancia.
    - Sustancias.
    - Mezclas
  4. Primeros auxilios.
    - Descripción de los primeros auxilios
    - Principales síntomas y efectos, agudos y retardados
    - Indicación de toda atención médica y de los tratamientos especiales que deban dispensarse inmediatamente
  5. Medidas de lucha contra incendios.
    - Medios de extinción
    - Peligros específicos derivados de la sustancia o la mezcla
    - Recomendaciones para el personal de lucha contra incendios
  6. Medidas en caso de vertido accidental.
    - Precauciones personales, equipo de protección y procedimientos de emergencia
    - Precauciones relativas al medio ambiente
    - Métodos y material de contención y de limpieza
    - Referencia a otras secciones
  7. Manipulación y almacenamiento.
    - Precauciones para una manipulación segura
    - Condiciones de almacenamiento seguro, incluida posibles incompatibilidades
    - Usos específicos finales.
  8. Controles de exposición/protección personal.
    - Parámetros de control
    - Controles de la exposición
  9. Propiedades fisicoquímicas.
    - Información sobre propiedades físico-químicas básicas
    - Otros datos
  10. Estabilidad y reactividad.
    - Reactividad

---

<sup>2</sup> Cada número de registro CAS, o Número CAS, es un identificador numérico único, que designa una única sustancia, que no tiene ningún significado químico, y que enlaza con una gran cantidad de información acerca de esa sustancia química específica. Puede contener hasta 10 dígitos, divididos por guiones en tres partes. El dígito del extremo derecho es un dígito de control para verificar la validez y originalidad de todo el número. Por ejemplo, 67-64-1 es el número CAS para la acetona.

- Estabilidad química
- Posibilidad de reacciones peligrosas
- Condiciones que deben evitarse
- Materiales incompatibles
- Productos de descomposición peligrosos

11. Información toxicológica.

- Información sobre las clases de peligro definidas en el Reglamento (CE) 1272/2008
- Información relativa a otros peligros

12. Información ecológica.

- Toxicidad
- Persistencia y degradabilidad
- Potencial de bioacumulación
- Movilidad en el suelo
- Resultados de la valoración PBT y mPmB<sup>3</sup>
- Propiedades de alteración endocrina
- Otros efectos adversos

13. Consideraciones relativas a la eliminación.

- Métodos para el tratamiento de residuos.

14. Información relativa al transporte.

- Número ONU o número ID<sup>4</sup>
- Designación oficial de transporte de las Naciones Unidas
- Clase(s) de peligro para el transporte
- Grupo de embalaje
- Peligros para el medio ambiente
- Precauciones particulares para los usuarios
- Transporte marítimo a granel con arreglo a los instrumentos de la Organización Marítima Internacional.

15. Información reglamentaria.

- Reglamentación y legislación en materia de seguridad, salud y medio ambiente específicas para la sustancia o la mezcla
- Evaluación de la seguridad química.

16. Otra información que no haya sido incluida en los puntos anteriores, como frases H o P, asesoramiento sobre formación para quienes manipulen el producto químico, explicación de abreviaturas o acrónimos...

<sup>3</sup> La valoración servirá para establecer si la sustancia cumple los criterios de identificación para **las sustancias persistentes, bioacumulables y tóxicas (PBT) o muy persistentes y bioacumulables (mPmB)**, de acuerdo con el anexo XIII de REACH

<sup>4</sup> Los números ONU o ID ONU son números de cuatro cifras que indican sustancias y objetos peligrosos (como explosivos, líquidos inflamables, sustancias tóxicas, etc.) para identificarlas en el transporte internacional. Algunas sustancias peligrosas tienen su propio número ONU (p. ej. la acrilamida se identifica con el UN2074), mientras que algunos grupos de sustancias o productos químicos con características similares comparten número ONU (p. ej. los líquidos inflamables, si no se indica en otra parte, se identifican con el UN1993). Una sustancia química en un formato estable puede tener un número ONU diferente al formato líquido ya que sus características peligrosas varían considerablemente. Las sustancias con niveles distintos de pureza (o de concentración en la solución) también se indican con números ONU diferentes.

Los números ONU van del UN0001 hasta aproximadamente el UN3500 y se conceden por expertos de la comisión de Naciones Unidas para el transporte de mercancías peligrosas

**Otras consideraciones** que se deben tener en cuenta en cuantos a las FDS son:

- No debe contener subsecciones en blanco y debe indicarse claramente si no se utilizan datos específicos o no se dispone de datos.
- El compilador de la ficha de datos de seguridad podrá indicar otras subsecciones, siempre que no contengan información contradictoria con otras secciones de la ficha de datos de seguridad.
- Una ficha de datos de seguridad no es un documento de longitud fija, sino que su longitud debe ser proporcional a los peligros de la sustancia o mezcla y a la información disponible, formulando la información de manera clara y concisa.
- No se utilizarán declaraciones que indiquen que la sustancia o mezcla no es peligrosa (tales como «puede ser peligrosa», «inofensiva», «no tiene efectos sobre la salud») o cualquier otra declaración que sea incompatible con la clasificación de esa sustancia o mezcla.
- Todas las páginas de una ficha de datos de seguridad deberán estar numeradas y llevarán una indicación de la longitud de la ficha de datos de seguridad (como «página 1 de 3») o una indicación de si hay una página siguiente (como «Continúa en página siguiente» o «Fin de la ficha de datos de seguridad»).

A modo de ejemplo, en el siguiente enlace tenéis la FDS de la formamida, reactivo utilizado frecuentemente en los laboratorios de diagnóstico molecular:

[https://www.fishersci.es/chemicalProductData\\_uk/wercs?itemCode=10592971&lang=ES](https://www.fishersci.es/chemicalProductData_uk/wercs?itemCode=10592971&lang=ES)

## 6. ACTUACIONES EN INCIDENTES/ ACCIDENTES POR PRODUCTOS QUÍMICOS

Con objeto de proteger la seguridad y salud de los trabajadores frente a los accidentes, incidentes y emergencias que puedan derivarse de la presencia de agentes químicos peligrosos en el lugar de trabajo, el laboratorio deberá planificar las actividades a desarrollar en caso de que se produzcan tales accidentes, incidentes o emergencias y adoptar las medidas necesarias para posibilitar, en tal caso, la correcta realización de las actividades planificadas.

Los productos químicos pueden provocar diferentes tipos de efectos; explosiones, incendios, enfermedades, contaminar la atmósfera, etc. Cada producto puede ser capaz de provocar uno o más efectos.

### 6.1. CONCEPTOS

Cuando hablamos de actuaciones frente a accidentes y/o incidentes se tiene que tener claro estos conceptos que en ocasiones se confunden:

- **Incidente:** podemos definir incidente como el suceso incontrolado, previsto o resultado de situaciones inesperadas, que pueden dar lugar a algún tipo de perjuicio que no se considera como daño. O dicho de otra manera, cualquier suceso no esperado

ni deseado que, no dando lugar a pérdidas de salud o lesiones a las personas, pueda ocasionar daños a la propiedad, equipos, productos o al medio ambiente, etc.

- **Accidente:** suceso incontrolado, previsto o resultado de situaciones inesperadas, que puede generar daños; es decir, que da lugar a pérdidas de la salud o lesiones a los trabajadores.
- **Daño:** cualquier lesión o efecto indeseable que sufra el trabajador, los animales o el medio ambiente.

En definitiva, cualquier accidente o incidente puede tener un **impacto sobre el medio ambiente**, entendiendo como tal, cualquier cambio en el medio ambiente, sea adverso o beneficioso, resultante en todo o en parte de las actividades o servicios de una organización.

## 6.2. GESTIÓN DEL RIESGO

La base para que los accidentes o incidentes dentro de la actividad de un laboratorio se reduzcan lo máximo posible es la elaboración sistemática de una correcta Evaluación del Riesgo frente a agentes químicos.

La **gestión del riesgo** asociada a cualquier actividad con productos químicos debe estar enfocada en la aplicación de una secuencia de actuación en cascada, de tal manera que cuando no se pueda actuar sobre la primera acción, se ejecutará la siguiente y así sucesivamente.

La **secuencia de actuación en cascada** es la siguiente:

- **Eliminar** la fuente causante del incidente/ accidente. Ej; sustituir el agente químico por otro de menor riesgo.
- **Aislar** la fuente causante del incidente/accidente. Ej; almacenamiento seguro del agente químico atendiendo a su peligrosidad.
- **Protección Colectiva:** utilización equipos de protección colectiva que evite la aparición del accidente/incidente. El fin de la protección colectiva es evitar el accidente Ej; Cabinas de extracción de gases.
- **Protección individual:** utilización de equipos de protección individual con el objetivo de evitar o reducir el daño. Ej; protección respiratoria, guantes de protección química...



Esquema de la secuencia de actuación

### 6.3. GESTIÓN DE INCIDENTES Y ACCIDENTES

Los incidentes y accidentes que pudiesen sucederse en un laboratorio se dividen en dos grupos, los que se pueden prever y los que simplemente suceden de manera inesperada.

Para aquellos incidentes y accidentes que han sido previstos mediante la evaluación inicial de riesgos y/o en posteriores revisiones, la metodología a seguir es:

- Identificación de peligros.
- Aplicación del criterio de valoración
- Evaluación de riesgos. En este punto se establece el Plan de Acción.

Para aquellos incidentes y accidentes que simplemente suceden de manera espontánea, tras realizar un análisis, se establece igualmente el Plan de Acción que quedará reflejado en el Parte de Incidente/Accidente realizada durante la investigación del mismo.

En **el parte de incidente** o accidente quedarán registrados todos los datos relacionados con el mismo (tipo, producto, equipo implicado, hora, fecha, etc.) que incluirá los siguientes aspectos:

- Situación en la que se ha producido el incidente/accidente
- Origen del incidente/accidente: fallo de equipo, fallo humano, incumplimiento de las medidas de prevención.
- Desarrollo del incidente/accidente: detección, comunicación, actuación del personal, material utilizado.
- Daños ocasionados.

Como parte final se establecerá un **“Plan de Acción”** en el que figurará en caso de aplicación:

- Acciones inmediatas a tomar para minimizar las consecuencias del incidente/accidente una vez que se materialice.
- Establecimiento de medidas de prevención y/o protección para evitar su repetición.
- Ampliación del “Plan de medidas preventivas y de control” para evitar su repetición.
- Notificaciones a las Autoridades u Organismos competentes.

A partir de la información generada en la evaluación inicial de riesgos, seguimiento y/o en posteriores revisiones, o de la generada en los incidentes y accidentes ocurridos, se pueden establecer, en caso de necesidad, **unas medidas preventivas** que controlen los riesgos y que limiten las potenciales consecuencias de la ocurrencia de los mismos.

La planificación de las actividades de comprobación de los mecanismos de respuesta a incidentes y accidentes contempla entre otros factores:

- Definición de las actividades concretas de comprobación.
- Herramientas a emplear para cada actividad de comprobación.
- Responsable de la ejecución de cada actividad.
- Plazo previsto para la actividad.

Todas estas actividades permiten detectar deficiencias y/o mejorar los mecanismos de respuesta ante incidentes / accidentes.

#### 6.4. RESPUESTA ANTE INCIDENTES Y ACCIDENTES

En líneas generales **los riesgos más frecuente** por el uso, transporte y almacenamiento de productos químicos son los siguientes:

- Riesgo de incendio o explosión.
- Riesgo de reacciones químicas peligrosas.
- Riesgo por inhalación.
- Riesgo por absorción o penetración a través de la piel.
- Riesgo por contacto con piel, heridas u ojos.
- Riesgo por ingestión.

Como **factores de riesgos** más comunes que desencadenan la aparición de Incidentes /accidentes en un laboratorio están relacionados con:

- Desconocimiento de las características de peligrosidad de las sustancias.
- Empleo de métodos y procedimientos de trabajo peligrosos.
- Malos hábitos de trabajo.
- Empleo de material de laboratorio inadecuado o de mala calidad.
- Instalaciones defectuosas.
- Diseño no ergonómico y falta de espacio.
- Contaminación ambiental

Frente a la ocurrencia de un incidente o un accidente en un laboratorio se debe tener en cuenta

- Qué se debe hacer.
- Quién debe actuar.
- Cómo actuar.
- Dónde actuar.

Como norma general se indicará siempre mantener la calma, tranquilizar al herido, pensar antes de actuar y usar el sentido común. Es conveniente recordar el siguiente orden de actuación:

- **Proteger:** Proteja al accidentado y evitar accidentes secundarios.
- **Avisar:** Solicitar ayuda al personal de primeros auxilios y, si así se estima oportuno, a los teléfonos de urgencias (bomberos, policía, ambulancia, etc.) que se han unificado en el Nº 112.
- **Socorrer:** Atender siempre al herido más grave.

Teniendo en cuenta los tipos de accidentes más habituales las actuaciones serían las siguientes:

- Salpicaduras en los ojos
  - a) Salpicaduras en **la cara y en los ojos:**

- Quitarse los guantes de protección y lavarse con agua durante 10-15 minutos, empleando si fuese necesario, la ducha de seguridad/fuente lavaojos.
  - No intentar neutralizarla.
  - Acudir al médico lo más rápidamente posible, con la ficha de seguridad del producto.
- b) Salpicaduras y contacto directo **sobre la piel descubierta:**
- Quitarse los guantes de protección y lavar la zona afectada con agua abundante y jabón desinfectante de clorhexidina o similar.
- c) Salpicaduras y contacto directo **sobre la ropa o calzado:**
- Valorar si se requiere cambio de ropa o calzado y ducha de emergencia.
  - Desechar la ropa o el calzado en una bolsa de autoclave.
  - Evaluar si ha podido haber salpicadura en el suelo y actuar según lo indicado
- Inhalación de un producto tóxico: Para acercarse a la víctima es necesario hacerlo con un adecuado equipo de respiración. Los pasos a seguir son:
- **Avisar a alguien** próximo con el fin que permanezca fuera de la zona de peligro y sirva de apoyo durante la intervención sobre el accidentado.
  - **Separar a la víctima** de la fuente de producción de la fuga, conduciéndola a un lugar fresco. Esta operación no se debe realizar por una única persona, debe existir el apoyo de otra persona, como mínimo, que se mantenga fuera.
  - Si es posible, **cortar la fuga**.
  - **No suministrar** alimentos, bebidas, ni productos que provoquen activar la respiración.
  - Al primer síntoma de dificultad respiratoria, **iniciar la respiración artificial** boca a boca. Informarse de cuál es el compuesto inhalado.
  - Si el afectado está consciente, hay que mantenerlo apoyado y tapanlo con una manta para evitar la hipotermia.
  - Ante la inhalación de un producto químico o de un gas se debe evacuar a todo el personal del recinto y solicitar inmediatamente asistencia médica. Para poder acceder a la zona de peligro deberá utilizarse la protección respiratoria apropiada.
- Ingestión de un producto tóxico
- **Identificar el tóxico y descartar que sea corrosivo** (ácidos nítrico, sulfúrico, clorhídrico, lejía, sosa, amoníaco, cianuro, etc.), ya que en este caso el traslado urgente es obligatorio.
  - **NUNCA debe provocarse el vómito**, ya que podría aumentar las lesiones que el producto ya originó a su paso por la boca, faringe y esófago.
  - Tampoco se debe provocar el vómito en estados de disminución de la consciencia.
  - Se debe **planificar el traslado urgente** al Servicio Médico y acudir con la Ficha de Seguridad del Producto.
- Corte y contacto por vía cutánea con un producto tóxico
- **Lavar con abundante agua**, hasta conseguir el total arrastre del tóxico.

- Si los cortes son pequeños y dejan de sangrar en poco tiempo, lavar con agua y jabón y taparlos con una venda o apósito adecuados.
- Si son grandes y no dejan de sangrar, se requiere asistencia médica inmediata.
- Quemaduras químicas
  - **Aplicar agua** en abundancia durante varios minutos.
  - **Nunca aplicar antisépticos.**
  - **Quitar la ropa** impregnada de producto, mejor mientras está bajo la ducha.
  - En el caso de que no se pueda sumergir la parte afectada, **se cubrirá esta con toallas bien mojadas**, que se renovarán tantas veces como sea preciso.
  - Si la quemadura precisa un tratamiento posterior será misión del médico realizarlo.
- Derrame de sustancias químicas

Si el derrame se produce **en las instalaciones** el modo de actuación es el siguiente:

  - **Detener el derrame** lo más pronto posible.
  - **Delimitar y aislar la zona.**
  - **Alertar al personal** presente inmediatamente-
  - **Acceder al área** del incidente **utilizando los equipos de protección adecuados.** Al menos debe utilizarse guantes y gafas y máscaras de gases y vapores si es peligroso por inhalación.
  - **Identificar el material derramado.** Si se trata de un derrame potencialmente inflamable, eliminar las fuentes de calor y aumentar la ventilación de la zona de derrame. Si no se conocen los riesgos asociados, consultar la Ficha de Datos de Seguridad del producto químico derramado.
  - **Neutralizar y absorber** el derrame según el tipo, siguiendo el principio de fuera hacia adentro: en el caso de derrame líquido, el material absorbente se esparce en toda el área del derrame comenzando por la parte externa, rodeando el derrame y continuando hacia el interior del mismo. Para la neutralización se debe seguir las recomendaciones de la Ficha de Datos de Seguridad.
  - Todo el material será **segregado en el contenedor** de “Material Absorbente Contaminado” del almacén de Residuos Peligrosos
  - **Limpiar la zona** con abundante agua y ventilar.
  - En el caso de derrames tóxicos o con afectados, atender y trasladar a una zona segura a los heridos y evacuar a toda persona no esencial de la zona del derrame

Si el derrame se produce en **el interior de una cabina de aspiración de gases** el modo de actuación es el siguiente:

- **No desconectar la cabina.**
- **Quitarse los equipos de protección** afectados por el derrame y desecharlos como residuos de “Material Absorbente Contaminado”.
- **Colocarse los equipos de protección adecuados y proceder a recoger** el derrame químico. Al menos, deben utilizarse guantes y gafas, y máscaras de gases y vapores, si el producto químico es tóxico por inhalación.
- **Cubrir el derrame** con papel absorbente para evitar su dispersión dentro de la cabina.

- **Verter** sobre dicho material absorbente, **neutralizantes** líquidos de acuerdo con la ficha de datos de seguridad del producto químico implicado.
- **Limpiar la cabina** con abundante agua y detergente y ventilar dejándola en funcionamiento.
- Todo el material será segregado en el contenedor de “Material Absorbente Contaminado” del almacén de Residuos Peligrosos.

Por último, remarcar que los laboratorios disponen habitualmente de una serie de **elementos de actuación ante emergencias específicos**, además de todos los de Protección Contra Incendios exigidos por normativa. Entre estos elementos nos encontramos con:

- **Duchas de seguridad:** Constituyen el sistema de emergencia más habitual para casos de proyecciones, derrames o salpicaduras de productos químicos sobre las personas con riesgo de quemaduras químicas e incluso si se prende fuego a la ropa. Diseñadas para proteger el cuerpo de los trabajadores frente a sustancias peligrosas y evitar los riesgos de contaminación o quemaduras químicas.
- **Fuente lavaojos:** Es un sistema que debe permitir la descontaminación rápida y eficaz de los ojos afectados por la salpicadura o el derrame de un producto peligroso.
- **Botellas y frascos lavaojos de emergencia:** son botellas lavaojos de disolución salina (al 0,9 %) que puede ser empleada en caso de proyección de líquidos o partículas.
- **Estaciones de seguridad:** que de manera general, podrá contener algunos de los siguientes elementos:
  - Material absorbente inerte específico para productos químicos.
  - Equipo de protección individual, con guantes desechables de nitrilo, gafas integrales, mascarilla 3M FFP2 9926 (partículas y niveles bajos de gases ácidos).
  - Hipoclorito de sodio 3,5-6% (lejía de uso doméstico con 35-60 gr. de Cl activo / litro) para diluir 1/10.
  - Papel y almohadillas absorbentes.
  - Recogedor y cepillo.

## 6.5. INVESTIGACIÓN DE INCIDENTE/ACCIDENTE

Cuando las acciones posteriores al accidente se realizan de manera correcta, permiten determinar las causas de él y sugerir a tiempo medidas adecuadas para reducirlas o eliminarlas y, por lo tanto, contribuir a evitar accidentes futuros. Una investigación a fondo puede identificar áreas problema en un laboratorio y contribuir a reducir los riesgos respectivos. Cuando esto se logra, el resultado es un ambiente de trabajo más seguro.

Las acciones de seguimiento de los accidentes se realizan para:

- Reunir datos y evidencias al respecto.
- Analizarlos objetivamente.
- Obtener conclusiones.
- Hacer recomendaciones para evitar que el accidente se repita.

El objetivo de la investigación del accidente es identificar los hechos y las condiciones en que se produjo, así como cada uno de los daños que ocasionó, además de registrar estos datos y evaluarlos. Es esencial recordar que el objetivo de la investigación de un accidente no es

buscar culpables sino identificar causas para, en una etapa posterior, eliminarlas o reducirlas, en la medida de lo posible.

MATERIAL NO OFICIAL

## BIBLIOGRAFÍA

European Chemicals Agency

<http://echa.europa.eu/>

European Commission. Environment.

[http://ec.europa.eu/environment/chemicals/reach/reach\\_intro.htm](http://ec.europa.eu/environment/chemicals/reach/reach_intro.htm)

Ministerio de Transición Ecológica y reto demográfico

<https://www.miteco.gob.es/es/calidad-y-evaluacion-ambiental/temas/productos-quimicos/reglamento-clp/default.aspx>

Portal de información REACH-CLP

<https://www.miteco.gob.es/es/calidad-y-evaluacion-ambiental/temas/productos-quimicos/portal-reach-clp/>

NTP 725: Seguridad en el laboratorio: almacenamiento de productos químicos

[https://www.insst.es/documents/94886/327446/ntp\\_725.pdf/8d7db0e4-c89d-4b56-94da-c554b1abee32](https://www.insst.es/documents/94886/327446/ntp_725.pdf/8d7db0e4-c89d-4b56-94da-c554b1abee32)

NTP 768 Trasvase de agentes químicos: medidas básicas de seguridad

<https://www.insst.es/documents/94886/327740/ntp-768+.pdf/79d02f5c-a8be-4148-bf5f-a49754785a47>

NTP 371: Información sobre productos químicos: Fichas de datos de seguridad

[https://www.insst.es/documents/94886/326853/ntp\\_371.pdf/7da82c47-3d7a-4859-84d2-ce6b9165b9f9?version=2.0&t=1638264956764](https://www.insst.es/documents/94886/326853/ntp_371.pdf/7da82c47-3d7a-4859-84d2-ce6b9165b9f9?version=2.0&t=1638264956764)

NTP 459: Peligrosidad de productos químicos: etiquetado y fichas de datos de seguridad

[https://www.insst.es/documents/94886/326962/ntp\\_459.pdf/d308a072-28df-440f-a1c2-7744713afa34](https://www.insst.es/documents/94886/326962/ntp_459.pdf/d308a072-28df-440f-a1c2-7744713afa34)

Plan de actuación en caso de accidente/incidente con productos químicos. Gobierno de Euskadi.

<https://www.euskadi.eus/informacion/publicaciones/web01-s2osa/es/adjuntos/GuiaSL11c.pdf>

**MATERIAL PARA LA PREPARACIÓN DEL TEMA 17**

**SISTEMAS DE ESTERILIZACIÓN DE MATERIAL DE LABORATORIO.  
DESCONTAMINACIÓN DE SALAS.**

*Este material no tiene carácter oficial, por lo que en ningún caso vinculará al Tribunal Calificador. Constituye, únicamente, un instrumento complementario que servirá de apoyo al opositor para enfocar cada uno de los epígrafes, pero nunca de forma exclusiva ni excluyente. El Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación no se hace responsable del contenido del mismo.*

*Los materiales no serán objeto de actualización constante.*

## **ÍNDICE**

### **1. INTRODUCCIÓN**

### **2. FACTORES QUE AFECTAN A LA EFICACIA DE LOS PROCESOS DE ESTERILIZACIÓN**

### **3. METODOLOGÍAS DE ESTERILIZACIÓN PREPARATIVA**

#### **3.1. ESTERILIZACIÓN POR CALOR**

3.1.1. Calor húmedo

3.1.2. Calor seco

#### **3.2. ESTERILIZACIÓN POR MÉTODOS MECÁNICOS**

3.2.1. Filtración

#### **3.3. ESTERILIZACIÓN POR RADIACIONES**

#### **3.4. ESTERILIZACIÓN POR MÉTODOS QUÍMICOS**

3.4.1. Agentes químicos líquidos

3.4.2. Esterilizantes gaseosos

### **4. METODOLOGÍAS DE ESTERILIZACIÓN FINAL**

4.1. INCINERACIÓN

4.2. HIDRÓLISIS ALCALINA

4.3. SAS, AIR LOCK y DUNK TANK

4.4. BIOWASTE

### **5. DESCONTAMINACIÓN AÉREA O DE SALAS.**

### **6. CONTROL DE ESTERILIZACIÓN**

## 1. INTRODUCCIÓN

Para el mantenimiento de la biocontención y bioseguridad en el laboratorio, es fundamental disponer de conocimientos básicos sobre la desinfección y la esterilización. Habida cuenta de que los objetos sucios no pueden desinfectarse o esterilizarse con garantías, es igualmente importante comprender los conceptos básicos de la limpieza previa.

La OMS define la esterilización como la técnica de saneamiento cuya finalidad es la destrucción de toda forma de vida, aniquilando todos los microorganismos, tanto patógenos como no patógenos, incluidas sus formas esporuladas, altamente resistentes.

La esterilización es un mecanismo por el que se consigue la muerte o eliminación de todos los microorganismos vivos de una muestra, medio, superficie o material de trabajo. Entre los microorganismos vivos se incluyen bacterias, hongos, protistas, virus y sus formas de resistencia. Un objeto esterilizado está, por lo tanto, totalmente libre de microorganismos, incluyendo sus formas de resistencia.

La esterilización se consigue por métodos físicos o por la aplicación de compuestos químicos. Entre los métodos físicos más comunes está la aplicación de calor (calor húmedo o calor seco), la filtración o las radiaciones. La esterilización, sin embargo, también se puede conseguir mediante la aplicación de algunos productos químicos, como el óxido de etileno, formaldehído o glutaraldehído.

Según el Manual de bioseguridad en el laboratorio de la OMS, la desinfección se define como el proceso, mediante medios físicos o químicos, de matar microorganismos pero no necesariamente de sus esporas. Un objeto desinfectado, por lo tanto, no está estéril.

Por su parte, la limpieza consiste en la eliminación de la suciedad y materia orgánica del material o de la sala a esterilizar o desinfectar.

La limpieza del material o de la sala, según sea el caso, debe ser un paso previo a todo proceso de esterilización o desinfección, ya que el rendimiento o actividad de muchos desinfectantes o germicidas pueden verse afectados por la presencia de suciedad o materia orgánica.

En los animalarios y laboratorios donde se manipulan agentes patógenos, la esterilización es uno de los mecanismos más utilizados, y las técnicas de esterilización aplicables dependen de diversos factores como pueden ser las características del material de trabajo, los procedimientos a realizar, los medios que se vayan a tratar o los agentes patógenos potencialmente presentes.

La esterilización se puede utilizar como esterilización preparativa o como esterilización final. La esterilización preparativa es la que se realiza para mantener libre de microorganismos el material que vamos a utilizar antes de empezar el trabajo en sí mismo o durante el proceso de trabajo (placas Petri, pipetas, medios de cultivo, asas de siembra, hisopos, etc.). La esterilización final, sin embargo, tiene como único fin destruir los microorganismos con los que se ha estado trabajando en el laboratorio antes de desechar el material utilizado y contaminado.

En el primer caso, la elección del proceso de esterilización se debe adecuar para preservar las características de los diversos materiales o medios a esterilizar, pues algunos pueden ser susceptibles de ser destruidos o alterados durante los mecanismos de esterilización. Sin embargo, en la esterilización final no es necesario considerar ni el tipo de medio de cultivo, ni la posible alteración de materiales, sólo deberemos de tener en cuenta que el proceso ha conseguido su finalidad, es decir, la muerte de todos los microorganismos y sus formas de resistencia.

## 2. FACTORES QUE AFECTAN A LA EFICACIA DE LOS PROCESOS DE ESTERILIZACION.

Los factores que afectan a la eficacia de los procesos de esterilización son:

- o **Número de microorganismos.** Este es un factor fundamental ya que es uno de los dos factores que miden la efectividad de los diferentes procesos de esterilización.
- o **Materia orgánica.** La presencia de materia orgánica dificulta la eliminación de los microorganismos, pero es uno de los factores fácilmente modificables. Este factor justifica la importancia de la limpieza antes de la esterilización, para garantizar siempre una disminución de los riesgos que afecten a dicho proceso.
- o **Tiempo.** Es otro de los factores por medio del cual se evalúa la función de los métodos de esterilización. El valor  $F_0^1$  es el tiempo necesario para que una suspensión a temperatura de 121°C elimine todas las esporas bacterianas, es decir, el tiempo en minutos para alcanzar la esterilidad<sup>2</sup> de un producto.
- o **Temperatura.** Al aumentar la temperatura durante un proceso específico de esterilización, su efectividad aumenta.
- o **Humedad relativa.** A mayor humedad relativa, mayor contenido de agua en las células o esporas y mejor resultado final de esterilización; es decir, más rápido.
- o **Estandarización de la carga.** Es importante estandarizar los procesos de esterilización según los diferentes artículos de la carga, ya que la efectividad del método puede variar en función de los artículos.

## 3. METODOLOGÍAS DE ESTERILIZACIÓN PREPARATIVA.

La esterilización preparativa se puede realizar, como se ha indicado, por mecanismos físicos o químicos (Tabla 1). El mecanismo físico más utilizado es el calor, ya sea húmedo o seco; sin embargo, cuando estas metodologías físicas no son aplicables, por las características del material o medio a esterilizar, la filtración o la radiación son los mecanismos a elegir.

---

<sup>1</sup> Otros parámetros considerados son el tiempo de reducción decimal (D) considerado como el tiempo que se requiere a una determinada temperatura para reducir el número inicial de microorganismos viables a una décima parte; o el valor Z, que es la reducción o incremento de temperatura necesarios para aumentar o reducir el índice D diez veces.

<sup>2</sup> La esterilidad de un producto se alcanza cuando la carga microbiológica inicial se ha reducido hasta niveles de seguridad de  $10^{-6}$ , es decir, cuando la probabilidad de que un producto contenga un microorganismo viable es de menos de una en un millón.

Excepcionalmente, cuando no se pueden utilizar las metodologías ya reseñadas, se utiliza generalmente algún tipo de esterilización fría.

La esterilización fría se lleva a cabo en dispositivos cerrados donde se emplea un agente químico gaseoso, como el óxido de etileno, el peróxido de hidrógeno, el formaldehído o líquidos como el glutaraldehído.

Agente Esterilizante	Técnica/Equipo
Calor Húmedo	Autoclave
	Tindalización
Calor Seco	Horno Pasteur
	Mechero
Filtración	Filtros de membrana
	Filtros HEPA
Radiación	Fuente Rayos gamma
	Fuente Rayos X
Óxido de etileno	Cámara
Glutaraldehído	

Tabla 1. Mecanismos de esterilización

### 3.1. ESTERILIZACIÓN POR CALOR

La energía térmica es la forma más efectiva de esterilización. Ésta puede utilizarse como calor húmedo o seco.

El calor “seco”, que no es en absoluto corrosivo, se utiliza para tratar muchos objetos de laboratorio que pueden soportar temperaturas  $\geq 160$  °C durante dos a cuatro horas. El calor “húmedo” es especialmente eficaz cuando se utiliza en el autoclave.

#### 3.1.1. Calor húmedo

La esterilización térmica destruye a los microorganismos de forma gradual; es por esto por lo que no hay un único mecanismo de acción, sino más bien la suma de distintos eventos complejos que se van sucediendo a medida que aumenta la temperatura.

Así, aunque el efecto final de la esterilización por calor húmedo a 121°C es la desnaturalización y coagulación de las proteínas, son importantes otros mecanismos de destrucción, que justifican la utilización de calor húmedo a temperaturas inferiores, como veremos más adelante.

El primer efecto letal mediante calor húmedo sería la producción de rupturas de cadena única en el ADN, que provocarían la muerte celular por activación o liberación de enzimas con actividad de endonucleasas.

A medida que aumenta la temperatura se agregaría la pérdida de la integridad funcional de la membrana citoplásmica, lo que produciría interferencias en el intercambio con el medio externo, los procesos respiratorios y la síntesis proteica.

Por último, las temperaturas más elevadas activarían ribonucleasas, que degradando el ARNr producen la pérdida de viabilidad de las células expuestas.

○ **Autoclaves**

El calor húmedo, mediante vapor de agua, es el agente esterilizante más frecuentemente utilizado.

Este sistema de esterilización es el empleado por los equipos denominados autoclaves.

El autoclave es un esterilizador de vapor destinado a la descontaminación de objetos sólidos y recipientes con líquidos (soluciones, medios de cultivo, suspensiones o emulsiones). Dicho vapor provoca la eliminación total de microorganismos y sus esporas, así como la desactivación irreversible de los virus, es decir, la descontaminación del material introducido en el equipo.

Durante el proceso de esterilización se condensa el vapor saturado (vapor que se obtiene a la temperatura de ebullición del agua) en el material a esterilizar, el cual se calienta. Este mecanismo destruye eficazmente los microorganismos por desnaturalización de proteínas y enzimas, y desestabilización de membranas.

Normalmente, el autoclave utiliza vapor de agua a 121°C durante 15'- 20'. A su vez, en el interior del autoclave se obtiene una presión de una atmósfera relativa (dos atmósferas absolutas), lo que hace que aumente el punto de ebullición de los líquidos.

Actualmente, los dos tipos de autoclave más utilizados son:

- Autoclaves de desplazamiento por gravedad.
- Autoclaves de prevacío.

**a. Autoclaves de desplazamiento por gravedad**

Este autoclave consta de dos recipientes cilíndricos, uno externo con tapa de cierre hermético, y otro interno donde se pone el material a esterilizar.

La fuente de calor puede venir incluida en el equipo, como una resistencia eléctrica, o se le suministra aparte, desde abajo, generalmente mediante gas.

Dentro del recipiente externo se coloca agua destilada, la cual al llegar al punto de ebullición producirá el vapor que entrará en contacto con los microorganismos y actuará como agente esterilizante.

Los materiales se cargan dentro del recipiente interno que al no tener tapa permite una fluida entrada de vapor, pero evita el contacto directo de estos con el agua.

Debemos tener en cuenta que el aire es un mal conductor del calor, lo que impide llegar a las temperaturas necesarias, por lo que una vez cargado y cerrado el autoclave debe purgarse.

Esto se consigue dejando la llave de escape abierta hasta que el vapor saturado a presión, por arrastre, elimine el aire contenido en el equipo, alcanzando temperaturas superiores a los 100°C sin que se produzca ebullición.

Terminado el ciclo, se apaga la fuente de calor y se deja descender la temperatura.

**b. Autoclaves de prevacío**

Si bien los componentes fundamentales son similares al tipo de autoclave anterior, su funcionamiento es diferente. Poseen una bomba de vacío que extrae rápidamente el aire del equipo, la cual permite eliminar el aire de la cámara antes de dar paso al vapor.

Este tipo de autoclaves son más eficientes y consiguen temperaturas más homogéneas en toda la cámara.

El procedimiento más habitual de esterilización consiste en someter el material a una temperatura de 121°C (1,1 atmósferas o 15 lb/in<sup>2</sup> o p.s.i.), durante 15-20 minutos. Sin embargo, estos parámetros se pueden modificar, dependiendo de la composición, naturaleza del medio (densidad) o el volumen a esterilizar, etc. El proceso, en cualquier caso, debe garantizar que se alcanza la temperatura adecuada en todo el volumen a esterilizar, por lo que se debe permitir el acceso del vapor de agua, evitando los empaquetados o cerramientos herméticos. Si el volumen a esterilizar es muy grande o la densidad (en caso de líquidos) es elevada, normalmente se debe aumentar el tiempo de exposición o la temperatura.

Una vez concluido el ciclo de autoclavado, los autoclaves no deberán de ser abiertos hasta que la temperatura de la cámara interior sean inferior a 80°C aproximadamente, ya que si hay líquidos dentro del autoclave, alcanzarán rápidamente el estado de ebullición y se derramarán, debido a que al abrir el equipo se disminuye la presión rápidamente pero no la temperatura.

El autoclave se puede utilizar para la esterilización de medios de cultivo ya sean sólidos, soluciones, material de vidrio borosilicato, ciertos tipos de plásticos (policarbonato o polipropileno), acero inoxidable, etc. No se deben esterilizar por este método materiales que resulten corroídos por el agua, ni tampoco polvos o aceites, ya que son impermeables al vapor.

El autoclavado también es un método muy habitual para llevar a cabo actividades de esterilización final de medios de cultivo, instrumental o residuos biológicos.

○ **Tindalización.**

La tindalización es un método de esterilización fraccionada con calor que se aplica para esterilizar materiales y medios de cultivo termosensibles, que no pueden someterse a temperaturas superiores a los 100°C. La denominación de este proceso es un homenaje al físico John Tyndall, que describió formas bacterianas con una elevada resistencia al calor, diseñando esta metodología para su eliminación.

Actualmente, el proceso de tindalización se lleva a cabo en el autoclave con la válvula abierta, de modo que no se produzca sobrepresión y por lo tanto, no se alcanzan temperaturas superiores a las de ebullición (100°C).

El procedimiento consiste en aplicar tratamientos térmicos de 30 minutos a 100°C durante tres días consecutivos, dejando el material a temperatura ambiente o a 37°C entre un tratamiento térmico y otro (en intervalos de 24 horas).

Las temperaturas próximas a los 100°C destruyen las formas vegetativas pero no las endosporas bacterianas, por eso se requiere la realización de tres periodos de tratamientos consecutivos con el fin de permitir el desarrollo de las formas esporuladas en los intervalos a temperatura ambiente.

Este procedimiento se puede utilizar en medios de cultivo con azúcares, gelatina, sueros o huevo que se descomponen a temperaturas elevadas. También se suele utilizar de forma aplicada en el control de microorganismos en alimentos.

### **3.1.2. Calor seco**

El mecanismo de acción de la esterilización por calor seco es diferente al del calor húmedo.

El calor seco provoca desnaturalización de proteínas, lesiones por oxidación y efectos tóxicos por niveles elevados de electrolitos.

Existen tres formas principales de esterilización por calor seco: flameado, incineración y mediante la utilización del horno Pasteur.

En comparación con el autoclave, los procesos de esterilización por calor seco necesitan alcanzar mayores temperaturas durante un mayor periodo de tiempo (en torno a 160°C durante 2h.). El motivo de estos incrementos estaría dado porque la ausencia de agua disminuiría el número de grupos polares de las cadenas peptídicas, lo que daría mayor estabilidad a las moléculas bacterianas, por lo que se requeriría mayor energía para abrirlas.

#### ○ **Horno Pasteur o Poupinell.**

Consiste en una cámara metálica de doble pared, con aislante entre ambas (para evitar la pérdida de calor), una puerta y una fuente de calor que suele ser eléctrica.

Existen dos tipos de hornos o estufas que comúnmente se utilizan para este fin: la estufa de convección por gravedad y la estufa de convección mecánica (circulación de aire forzado).

##### **a. Estufa de convección por gravedad**

Estufa compuesta por una cámara revestida con una resistencia eléctrica en su pared interior y un canal u orificio de drenaje de aire en la parte superior. La circulación del aire depende de las corrientes de convección generadas, debidas a las diferencias de temperaturas, por ello, es un proceso más lento y menos uniforme.

##### **b. Estufa de convección mecánica**

Este equipo produce el rápido movimiento de un gran volumen de aire caliente, facilitando la transmisión del calor directamente a la carga o paquete; de esta forma, el proceso requiere menos tiempo y ofrece un mayor equilibrio térmico.

El horno Pasteur se utiliza para esterilizar objetos de porcelana o vidrio (pipetas, probetas, embudos,...), materiales metálicos que no se pueden esterilizar en autoclave por problemas de corrosión, así como fluidos oleaginosos (impermeables al vapor del autoclave).

Cuando se decida usar el horno Pasteur como sistema de esterilización, debemos de tener en cuenta las siguientes precauciones:

- Colocar paquetes pequeños y espaciados, para no interferir con la difusión del calor.
- La recarga del horno debe hacerse cuando éste se encuentre frío, de lo contrario su interior alcanzará la temperatura antes que el material a esterilizar, por lo que se medirá mal el tiempo.
- **Flameado**

Esta técnica de esterilización rápida se utilizaba frecuentemente durante los procedimientos de trabajo en microbiología, para la esterilización de agujas y asas de siembra, o para la boca de los tubos y matraces, ya estériles o con cultivos, durante los procedimientos habituales de manipulación de microorganismos y/o medios estériles.

Es una técnica muy sencilla que consiste en la exposición directa y breve de los materiales a la llama de un mechero. Hoy en día, su uso es más inusual, ya que se ha visto que la generación de llamas dentro de las cabinas de bioseguridad interfiere en el mantenimiento del flujo laminar de la misma, por lo que su uso no se recomienda cuando las practicas microbiológicas deban de hacerse en dichas cabinas (según el agente patógeno que se manipule).

## **3.2. ESTERILIZACION POR METODOS MECANICOS.**

### **3.2.1. Filtración**

Las aplicaciones de la esterilización por filtración son diversas en el campo de la microbiología. Se puede aplicar para eliminar microorganismos de soluciones, fluidos o gases, o para la esterilización del ambiente de trabajo. En todos los casos, los microorganismos no son destruidos sino que son retenidos físicamente o adsorbidos por los filtros con un tamaño de poro adecuado.

El tamaño de poro que se considera en la actualidad esterilizante es el de 0,22  $\mu\text{m}$ , aunque más recientemente se tiende a la utilización de poros de 0.1  $\mu\text{m}$ .

Se describen a continuación los tipos de filtros más utilizados y sus aplicaciones más relevantes:

- **Filtros de membrana**

Se utilizan para esterilizar soluciones termolábiles como son los antibióticos, vitaminas, medios de cultivo líquidos que contienen azúcares a concentraciones elevadas que pueden caramelizar o proteínas que pueden desnaturalizarse por el calor. De esta forma, los microorganismos quedan retenidos en el filtro y el líquido filtrado se encuentra estéril.

Los filtros son de muy variada composición, normalmente son de ésteres de celulosa (acetato de celulosa, nitrato de celulosa), politetrafluoretileno (PTFE o teflón), fluoruro de polivinilo hidrofóbico (PVDF), etc.

○ **Filtros de profundidad**

Este tipo de filtros están compuestos por columnas de materiales fibrosos o porosos (tierra de diatomeas, lana de vidrio, materiales cerámicos porosos...) que permiten retener las partículas, en este caso microorganismos, y que normalmente se utilizan para la esterilización de gases o como prefiltros para otros filtros esterilizantes.

Un claro ejemplo de este tipo de filtros son los filtros HEPA (High Efficiency Particulate Air) empleados tanto en las cabinas de seguridad biológica como los usados para la filtración del aire en instalaciones de Nivel de Contención Biológica de tipo 3 ó 4.

### **3.3. ESTERILIZACION POR RADIACIONES**

Diversas radiaciones se pueden llegar a utilizar en los laboratorios de diagnóstico con la finalidad de esterilizar. La radiación más utilizada en el laboratorio de microbiología es la ultravioleta (UV), de una longitud de onda de unos 260 nm.

El efecto letal de la luz UV sobre las bacterias se atribuye a su absorción por el ADN y al resultante daño de éste mediante la formación de uniones covalentes entre los residuos de pirimidina adyacentes pertenecientes a la misma cadena, lo que provoca la formación de dímeros de pirimidina de tipo ciclobutano.

Esto produce distorsiones en la forma del ADN e interfiere en el apareamiento normal de las bases. El resultado final es la inhibición de la síntesis de ADN y secundario a esto, inhibición del crecimiento y la respiración.

Suele ser poco eficaz debido a su escaso poder de penetración en ciertos materiales, pero sí resulta muy útil para esterilizar el aire y las superficies, es por ello que se suelen colocar en cabinas de flujo laminar, en habitaciones estériles, quirófanos, etc.

Son igualmente efectivas frente a bacterias Gram (+) y Gram (-).

Los rayos gamma, son radiaciones electromagnéticas más penetrantes, por su menor longitud de onda (<0,1 nm), por tanto, suelen ser más efectivas como agentes esterilizantes.

Su efecto letal se debe, fundamentalmente, a la formación de radicales entre los componentes celulares de gran reactividad. Su acción mutagénica se produce al inhibir la división celular incidiendo directamente sobre los ácidos nucleicos.

### **3.4. ESTERILIZACION POR MÉTODOS QUÍMICOS**

Estos métodos se utilizan solamente en los casos en que los materiales no soporten el calor y su naturaleza lo permita.

### 3.4.1. Agentes químicos líquidos

La esterilización por agentes químicos por inmersión, hecha de forma manual, será siempre el último método de elección. Estos procesos son difíciles de controlar, con una gran probabilidad de recontaminación durante el enjuague, el secado y posterior almacenado.

Entre los agentes químicos más destacados en los procesos de esterilización podemos citar:

- **Glutaraldehído:** Este desinfectante, que puede ser ácido o alcalino, se utiliza a una concentración del 2 % para fines de esterilización. Tiene un amplio espectro de actividad antimicrobiana, es esporicida y se mantiene activo ante la presencia de cierta materia orgánica; por contra, la duración del tiempo de contacto necesaria para esterilizar es de aproximadamente 10 horas. El glutaraldehído es tóxico e irritante para la piel y las mucosas, por tal motivo debe evitarse el contacto con él. No se recomienda su uso en forma de pulverización.
- **Peróxido de hidrógeno:** Es un germicida de amplio espectro con alto poder oxidante. El peróxido de hidrógeno se suministra en forma de solución al 3% lista para usar o como solución acuosa al 30% que debe ser diluida hasta 5–10 veces su volumen en agua. Sin embargo, esas soluciones al 3–6% por sí solas son relativamente lentas y limitadas como germicidas, por lo que los productos comerciales disponibles hoy en día, tienen otros ingredientes para estabilizar el contenido de peróxido de hidrógeno, acelerar su acción germicida y hacerlo menos corrosivo.  
El peróxido de hidrógeno puede utilizarse para descontaminar las superficies de trabajo del laboratorio. Además, el uso de peróxido de hidrógeno vaporizado es muy empleado como aerosol en la desinfección de locales o salas.  
Entre los inconvenientes del peróxido de hidrógeno podemos decir que es corrosivo en metales como el aluminio, el cobre, el latón y el zinc, tóxico e inestable químicamente.
- **Formaldehído:** El formaldehído es un gas que mata todos los microorganismos y esporas a temperaturas superiores a los 20°C. Sin embargo, no tiene actividad contra los priones. Su acción es relativamente lenta y requiere una humedad relativa en torno al 70%. Se comercializa en forma de polímero sólido (paraformaldehído) o como formol, solución del gas en agua con aproximadamente 370 g/l (37%) y con metanol (100 ml/l) como estabilizante.  
Ambas formulaciones se calientan para liberar el gas, que se utiliza en la descontaminación y la desinfección de espacios cerrados como Cabinas de Seguridad Biológica y/o salas.  
El uso del formaldehído está muy restringido en la actualidad debido a su alta toxicidad (cancerígeno y mutagénico).
- **Ácido peracético:** Posee una actividad antimicrobiana mayor que la del peróxido de hidrogeno. Es un oxidante, soluble en agua, que no deja residuos tóxicos.
- **Compuestos de amonio cuaternario:** Se utilizan como mezclas, y a menudo en combinación con otros germicidas como los alcoholes. Tienen buena actividad contra algunas bacterias en fase vegetativa y virus con envoltura lipídica.  
La actividad germicida de ciertos tipos de compuestos de amonio cuaternario se reduce considerablemente con la materia orgánica, las aguas duras y los detergentes aniónicos. Así pues, es necesario tener cuidado en la selección de los agentes empleados en la

limpieza previa cuando se vayan a utilizar compuestos de amonio cuaternario para la desinfección. Debido a su baja biodegradabilidad, estos compuestos también pueden acumularse en el medio ambiente.

### **3.4.2. Esterilizantes gaseosos**

Dentro de este apartado incluiremos todos aquellos compuestos químicos que se suelen utilizar como esterilizantes en fase gaseosa. Entre estos compuestos cabe destacar el óxido de etileno o el formaldehído.

Suelen utilizarse para esterilizar materiales sensibles al calor o que no pueden someterse a radiaciones.

El compuesto más utilizado es el óxido de etileno, que actúa por medio de su actividad alquilante sobre los hidrógenos lábiles en ácidos nucleicos y otras macromoléculas, inactivándolas. El proceso de esterilización en estos casos suele darse en cámaras herméticas y suele requerir en general tiempos de exposición largos (30 minutos - 18 horas), aunque procesos a temperaturas entre 60- 80°C pueden disminuir el tiempo de exposición (30 min.-6 h). Sin embargo, el principal uso (como veremos más adelante) de estos agentes esterilizantes, es la esterilización de salas que han sido expuestas a agentes patógenos.

## **4. METODOLOGÍAS DE ESTERILIZACIÓN FINAL.**

La finalidad de estas metodologías de esterilización final es destruir los microorganismos con los que se ha trabajado, y descontaminar el material utilizado antes de que sea desechado. Generalmente se hace por calor húmedo en autoclave, o por incineración.

Cuando se utiliza el calor húmedo en autoclave, la temperatura y el tiempo de elección alcanzados son irrelevantes siempre que sean esterilizantes, ya que las precauciones para evitar la alteración de medios de cultivo y materiales en este caso, ya no tienen importancia.

### **4.1. INCINERACIÓN.**

Este método es adecuado para la destrucción de cadáveres y restos anatómicos de animales que tengan un tamaño superior al del ratón, ya que el método de autoclavado por vapor saturado no es eficiente para la inactivación biológica de estos cadáveres.

La incineración se realiza en hornos que destruyen los compuestos orgánicos a través de la combustión a altas temperaturas (> 900°C), produciéndose la oxidación de la materia orgánica a dióxido de carbono, agua y otros productos secundarios de la reacción.

Una incineración correcta exige disponer de control eficiente de la temperatura y de una cámara de combustión secundaria destinada al tratamiento de gases.

Muchos de los residuos generados en los laboratorios de sanidad animal son recogidos por empresas autorizadas que se encargan de su tratamiento y eliminación, siendo en muchos casos el tratamiento final la incineración.

#### 4.2. HIDRÓLISIS ALCALINA

La versión moderna de la digestión por hidrólisis alcalina fue introducida por los doctores Gordon Kaye y Peter Weber (1994) y se presentó como una alternativa a la incineración. La tecnología combina un tratamiento alcalino a alta temperatura que permite convertir las carcasas animales contaminadas en una solución acuosa estéril que finalmente es neutralizada o deshidratada para su eliminación final.

La hidrólisis es una reacción química en la que los enlaces se rompen mediante la inserción de una molécula de agua. La reacción puede ser catalizada por enzimas, sales de metales, ácidos o bases.

La hidrólisis alcalina se basa en **la utilización de productos de carácter básico**, normalmente soluciones acuosas de hidróxidos de metales alcalinos como el hidróxido de sodio (NaOH) o el hidróxido de potasio (KOH). Dado que el calor acelera significativamente los procesos hidrolíticos, el tratamiento por hidrólisis alcalina utiliza **temperaturas elevadas** (150 °C) para acelerar la conversión del material biológico (proteínas, ácidos nucleicos, hidratos de carbono, lípidos, etc.) en una solución acuosa estéril compuesta de pequeños péptidos, aminoácidos, azúcares y detergentes. Los únicos subproductos sólidos de la hidrólisis alcalina son los componentes minerales (fosfato cálcico) de los huesos y dientes del animal. Este residuo no digerido, que puede constituir el dos por ciento del peso de los restos cadavéricos originales, es estéril y se puede gestionar como residuo banal o bien triturarlo para obtener un polvo que puede ser utilizado como aditivo fertilizante para el suelo.

El proceso destruye todos los patógenos conocidos, consiguiendo una reducción de 6 log en agentes infecciosos vegetativos y de 4 log en agentes formadores de esporas. El proceso de la hidrólisis alcalina ha sido homologado expresamente en la legislación de la UE (REGLAMENTO 142/2011 DE LA COMISIÓN de 25 de febrero de 2011)<sup>3</sup> para el tratamiento de los animales sospechosos de estar infectados o afectados por una encefalopatía espongiforme transmisible (EET), así como otros subproductos animales de "categoría 1" además de los materiales de categoría 2 y 3.

La hidrólisis alcalina se lleva a cabo en **un digestor**. Se trata de un recipiente a presión de acero inoxidable y tapa fija, de obertura manual o automática, que dispone de una cesta de retención para los restos óseos de los grandes animales y otros materiales no digeribles.

---

<sup>3</sup> Reglamento por el que se establecen las disposiciones de aplicación del Reglamento (CE) no 1069/2009 del Parlamento Europeo y del Consejo por el que se establecen las normas sanitarias aplicables a los subproductos animales y los productos derivados no destinados al consumo humano, y la Directiva 97/78/CE del Consejo en cuanto a determinadas muestras y unidades exentas de los controles veterinarios en la frontera en virtud de la misma.

### 4.3. SAS, AIR LOCK Y DUNK TANKS

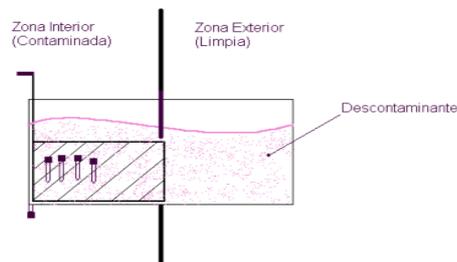
Este tipo de equipos o instalaciones son pasos de doble frontera que permiten la transferencia de materiales, que por sus características o tamaño no pueden ser autoclavados, desde un nivel de contención biológica de tipo 3 ó 4, al exterior de dicha instalación. El objetivo de estos equipos es la esterilización de la superficie de un material mediante un descontaminante químico.

El **SAS** (Surface Air System), son cámaras de diferentes tamaños, normalmente ventilados, que mediante puertas estancas a ambos lados y sistemas internos de desinfección o esterilización (mediante agentes químicos o radiaciones) permiten el intercambio seguro de muestras biológicas y de materiales de pequeño tamaño entre zonas de diferente riesgo biológico.

El SAS químico dispone de un dispositivo que calienta el descontaminante químico (formaldehído por ejemplo) y por microdifusión lo distribuye por toda la cámara en forma de un aerosol. Todo el aire que lo contiene es expulsado a través de filtros HEPA gracias a un motor de expulsión.

El **Airlock** consiste en una pequeña sala cuyas paredes verticales y horizontales están revestidas de pintura epoxídica para resistir la acción de los descontaminantes químicos. Dicha sala dispone de una rejilla de aireación, de un sumidero de drenaje para los efluentes generados en los procesos de limpieza o descontaminación, y de un par de puertas grandes (una que da a la zona de biocontención y otra al exterior) que permiten la entrada y salida de material de grandes dimensiones.

El **Dunk tanks** consiste en un cámara no muy grande rellena de un descontaminante líquido y comunicada por un lado con la zona de biocontención y por otro con el exterior a dicha zona; de tal manera que para sacar cualquier tipo de objeto o instrumento de la zona de biocontención lo tengas que sumergir en dicho descontaminante.



### 4.4. BIOWASTE.

El Biowaste es un equipo cuya misión es la recogida y esterilización final de todos los efluentes generados dentro de las zonas de biocontención de tipo 3 ó 4, tanto de los efluentes potencialmente contaminados como los que por sus características físico-químicas deban ser neutralizados, utilizando para ello un proceso de inactivación térmica y/o química.

El sistema Biowaste lo integran tres subsistemas:

1. El subsistema de almacenamiento de los efluentes generados.
2. El subsistema de inactivación térmica, refrigeración y bombeo del fluido esterilizado.
3. El subsistema de tratamiento químico del fluido esterilizado y bombeo a la red general de saneamiento.

El funcionamiento del sistema biowaste es automático, llevándose a cabo la sucesión de procesos cuando se alcanza en cada tanque el nivel de efluente contenido.

El paso del efluente del tanque de almacenamiento al de inactivación térmica se produce cuando se alcanza aproximadamente el 20% del volumen del depósito. Una vez en el tanque de inactivación térmica se iniciara un ciclo de inactivación mediante temperatura; finalizado dicho ciclo, el contenido pasará al tanque de tratamiento químico para ajustarlo a pH neutro mediante la inyección de NaOH o HCl, una vez ajustado se autorizará su descarga a la red sanitaria.

## **5. DESCONTAMINACIÓN AÉREA O DE SALAS.**

En determinados casos en los que se haya trabajado con microorganismos patógenos en alguna sala, laboratorio, departamento o animalario, se deberá de esterilizar dichas estancias, ya sea por la seguridad del personal que pueda acceder a ellas posteriormente y/o por el aseguramiento de la calidad de los sucesivos procesos o proyectos que se puedan iniciar en esa misma sala o animalario.

Las instalaciones de nivel de contención biológica de tipo 3 ó 4 deberán de estar preparadas para permitir la descontaminación ambiental de todas sus salas. En los procesos de descontaminación ambiental, la zona de contención debe poderse aislar de forma estanca, y las superficies y materiales en esta zona deben ser resistentes a los desinfectantes a utilizar.

Los procesos de descontaminación ambiental incluyen, entre otros, la microdifusión de desinfectantes, creando una niebla húmeda o seca, o la gasificación de productos químicos descontaminantes, desinfectantes o esterilizantes.

Los laboratorios o salas pueden esterilizarse a través de equipos portátiles transportados in situ hacia el área a esterilizar, o a través de las redes de impulsión y extracción del aire de la instalación (lo cual optimiza la eficiencia del proceso).

Algunos ejemplos de nebulización de los agentes esterilizantes pueden ser:

- **Nebulización seca y fría (MINNCARE).**
- **Nebulización húmeda (VHP).**

En ambos tipos de nebulización habrá que tener en cuenta parámetros como la temperatura y la humedad de la sala a descontaminar, tiempos de exposición del agente descontaminante, tiempos de aireación, forma y tamaño de la sala a tratar, así como la necesidad de ventiladores que ayuden a la difusión del agente esterilizante.

El sistema MINNCARE está basado en la difusión de micropartículas de una mezcla desinfectante nebulizada que ejerce una acción biocida en la sala tratada. La mezcla desinfectante está compuesta por peróxido de hidrógeno, ácido peracético, ácido acético y agua destilada en unas proporciones determinadas.

El sistema MINNCARE está compuesto por un equipo fácilmente transportable capaz de inyectar en forma de neblina fría y seca la mezcla desinfectante. El agua destilada actúa como vehículo del agente descontaminante principal, el peróxido de hidrógeno, y donde el ácido acético y el ácido peracético actúan como coadyuvantes para aumentar la eficacia del citado peróxido. Para lograr una adecuada difusión, la humedad relativa de la sala deberá estar entre 70-90% durante al menos una hora, que es el tiempo de acción mínimo requerido para provocar la descontaminación.

El peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) vaporizado (VHP, Vaporized Hydrogen Peroxide) es uno de los métodos más utilizados en la esterilización de salas. Este sistema de esterilización se genera al vaporizar activamente una solución acuosa de peróxido de hidrógeno en una sala o laboratorio.

Para alcanzar una tasa alta de biodescontaminación de microorganismos se requiere establecer una concentración y un tiempo de exposición elevados.

El VHP es un vapor, no un gas, lo cual significa que la concentración en el aire nunca sobrepasa la presión del vapor a la temperatura (y a la presión) correspondiente. Por encima del punto de saturación (punto de rocío), el vapor de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> empieza a condensarse sobre las superficies.

Hay que tener en consideración que el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> es un compuesto inestable, descomponiéndose en oxígeno y agua, por lo que la concentración de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> se reduce constantemente, razón por la que se añaden químicos estabilizadores a la solución acuosa.

Un ciclo normal de esterilización de una sala puede dividirse en cuatro fases:

- La primera fase es la deshumidificación. Durante esta fase, el aire de la estancia a esterilizar se hace circular a través de un deshumidificador para reducir la humedad del aire. En función del volumen de la estancia, este proceso puede tardar unos 20 minutos.
- En la fase de  acondicionamiento o fumigación, el peróxido de hidrógeno se vaporiza activamente a una velocidad de inyección preestablecida y se introduce en la estancia. Este proceso tarda unos 30-60 minutos, aunque dependerá del equipo y del tamaño y forma de la sala.
- La fase de esterilización se denomina, a veces, fase de "exposición". La concentración de VHP se mantiene constante durante toda la exposición predefinida.
- La fase más larga del ciclo es la de ventilación (hasta 5 horas), durante la cual se deja de bombear VHP en la estancia. El aire se pasa a través de un depurador catalítico o se reemplaza por aire fresco para reducir la concentración de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> hasta alcanzar un valor de umbral predefinido (por lo general menos de 1 ppm), ya que el VHP se considera nocivo para los seres humanos.

El VHP es una metodología que presenta características atractivas: tiempo de ciclo rápido (por ejemplo, 30-45 minutos), baja temperatura, subproductos ambientalmente seguros (H<sub>2</sub>O, oxígeno), buena compatibilidad de los materiales y facilidad de uso.

Otra forma común de biodescontaminar una sala es mediante formaldehído. En este caso se produce un gas mediante calentamiento del paraformaldehído o formalina.

Es un proceso lento que requiere una limpieza previa y posterior, ya que genera residuos de depósitos cristalinos. Además, el formaldehído es una sustancia carcinógena y mutagénica, con limitaciones en su uso, por lo que se tendrá que tener especial cuidado en la evacuación del personal de las salas durante el proceso.

Como ventajas, el formaldehído es muy económico y presenta un amplio espectro de acción.

## 6. CONTROL DE LA ESTERILIZACIÓN

Los procesos de esterilización deben disponer de sistemas o mecanismos que nos permitan garantizar y controlar que el proceso se ha realizado con éxito. Existen diferentes mecanismos para ello:

Sistemas de control físico: Están relacionados con el operario que realiza el procedimiento y la vigilancia de ciertos parámetros como: presión, tiempo, temperatura, etc.

Lo más básico es el control mecánico de las temperaturas (sensor de temperatura), que permita realizar un registro de las temperaturas alcanzadas en el interior durante todo el proceso.

Sistemas de control químico: Son habitualmente sistemas constituidos por cintas adhesivas que, por ejemplo, están impregnadas en compuestos químicos termosensibles, o son sensibles a radiaciones o al óxido de etileno, las cuales cambian de color si el proceso se ha desarrollado de forma correcta, es decir, si se ha alcanzado la temperatura adecuada, si ha sido irradiado, o si ha estado expuesto a óxido de etileno, respectivamente.

Estas tiras se adhieren al material a esterilizar de forma que el cambio de color supone una garantía de la temperatura alcanzada. La ventaja de este método, es la rapidez con que se sabe el resultado, ya que es inmediato; la gran desventaja es que dice poco sobre el tiempo de exposición, por lo que no asegura un procedimiento correcto.

Estos sistemas de control químicos se usan de forma rutinaria en los laboratorios de microbiología.

Sistemas de control biológico: Consisten en exponer esporas bacterianas al ciclo de esterilización, y posteriormente verificar su viabilidad. Este tipo de sistemas, llamados como **indicadores biológicos**<sup>4</sup>, son los más fiables.

---

<sup>4</sup> Un indicador biológico es un dispositivo de control del proceso de esterilización que consiste en una población viable y estandarizada de microorganismos, los cuales son bastantes resistentes al proceso de esterilización al que se van a someter.

En el autoclave o en las descontaminaciones de salas por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, normalmente se utilizan **esporas no patógenas de *Geobacillus stearothermophilus*** para verificar su correcto funcionamiento.

Este sistema se coloca dentro del paquete menos accesible, ya sea para el calor o el vapor. Finalizado el ciclo de esterilización las esporas se incuban en un medio adecuado con un indicador de pH, y finalmente se evaluará la viabilidad de los mismos. Si existen microorganismos viables, su metabolismo provocará un cambio de pH que hará virar el color del marcador, revelando el fallo del procedimiento, por lo que deberá volverse a esterilizar todo.

Este tipo de controles debe realizarse periódicamente, o cuando se dude de la efectividad del procedimiento.

MATERIAL NO OFICIAL

## **BIBLIOGRAFIA**

U.S. Department of Health and Human Services. Public Health Service Centers for Disease Control and Prevention National Institutes of Health (CDC). Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories.

Guideline for Disinfection and Sterilization in Healthcare Facilities, CDC 2008.

Norma UNE 171400-1:2019 de Diseño de instalaciones de nivel 3 de contención biológica (NCB3).

Manual de bioseguridad de laboratorios de la OMS. Cuarta edición. 2021. Versión en Inglés. <https://www.who.int/publications/i/item/9789240011311>

Revista de calidad ambiental interior en hospitales, laboratorios, animalarios y salas de ambiente controlado. International Standard Serial Number (ISSN) 2013-746X. Núm. 16, Enero 2014.

MATERIAL NO OFICIAL

**MATERIAL PARA LA PREPARACIÓN DEL TEMA 18**

**RESIDUOS GENERADOS EN LOS LABORATORIOS: CLASIFICACIÓN Y GESTIÓN. LEGISLACIÓN APLICABLE. IMPACTO MEDIOAMBIENTAL**

*Este material no tiene carácter oficial, por lo que en ningún caso vinculará al Tribunal Calificador. Constituye, únicamente, un instrumento complementario que servirá de apoyo al opositor para enfocar cada uno de los epígrafes, pero nunca de forma exclusiva ni excluyente. El Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación no se hace responsable del contenido del mismo.*

*Los materiales no serán objeto de actualización constante.*

## **ÍNDICE**

### **1. INTRODUCCIÓN**

### **2. RESIDUOS GENERADOS EN LOS LABORATORIOS: CLASIFICACIÓN Y GESTIÓN**

#### 2.1 CLASIFICACIÓN DE LOS RESIDUOS

#### 2.2 CLASIFICACIÓN DE LOS RESIDUOS GENERADOS EN LOS LABORATORIOS

##### 2.2.1 Residuos sanitarios

##### 2.2.2 Residuos químicos Peligrosos

##### 2.2.3 Residuos SANDACH

##### 2.2.4 Residuos urbanos

#### 2.3 GESTIÓN DE LOS RESIDUOS GENERADOS EN LOS LABORATORIOS

##### 2.3.1 Gestión intracentro

##### 2.3.2 Gestión extracentro

##### 2.3.3 Gestión de residuos generados en áreas de contención biológica 3 o 4

##### 2.3.4 Gestión de residuos generados en animalario

### **3. LEGISLACIÓN APLICABLE**

### **4. IMPACTO MEDIOAMBIENTAL**

## 1. INTRODUCCIÓN

Desde la aparición de las primeras sociedades urbanas, los residuos se han convertido en uno de los principales problemas más preocupantes para la sociedad mundial. Este problema se origina por un cambio de la sociedad hacia unas pautas consumistas que conllevan un aumento desmesurado del consumo de recursos y la aparición de grandes volúmenes de residuos. Estos residuos están formados por productos de poca duración (embalajes, envoltorios y otros residuos de envases), algunos de ellos de tipo peligroso (pilas, baterías, pinturas, etc.) y además son difícilmente reutilizables.

Entre las actividades que se llevan a cabo en los laboratorios de Sanidad y Genética Animal se incluyen: desarrollo y valoración de técnicas, identificación y/o conservación de los agentes patógenos, transferencia y validación de métodos de diagnóstico, contrastación de reactivos de diagnóstico, organización de ensayos de intercomparación, etc. De la realización de dichas actividades se generan diferentes clases de residuos que, el laboratorio, en calidad de productor de residuos, son necesarios gestionar de acuerdo a la legislación vigente, requisitos propios (como puede ocurrir en el caso de aquellos centros certificados por la norma ISO 14001 de certificación ambiental) y en beneficio del medio ambiente que nos rodea.

Se define “**residuo**” como cualquier sustancia u objeto que su poseedor deseche o tenga la intención o la obligación de desechar. La clasificación de los residuos es un aspecto fundamental para regular la producción, transporte y gestión de los mismos.

Se define “**Gestión de residuos**” a la recogida, el transporte, la valorización y la eliminación de los residuos, incluida la clasificación y otras operaciones previas; así como la vigilancia de estas operaciones y el mantenimiento posterior al cierre de los vertederos.

Se define “**Gestor de residuos**” a la persona física o jurídica, pública o privada, registrada mediante autorización o comunicación que realice cualquiera de las operaciones que componen la gestión de los residuos, sea o no el productor de los mismos.

## 2. RESIDUOS GENERADOS EN LOS LABORATORIOS: CLASIFICACIÓN Y GESTIÓN

Con fecha 1 de enero de 2002 entró en vigor el **Catálogo Europeo de Residuos (CER)**, mediante Decisión 2000/532/EC, por lo que pasó a utilizarse para clasificar los residuos y determinar sus vías de gestión.

El CER lo conforman las siguientes Decisiones de la Comisión de la Comunidad Europea.

- La Decisión de la Comisión 2000/532/CE, de 3 de mayo, que establece una lista de residuos de conformidad con la Directiva 75/442/CEE.
- La Decisión de la Comisión 2001/118/CE, de 16 de enero, en la que se modifica el art. 2 y se instrumenta un nuevo anexo.
- La Decisión de la Comisión 2001/119/CE, de 22 de enero, en la que se clasifican los vehículos fuera de uso como residuo peligroso.

- La Decisión de la Comisión 2001/573/CE, de 23 de julio, en la que se modifica la clasificación de algunos residuos.
- La Decisión 2014/955/UE de la Comisión, de 18 de diciembre de 2014, por la que se suprimen los artículos 2 y 3 de la Decisión 2000/532/CE, y se adapta su contenido a lo establecido por la Directiva 2008/98/CE.

Diferentes revisiones en la normativa sobre la clasificación de los residuos y el CER han concluido en un **sistema de lista única** en el que se determinan mediante un asterisco qué residuos son considerados como peligrosos.

La **Lista Europea de Residuos (LER)**, refunde el CER y la Lista de Residuos Peligrosos aprobados, respectivamente, por las Decisiones comunitarias 94/3/CE, de la Comisión, de 20 de diciembre, y 94/904/CE, del Consejo, de 22 de diciembre. Estas Decisiones comunitarias han sido derogadas por la Decisión 2000/532/CE, de la Comisión, de 3 de mayo (posteriormente modificada por las Decisiones de la Comisión, 2001/118/CE, de 16 de enero y 200/119, de 22 de enero y por la Decisión del Consejo, 2001/573, de 23 de julio).

Cabe reseñar en el compendio normativo, la Comunicación 2018/C 124/01 de la Comisión, Orientaciones técnicas sobre la clasificación de los residuos, publicada el 9 de abril en el Diario Oficial de la Unión Europea, y que tiene como objetivo proporcionar orientación técnica sobre determinados aspectos de la Directiva 2008/98/CE, sobre los residuos.

**Clasificar los residuos como peligrosos o no peligrosos** y, en particular, entender cuándo y en qué circunstancias los residuos deben considerarse peligrosos es una decisión crucial en toda la cadena de gestión de los residuos desde la producción hasta el tratamiento final. Cuando un residuo se clasifica correctamente como peligroso, se generan una serie de obligaciones importantes, por ejemplo en materia de etiquetado y embalaje, pero también en términos del tratamiento correcto disponible.

## 2.1 CLASIFICACIÓN DE LOS RESIDUOS

**PROCEDIMIENTO PARA LA CLASIFICACIÓN DE LOS RESIDUOS:** (según la Comunicación 2018/C 124/01)

### **FASE 1. ¿Es aplicable la Directiva Marco de Residuos (DMR)?**

Antes de clasificar los residuos, debe comprobarse si la DMR es aplicable en algún punto:

- En primer lugar, se ha de determinar si la sustancia u objeto de que se trate es un residuo (tal como se define en la DMR).  
Determinar si el objeto o la sustancia en cuestión constituye un residuo en el sentido de la DMR es un requisito previo para una evaluación posterior en relación con su peligrosidad. Para esta evaluación en concreto, las Orientaciones DMR ofrecen directrices sobre la definición clave de «descarte» en virtud de la DMR, así como de conceptos afines tales como «subproducto» y «fin de la condición de residuo».
- En segundo lugar, hay que comprobar si determinados flujos de residuos especificados están excluidos del ámbito de aplicación de la DMR. Algunas exclusiones son por

ejemplo los residuos radiactivos o subproductos animales que se rigen por su propia normativa.

## **FASE 2: ¿Qué código de la lista de residuos hay que aplicar?**

La LER, en la versión establecida por la Decisión 2000/532/CE y en su forma enmendada por la Decisión 2014/955/UE, se aplica desde el 1 de junio de 2015.

La LER consta de veinte capítulos (códigos de dos dígitos), divididos a su vez en subcapítulos (códigos de cuatro dígitos) y entradas (códigos de seis dígitos).

Ejemplos de capítulo, subcapítulos y códigos:

Capítulo: 20 RESIDUOS MUNICIPALES (RESIDUOS DOMÉSTICOS Y RESIDUOS ASIMILABLES PROCEDENTES DE COMERCIOS, INDUSTRIAS E INSTITUCIONES) INCLUIDAS LAS FRACCIONES RECOGIDAS SELECTIVAMENTE

Subcapítulo: 20 01 Fracciones recogidas selectivamente (excepto 15 01)

Código: 20 01 02 Vidrio

Al clasificar un residuo, primero tiene que asegurarse de que éste entra en el ámbito de aplicación del título del capítulo. Si lo hace, a continuación deberá comprobar si entra en el ámbito de aplicación del título del subcapítulo. Solo entonces podrá buscar un código adecuado.

En el citado ejemplo, en el que el residuo se clasifica con un código 20 01 02, este:

- debe ser un residuo doméstico o asimilable procedente de comercios, industrias e instituciones (para poder inscribirse en el capítulo 20);
- debe recogerse por separado (para poder inscribirse en el subcapítulo 20 01); y además
- debe estar compuesto de vidrio;
- pero no debe considerarse un envase de vidrio, puesto que los residuos de envases quedan excluidos del subcapítulo 20 01 por su título y hay que asignarles un código del capítulo 15 para los residuos de envases.

Orden de prioridad de los capítulos de la LER tal como se establecen en la misma lista:

Los capítulos (códigos de dos dígitos) se pueden clasificar en tres grupos diferentes, que hay que evaluar siguiendo un orden predeterminado establecido en el anexo de la LER al intentar identificar el código absoluto o el código espejo que se corresponda mejor con los residuos objeto de investigación:

- del 01 al 12 y del 17 al 20: capítulos relativos a la fuente de los residuos
- del 13 al 15: capítulos relativos al tipo de residuo
- 16: capítulo para los residuos no especificados en otra categoría de la lista

Los capítulos de la lista LER son:

CÓDIGO	DESCRIPCIÓN DEL CAPÍTULO	PRIORIDAD
01	RESIDUOS DE LA PROSPECCIÓN, EXTRACCIÓN DE MINAS Y CANTERAS Y TRATAMIENTOS FÍSICOS Y QUÍMICOS DE MINERALES	A
02	RESIDUOS DE LA AGRICULTURA, HORTICULTURA, ACUICULTURA, SILVICULTURA, CAZA Y PESCA; RESIDUOS DE LA PREPARACIÓN Y ELABORACIÓN DE ALIMENTOS	
03	RESIDUOS DE LA TRANSFORMACIÓN DE LA MADERA Y DE LA PRODUCCIÓN DE TABLEROS Y MUEBLES, PASTA DE PAPEL, PAPEL Y CARTÓN	
04	RESIDUOS DE LAS INDUSTRIAS DEL CUERO, DE LA PIEL Y TEXTIL	
05	RESIDUOS DEL REFINO DE PETRÓLEO, PURIFICACIÓN DEL GAS NATURAL Y TRATAMIENTO PIROLÍTICO DEL CARBÓN	
06	RESIDUOS DE PROCESOS QUÍMICOS INORGÁNICOS	
07	RESIDUOS DE PROCESOS QUÍMICOS ORGÁNICOS	
08	RESIDUOS DE LA FABRICACIÓN, FORMULACIÓN, DISTRIBUCIÓN Y UTILIZACIÓN (FFDU) DE REVESTIMIENTOS (PINTURAS, BARNICES Y ESMALTES VÍTREOS), ADHESIVOS, SELLANTES Y TINTAS DE IMPRESIÓN	
09	RESIDUOS DE LA INDUSTRIA FOTOGRÁFICA	
10	RESIDUOS DE PROCESOS TÉRMICOS	
11	RESIDUOS DEL TRATAMIENTO QUÍMICO DE SUPERFICIE Y DEL RECUBRIMIENTO DE METALES Y OTROS MATERIALES; RESIDUOS DE LA HIDROMETALURGIA NO FÉRREA	
12	RESIDUOS DEL MOLDEADO Y DEL TRATAMIENTO FÍSICO Y MECÁNICO DE SUPERFICIE DE METALES Y PLÁSTICOS	
13	RESIDUOS DE ACEITES Y DE COMBUSTIBLES LÍQUIDOS (EXCEPTO LOS ACEITES COMESTIBLES Y LOS DE LOS CAPÍTULOS 05 Y 12)	B
14	RESIDUOS DE DISOLVENTES, REFRIGERANTES Y PROPELANTES ORGÁNICOS (EXCEPTO LOS DE LOS CAPÍTULOS 07 Y 08)	
15	RESIDUOS DE ENVASES; ABSORBENTES, TPAPOS DE LIMPIEZA, MATERIALES DE FILTRACIÓN Y ROPAS DE PROTECCIÓN NO ESPECIFICADOS EN OTRA CATEGORÍA	
16	RESIDUOS NO ESPECIFICADOS EN OTRO CAPÍTULO DE LA LISTA	C
17	RESIDUOS DE LA CONSTRUCCIÓN Y DEMOLICIÓN (INCLUIDA LA TIERRA EXCAVADA DE ZONAS CONTAMINADAS)	A
18	RESIDUOS DE SERVICIOS MÉDICOS O VETERINARIOS O DE INVESTIGACIÓN ASOCIADA (SALVOS LOS RESIDUOS DE COCINA Y DE RESTAURANTE NO PROCEDENTES DIRECTAMENTE DE LA PRESTACIÓN DE CUIDADOS SANITARIOS)	
19	RESIDUOS DE LAS INSTALACIONES PARA EL TRATAMIENTO DE RESIDUOS, DE LAS PLANTAS EXTERNAS DE TRATAMIENTO DE AGUAS RESIDUALES Y DE LA PREPARACIÓN DE AGUA PARA CONSUMO HUMANO Y DE AGUA PARA CONSUMO INDUSTRIAL	
20	RESIDUOS MUNICIPALES (RESIDUOS DOMÉSTICOS Y RESIDUOS ASIMILABLES PROCEDENTES DE LOS COMERCIOS, INDUSTRIAS E INSTITUCIONES), INCLUIDAS LAS FRACCIONES RECOGIDAS SELECTIVAMENTE	

La asignación de un código concreto se realiza a partir del procedimiento para la utilización de la lista de residuos.

Cualquier residuo que pueda identificarse mediante un **código** marcado con un **asterisco (\*)** deberá considerarse como **peligroso**. Los residuos definidos mediante los demás códigos se consideran como no peligrosos.

Para la correcta **asignación de un código** debe determinarse el código o códigos de la LER adecuados para los residuos en cuestión, teniendo en cuenta que, a nivel de los Estados miembros, pueden haberse introducido códigos específicos en la legislación nacional en virtud del artículo 7, apartados 2 o 3, de la DMR;

A continuación, debe analizarse a cuál de los siguientes tipos de código deben asignarse los residuos en cuestión:

- ✓ Código de residuo peligroso absoluto (RP) [marcado con un asterisco (\*)]

Los residuos asignados a códigos RP no pueden asignarse a códigos no peligrosos y se consideran peligrosos sin ninguna evaluación complementaria.

En caso de que se asigne un código RP, el residuo se clasifica como peligroso y no es necesario realizar más evaluaciones a fin de decidir si el residuo en cuestión se clasifica como peligroso. No obstante, seguirá siendo necesario determinar qué características de peligrosidad presentan los residuos en cuestión, ya que esta información puede ser necesaria para el cumplimiento de las disposiciones establecidas en el artículo 19 de la DMR sobre el etiquetado correcto de los residuos peligrosos (por ejemplo, para rellenar una carta de porte para los traslados de residuos).

- ✓ Códigos de residuos no peligrosos absolutos (RNP)

Los residuos asignados a códigos RNP no pueden asignarse a códigos peligrosos y deben clasificarse como no peligrosos sin ninguna evaluación posterior.

En caso de que se asigne un código RNP, los residuos se clasifican como no peligrosos y no es necesario realizar más evaluaciones a fin de decidir si los residuos se clasifican como no peligrosos.

- ✓ Código espejo

Los códigos espejo se pueden definir como dos o más códigos relacionados en los que uno es peligroso y el otro no lo es. A diferencia de los códigos RP o RNP, si los residuos van a ser asignados a un grupo de códigos alternativos, deben tomarse medidas complementarias en la evaluación para la asignación. Los códigos alternativos consisten en al menos una de las indicaciones siguientes:

- Código espejo de residuos peligrosos (ERP) [marcado con un asterisco (\*)]
- Código espejo de residuos no peligrosos (ERNP)

Número de códigos en la LER			
842 códigos de la lista de residuos			
408 códigos peligrosos		434 códigos no peligrosos	
230 RP	178 ERP	188 ERNP	246 RNP

**FASE 3: ¿Se dispone de conocimientos suficientes sobre la composición de los residuos para determinar si presentan características de peligrosidad, bien mediante cálculo o ensayo de conformidad con la fase 4?**

Obtener información suficiente sobre la presencia y el contenido de sustancias peligrosas en los residuos a fin de poder determinar si estos pueden presentar alguna de las características de peligrosidad HP1 a HP15 es un paso importante en la clasificación de los residuos. Se requiere determinada información sobre la composición de los residuos, con independencia del método elegido para evaluar las características de peligrosidad (cálculo o ensayo), tal como se describe en la fase 4. Existen varias vías para recabar información sobre la composición de los residuos, las sustancias peligrosas presentes y las potenciales características de peligrosidad:

- información sobre el proceso de producción y el proceso químico «generador de residuos» y sus sustancias de entrada y sustancias intermedias, incluidas opiniones de expertos (pueden ser fuentes útiles informes BREF, manuales de procesos industriales, descripciones de procesos y listas de materiales de entrada facilitadas por el productor, etc.);
- información del productor inicial de la sustancia u objeto antes de que este se convirtiera en residuo, por ejemplo, fichas de datos de seguridad (FDS), etiqueta o fichas de producto;
- bases de datos sobre análisis de residuos disponibles a nivel de los Estados miembros;
- muestreo y análisis químico de los residuos.

Una vez que se ha recopilado información acerca de la composición de los residuos, es posible evaluar si las sustancias identificadas están clasificadas como peligrosas, es decir, si se les asigna un código de indicación de peligro.

Si las sustancias identificadas como componentes de los residuos pertinentes se consideran sustancias peligrosas, deberán evaluarse con arreglo a los criterios del Reglamento CLP. Obsérvese que según el Reglamento CLP, las «indicaciones de peligro» se definen como: una frase que, asignada a una clase o categoría de peligro, describe la naturaleza de los peligros de una sustancia o mezcla peligrosas, incluyendo, cuando proceda, el grado de peligro;

Un ejemplo de código de indicación de peligro y clase y categoría de peligro puede ser:

**Indicación de peligro:** -Descripción: -Clase y categoría de peligro:

**H330-Mortal en caso de inhalación-Acute Tox. 2**

Así, la primera cifra después de la «H» representa la clasificación del peligro (2 — peligros físicos, 3 — peligros para la salud, 4 — peligros para el medio ambiente), el segundo y tercer dígito son números consecutivos de agrupación de códigos de peligro.

**FASE 4: ¿Los residuos presentan alguna de las características de peligrosidad HP1 a HP15?**

A continuación debe **determinarse las características de peligrosidad**, mediante la Tabla de Características de los residuos que permiten calificarlos de peligrosos (descripción tomada de la DMR, anexo III):

Características de peligrosidad

HP 1	Explosivo
HP 2	Comburente
HP 3	Inflamable
HP 4	Irritante — irritación cutánea y lesiones oculares
HP 5	Toxicidad específica en determinados órganos (STOT en su sigla inglesa)/Toxicidad por aspiración
HP 6	Toxicidad aguda
HP 7	Carcinógeno
HP 8	Corrosivo
HP 9	Infeccioso
HP 10	Tóxico para la reproducción
HP 11	Mutágeno
HP 12	Liberación de un gas de toxicidad aguda
HP 13	Sensibilizante
HP 14	Ecotóxico
HP 15	Residuos que pueden presentar una de las características de peligrosidad antes mencionadas que el residuo original no presentaba directamente.

En la Directiva 2008/98/CE del Parlamento Europeo y del Consejo, de 19 de noviembre de 2008, sobre los residuos y por la que se derogan determinadas Directivas, se listan en sus anexos las operaciones de eliminación, valorización y las características de los residuos que permiten clasificarlos de peligrosos. Cabe reseñar que esta normativa ha sido modificada en algunos artículos por la Directiva (UE) 2018/851 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 30 de mayo de 2018, por la que se modifica la Directiva 2008/98/CE sobre los residuos.

## **2.2 CLASIFICACIÓN DE LOS RESIDUOS GENERADOS EN LOS LABORATORIOS**

De las actividades que se llevan a cabo en los laboratorios de Sanidad y Genética Animal se pueden generar los siguientes tipos de residuos:

### **2.2.1 Residuos sanitarios (RS)**

Podríamos definir los RS como los producidos en la actividad sanitaria, actividad pues que se desarrolla principalmente en centros hospitalarios o centros de salud, pero también en centros veterinarios, consultorios profesionales privados (dentistas, quiroprácticos, etc.), etc.

También deben ser incluidos los residuos biológicos de la investigación científica, análisis o docencia, así como los de obtención o manipulación de productos biológicos humanos, y los de asistencia sanitaria a domicilio.

En general, los RS se pueden clasificar en los siguientes cuatro grupos:

- Grupo I: RS asimilables a municipales.
- Grupo II: RS no específicos.
- Grupo III: RS específicos o de riesgo.
- Grupo IV: Residuos tipificados en normativas singulares.

Los RS asimilables a residuos municipales o de Grupo I son los que no plantean exigencias especiales en su gestión. Estos residuos incluyen cartón, papel, material de oficinas y despachos, cocinas, bares y comedores, talleres, jardinería y residuos procedentes de pacientes no infecciosos, no incluidos en los Grupos II y III.

Los RS no específicos, o de Grupo II son aquellos residuos sobre los cuales se han de practicar medidas de prevención en la manipulación, la recogida, el almacenamiento y el transporte, únicamente en el ámbito del centro sanitario. Estos residuos incluyen material de curas, yesos, ropa y material de un solo uso contaminados con sangre, secreciones y/o excreciones, todos ellos no englobados dentro de los residuos del Grupo III.

Los RS específicos, o de riesgo, o de Grupo III, son aquellos residuos sobre los cuales se han de practicar medidas de prevención en la manipulación, la recogida, el almacenamiento, el transporte y la eliminación, tanto dentro como fuera del centro sanitario, ya que pueden representar un riesgo para la salud laboral y pública.

Los RS específicos o de riesgo, a su vez, se pueden clasificar en los siguientes tipos:

- a) Residuos infecciosos, aquellos capaces de transmitir alguna de las enfermedades infecciosas (Ej. Brucelosis, Fiebre Q, Muermo, etc.)
- b) Residuos anatómicos, cualquier resto anatómico humano o animal que se pueda reconocer como tal.
- c) Sangre y homoderivados en forma líquida.
- d) Agujas, y material punzante y cortante, entendiéndose como tal, a cualquier objeto punzante utilizado en la actividad sanitaria, independientemente de su origen. Se trata,

pues, de agujas, pipetas, hojas de bisturí, portaobjetos, cubreobjetos, capilares y tubos de vidrio.

- e) Vacunas vivas y atenuadas.

Los Residuos tipificados en normativas singulares o del Grupo IV, son aquellos cuya gestión está sujeta a requerimientos especiales desde el punto de vista higiénico y ambiental, tanto dentro como fuera del centro sanitario generador.

Los Residuos del Grupo IV incluyen:

- a) Residuos citostáticos: restos de medicamentos que frenan la proliferación celular en los tratamientos antitumorales, y todo el material de un solo uso que haya estado en contacto con los citados fármacos.
- b) Restos de sustancias químicas: residuos contaminados con productos químicos que dan lugar a residuos peligrosos. Se trata de materiales muy diversos, tales como pilas, termómetros, disolventes, reactivos químicos, baños de revelado de radiografías, medicamentos y lubricantes.
- c) Medicamentos caducados.
- d) Aceites minerales y sintéticos.
- e) Residuos radioactivos: residuos contaminados con sustancias radiactivas. Su recogida y eliminación es competencia exclusiva de ENRESA (Empresa Nacional de Residuos Radioactivos, S.A).
- f) Restos anatómicos humanos o animales con entidad: cadáveres y restos humanos o animales con entidad procedentes de abortos u operaciones quirúrgicas. Su gestión está regulada por el Reglamento de Policía Sanitaria Mortuoria.

### **2.2.2 Residuos químicos peligrosos**

Se denomina residuo peligroso a aquel que es considerado peligroso debido a contener propiedades intrínsecas que presentan riesgos para la salud y para el medio ambiente, es decir, aquel residuo que presenta una o varias de las características peligrosas enumeradas en el anexo III de la DMR.

Existen multitud de tipos de residuos químicos peligrosos que se pueden generar en un laboratorio de Sanidad y Genética Animal, tantos como la clasificación en según de su peligrosidad se pueda dar, cumpliendo la normativa anteriormente descrita. Algunos ejemplos más concretos pueden ser:

- disolventes halogenados o no halogenados (alcoholes, aldehídos),
- reactivos químicos cancerígenos (formamida),
- reactivos químicos inflamables, tóxicos, etc. (etanol, metanol)
- reactivos procedentes de tinciones histológicas, microbiológicas (hematoxilina, eosina),
- envases vacíos que hayan contenido sustancias peligrosas, ya sean de plástico o vidrio,
- material absorbente procedente de limpieza de vertidos de reactivos químicos,

- medicamentos y vacunas caducadas o antibióticos utilizados para técnicas de resistencias microbianas,
- lodos de tratamiento de instalaciones,
- residuos eléctricos y electrónicos (REE), pilas, pinturas, etc. que son considerados como residuos peligrosos según la normativa,
- otros: chatarra, madera, etc.

### **2.2.3 Residuos SANDACH**

Los residuos de animales que puedan contener algún agente infeccioso que suponga un riesgo biológico para el personal o el medio ambiente durante su manipulación, almacenamiento, transporte o procesado (cadáveres, partes del cuerpo, camas, viruta procedente de los lechos de estabulación de tales animales, etc) se clasifican y gestionan como residuos sanitarios. No obstante, existen otra clase de residuos que se denominan SANDACH, que son residuos de subproductos animales y sus productos derivados no destinados al consumo humano.

La norma sanitaria aplicable a esta clase de residuos es el Reglamento (CE) nº 1069/2009 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 21 de octubre de 2009.

Se clasifican según su riesgo en categorías de 1 a 3, entre los que podemos encontrar dentro de un laboratorio de Sanidad Animal por ejemplo:

- Material de categoría 1: animales sospechosos de estar infectados por una EET o los animales utilizados para experimentos
- Material de categoría 2: los subproductos animales recogidos durante el tratamiento de aguas o que contienen residuos de sustancias autorizadas.

### **2.2.4 Residuos urbanos**

Además de los residuos mencionados anteriormente, se pueden segregar residuos de tipo urbano como con el papel y cartón, plásticos y envases, vidrio, poliespan, residuos de tinta tóner, lodos de fosas sépticas, etc.

## **2.3 GESTIÓN DE LOS RESIDUOS GENERADOS EN LOS LABORATORIOS**

La Gestión en el laboratorio se divide en dos partes en función de dónde se realice:

### **2.3.1 Gestión intracentro**

Se debe llevar a cabo en primer lugar una Identificación y clasificación de residuos de acuerdo a la legislación vigente tal y como se ha descrito anteriormente.

Cumpliendo la normativa, los residuos deben segregarse en envases y contenedores homologados y etiquetarse con la información que indica la normativa.

Para el caso concreto de los residuos sanitarios deben ser segregados en envases rígidos o semirrígidos, opacos, impermeables, resistentes a la humedad y perforación, provistos de cierre hermético y de un volumen no superior a 60 litros y señalizados con el pictograma "Biopeligroso". En el caso de segregarse en bolsas estas deben ser rojas y superior a una galga de 300 y con la misma señalización.

Para el caso concreto de los residuos citotóxicos se segregan en contenedores de las mismas características pero de color azul y señalados con su pictograma (citotóxico). Cabe reseñar que para la correcta diferenciación de los contenedores y facilitar su identificación se establecen diferentes colores, en el caso de la CAM mediante el Decreto 83/1999, de 3 de junio, por el que se regulan las actividades de producción y de gestión de los residuos biosanitarios y citotóxicos en la comunidad de Madrid, los contenedores citotóxicos deben ser de color azul

Cabe reseñar que todos los envases de residuos Biosanitarios y Citotóxicos serán de un solo uso, y una vez cerrados, no podrán volver a abrirse.

Los residuos químicos peligrosos se segregarán en garrafas y contenedores adecuados a sus características de peligrosidad, volumen, estado sólido/líquido, emisión de posibles gases de descomposición, etc. Es importante mencionar que las garrafas con líquidos no deben superar el 80% de su capacidad cumpliendo con las recomendaciones de PRL y correctamente identificadas con la etiqueta correspondiente.

El etiquetado contiene al menos los siguientes puntos:

Nombre del residuo, código de identificación del residuo, nombre, dirección y teléfono del titular del residuo, fecha de envasado, naturaleza de los riesgos que presentan los residuos, símbolos o pictogramas.

Los pictogramas asociados a los residuos son:

Sanitario



Citotóxico



Pictogramas asociados a los residuos peligrosos



Como depósito intermedio el laboratorio puede mantener puntos intermedios para facilitar la segregación diferenciada a los usuarios. Una vez llenos los envases o contenedores se trasladarán al depósito final de residuos cumpliendo con las indicaciones que haya marcado

el laboratorio para evitar incidentes como vertidos de residuos. En caso de vertidos, se seguirá el plan de emergencia establecido.

Como depósito final, podemos encontrar:

- Cámaras frigoríficas acondicionadas para el depósito final de los residuos sanitarios donde se almacenan hasta su entrega a un gestor autorizado.
- Almacén de residuos químicos peligrosos acondicionado para el depósito final de estos residuos en el que se almacenan hasta su entrega a un gestor autorizado.

El almacenamiento de realizará agrupándolos por grupos de riesgo y cumpliendo las recomendaciones de incompatibilidades químicas. Por ejemplo, se podrán desechar en la misma garrafa mezclas de ácidos inorgánicos y bases que se puedan neutralizar entre sí y se evitarán aquellas mezclas que produzcan una reacción severa o que su reacción libere productos.

- Contenedores como depósito final de Residuos Urbanos o asimilables a urbanos: contenedores de papel, poliespan, envases y residuos de envases (fracción amarilla), vidrio, etc.

La gestión se completa con la gestión y control de la documentación que marca la normativa.

La documentación relativa a la gestión de residuos consta de:

- ✓ Autorización emitida por la CCAA que habilita al laboratorio para la Producción de Residuos Peligrosos
- ✓ Autorización de las/s empresa/s externa para la Gestión de residuos y los documentos relativos a su transporte.
- ✓ Documentos de identificación, anteriormente denominado Documento de control y seguimiento (DCS).
- ✓ Contrato de Tratamiento de residuos
- ✓ Documentos de Notificación de traslado en su caso.
- ✓ Documentos para la Presentación telemática de los residuos por parte de la empresa gestora en su caso.

La gestión se formaliza con la entrega de residuos sanitarios y peligrosos a un transportista o gestor autorizado y se realiza con una periodicidad tal que garantiza que estos residuos nunca permanecen en el depósito final durante un tiempo superior al establecido por la legislación vigente.

Se mantendrá un Registro de retiradas de residuos sanitarios y peligrosos empleando por ejemplo un “Libro de Registro” para cada tipo de residuo, en el que figure al menos la siguiente información relacionada con la retirada: origen, frecuencia de recogida, fecha de inicio del almacenamiento y cesión, naturaleza del residuo, Código LER del residuo, cantidad (Kg), nº de identificación del seguimiento, matrícula, etc.

Asimismo, hay que tener en cuenta que en caso de desaparición, pérdida o escape de residuos sanitarios y peligrosos, en caso de necesidad se comunicará lo sucedido a las autoridades o figuras competentes en cada caso.

### **2.3.2 Gestión extracentro**

Como hemos mencionado anteriormente, tan sólo aquellas empresas autorizadas por la CCAA estarán en disposición de transportar y gestionar los residuos. No obstante, es importante a la hora de gestionar los residuos conocer el proceso final al que se somete cada tipo de los residuos definidos para ayudar a segregarlos de forma correcta para provocar en el medio ambiente el menor impacto perjudicial.

De manera resumida los procesos que sufren en una gestión extracentro son:

- Residuos Sanitarios: Esterilización en autoclave de vacío (134 °C y 2.2 bares de presión durante al menos 20 minutos en distintas fases). Con ello se consigue eliminar toda forma vegetativa de bacterias, micobacterias, hongos, virus y sus esporas. A continuación es sometido a un proceso de trituración con la finalidad de reducir el volumen de residuo y ocupar un menor espacio en el vertedero autorizado.
- Residuos Sanitarios para incinerar: Para aquellos residuos de animales que debido a su volumen no se garantiza que el vapor alcance las partes más profundas. En lugar de realizar un proceso de esterilización por autoclave se realiza una incineración, de este modo se asegura la completa eliminación de los agentes infecciosos.
- Residuos específicos de EETs: Debido a las características de los residuos que se generan durante la realización de los análisis de estas enfermedades, es necesario realizar un tratamiento interno específico para estos residuos: son esterilizados en el autoclave de vacío en un ciclo de esterilización de al menos 134°C, 3.2 bar durante 18 minutos mínimo tal y como marca la normativa específica de estas enfermedades, y posteriormente son gestionados como los residuos sanitarios.
- Residuos Citotóxicos: Incineración. Las condiciones en términos de temperatura, tiempo de combustión y proporción de oxígeno son tales que garanticen la incineración de los residuos y la oxidación del gas de combustión. A la salida del horno se recuperan los gases producidos y los residuos completamente incinerados que son trasladados a vertedero autorizado.
- Residuos Peligrosos: En función del subtipo, residuos de laboratorio, medicamentos caducados, filtros contaminados, etc., sufrirán el tratamiento que mejor se adecue, entre otros:
  - Recuperación
  - tratamientos físico-químicos
  - tratamientos térmicos
  - valorización energética, etc.
- Residuos Urbanos o asimilables a urbanos: Reciclado y/o recuperación y/o valorización energética de residuos de papel, plástico y vidrio. Recomposición de partículas de poliespán. Traslado a vertedero autorizado del resto de residuos orgánicos.

### 2.3.3. Gestión de residuos generados en áreas de contención biológica de tipo 3 ó 4

En las instalaciones de contención biológica de tipo 3 o superior se manejan agentes biológicos de grupo 3 o superior, (según la evaluación de riesgos que se haya realizado). Para el caso concreto de los residuos que se generan en el interior de estas áreas, todos ellos deben ser tratados específicamente antes de salir hacia el exterior con el fin de evitar cualquier escape o contaminación.

Es necesario llevar un tratamiento *in situ* y en función de las características y tipo de residuo los posibles tratamientos que se llevan a cabo pueden ser:

- Esterilización en autoclave *in situ*: Se esterilizarán en autoclave todos los residuos sólidos sanitarios que se segreguen en el interior del área contenida.
- Descontaminación en superficie: para garrafas y botellas que contengan residuos químicos y que se deban a gestionar con otra empresa autorizada.
- Esterilización y tratamiento en *Biowaste*: los residuos líquidos potencialmente contaminados con agentes biológicos segregados en los laboratorios se les aplica una descontaminación con virucidas (apropiados al agente biológico en cuestión) para inactivar dichos agentes y posteriormente se desechan por la pila para ser tratados en el *Biowaste* mediante ciclos de esterilización.

### 2.3.4 Gestión de residuos generados en animalario

Los residuos generados en las instalaciones de animalario se clasifican en función de su peligrosidad, y pueden ser:

- Residuos de animales infecciosos/inoculados y modificados genéticamente los cuales se gestionarán como residuos sanitarios para incinerar para el caso de cadáveres o partes del cuerpo, y residuos sanitarios para autoclavar para los residuos procedentes de las camas de los animales u otros residuos obtenidos de su manipulación como por ejemplo, guantes, papel, agujas, jeringas, gasas, etc.
- Residuos de animales sanos: los cadáveres se gestionarán igualmente con un gestor autorizado con la salvedad que no es necesario segregarlos en contenedores cerrados herméticamente. Estos residuos son considerados residuos tipo SANDACH

## 3. LEGISLACIÓN APLICABLE

La Regulación sobre Residuos en nuestro país se concreta en la reciente **Ley 7/2022**, de 8 de abril, de **residuos y suelos contaminados para una economía circular**.

La Ley tiene por objeto sentar los principios de la economía circular a través de la legislación básica en materia de residuos, así como contribuir a la lucha contra el cambio climático y proteger el medio marino. Se contribuye así al cumplimiento de los Objetivos de Desarrollo Sostenible, incluidos en la Agenda 2030 y en particular a los objetivos 12 de producción y consumo sostenible, 13 de acción por el clima y 14 de vida submarina. Asimismo, en el ámbito

de su contribución a la lucha contra el cambio climático, esta ley es coherente con la planificación en materia de energía y clima.

Con el ánimo de transformar la Unión Europea en una «sociedad del reciclado» y contribuir a la lucha contra el cambio climático, se aprobó en 2008 la **Directiva 2008/98/CE** del Parlamento Europeo y del Consejo, de 19 de noviembre de 2008, sobre los residuos y por la que se derogan determinadas Directivas (en adelante, **Directiva Marco de residuos, DMR**). Es el principal documento legislativo sobre residuos a escala de la UE. Al ser una directiva, la DMR se transpone a la legislación nacional de los Estados miembros por medio de distintos actos jurídicos. Esta directiva estableció el principio de jerarquía de residuos como instrumento clave que permitía disociar la relación existente entre el crecimiento económico y la producción de residuos. Dicho principio explicita el orden de prioridad en las actuaciones en materia de residuos: prevención de residuos, preparación para la reutilización, reciclado, otros tipos de valorización incluida la energética y por último, la eliminación de los residuos.

En el año 2015, la Comisión Europea aprobó el Plan de Acción en materia de economía circular (COM (2015) 614 final), que incluía un compendio de medidas entre las que se encontraba la aprobación de un paquete normativo que revisara las piezas clave de la normativa de la Unión Europea relativa a residuos. Así, en 2018 se aprueba la **Directiva (UE) 2018/851** del Parlamento Europeo y del Consejo, de 30 de mayo de 2018, por la que se modifica la Directiva 2008/98/CE sobre los residuos (en adelante, Directiva (UE) 2018/851). Esta directiva **revisa algunos artículos de la Directiva Marco de residuos** con el objetivo de avanzar en la economía circular, armonizar, mejorar la información y trazabilidad de los residuos y reforzar la gobernanza en este ámbito.

El ámbito de aplicación de la Directiva viene determinado por la definición de «residuo» que figura en el artículo 3, punto 1: *“cualquier sustancia u objeto del cual su poseedor se desprenda o tenga la intención o la obligación de desprenderse”*.

En muchos casos, la decisión en cuanto a si una sustancia u objeto es «residuo» de conformidad con la DMR es fácil de determinar. Sin embargo, en otros casos resulta más difícil. El documento *Guidance on the interpretation of key provisions of Directive 2008/98/EC on waste* (en lo sucesivo, «las **Orientaciones DMR**») ofrece orientaciones detalladas sobre la definición de «residuo», incluida información sobre las excepciones a la aplicación de la DMR y ejemplos de la jurisprudencia vinculante del TJUE. En caso de que una sustancia u objeto cumpla los criterios para considerarse residuo, estará sujeto a la legislación en materia de residuos, incluidas las normas sobre la clasificación de los residuos (salvo que esté específicamente excluido del ámbito de aplicación de la DMR).

La DMR define el concepto de «residuo peligroso» en su artículo 3, punto 2, como: « **residuo que presenta una o varias de las características peligrosas enumeradas en el anexo III** ».

Decidir si una sustancia u objeto puede considerarse «residuo» en el sentido de la DMR es una decisión importante, tan importante como la decisión de si debe calificarse de «residuo no peligroso» o «residuo peligroso».

Se aplican condiciones estrictas a la gestión de residuos peligrosos, en especial:

- la obligación de aportar pruebas para el seguimiento de los residuos según el sistema establecido por el Estado miembro de que se trate (artículo 17 de la DMR);
- una prohibición de efectuar mezclas (artículo 18 de la DMR);
- obligaciones específicas en materia de etiquetado y envasado (artículo 19 de la DMR).

Además, la legislación de la UE establece que los **residuos peligrosos solo pueden ser tratados en instalaciones de tratamiento especialmente designadas** que hayan obtenido una **autorización especial** con arreglo a lo dispuesto en los artículos 23 a 25 de la Directiva marco sobre los residuos, pero también con arreglo a otros actos legislativos.

Las características de los residuos que los hacen peligrosos, establecidas en el anexo III de la DMR, se han adaptado recientemente al progreso científico mediante el Reglamento (UE) n.º 1357/2014 de la Comisión, aplicable a partir del 1 de junio de 2015, así como el Reglamento (UE) 2017/997 del Consejo, aplicable a partir del 5 de julio de 2018. Los reglamentos de la UE son directamente aplicables en los Estados miembros sin necesidad de transposición a la legislación nacional. En el contexto de la clasificación de los residuos, el artículo 7 de la DMR establece las bases para la lista de residuos y su aplicación. Los Estados miembros podrán introducir códigos adicionales en los textos nacionales que incorporan la LER.

**La Ley 7/2022 incorpora a nuestro ordenamiento jurídico la directiva aprobada en 2018, con las modificaciones que esta introduce en la Directiva Marco de residuos**

Por otro lado, se deroga de forma expresa Ley 22/2011, de 28 de julio; el Real Decreto 833/1988, de 20 de julio, por el que se aprueba el Reglamento para la ejecución de la Ley 20/1986, Básica de Residuos Tóxicos y Peligrosos; y las órdenes relativas a la publicación de las operaciones de valorización y eliminación de residuos y lista europea de residuos, así como la relativa a la determinación de los métodos de caracterización de los residuos tóxicos y peligrosos.

La **Ley 7/2022** contempla dentro de su articulado requisitos, en el capítulo I de la producción y posesión de los residuos, de obligaciones del productor inicial u otro poseedor relativas a la gestión de sus residuos.

El productor inicial u otro poseedor de residuos está obligado a asegurar el tratamiento adecuado de sus residuos y para ello, dispondrá de las siguientes opciones:

- a) Realizar el tratamiento de los residuos por sí mismo, siempre que disponga de la correspondiente autorización para llevar a cabo la operación de tratamiento.
- b) Encargar el tratamiento de sus residuos a un negociante registrado o a un gestor de residuos autorizado que realice operaciones de tratamiento.
- c) Entregar los residuos a una entidad pública o privada de recogida de residuos, incluidas las entidades de economía social, para su tratamiento, siempre que estén registradas conforme a lo establecido en esta ley.

Dichas obligaciones deberán acreditarse documentalmente.

Además, establece las obligaciones relativas al almacenamiento, mezcla, el envasado y el etiquetado de residuos.

En relación con el almacenamiento, la mezcla, el envasado y el etiquetado de residuos en el lugar de producción, el productor inicial u otro poseedor de residuos está obligado a:

- a) Disponer de una zona habilitada e identificada para el correcto almacenamiento de los residuos que reúna las condiciones adecuadas de higiene y seguridad mientras se encuentren en su poder. En el caso de almacenamiento de residuos peligrosos estos deberán estar protegidos de la intemperie y con sistemas de retención de vertidos y derrames.

La duración máxima del almacenamiento de los residuos no peligrosos en el lugar de producción será inferior a dos años cuando se destinen a valorización y a un año cuando se destinen a eliminación.

En el caso de los residuos peligrosos, en ambos supuestos, la duración máxima será de seis meses; en supuestos excepcionales, la autoridad competente de las comunidades autónomas donde se lleve a cabo dicho almacenamiento, por causas debidamente justificadas y siempre que se garantice la protección de la salud humana y el medio ambiente, podrá modificar este plazo, ampliándolo como máximo otros seis meses.

Los plazos mencionados empezarán a computar desde que se inicie el depósito de residuos en el lugar de almacenamiento debiendo constar la fecha de inicio en el archivo cronológico y también en el sistema de almacenamiento (jaulas, contenedores, estanterías, entre otros) de esos residuos.

- b) No mezclar residuos no peligrosos si eso dificulta su valorización
- c) No mezclar ni diluir los residuos peligrosos con otras categorías de residuos peligrosos ni con otros residuos, sustancias o materiales.
- d) Envasar los residuos peligrosos de conformidad con lo establecido en el artículo 35 del Reglamento (CE) n.º 1272/2008 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 16 de diciembre de 2008, sobre clasificación, etiquetado y envasado de sustancias y mezclas, y por el que se modifican y derogan las Directivas 67/548/CEE y 1999/45/CE y se modifica el Reglamento (CE) n.º 1907/2006.
- e) Los recipientes o envases que contengan residuos peligrosos deberán estar etiquetados de forma clara y visible, legible e indeleble, al menos en la lengua española oficial del Estado.

En la etiqueta deberá figurar:

- El código y la descripción del residuo, así como el código y la descripción de las características de peligrosidad.
- Nombre, Asignación de Número de Identificación Medioambiental (en adelante «NIMA»), dirección, postal y electrónica, y teléfono del productor o poseedor de los residuos.
- Fecha en la que se inicia el depósito de residuos.
- La naturaleza de los peligros que presentan los residuos, que se indicará mediante los pictogramas descritos en el Reglamento (CE) n.º 1272/2008 del Parlamento y del Consejo, de 16 de diciembre de 2008.

En el artículo 31, se establecen las obligaciones en lo referente al traslado de los residuos en el interior del territorio del Estado.

Los traslados de residuos se efectuarán teniendo en cuenta los principios de autosuficiencia y proximidad. Todo traslado de residuos deberá ir acompañado de un documento de identificación, a los efectos de seguimiento y control.

Los operadores de traslados deberán presentar una notificación previa a la autoridad competente de la comunidad autónoma de origen, que la remitirá a la autoridad competente de la comunidad autónoma de destino siguiendo el procedimiento reglamentariamente establecido, en los casos siguientes:

- a) los traslados de residuos, peligrosos y no peligrosos, destinados a eliminación y
- b) los traslados de residuos peligrosos, de residuos domésticos mezclados identificados con el código LER 200301, y los que reglamentariamente se determinen, destinados a valorización.

Las notificaciones podrán ser generales con la duración temporal que se determine reglamentariamente o podrán referirse a traslados concretos.

Cabe reseñar la normativa específica mediante el **Real Decreto 553/2020**, de 2 de junio, por el que se regula el traslado de residuos en el interior del territorio del Estado.

En el capítulo III, se establece el régimen de autorización y comunicación de las actividades de producción y gestión de residuos. En cumplimiento de ellos, solamente se podrán contratar empresas autorizadas para la recogida y el tratamiento de los residuos.

#### Histórico de la normativa de residuos:

A nivel estatal la Ley 20/1986 de 14 de mayo, Básica de Residuos Tóxicos y Peligrosos, desarrollada por el Real Decreto 833/1988, de 20 de julio, fue uno de los primeros referentes en cuanto a la clasificación de los residuos peligrosos.

La Ley 20/1986 fue derogada por la Ley 10/1998, de 21 de abril, de Residuos y el RD 833/1988, posteriormente fue modificado por el Real Decreto 952/1997 de 20 de junio, en el que se publicaba la lista de residuos peligrosos, aprobada mediante Decisión 94/904/CE.

Posteriormente, en fecha 1 de enero de 2002 entró en vigor el Catálogo Europeo de Residuos (CER, en adelante), mediante Decisión 2000/532/EC, por lo que pasó a utilizarse para clasificar los residuos y determinar sus vías de gestión. Cabe reseñar que posteriormente se publicó la Decisión 2001/118/CE de la Comisión, de 16 de enero de 2001, por la que se modifica la Decisión 2000/532/CE en lo que se refiere a la lista de residuos y se instrumenta un nuevo anexo. Otras Decisiones que conforman la lista CER: La Decisión de la Comisión 2001/573/CE, de 23 de julio, en la que se modifica la clasificación de algunos residuos y la Decisión 2014/955/UE de la Comisión, de 18 de diciembre de 2014, por la que se suprimen los artículos 2 y 3 de la Decisión 2000/532/CE, y se adapta su contenido a lo establecido por la Directiva 2008/98/CE.

Con la entrada en vigor de la Ley 22/2011, de 28 de julio, de residuos y suelos contaminados, se derogó la Ley 10/1998, en la que se establecía la posible reclasificación de los residuos, conforme a los procedimientos previstos en la Directiva 2008/98/CE.

Por otro lado, cabe reseñar la derogación y deslegalización de la Ley 11/1997, de 24 de abril, de envases y residuos de envases, que se llevó a cabo mediante la Ley 22/2011, de 28 de julio, a pesar de que todavía no haya sido aprobado el nuevo reglamento regulador de este flujo de residuos, si bien se ha incluido una disposición transitoria al respecto.

#### **4. IMPACTO MEDIOAMBIENTAL**

Los impactos de los residuos sobre el medio ambiente, el cambio climático y las basuras marinas son los principales focos de preocupación actual.

Por lo que se refiere a la incidencia de los residuos en el cambio climático, estos suponen una fuente difusa de emisión de gases de efecto invernadero, principalmente debido al metano emitido en vertederos que contienen residuos biodegradables. Si bien su contribución a las emisiones de gases de efecto invernadero se mantiene en porcentajes en torno al cuatro por ciento, esta se puede reducir de forma significativa promoviendo, por ejemplo, políticas que evite el depósito de residuos biodegradables en vertedero.

Adicionalmente, la gestión sostenible de residuos ayuda a otros sectores económicos a reducir sus emisiones de gases de efecto invernadero y de otros contaminantes atmosféricos.

Por otra parte, la correcta gestión de los residuos evita que estos acaben en el medio marino, lo que contribuye positivamente a la consecución de los objetivos enmarcados en las estrategias marinas para la protección y la conservación del medio ambiente marino.

En lo que respecta al uso eficiente de los recursos, en España la gestión de residuos todavía descansa preponderantemente en el vertedero, con lo que una política de residuos que aplique rigurosamente el principio de jerarquía contribuirá a una mayor sostenibilidad, así como a la implantación de modelos económicos circulares.

En cumplimiento de la Ley 7/2022, se establece en su artículo 17, del título II de prevención de residuos, que con la finalidad de romper el vínculo entre el crecimiento económico y los impactos sobre la salud humana y el medio ambiente asociados a la generación de residuos, las políticas de prevención de residuos se encaminarán a lograr un objetivo de reducción en peso de los residuos generados, conforme al siguiente calendario:

- a) En 2025, un 13 % respecto a los generados en 2010.
- b) En 2030, un 15 % respecto a los generados en 2010.

Cabe reseñar que en el título V de la mencionada ley se establece un punto dedicado a la “Reducción del impacto de determinados productos de plástico en el medio ambiente”. En el articulado de la norma se enumeran los requisitos y las obligaciones para los productos de plástico de un solo uso, estableciendo el siguiente calendario de reducción de la comercialización:

- a) En 2026, se ha de conseguir una reducción del 50 % en peso, con respecto a 2022.
- b) En 2030, se ha de conseguir una reducción del 70 % en peso, con respecto a 2022.

Y además, se establece la prohibición de la introducción en el mercado de los siguientes productos:

- a) Productos de plástico mencionados en el apartado B del anexo IV de la Ley.
- b) Cualquier producto de plástico fabricado con plástico oxodegradable.<sup>1</sup>
- c) Microesferas de plástico de menos de 5 milímetros añadidas intencionadamente.

A nivel interno, en el laboratorio, es necesario identificar y evaluar los aspectos ambientales que se generan de las actividades normales del trabajo diario para intentar eliminar o mitigar, en la medida de las posibilidades del laboratorio, los impactos negativos en el medio ambiente y por otro lado, aquellos impactos beneficiosos potenciarlos.

Por ejemplo, de la actividad de realización de ensayos de diagnóstico, se provoca un aspecto ambiental que sería la segregación de residuos peligrosos, lo que provoca un impacto negativo en el medioambiente que sería la mera presencia de residuos soterrados y no biodegradables. Se puede evaluar la actividad, para encontrar otra metodología en la que se utilicen otro tipo de reactivos menos perjudiciales para el medio ambiente, menos cantidad, etc.

Para entender el concepto de impacto beneficioso, podemos poner como ejemplo la segregación diferenciada de los envases peligrosos para su tratamiento y reutilización. Esto se traduce en tener en cuenta o reflexionar sobre la perspectiva del ciclo de vida que puede estar bajo el control o influencia del laboratorio.

---

<sup>1</sup> Los plásticos oxodegradables son un material plástico que se degradan a la vista de cualquier persona pero que permanecen pequeñas partículas en suspensión. Estas partículas son nocivas para la salud y contaminan el medioambiente.

## **BIBLIOGRAFÍA**

Comunicación 2018/C 124/01 de 9 Abr. (orientaciones técnicas sobre la clasificación de los residuos)

Directiva 2008/98/CE del Parlamento Europeo y del Consejo, de 19 de noviembre de 2008, sobre los residuos y por la que se derogan determinadas Directivas.

Directiva (UE) 2018/851 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 30 de mayo de 2018, por la que se modifica la Directiva 2008/98/CE sobre los residuos.

Ley 7/2022, de 8 de abril, de residuos y suelos contaminados para una economía circular

Ficha 20000, Información general sobre el Vector Residuos (Wolters Kluwer)

Ficha 20005, La clasificación de los Residuos (Wolters Kluwer)

Ficha 20090, Información general sobre Residuos Sanitarios (Wolters Kluwer)

Ministerio para la Transición Ecológica y Reto Demográfico. Guía técnica para la Clasificación de residuos.

[https://www.miteco.gob.es/images/es/guiatecnicaclasificacionderesiduosnov\\_21\\_tcm30-509157.pdf](https://www.miteco.gob.es/images/es/guiatecnicaclasificacionderesiduosnov_21_tcm30-509157.pdf)

## **MATERIAL PARA LA PREPARACIÓN DEL TEMA 19**

### **ESPECTROFOTOMETRÍA ULTRAVIOLETA/VISIBLE Y FLUORESCENCIA: CONCEPTOS Y APLICACIONES EN LABORATORIOS**

*Este material no tiene carácter oficial, por lo que en ningún caso vinculará al Tribunal Calificador. Constituye, únicamente, un instrumento complementario que servirá de apoyo al opositor para enfocar cada uno de los epígrafes, pero nunca de forma exclusiva ni excluyente. El Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación no se hace responsable del contenido del mismo.*

*Los materiales no serán objeto de actualización constante.*

## **ÍNDICE**

### **1. INTRODUCCIÓN**

### **2. PROPIEDADES DE LA RADIACIÓN ELECTROMAGNÉTICA**

- 2.1. PROPIEDADES COMO ONDA
- 2.2. PROPIEDADES COMO PARTÍCULA
- 2.3. EL ESPECTRO ELECTROMAGNÉTICO

### **3. INTERACCIÓN DE LA RADIACIÓN ELECTROMAGNÉTICA CON LA MATERIA**

- 3.1. ABSORCIÓN DE RADIACIÓN
- 3.2. CUANTIFICACIÓN. LEY DE BEER (LAMBERT-BEER)

### **4. BASES MOLECULARES DE LA ESPECTROFOTOMETRÍA DE ABSORCIÓN UV-VISIBLE**

### **5. INSTRUMENTACIÓN EN ESPECTROSCOPIA UV-VIS**

- 5.1. FUENTE
- 5.2. SELECTOR DE RADIACIÓN O DE LONGITUD DE ONDA
- 5.3. RECIPIENTE DE MUESTRA
- 5.4. DETECTOR
- 5.5. PROCESADOR Y TRANSDUCTOR DE SEÑAL
- 5.6. EQUIPOS DE HAZ SIMPLE Y HAZ DOBLE.
- 5.7. LECTORES DE PLACAS MICROTITTER

### **6. METODOLOGÍA DE TRABAJO EN ESPECTROSCOPIA UV-VIS**

### **7. ESPECTROSCOPIA DE FLUORESCENCIA MOLECULAR**

- 7.1. ESPECIES FLUORESCENTES
- 7.2. CUANTIFICACIÓN. INFLUENCIA DE LA CONCENTRACIÓN EN LA INTENSIDAD DE FLUORESCENCIA.
- 7.3. INSTRUMENTACIÓN EN FLUORESCENCIA.
- 7.4. PLICACIONES.

### **8. APLICACIONES DE LA ESPECTROSCOPIA UV-VIS Y FLUORESCENCIA. APLICACIONES EN LABORATORIOS DE SANIDAD Y GENÉTICA ANIMAL.**

- 8.1. ESPECTROFOTOMETRÍA.
- 8.2. FLUORESCENCIA.

## 1. INTRODUCCIÓN

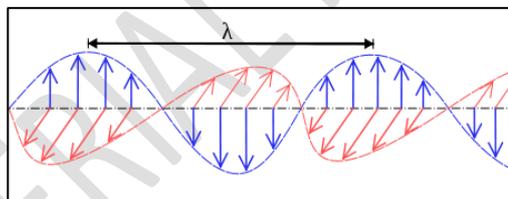
Desde un punto de vista histórico, el término espectroscopía significaba “la rama de la ciencia que estudiaba la resolución de la luz” (o sea, la radiación visible), es decir, el estudio de espectros. Con el paso del tiempo, el significado de la espectroscopía se amplió al estudio no sólo de la luz sino de cualquier otro tipo de radiación electromagnética.

## 2. PROPIEDADES DE LA RADIACIÓN ELECTROMAGNÉTICA

La radiación electromagnética (**REM**) (por ejemplo la luz visible) es un tipo de energía que se transmite por el espacio a grandes velocidades. Muchas de las propiedades de la luz pueden explicarse atendiendo a sus propiedades ondulatorias, pero hay otras, como el fenómeno de absorción o el de emisión por parte de la materia, que sólo pueden explicarse atendiendo a sus propiedades como partícula. Es por ello que se dice que la luz presenta una dualidad onda-corpúsculo (u onda-partícula). Estos dos puntos de vista de la radiación, como partícula y como onda, no se excluyen entre sí, sino que más bien se complementan.

### 2.1. PROPIEDADES COMO ONDA

Atendiendo a su naturaleza ondulatoria, la luz se podría describir como una serie de campos eléctricos y magnéticos que oscilan perpendicularmente entre sí, y perpendiculares a la dirección de traslación por el espacio dando lugar a ondas transversales:



Como cualquier otro fenómeno ondulatorio, se pueden definir, entre otros, dos parámetros importantes:

- Longitud de onda ( $\lambda$ ): distancia recorrida por un ciclo completo (por ejemplo, de cresta a cresta de la onda). La longitud de onda se expresa en unidades de longitud (en la región ultravioleta-visible se mide en nanómetros ( $1 \text{ nm} = 10^{-9}$  metros)).
- Frecuencia ( $\nu$ ): número de oscilaciones completas que realiza la onda por segundo. La frecuencia se expresa en ciclos por segundo ( $\text{s}^{-1}$  o Hertzios (Hz);  $1 \text{ Hz}$  es igual a  $1$  ciclo/s).

En el vacío, el producto de estos dos parámetros es constante e igual a la velocidad de traslación de la luz:  $c = \lambda \cdot \nu$  donde  $c$  es la velocidad de la luz en el vacío ( $3 \cdot 10^8 \text{ m/s}$ ).

## 2.2. PROPIEDADES COMO PARTÍCULA

Por otro lado, la luz se puede describir como una partícula. En este caso se dice que la luz se compone de partículas llamadas fotones, de energía proporcional a la frecuencia de la radiación. También se puede describir como paquetes de energía. La energía que tiene un fotón es proporcional a la frecuencia de la radiación, y se describe mediante la ecuación:

$$E = h \cdot \nu$$

donde  $h$  es la constante de Planck ( $6,6 \cdot 10^{-34}$  J·s). Teniendo en cuenta ambas ecuaciones llegamos anteriores a:

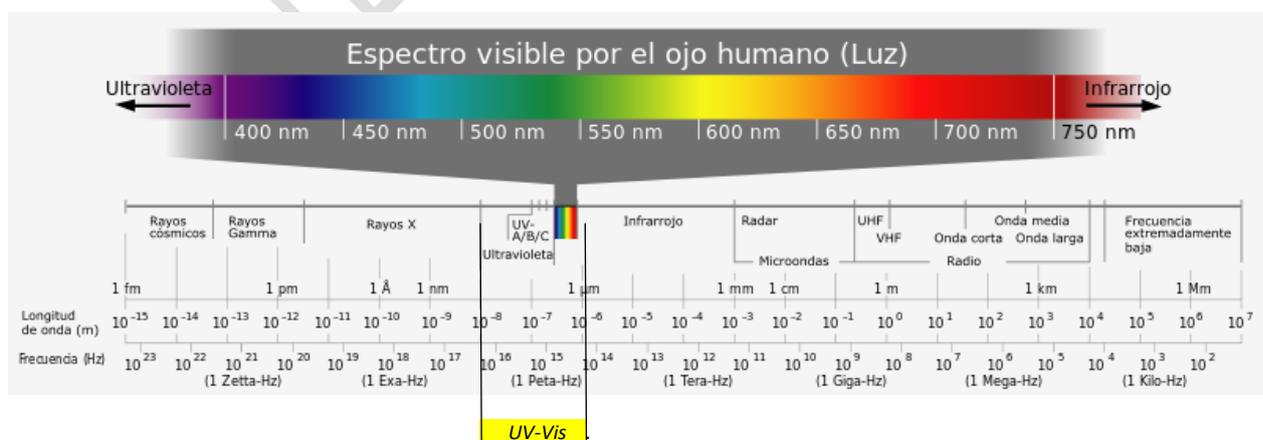
$$E = h \cdot \frac{c}{\lambda}$$

De donde se deduce que a menor longitud de onda, mayor energía tiene esa radiación.

## 2.3. EL ESPECTRO ELECTROMAGNÉTICO

El conjunto de REMs se llama espectro electromagnético y comprende un intervalo enorme de longitudes de onda y energías. Se puede dividir en regiones para poder conocer sus propiedades. En la figura se muestran las zonas del espectro según la clasificación más aceptada. Como se puede observar la zona del UV y la del visible (correspondiente a radiaciones percibidas por nuestro ojo) es muy pequeña en comparación con la gran amplitud del espectro EM.

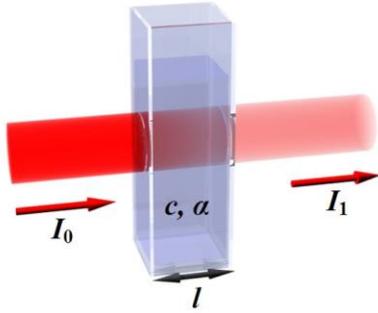
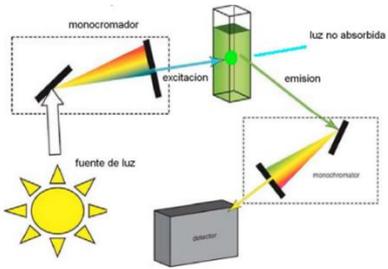
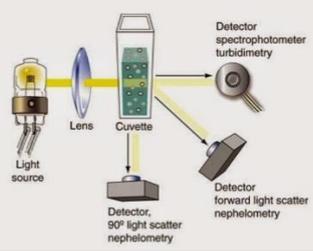
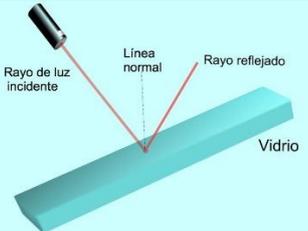
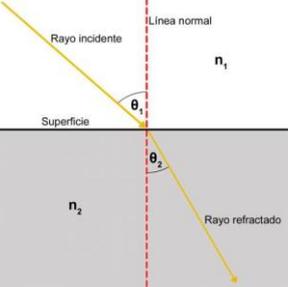
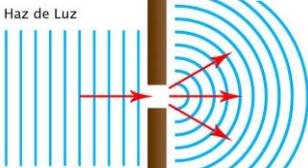
Cuando hablamos de una radiación determinada (de una única longitud de onda  $\lambda$ ), físicamente es imposible aislar dicha radiación del resto que la acompaña. Existen dispositivos que pueden filtrar la luz, pero no se puede obtener una luz monocromática al 100% (una radiación monocromática es prácticamente imposible de obtener), sino que con lo que habitualmente se trabaja es con un pequeño rango, haz o intervalo de radiaciones según la exactitud del dispositivo de selección (monocromadores o filtros), pero nunca una sola.

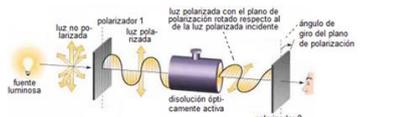


En el caso que nos ocupa, nos centraremos únicamente en la zona del ultravioleta, en adelante UV (190-350 nm) y visible (350-750 nm).

### 3. INTERACCIÓN DE LA RADIACIÓN ELECTROMAGENÉTICA CON LA MATERIA

Cuando la REM interacciona con la materia se pueden producir varios fenómenos dependiendo de su comportamiento posterior. En la tabla siguiente se describen alguno de dichos fenómenos aunque existen muchos más

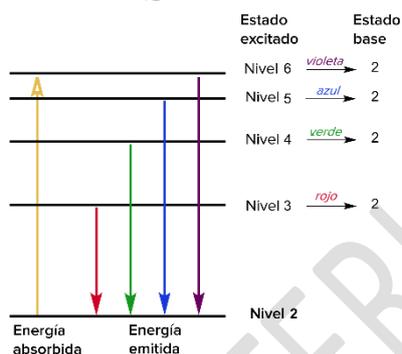
Fenómeno	Esquema	Efecto	Métodos instrumentales empleados Ej.
<b>Absorción</b>		La radiación ( $I_0$ ) incide sobre la muestra y parte se absorbe disminuyendo la intensidad de la radiación emitida ( $I_1$ )	Espectrofotometría y fotometría (rayos X, UV, luz visible, IR) Resonancia magnética nuclear
<b>Emisión</b>		La radiación incidente es absorbida produciéndose la emisión de radiación de distintas características que la incidente	Espectroscopia de emisión (rayos X, UV, luz visible, de electrones, de Auger) fluorescencia, fosforescencia y luminiscencia (rayos X, UV y luz visible)
<b>Dispersión</b>		La radiación incidente se dispersa en todos los ángulos como consecuencia de la interacción con la muestra o materia particulada presente	Turbidimetría; Nefelometría; Espectroscopia Raman
<b>Reflexión</b>		La radiación incidente se refleja	Espectroscopía infrarroja de reflexión-absorción (RAIRS)
<b>Refracción</b>		La radiación incidente se refracta	Refractometría Interferometría
<b>Difracción</b>		La radiación incidente interacciona con un objeto o rendija y el objeto difractante o rendija se convierte en una nueva fuente secundaria de propagación de la onda.	Métodos de rayos X Difracción electrónica

<p><b>Rotación</b></p>		<p>La radiación incidente polarizada cambia el plano de polarización al interactuar con la muestra.</p> <p>Polarimetría                  Dispersión óptica rotatoria                  Dicroísmo circular</p>
------------------------	---	--

En todas estos fenómenos no se produce modificación de la materia ya que se emplean radiaciones de “baja energía” como es la del rango espectral que nos ocupa; cosa que sí ocurre en otras como: Efecto fotoeléctrico (que arranca electrones de la corteza de átomos fácilmente ionizables = bajo potencial de ionización), Efecto Compton (que arranca electrones de capas inferiores de los átomos), reacciones fotonucleares (se arrancan protones del núcleo y se producen nuevos elementos), etc.

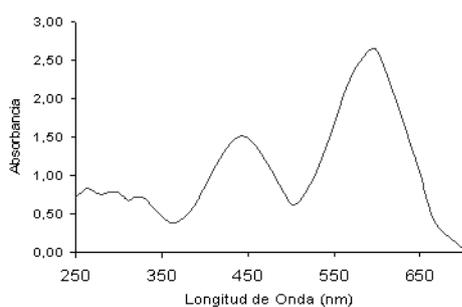
### 3.1. ABSORCIÓN DE RADIACIÓN

De todas las propiedades antes citadas, la absorción, es sin duda alguna la más ampliamente utilizada con fines analíticos en el laboratorio. Cuando un haz de luz atraviesa una molécula, ésta tiene la capacidad de absorber un fotón lo que genera que un electrón salte a un estado excitado de mayor inestabilidad, por lo que rápidamente vuelve a liberar esa energía “sobrante” (generalmente en forma de calor) y vuelve al estado inicial que es más estable.



El estado inicial se denomina **estado fundamental** y el estado más energético se llama **estado excitado**. La absorción de radiación produce el paso de electrones del estado fundamental al excitado (excitación). En el proceso contrario (relajación) se produce una liberación de energía. Esta energía liberada en la relajación puede ser en forma no radiante (es lo más habitual por ejemplo térmica, calentando el entorno).

Para estudiar la absorción de luz por parte de una sustancia, se hacen incidir sobre ella radiación electromagnética de un amplio rango de energía ( $\lambda$ ). Normalmente se estudia un rango de radiaciones y se va aumentando (o disminuyendo) la longitud de onda de las radiaciones incidentes desde un extremo del rango hasta el extremo opuesto (en el caso que nos ocupa, desde la zona UV al visible o viceversa). Así se obtiene un espectro de absorción de la sustancia, que se puede representar gráficamente como se muestra en la figura.



Cada uno de los picos/máximos del espectro corresponde, aproximadamente, a una transición energética de un enlace molecular, por lo tanto el espectro es único de cada molécula. Es como una “huella digital” de esa molécula donde quedan registrados todos los enlaces y sus transiciones correspondientes. Se podría pensar que a partir de un espectro de absorción de una molécula podríamos identificarla. El problema es más complicado de lo que parece. En realidad, la

espectroscopía de absorción UV-visible no sirve para identificar estructuras o moléculas, para esto se emplea la espectroscopía de absorción infrarroja. La utilidad real de la espectroscopía de absorción UV-visible es la cuantificación.

### 3.2. CUANTIFICACIÓN. LEY DE BEER (LAMBERT-BEER)

La importancia de la absorción de radiación electromagnética es que la cantidad de radiación absorbida por un analito presente en una disolución se puede relacionar cuantitativamente con su concentración, de modo que, si conocemos la cantidad de luz absorbida podremos calcular su concentración (→ mediante el calibrado).

Cuando se irradia una disolución de una sustancia, parte de la luz se absorbe, parte se refleja, parte se dispersa y parte traspasa la misma (o se transmite). Se define la **transmitancia (T)** como la fracción de radiación incidente transmitida (o no absorbida) por la disolución. Si la intensidad radiante que incide sobre la disolución es  $I_0$  y  $I$  la intensidad radiante que es transmitida, entonces:

$$T = \frac{I}{I_0}$$

Experimentalmente se observa que la intensidad de la energía transmitida ( $I$ ) disminuye geoméricamente (exponencialmente) con la concentración " $c$ " y con la distancia " $b$ " recorrida a través de la disolución (o paso de luz). Operando matemáticamente se obtiene finalmente la expresión de la Ley de Beer:

$$-\log T = a \cdot b \cdot c = A$$

donde " $a$ " es una constante llamada absorptividad e indica la absorción de cada analito por unidad de concentración y unidad de distancia (espesor de la muestra/cubeta) recorrida por el haz y " $A$ " es la absorbancia. Cuando se usan concentraciones molares (*moles/litro*) se usa la absorptividad molar ( $\epsilon$ ) y se expresa en  $L/mol \cdot cm$ . La absorptividad (normal o molar) es un valor constante característico de cada sustancia.

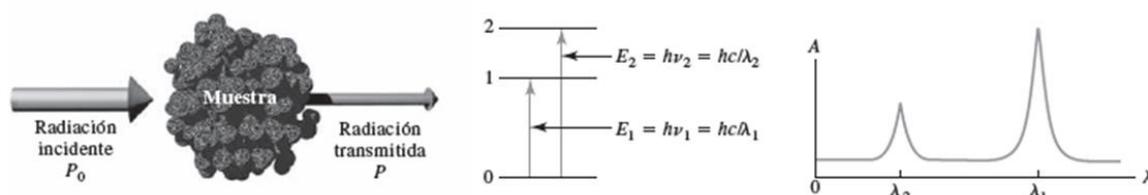
La Ley de Beer expresa la relación directa entre la absorbancia ( $A$ ) de un analito y su concentración en disolución. Se puede definir la absorbancia como una medida de la cantidad de luz absorbida por una disolución.

En la práctica esta ley no se cumple exactamente, existiendo zonas donde el comportamiento real se aparta del teórico (a concentraciones elevadas), debiendo trabajar siempre a concentraciones adecuadas, normalmente del orden de la partes por millón (ppm). Debe, además, construirse una recta de calibración para determinar la concentración de un analito a partir de las medidas de absorbancia. El procedimiento de la calibración se basa en medir la absorbancia de varias disoluciones patrón (de concentración conocida), en las mismas condiciones que se mide la absorbancia de la disolución problema. Con esos datos de absorbancia y concentración se construye una gráfica representando la absorbancia frente a la concentración. Con la ayuda de una calculadora, Excel, ..., se hace una regresión por mínimos cuadrados y se obtiene la ecuación de la recta de calibrado. De esta forma obtenemos una relación matemática entre la concentración y la absorbancia. Posteriormente,

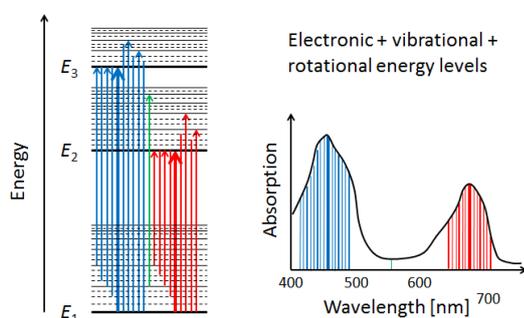
se puede medir la absorbancia de la muestra problema y mediante interpolación gráfica en la recta, o empleando la función de calibrado calcular la concentración del analito.

#### 4. BASES MOLECULARES DE LA ESPECTROFOTOMETRÍA DE ABSORCIÓN UV-VISIBLE

La espectrofotometría de absorción es una técnica molecular. Tal y como se ha descrito, las moléculas absorben generalmente radiación UV o visible en forma de una o más bandas de absorción. Como se observa en la figura siguiente, si la radiación incidente ( $I_0$  ó  $P_0$ ) posee una energía (una longitud de onda adecuada) puede producir el tránsito de electrones en las moléculas presentes en la muestra de un nivel elemental (0) a un excitado (1 o 2) generando picos/bandas de absorción que caracterizan el espectro de esta sustancia.



En este caso se dice que la muestra posee dos bandas o picos de absorción a  $\lambda_1$  y  $\lambda_2$ . Cualquier otra radiación que incida sobre la muestra de mayor o menor energía (que no sea exactamente igual la diferencia energética entre los niveles 1 o 2 involucrados) no produce absorción debido a que: a) no todos los niveles energéticos están permitidos en las moléculas (depende de la naturaleza intrínseca de la molécula considerada, de sus átomos constituyentes y su disposición) y, b) a que la energía esté cuantizada (constante de Planck  $E = h \cdot \nu = h \cdot c / \lambda$ ). Esto hace que la absorción solo se produzca irradiando con la energía correspondiente exactamente a la diferencia energética de los niveles implicados. Así pues se dice que a tal o cual energía (longitud de onda o frecuencia) la molécula absorbe y en caso contrario no. Cualquier otra radiación de mayor o menor energía no produce estos dos tránsitos electrónicos y por tanto la sustancia no posee más bandas de absorción. Los niveles energéticos no son tan simples como se ha indicado en la figura anterior.



Lo habitual es que conjuntamente con los niveles electrónicos (los considerados en este tema) se encuentran otros niveles debidos a otro tipo de transiciones energéticas posibles como los niveles vibracionales y rotacionales, lo cual hace que lo que inicialmente eran picos ahora sean "bandas" más anchas complicándose sensiblemente los espectros. (Véase la figura adyacente). La absorción se produce a varias longitudes de onda

que originan amplias bandas de absorción, por lo que no hay picos bien definidos sino bandas de absorción. Esto confiere poca selectividad a la técnica para identificación de especies, siendo más útil en análisis cuantitativo.

Los principales tipos de moléculas que experimentan el fenómeno de la absorción en el UV-Vis son:

- compuestos orgánicos con grupos no saturados (dobles y triples enlaces), donde hay electrones de enlace que pueden saltar a otros orbitales. En este grupo se incluyen la mayoría de las moléculas orgánicas que poseen anillo bencénico (benceno, naftaleno, etc.) Estos grupos funcionales que absorben en VIS o UV se llaman cromóforos.
- compuestos de coordinación (complejos) de metales de transición. Ej. Fe (SCN)<sup>2-</sup> rojo intenso.
- iones de metales de transición, de lantánidos y de actínidos. Ej. color azul de la disolución de Cu<sup>2+</sup>.

En la tabla siguiente se muestran los máximos de absorción de algunas de estas sustancias:

Compuesto		$\lambda_{\text{máx}}$ , nm	$\epsilon_{\text{máx}}$
Benceno	C <sub>6</sub> H <sub>6</sub>	204	7900
Tolueno	C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> CH <sub>3</sub>	207	7000
<i>m</i> -Xileno	C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> (CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	—	—
Clorobenceno	C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> Cl	210	7600
Fenol	C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> OH	211	6200
Ion fenolato	C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> O <sup>-</sup>	235	9400
Anilina	C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> NH <sub>2</sub>	230	8600
Ion anilinio	C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> NH <sub>3</sub> <sup>+</sup>	203	7500
Tiofenol	C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> SH	236	10 000
Naftaleno	C <sub>10</sub> H <sub>8</sub>	286	9300
Estireno	C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> CH=CH <sub>2</sub>	244	12 000

Cuando la especie química a medir absorbe en el visible (la disolución tiene color) la técnica se llama vulgarmente colorimetría. Y los aparatos utilizados se llaman colorímetros. También se comercializan kits de análisis rápidos que tienen unas tablas de referencia de comparación de colores (o disoluciones preparadas y de color estable). La disolución problema se mezcla con los reactivos adecuados en un pequeño tubo de ensayo y se compara con la tabla de colores de referencia. En esta tabla está asignada la concentración de analito que corresponde a cada color, con lo cual se puede determinar, de forma semicuantitativa, la concentración en la muestra problema. Este método no tiene una gran exactitud pero en muchas aplicaciones es suficiente (ej. cloro en piscinas, nitratos en aguas de embalses, etc. Un ejemplo más de esto es la lectura de pH mediante tiras reactivas). En muchos casos la especie estudiada no absorbe en el UV-Visible, pero sí lo hace un complejo formado con otro compuesto. Por ej. el ion fosfato no absorbe en el VIS, pero forma un complejo con el ion molibdato y el vanadato (fosfomolibdovanadato) que tiene una gran intensidad de absorción a 430 nm (azul), y se emplea para análisis de fósforo en aguas, suelos, etc. En estos casos la determinación espectrofotométrica es indirecta, ya que previamente se hace reaccionar la muestra con unos

reactivos adecuados (reacción colorimétrica) y posteriormente se mide la absorbancia de la mezcla.

Ventajas de la espectrofotometría:

- gran aplicabilidad, ya que hay muchas especies absorbentes y posibilidades de formar complejos con las que no lo son.
- elevada sensibilidad, se pueden determinar concentraciones hasta  $10^{-5}$  M (moles/litro).
- selectividad media
- permite automatización del proceso, se usa en sistemas de análisis en continuo.
- sistema no destructivo en medidas directas debido a que aprovecha las propiedades intrínsecas de los analitos.

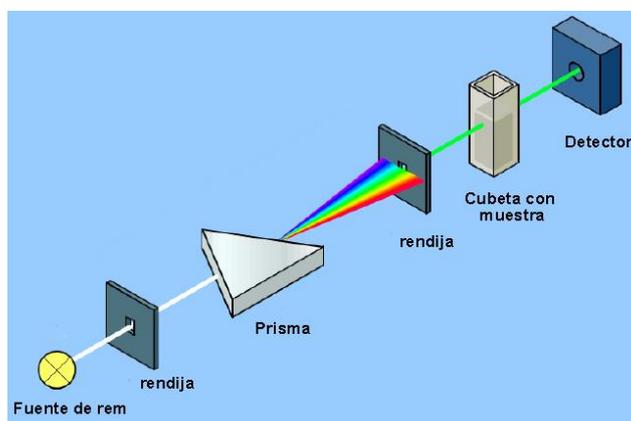
Como principal desventaja de la técnica está la posible interacción de partículas que interfieran el paso de luz. Por ello, las disoluciones han de estar exentas de sólidos en suspensión.

## 5. INSTRUMENTACIÓN EN ESPECTROSCOPIA UV-Vis

La mayoría de los instrumentos espectroscópicos constan de cinco componentes:

- A. Una fuente estable de energía radiante que se hará incidir sobre la muestra.
- B. Un selector de longitudes de onda que permita el aislamiento de una región reducida de longitudes de onda que posteriormente se hace incidir sobre la muestra.
- C. Uno o dos recipientes con la muestra. Si hay dos uno de ellos se utilizará para el blanco)
- D. Un detector de radiación que convierte la energía radiante en una señal eléctrica medible.
- E. Un transductor de señal y posterior procesador que genere un dato numérico (absorbancia)

En la figura siguiente podemos observar los componentes de un instrumento espectroscópico y su disposición.



## 5.1. FUENTE

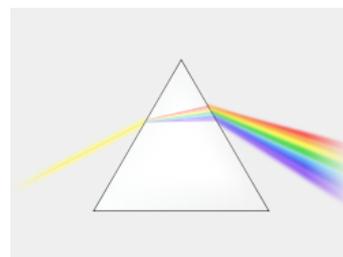
Fuente: es el dispositivo emisor de radiación electromagnética esto es, una lámpara. Las espectroscopías de absorción y de fluorescencia requieren una fuente de radiación externa de una intensidad constante y suficientemente intensa para facilitar la detección y medida. Generalmente emite una banda muy amplia de radiaciones continuas que cubre todo el espectro deseado. Para cada zona del espectro UV-Vis-IR hay un tipo de lámpara específica que ofrece radiación homogénea:

- Visible: lámparas de filamento de wolframio (o tungsteno) incandescente. Son similares a las bombillas de luz amarilla comunes hasta hace poco en los hogares.
- Ultravioleta: lámpara de hidrógeno o de descarga de deuterio. A veces están refrigerados con agua para disipar el elevado calor que producen.
- Fluorescencia: lámpara de Xenón.
- Infrarrojos: fuentes especiales de óxidos de tierras raras (disprobio, holmio, erbio) o carburos (de silicio). Estos emiten radiación en IR (1,5 a 2,0  $\mu\text{m}$ ) a elevadas temperaturas (1000-2000°C).

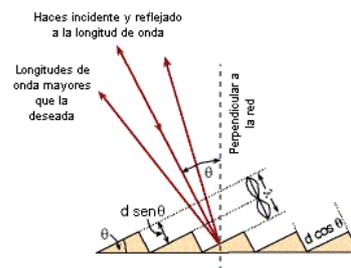
## 5.2. SELECTOR DE RADIACIÓN O DE LONGITUD DE ONDA

De toda la radiación que emite la lámpara mediante este dispositivo se selecciona la radiación de la energía deseada ( $\lambda$ ). Su objetivo es controlar la pureza de la radiación seleccionada consiguiendo el menor ancho de banda. Existen dos tipos de selectores de longitud de onda:

- FILTROS: Se trata de cristales tintados que al incidir la luz “blanca” (de todos los colores) absorben todas las radiaciones excepto una banda de luz monocromática (similares a los cristales de unas gafas de sol). Es necesario cambiar el filtro para poder seleccionar otra longitud de onda deseada.
- MONOCROMADORES: es un sistema que consta de un conjunto de lentes, espejos y rendijas para dispersar, separar, enfocar y restringir la radiación no deseada. Los monocromadores más comunes son:
  - PRISMA: producen una refracción de la luz, siendo el ángulo de refracción mayor cuanto menor es la longitud de onda de la radiación. Después del prisma hay una rendija por donde se selecciona la radiación deseada. Según el tipo de radiaciones se usan prismas de vidrio (VIS), cuarzo o sílice (UV) y cristales de cloruro sódico (NaCl) para IR.



- RED DE DIFRACCION: Es una lámina metálica (de aluminio generalmente) altamente pulida sobre la que se han hecho una gran cantidad de estrías (líneas paralelas). Estas estrías actúan como centros de dispersión de todas las radiaciones incidentes.



Cuando sobre una sustancia se hace incidir radiación previamente seleccionada en orden creciente (o decreciente) de energía ( $\lambda$ ) y se registra la absorbancia generada a cada longitud de onda se obtiene su espectro característico de absorción. Un espectro de absorción es un registro de la intensidad de la absorción por una muestra en función de la longitud de onda (o frecuencia) de la radiación incidente. Un espectro de absorción muestra que longitudes de onda son absorbidas por la molécula en estudio.

### 5.3. RECIPIENTE DE MUESTRA

Son cubetas que establecen el “paso de luz” donde se coloca la muestra a analizar (generalmente líquida). Varían mucho según la técnica a utilizar, pero como característica común deben ser transparentes en la región de longitud de onda que se va a medir:

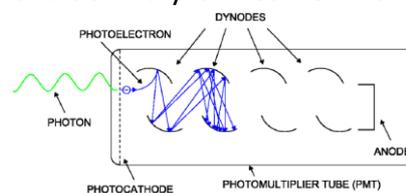
- Visible: se usan cubetas cuadradas de vidrio de, generalmente, 1 cm de lado.
- UV: se usan cubetas cuadradas de cuarzo de, generalmente, 1 cm de lado ya que el vidrio no es transparente a la radiación UV y la absorbería impidiendo que llegara a la muestra
- Infrarrojo: cubetas de cloruro sódico (NaCl) o cloruro de plata (AgCl).

Recordar que la absorbancia depende de la longitud del paso de luz por la muestra (cubeta); de tal forma que al aumentar la longitud aumenta la absorbancia y consecuentemente a mayor longitud mayor sensibilidad se puede conseguir. Se puede emplear cubetas de otros espesores distintos 5 cm, 5 mm etc. dependiendo de la sensibilidad requerida. En espectroscopía UV-Vis las cubetas de cuarzo son deben serlo solo en dos de sus caras enfrentadas que son por las que debe pasar el haz de luz

### 5.4. DETECTOR

Un detector (ó transductor) es un dispositivo que produce una señal eléctrica cuando recibe un fotón. Esta señal eléctrica luego es convertida en unidades de intensidad radiante transmitida o absorbida. Existen varios tipos de detectores, cuyo uso depende de la región de longitud de onda en la que se trabaja:

- FOTOTUBO o TUBO FOTOMULTIPLICADOR: para la zona del VIS y UV. Con el mismo principio de funcionamiento que la célula fotoeléctrica. Al golpear un fotón en el cátodo (cargado negativamente), este emite un electrón que se dirige hacia el ánodo (cargado negativamente) que arranca nuevos electrones



que se dirigen hacia el siguiente ánodo y así sucesivamente; ello provoca una corriente eléctrica que es medida por un voltímetro. Al final la intensidad de la corriente eléctrica generada dependerá del nº de fotones que llegaran inicialmente. Esta intensidad de corriente se transforma en un número.

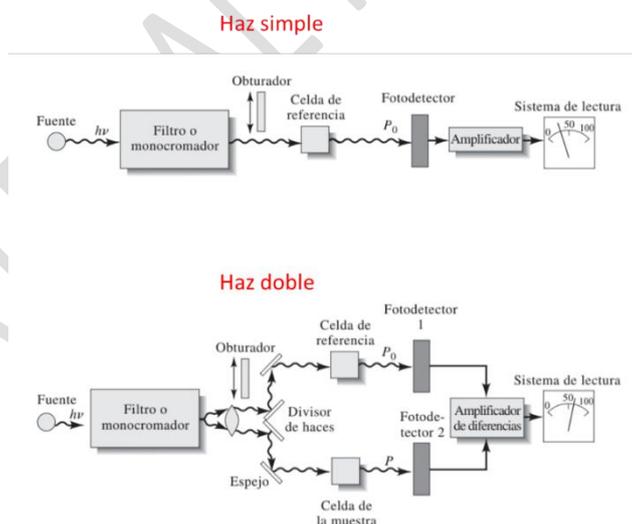
- FOTODIODO ARRAY (o detector de diodos en fila): sobre un semiconductor se fabrican diodos en serie, unos junto a otros, de manera que al incidir sobre él una radiación difractada, se puede tener una señal instantánea para un amplio rango de longitud de onda de forma simultánea, permitiendo así una espectroscopía muy rápida.

## 5.5. PROCESADOR Y TRANSDUCTOR DE SEÑAL

En los instrumentos más antiguos la señal se mostraba en un medidor de aguja que tenía una escala en unidades de transmitancia y de absorbancia. Los instrumentos más modernos tienen un display digital, en el que aparece el valor numérico de absorbancia o el valor de concentración cuando puede realizar automáticamente los cálculos a partir de una función de calibrado.

## 5.6. EQUIPOS DE HAZ SIMPLE Y HAZ DOBLE.

En los instrumentos de doble haz la luz proveniente de la fuente es dividida en dos haces después de salir del monocromador mediante un sistema de espejos divisores (Figura). Esta



división produce dos haces de luz, uno de ellos se dirige a la celda de referencia, que contiene el blanco, y el otro haz se dirige hacia la celda de muestra. Los dos haces de luz después de atravesar la celda de referencia y la de muestra llegan a detectores separados para obtener la señal correspondiente como diferencia entre el haz de luz de la muestra y el del blanco o referencia. Los sistemas de doble haz tienen la ventaja de que cualquier variación en la intensidad de la fuente, la eficiencia de la red, la reflectividad de los espejos, la fotosensibilidad del detector, etc., afecta simultáneamente a los dos haces. En consecuencia,

la relación de energía de los dos haces permanece siempre constante.

## 5.7. LECTORES DE PLACAS MICROTITTER

Un lector de placa habitualmente utilizado como analizador de ELISA es un espectrofotómetro especializado. A diferencia de los espectrofotómetros convencionales que permiten efectuar lecturas en un rango amplio de longitudes de onda, este dispone de filtros o rejillas de difracción que limitan el rango de longitudes de onda a aquellas que se utilizan en la técnica ELISA, la cual generalmente se realiza con longitudes de onda comprendidas entre los 400 y los 750 nm –nanómetros–.

Algunos analizadores operan en el rango ultra-violeta y pueden efectuar análisis entre los 340 y los 700 nm. El sistema óptico utilizado por muchos fabricantes utiliza la fibra óptica para llevar la luz hasta los pozos de la placa, donde se encuentra la muestra bajo análisis. El haz de luz que atraviesa la muestra tiene un diámetro que varía entre 1 y 3 mm. Un sistema de detección recibe la energía lumínica, proveniente de la muestra, la amplifica, determina la absorbancia y, la convierte en datos que permiten interpretar el resultado de la prueba. También hay analizadores de ELISA que emplean sistemas lumínicos de doble haz. Las muestras del ensayo de ELISA se colocan en placas de diseño especial, las cuales disponen de un número definido de pozos o vasos, en los cuales se lleva a cabo el procedimiento o ensayo. Son comunes las placas de 8 columnas por 12 filas, con un total de 96 pocillos.

## 6. METODOLOGÍA DE TRABAJO EN ESPECTROSCOPIA UV-VIS

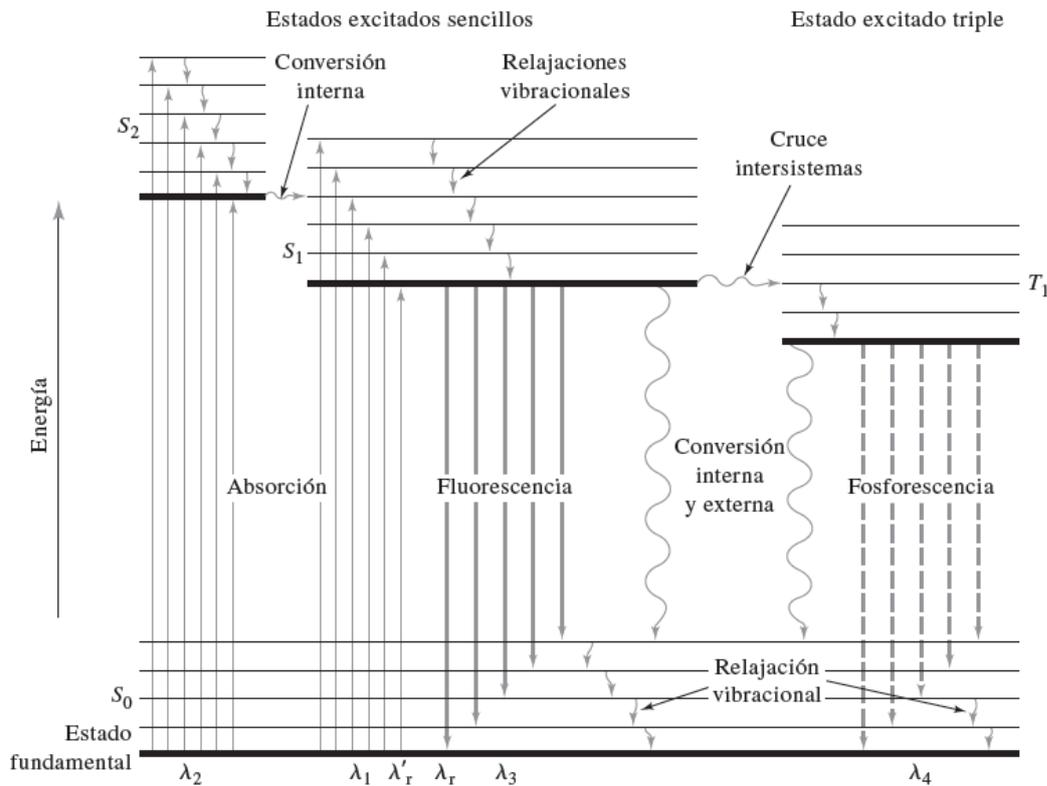
Análisis cualitativos: es decir, determinar la presencia de determinados grupos funcionales en las muestras. La presencia de absorción en UV puede ser indicativa de la presencia de dobles enlaces conjugados. Algo similar ocurre en el visible una coloración determinada puede indicar la presencia de alguna sustancia (por ej. coloración azulada puede indicar presencia de  $\text{Cu}^{2+}$ , amarillo-verdosa de Fe, etc. en aguas El poder resolutivo de la técnica en sí es limitado y puede informar de la presencia de algunos compuestos. Más aplicación tiene como sistema de detección en cromatografía líquida donde la obtención del espectro de una sustancia (pico) y posterior comparación con librerías puede evidenciar su presencia. En este punto es una herramienta potente.

Análisis cuantitativo: determinar las cantidades de ciertas sustancias. Requiere previamente la obtención del espectro de la sustancia de interés para fijar (conocer) las longitudes de onda de los máximos de absorción y posteriormente realizar el análisis cuantitativo por interpolación mediante calibrado obtenido por diluciones de patrones de la sustancia de interés.

## 7. ESPECTROSCOPIA DE FLUORESCENCIA MOLECULAR

Hasta ahora en la espectroscopía de absorción hemos visto que la radiación una vez que incide sobre la muestra (molécula) parte de ella se invierte en producir los tránsitos electrónicos adecuados y una parte de ella atraviesa la muestra sin más. La relación entre la “cantidad”

incidente y la transmitida nos da una idea de la “absorción” producida. Posteriormente los electrones excitados regresan a su estado fundamental (relajación) desprendiendo la energía que se les administró para su excitación en forma principalmente de calor.

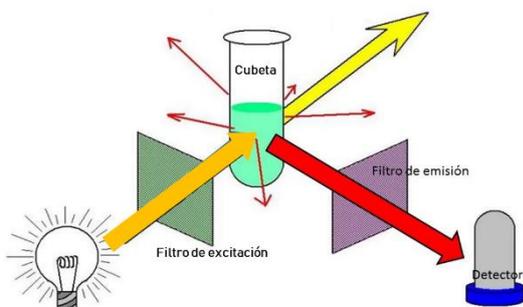


En ocasiones el proceso de relajación no conduce a los electrones al nivel fundamental directamente sino a un estado intermedio de menor energía desde el que sí regresan ahora al estado fundamental pero desprendiendo energía en forma de radiación que no es de la misma magnitud ( $\lambda$  ó  $\nu$ ) que la absorbida.

En la figura anterior se esquematiza desde el punto de vista de los niveles energéticos implicados los fenómenos de absorción, fluorescencia y fosforescencia. En la fluorescencia una vez excitados los electrones a niveles superiores de energía como consecuencia de la irradiación sufrida (excitación), éstos no regresan al estado fundamental emitiendo energía térmica sino que antes pasan por un estado excitado intermedio ( $S_1$ ) desde el que ahora sí regresan al estado fundamental pero emitiendo energía radiante (no térmica) obviamente de mayor longitud de onda (menor energía).

El fenómeno de la fluorescencia se produce en un intervalo de tiempo muy pequeño después de la absorción (o excitación) de unos  $10^{-5}$  segundos a diferencia de la fosforescencia que puede durar minutos y horas ya que en la fosforescencia están implicados fenómenos de cambio del spin del electrón. En el caso de la fosforescencia se presenta cuando una molécula excitada se relaja hasta llegar a un estado electrónico excitado metaestable, que se denomina estado triplete, el cual tiene un promedio de vida mayor de  $10^{-5}$  segundos.

La fluorescencia y la fosforescencia se parecen en que la excitación se consigue mediante la absorción de fotones. Como consecuencia, se alude a menudo a los dos fenómenos con el término más general de fotoluminiscencia. Uno de los aspectos más interesantes de los métodos luminiscentes es su inherente sensibilidad, con límites de detección que son casi siempre de uno a tres órdenes de magnitud inferiores a los encontrados en la espectroscopía por absorción.

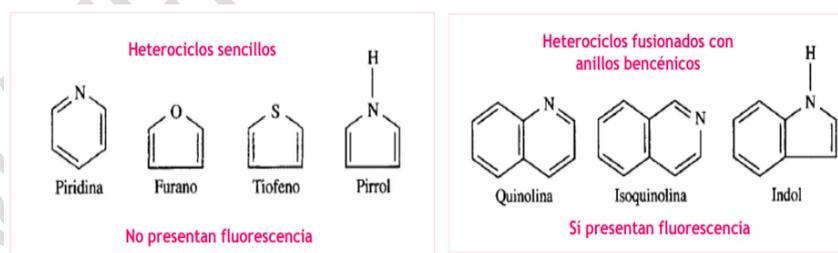


La fluorescencia y la fosforescencia se observan con más facilidad a un ángulo de 90° respecto al haz de excitación ya que de esta forma al detector solo llega la radiación fluorescente “emitida” sin interferencia de la radiación incidente no absorbida empleada en la excitación. Si el detector estuviera en línea con la cubeta y la lámpara como en el caso de la espectroscopía UV-Vis al detector

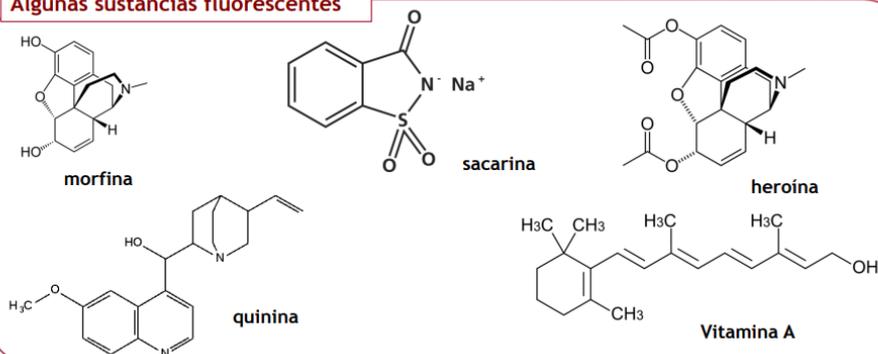
llegaría junto con la radiación fluorescente emitida el excedente de la radiación excitante no absorbida.

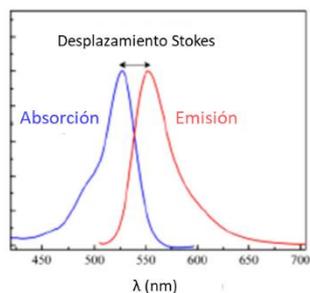
## 7.1. ESPECIES FLUORESCENTES

Todas las moléculas absorbentes en UV serían potencialmente fluorescentes. Sin embargo, no lo son porque su estructura permite para los electrones excitados caminos de relajación no radiante (térmicos). En general, los compuestos que poseen elevada conjugación (dobles enlaces “=” alternados) como los compuestos aromáticos o mejor varios anillos aromáticos en su estructura son los que presentan una mayor fluorescencia molecular. Además cuanto más rígida es la molécula como consecuencia de enlaces adicionales “puente”, más se favorece el proceso de fluorescencia (ej. quinina, morfina, heroína).



### Algunas sustancias fluorescentes





Aquellas sustancias que son fluorescentes presentan pues dos tipos de espectros: uno de excitación (que es el mismo de absorción) y otro de emisión fluorescente. El espectro de emisión fluorescente se encuentra desplazado respecto del de absorción a longitudes de onda superiores (menor energía) lo que se conoce como *desplazamiento de Stokes*.

## 7.2. CUANTIFICACIÓN. INFLUENCIA DE LA CONCENTRACIÓN EN LA INTENSIDAD DE FLUORESCENCIA

En el fenómeno de la fluorescencia ocurre algo similar a lo descrito para el fenómeno de absorción: la intensidad de la fluorescencia de un compuesto es proporcional a la concentración del mismo mediante la siguiente expresión:

$$F = K \cdot c$$

Donde "K" es una constante característica de cada sustancia fluorescente. Al igual que pasaba con la Ley de Beer para la absorción, en fluorescencia también hay desviaciones de la ecuación anterior. Para solventar estas desviaciones es necesario trabajar siempre a concentraciones del orden de las partes por billón (ppb), esto es 2 o 3 órdenes de magnitud inferiores a las de la espectrofotometría UV-Vis.

La metodología de trabajo es similar y se requiere de la preparación de un calibrado previo empleando patrones de concentración conocida con los que obtener una función de calibrado y así posteriormente mediante interpolación realizar la cuantificación de muestras desconocidas.

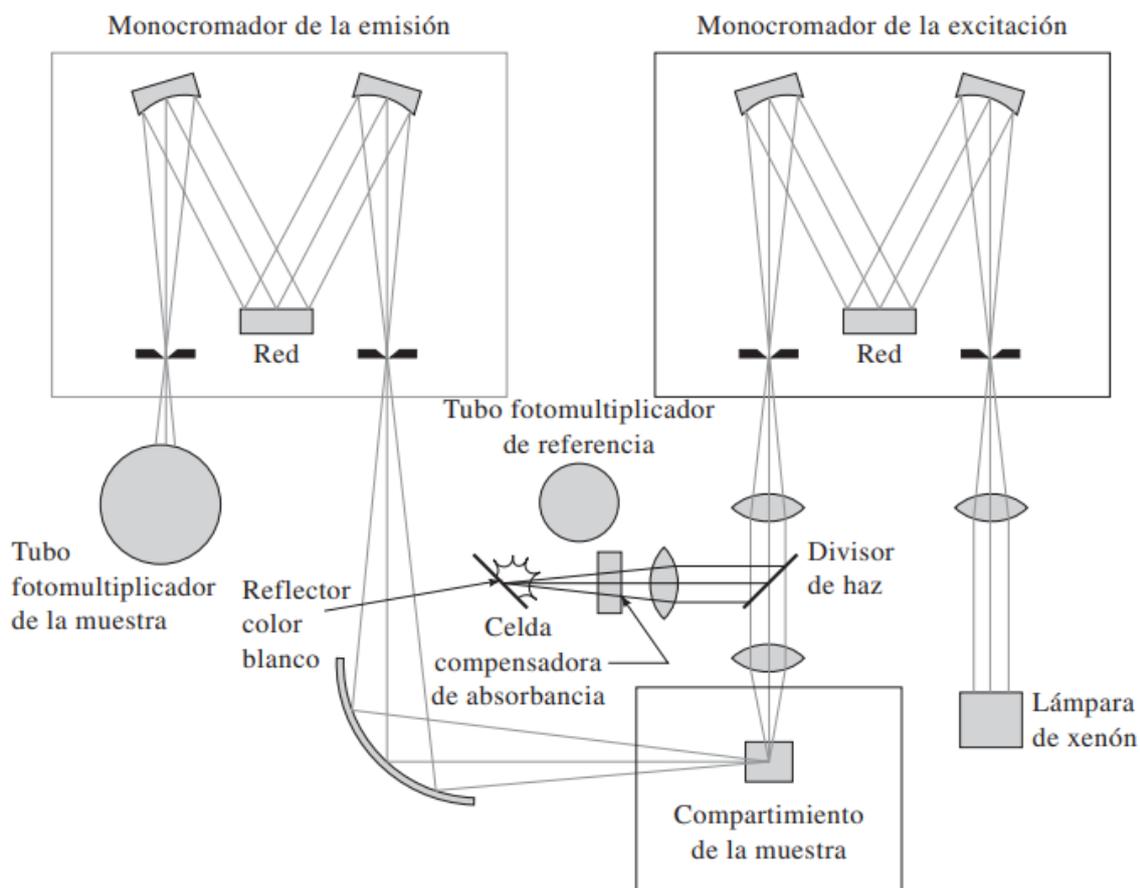
## 7.3. INSTRUMENTACIÓN EN FLUORESCENCIA

En la figura siguiente se esquematiza un espectrofluorímetro de doble haz.

Los componentes son básicamente los mismos descritos para espectroscopía UV-Vis. Sin embargo el equipo es algo más complejo. Brevemente consta: (El flujo de radiación en la figura va de derecha a izquierda)

1. Una fuente de radiación: lámpara de Xenón que emite un amplio haz de radiación 200-1000nm
2. Un monocromador de excitación que permite seleccionar mediante una red de difracción (o también podría ser un prisma) la longitud de onda de excitación
3. Un divisor del haz (splitter) que consta de un sistema de espejos divisores que permiten dirigir el haz de radiación alternativamente (milisegundos) a la cubeta de muestra o a la cubeta compensadora de absorbancia que contiene la referencia o blanco.
4. Uno o dos compartimento de muestra con una cubeta que en el caso de fluorescencia debe ser de cuarzo las cuatro caras.

5. Un monocromador de emisión con el que seleccionar la longitud de onda de medida de la fluorescencia generada.
6. Un detector y tubo fotomultiplicador que transforme la radiación fluorescente (UV) generada en una corriente eléctrica proporcional.



Las diferencias esenciales entre un espectrofotómetro UV-Vis y un espectrofluorímetro son que éste último:

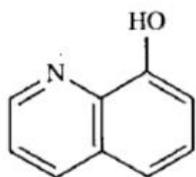
- a) dispone de dos monocromadores para seleccionar en cada caso la longitud de onda de los máximos de excitación y emisión.
- b) la cubeta debe ser de cuarzo en dos caras perpendiculares de las cuatro disponibles (o las cuatro lo que es más habitual), por una de ellas incide la radiación de excitación y por la perpendicular sale la fluorescencia emitida

#### 7.4. APLICACIONES

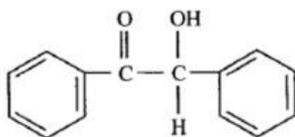
El fenómeno de la fluorescencia permite disponer de una técnica muy sensible (de uno a tres órdenes de magnitud mayor que la espectroscopía de absorción, obteniéndose límites de detección inferiores) y selectiva (ya que no todas las moléculas son fluorescentes).

Tiene una gran aplicabilidad en la cuantificación de moléculas orgánicas en productos alimenticios, farmacéuticos, clínicos y naturales. Al igual que en espectroscopía de absorción, pueden analizarse especies que no son fluorescentes (como es el caso de las moléculas

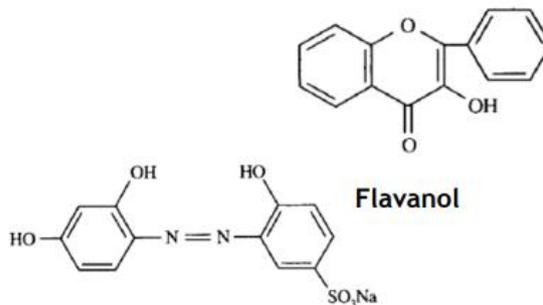
inorgánicas) mediante su reacción con otras que sí lo son llamadas fluorógenos como benzoína, 8-hidroxiquinoleína, rojo de alizarina, flavanol, etc.; su mayor aplicación es en el análisis de moléculas orgánicas (como los fármacos) o bioquímicas (adenina, cisteína, guanidina, proteínas, triptófano,...).



8-hidroxiquinoleína



Benzoína



Rojo de Alizarina R

Las aplicaciones de ambas técnicas (espectrofotometría y fluorescencia) en cualquier laboratorio son inmediatas. A continuación se describen, de forma muy resumida, algunos ejemplos de aplicación a los laboratorios de sanidad animal.

## 8. APLICACIONES DE LA ESPECTROSCOPIA UV-VIS y FLUORESCENCIA. APLICACIONES EN LABORATORIOS DE SANIDAD Y GENÉTICA ANIMAL.

La espectrofotometría UV/Vis o la fluorescencia pueden utilizarse como sistema de detección en Cromatografía Líquida de Alta Resolución (CLAR); bien para el análisis de compuestos orgánicos que absorben luz UV-Vis o que muestran fluorescencia; o bien para aquellos que previa derivatización con el agente adecuado les aporta absorción UV-Vis o mediante un fluorógeno que les confiere fluorescencia. Para resultados precisos, la respuesta del instrumento al analito debe compararse con la respuesta a un estándar, lo que conlleva el uso de curvas de calibración. La respuesta (por ejemplo, el área/altura de pico) para una concentración particular se conoce como factor de respuesta.

### 8.1. ESPECTROFOTOMETRÍA

- a) Cuantificación de proteínas. Existen múltiples ocasiones en laboratorios de sanidad en las que conocer el contenido de proteína es de interés, por ejemplo en la contrastación laboratorial de vacunas como la perineumonía. La cuantificación de proteína es una de las más amplias aplicaciones de la espectrofotometría UV-Vis. Estos métodos son muy inespecíficos ya que casi todas las proteínas reaccionan por igual con los diferentes reactivos descritos por lo que si la muestra contiene varias proteínas todas son determinadas conjuntamente. A ello se une la dificultad de encontrar patrones puros de la proteína de interés por lo que habitualmente se emplea un patrón común en todos ellos como la albúmina de suero bovino (BSA). Son por tanto métodos semicuantitativos que permiten tener una idea del orden de magnitud del contenido en proteína de la muestra.

Muchos de estos métodos se basan en: a) la propiedad intrínseca de las proteínas para absorber luz en el UV, b) la formación de derivados químicos, o c) la capacidad que tienen las proteínas de unir (adsorber) ciertos colorantes.

- I. Absorbancia a 280 nm: La mayoría de las proteínas absorben a 280 nm. Es un método rápido y sencillo pero tiene la desventaja es que la muestra debe estar pura, ya que otras proteínas distintas de las de interés y moléculas no-proteicas como el DNA, también absorben a esa longitud de onda.
- II. Ensayos colorimétricos: Los ensayos colorimétricos involucran la adición de una sustancia química que es capaz de reaccionar con determinados residuos aminoacídicos. El resultado de estas reacciones es el cambio de color en la solución, que es cuantificado mediante una medida de absorbancia. En general, estos métodos son más sensibles que la cuantificación por absorbancia directa a 280 nm. Se suele utilizar albúmina sérica bovina (BSA bovine seric albumin) como patrón para obtener la función de calibrado. Los ensayos colorimétricos más utilizados son:
  - ENSAYO DE BRADFORD (595nm): Se basa en la unión de un colorante, *Comassie Blue G-250* (también *Serva Blue*) a las proteínas. El colorante, en solución ácida, existe en dos formas una azul y otra naranja. Las proteínas se unen a la forma azul para formar un complejo proteína-colorante con un coeficiente de extinción mayor que el colorante libre. Este método es sensible (1-15 µg), simple, rápido, barato y con pocas interferencias. La desventaja es que es altamente sensible a detergentes y lípidos.
  - ENSAYO DE LOWRY (750 nm): se trata de una reacción redox en presencia de iones  $\text{Cu}^{2+}$  de los enlaces peptídicos de los aminoácidos Tyr, Trp y Cys. Es rápido, sencillo y relativamente sensible.
  - ENSAYO BCA (Ácido bicinonínico) (562nm): El ácido bicinonínico es un compuesto capaz de formar un complejo púrpura intenso con iones  $\text{Cu}^{1+}$  en medio alcalino. Este reactivo forma la base de un método analítico capaz de monitorizar el ion cuproso producido en una reacción entre las proteínas con  $\text{Cu}^{2+}$  en medio alcalino (reacción de Biuret). La proteína presente en la muestra reduce el  $\text{Cu}^{2+}$  a  $\text{Cu}^{+}$  que forma un complejo altamente coloreado con BCA. Es más sensible que Lowry. Los complejos coloreados son muy estables. Aunque es altamente susceptible a interferencias, no interfiere con detergentes y lípidos.
  - MÉTODO DE BIURET: Se basa en la formación de un complejo coloreado entre el  $\text{Cu}^{2+}$  y los grupos NH de los enlaces peptídicos en medio básico dando un color purpúreo que se cuantifica espectrofotométricamente (540 nm). Como estándar se utiliza una solución de albúmina.  
 $\text{Proteína} + \text{Cu}^{2+} \rightarrow \text{Complejo Cu-Proteína (púrpura)}$

La intensidad de coloración es directamente proporcional a la cantidad de proteínas (enlaces peptídicos) y la reacción es bastante específica, de manera que pocas sustancias interfieren. La sensibilidad del método es muy baja y sólo se recomienda para la cuantificación de proteínas en preparados muy concentrados (por ejemplo en suero).

- b) Elisa: (acrónimo del inglés Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay: “ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas”) es una técnica de inmunoensayo en la cual un antígeno inmovilizado se detecta mediante un anticuerpo enlazado a una enzima capaz de generar un producto detectable, como cambio de color (espectrofotometría) o fluorescencia. Se usa en muchos laboratorios para determinar si un anticuerpo particular está presente en un suero.
- c) Cuantificación de ADN: uno de los métodos más utilizados para la cuantificación del ADN es el análisis de la absorción UV, ya que los nucleótidos poseen máximos de absorción alrededor de 260 nm (por ejemplo, dATP: 259 nm; dCTP: 272 nm; dTTP: 247 nm). Este método proporciona una estimación simple y precisa de la concentración de una muestra, pero sólo si ésta se encuentra pura, sin contaminación significativa de proteínas o solventes orgánicos que absorban a longitudes de onda cercanas. Para evaluar la pureza de la muestra debe determinarse la proporción  $\text{Abs}_{260 \text{ nm}}/\text{Abs}_{280 \text{ nm}}$ . Si la relación es mayor a 1,6 puede estimarse que la muestra es lo bastante pura para confiar en la cuantificación espectrofotométrica.
- d) Determinación de ADN y proteínas mediante electroforesis en gel: cuando se ha completado la electroforesis y producida la separación; los componentes de una muestra pueden ser visualizados (“revelados”) mediante la adición de un colorante específico para hacerlas visibles. Se emplean compuestos como el bromuro de etidio, para los ácidos nucleicos, o tinciones como de plata (las proteínas se visualizan en color negro) o Azul Coomassie para proteínas. La intensidad de la fluorescencia o coloración adquirida es proporcional al contenido de la muestra.
- e) Proteómica: Al igual que con el ADN, las proteínas absorben la luz ultravioleta a una longitud de onda específica, lo que permite la medición directa usando un espectrofotómetro. Se puede distinguir así productos transgénicos.

## 8.2. FLUORESCENCIA

- a) Análisis de residuos de medicamentos veterinarios. Algunos medicamentos veterinarios son fluorescentes, y se pueden analizar de forma muy selectiva mediante fluorescencia. Es el caso de las avermectinas (es un grupo de moléculas con propiedades antihelmínticas) que si bien no son fluorescentes “per se” pueden adquirir esta propiedad mediante una reacción de derivatización previa. Son determinadas por cromatografía líquida con detección por fluorescencia.

- b) Cuantificación de anticuerpos frente a las especies lisas del género *Brucella* (*Brucella abortus*, *Brucella melitensis* y *Brucella suis*) por la técnica de polarización fluorescente (FPA). La técnica de Fluorescencia Polarizada en microplaca (FPAm) es un ensayo basado en la tecnología de fluorescencia polarizada, y diseñado para determinar la presencia de anticuerpos anti brucelares en el suero de bovinos, ovinos y caprinos. La presencia de anticuerpos es indicadora de infección o de una vacunación. El antígeno marcado y los anticuerpos (suero positivo) incubados en solución se unirán en una molécula de mayor tamaño y peso molecular, y esto se traduce en una mayor capacidad de emisión de luz. Cuando no hay anticuerpos presentes (suero negativo), no hay cambio en el tamaño y peso molecular, entonces la molécula gira más deprisa dando lugar a una menor emisión de luz polarizada.
- c) Detección molecular del Complejo *Mycobacterium tuberculosis* (MTB) mediante PCR Real Time. La PCR cuantitativa (o PCR en tiempo real) se realiza en un termociclador con capacidad de hacer incidir sobre cada muestra un haz de luz de una longitud de onda determinada y de detectar continuamente la fluorescencia emitida por el fluorocromo excitado.
- d) Técnicas de inmunofluorescencia: Detección e identificación molecular de *Mycobacterium avium* subespecie paratuberculosis (MAP), agente causal de la Paratuberculosis, mediante PCR a tiempo real.
- e) Secuenciación de ADN: la secuenciación del ADN es un conjunto de métodos y técnicas bioquímicas cuya finalidad es la determinación del orden de los nucleótidos (A, C, G y T) en un oligonucleótido de ADN. Una de esas técnicas es la de secuenciación por terminador fluorescente. En una secuenciación por terminador fluorescente se marcan cada uno de los cuatro di-desoxinucleótidos que terminan la cadena con un colorante fluorescente generando fluorescencias a diferentes longitudes de onda dependiendo del nucleótido existente al final de la cadena.
- f) Determinación de ADN y proteínas mediante electroforesis en gel. Ídem. que en el caso de la espectrofotometría UV-Vis. Si el reactivo es fluorescente bajo la luz UV, se puede visualizar o simplemente hacer una fotografía de la placa bajo dicha luz.
- g) Microscopio de fluorescencia: se usa para detectar sustancias fluorescentes o sustancias marcadas con fluorocromos (o fluoróforos). Los más comunes son el DAPI (4',6-diamino-2-fenilindol) que tiñe el núcleo de las células y el GFP (o proteína verde fluorescente) que se usa, por ejemplo, para ver el crecimiento de bacterias patogénicas.

## BIBLIOGRAFÍA

Fundamentos de química analítica. (4 ed.) D. Skoog, D. West y J. Holler. Cengage

Principios de análisis instrumental. (7ª ed) Skoog Holler Crouch 2018 Cengage

Espectroscopía de Fluorescencia, Fosforescencia y Quimioluminiscencia molecular.  
Universidad Europea. *Laureate International Universities*.

Espectroscopia ultravioleta-visible

[https://es.wikipedia.org/wiki/Espectroscopia\\_ultravioleta-visible](https://es.wikipedia.org/wiki/Espectroscopia_ultravioleta-visible)

MATERIAL NO OFICIAL

## **MATERIAL PARA LA PREPARACIÓN DEL TEMA 20**

**ESPECTROMETRÍA DE MASAS. FUNDAMENTOS. ACOPLAMIENTO CON OTRAS TÉCNICAS ANALÍTICAS. APLICACIONES. CROMATOGRAFÍA. CONCEPTO, TIPOS Y APLICACIONES EN LABORATORIOS.**

*Este material no tiene carácter oficial, por lo que en ningún caso vinculará al Tribunal Calificador. Constituye, únicamente, un instrumento complementario que servirá de apoyo al opositor para enfocar cada uno de los epígrafes, pero nunca de forma exclusiva ni excluyente. El Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación no se hace responsable del contenido del mismo.*

*Los materiales no serán objeto de actualización constante.*

## ÍNDICE

### 1. INTRODUCCIÓN

### 2. FUNDAMENTOS DE LA ESPECTROMETRÍA DE MASAS

### 3. INSTRUMENTACION EN ESPECTROMETRÍA DE MASAS

#### 3.1. SISTEMA DE INTRODUCCIÓN DE MUESTRAS.

#### 3.2. FUENTE DE IONES

3.2.1. Ionización por impacto electrónico (fuerte).

3.2.2. Método de ionización química (suave).

3.2.3. Ionización por desorción.

#### 3.3. ANALIZADORES DE MASAS

3.3.1. Analizador de sector magnético.

3.3.2. Analizador de cuadrupolos.

3.3.3. Analizador de trampa de iones.

3.3.4. Analizador de tiempo de vuelo (TOF).

#### 3.4. DETECTORES

#### 3.5. SISTEMAS DE VACÍO

### 4. INTERPRETACION DE ESPECTROS DE MASAS

### 5. ACOPLAMIENTOS

### 6. APLICACIONES

### 7. CROMATOGRAFÍA. CONCEPTO

### 8. CROMATOGRAFÍA DE GASES

#### 8.1. DESCRIPCIÓN DE UN CROMATÓGRAFO DE GASES

8.1.1. Gas portador

8.1.2. Muestreador automático

8.1.3. Sistema de inyección

8.1.4. Columna cromatográfica

8.1.5. Fase estacionaria

8.1.6. Horno de columna

8.1.7. Detectores

**8.2. ANALISIS CUALITATIVO EN CROMATOGRAFÍA DE GASES. ÍNDICE DE RETENCIÓN**

**9. CROMATOGRAFÍA LIQUIDA**

**9.1. COMPONENTES DE UN CROMATÓGRAFO DE LÍQUIDOS**

9.1.1. Bomba

9.1.2. Sistemas de inyección

9.1.3. Columna

9.1.4. Detectores

**10. PARÁMETROS DE INTERÉS EN CROMATOGRAFÍA**

**11. METODOLOGÍA DE TRABAJO**

MATERIAL NO OFICIAL

## 1. INTRODUCCIÓN

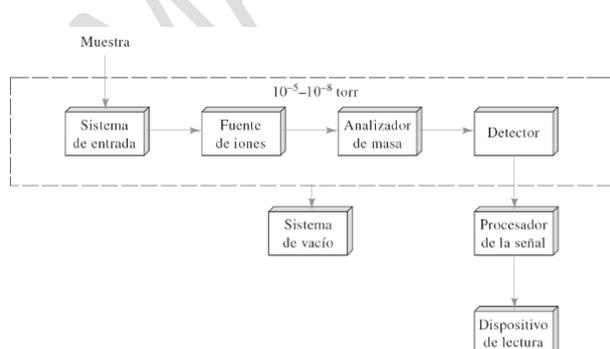
La espectrometría de masas es una técnica instrumental de análisis de amplia utilización para la determinación de estructuras orgánicas; por si sola o en combinación con otras técnicas especialmente espectrofotométricas. No es una técnica espectrofotométrica ya que no está relacionada con la absorción o emisión de radiación. Es una técnica destructiva en la que la muestra (molécula) es destruida no pudiéndose recuperarse a diferencia de técnicas espectrofotométricas (UV-VIS, fluorescencia). La cantidad de muestra necesaria para la obtención de un espectro de masas, es pequeñísima (del orden del  $\mu\text{g}$ ).

## 2. FUNDAMENTOS DE LA ESPECTROMETRÍA DE MASAS

La espectrometría de masas está basada en la producción de iones a partir de moléculas orgánicas en fase gaseosa; una vez obtenidos estos iones, se separan de acuerdo con su masa y su carga tras hacerlos pasar de forma acelerada sobre campos eléctricos y/o magnéticos, y finalmente se detectan por medio de un dispositivo adecuado. Ionizada la molécula adquiere cierta inestabilidad y es susceptible de producirse ciertas rupturas de enlaces y/o reordenamientos de enlaces dando lugar a fragmentos de la molécula original. Un espectro de masas será, en consecuencia, una información bidimensional que representa un parámetro relacionado con la abundancia de los diferentes tipos de iones producidos en función de la relación masa/carga de cada uno de ellos. Los procesos que tienen lugar en un espectrómetro de masas, son de naturaleza química; en consecuencia, la presencia y la abundancia en el espectro de determinados tipos de iones, identificables a partir de su masa, será función de la estructura y reactividad química del compuesto; pudiendo ofrecer una enorme cantidad de información sobre su estructura.

## 3. INSTRUMENTACION EN ESPECTROMETRÍA DE MASAS

Un espectrómetro de masas consta de cuatro partes más o menos independientes. El esquema de un espectrómetro de masas clásico, de separación magnética, es el siguiente:



1.- Sistema de introducción de muestras capaz de vaporizar sustancias de volatilidades muy diferentes.

2.- Fuente de iones capaz de originar iones a partir de las moléculas neutras en fase gaseosa previamente vaporizadas y posibles fragmentos.

3.- Analizador para la separación de iones en función de su relación masa/carga.

4.- Sistema detector y registrador para tratar convenientemente la información.

### 3.1. SISTEMA DE INTRODUCCIÓN DE MUESTRAS.

De acuerdo con la naturaleza de la muestra a estudiar, se utilizan principalmente dos métodos para la introducción de muestras:

1.- Introducción directa. En este procedimiento, se introduce la muestra directamente en la fuente de iones por medio de una varilla metálica, que lleva en la punta un capilar conteniendo la muestra.

2.- Introducción a partir de un sistema cromatógrafo (gases o líquidos). Sistemas híbridos. Este sistema de introducción de muestra se ha popularizado para el análisis por espectrometría de masas de mezclas de compuestos, ya que la introducción se realiza directamente en fase gaseosa donde el cromatógrafo ha realizado previamente la separación de los diversos componentes de la mezcla.

### 3.2. FUENTE DE IONES

Convierte los componentes de la muestra en iones por bombardeo con electrones, moléculas ionizadas o fotones. Existen dos métodos para producir la ionización de la muestra en estado gaseoso; la ionización por impacto o bombardeo electrónico, que es con mucho el más utilizado, y la ionización química.

3.2.1. Ionización por impacto electrónico (FUERTE). En este método, las moléculas de muestra son ionizadas por medio de un haz de electrones de elevada energía. Los electrones utilizados para la ionización, proceden de un filamento incandescente emitidos por efecto termoeléctrico y son acelerados por aplicación de una diferencia de potencial variable entre el filamento y la fuente de iones, adquiriendo los electrones energías entre 5 y 70 eV. Las moléculas procedentes del sistema de introducción de muestras, atraviesan el haz de electrones de alta energía, y al entrar en colisión con ellos, pierden un electrón generándose especies cargadas. El proceso de producción de iones, lógicamente dependerá de la energía de los electrones; la energía mínima que deben llevar éstos, se corresponderá con el potencial de ionización de la molécula, normalmente entre 7 y 10 eV.

3.2.2. Método de Ionización Química (SUAVE). En este método, se utiliza como agente ionizante un ion que va a transferir su carga a la molécula de muestra por medio de una reacción bimolecular. La fuente de iones es en esencia igual que la del caso anterior. Para producir una ionización química, se introduce metano en la fuente de iones, a una presión de 1 mm de Hg. En estas condiciones, los electrones ionizan fundamentalmente a las moléculas de metano originándose iones  $\text{CH}_5^+$  y  $\text{CH}_3^-$ . La especie  $\text{CH}_5^+$ , ion metonio, será la que reaccione ahora con las moléculas de la muestra, ionizándolas por transferencia de un protón ( $\text{H}^+$ ). Al ion así originado, con una unidad de masa más que el ion molecular, se le denomina ion cuasimolecular. El ion cuasimolecular, se origina casi sin exceso de energía interna, por lo que no presentará tendencia a descomponerse, y al obtener el espectro de masas, la única señal intensa corresponderá al pico cuasimolecular. Estos espectros suelen permitir la determinación exacta del peso molecular de un compuesto.

**3.2.3. Ionización por desorción.** Los métodos de ionización descritos hasta este punto requieren que los agentes de ionización actúen sobre muestras gaseosas. Dichos métodos no son aplicables a muestras no volátiles o térmicamente inestables. Los métodos de ionización por desorción aplican a este tipo de muestras. Estos métodos permiten obtener espectros de masas de especies bioquímicas térmicamente delicadas y de especies que tienen masas moleculares superiores a 100.000 Da. Los métodos de desorción prescinden de la volatilización y de la posterior ionización de la molécula de analito. En ellos se suministra energía a la muestra sólida o líquida de diversas maneras, de modo que se provoca la formación directa de iones gaseosos. Por consiguiente, se obtienen espectros muy complicados y poco específicos por estar fuertemente influenciada la fragmentación por la matriz (entorno) que acompaña a la muestra. Así, pueden mencionarse métodos como:

a) El método M.A.L.D.I (*Matrix-assisted laser desorption/ionization*) en el que vaporización e ionización se producen por medio de una fuente de radiación láser. La espectrometría de desorción-ionización por láser con ayuda de una matriz es un método de ionización nuevo que permite obtener información exacta sobre las masas moleculares. En la técnica MALDI una baja concentración del analito se dispersa de manera uniforme en una matriz sólida o líquida que está depositada en el extremo de una sonda de acero inoxidable, o colocada en una placa de metal. Esta última se coloca luego en una cámara de vacío y un rayo láser se enfoca sobre la muestra generándose los iones.

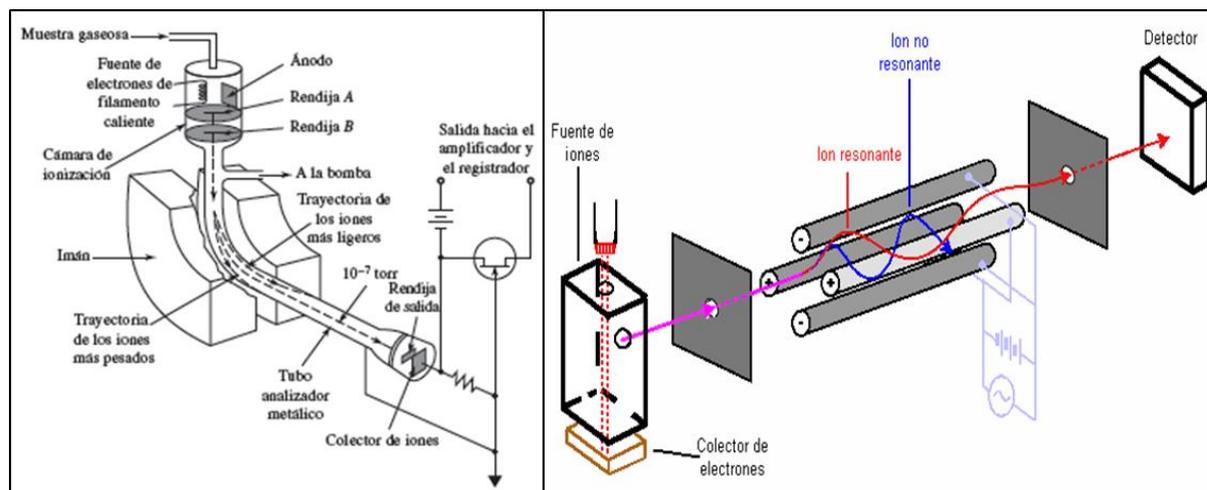
b) El método F.A.B. (*Fast Atom Bombardment*) en el que la muestra es ionizada por bombardeo con iones de elementos ligeros. Las muestras en un estado condensado se ionizan mediante un bombardeo con átomos de xenón o argón de elevada energía (varios kV).

### **3.3. ANALIZADORES DE MASAS**

A la salida de la fuente de iones, se tiene una mezcla de diversos iones pertenecientes a la misma molécula inicial que deben ser separados para detectarlos de forma individual; para la separación de estos iones, existen también varios procedimientos posibles. Los analizadores más utilizados son el de campo o sector magnético, el analizador cuadrupolar y el analizador de trampa de iones.

**3.3.1. Analizador de sector magnético.** Una vez que los diversos iones abandonan la cámara de ionización, llevan una cierta velocidad que les ha sido suministrada por el campo eléctrico al que han sido sometidos. A continuación se dispone un campo magnético perpendicular al movimiento de éstos. Al aplicar este campo magnético (B), se obligará a los iones a describir una trayectoria circular (Ley Lorentz mano izquierda.). Cada especie iónica, caracterizada por una determinada relación masa/carga, seguirá, para un valor dado del campo magnético, su propia trayectoria de radio "r". De esta forma cada ion llegará al sistema de detección (similar a una "regla de medida") en diferentes posiciones. Los iones más pesados se desviarán menos y los más ligeros menos desviados. En los aparatos comerciales, lo que en realidad se hace se efectuar un barrido de campo magnético para hacer que todos los iones se focalicen para

llegar al mismo sitio (detector), haciéndolo cada uno a un valor del campo B. Este valor del campo aplicado se correlacionará con la masa molecular de cada ion.



Esquema de un espectrómetro de sector magnético y de cuadrupolo

**3.3.2. Analizador de cuadrupolos.** El analizador cuadrupolar está formado por cuatro barras metálicas de sección circular exactamente rectas y paralelas y dispuestas con gran precisión sobre una circunferencia, de tal forma que el haz de iones procedente de la fuente incida sobre el hueco que dejan las cuatro barras del dispositivo. Sobre estas barras, por pares alternos, se aplica un potencial constante  $V$ , y un potencial alterno de radiofrecuencia superpuesto. Ninguno de estos dos campos eléctricos tienen efecto sobre el movimiento longitudinal de los iones, pero la combinación de los dos campos origina un movimiento lateral complejo. Los movimientos de los iones dependen de la relación carga/masa, existiendo solamente un pequeño rango de frecuencia en el que la trayectoria de un determinado ion es estable (ion resonante); fuera de éste, la trayectoria de los restantes iones los lleva a chocar contra cualquier barra lo que produce su descarga y pérdida de movilidad (iones no resonantes). La principal desventaja que presenta este tipo de analizador, consiste en su poder de resolución, relativamente pequeño, del orden de 500 a 1.000, y su limitado rango de utilización, ya que sólo permite la separación de iones con relaciones  $m/e$  menores de 1.000. Últimamente se han desarrollado los sistemas triple cuadrupolo. La muestra se introduce en una fuente de ionización blanda. Entonces, los iones generados son seleccionados en el cuadrupolo 1(Q) y se hacen pasar por el cuadrupolo 2(Q), que es una celda de colisiones donde tiene lugar la ruptura por bombardeo de los iones seleccionados por el cuadrupolo 1(Q). En esta celda se atrapa los productos generados de la ruptura. A continuación, el cuadrupolo 3(Q) facilita el análisis de masas de los iones producto formados en la celda de colisiones que van siendo liberados secuencialmente gracias a la aplicación de un campo adecuado para cada ion. Esta configuración se conoce como configuración QqQ o triple cuadrupolo.

**3.3.3. Analizador de trampa de iones.** Una trampa de iones es un dispositivo en el que los cationes o aniones gaseosos pueden formarse y quedar confinados durante largos periodos gracias a la acción de campos eléctricos y magnéticos simultáneos. Los iones con valores de

masas dentro de un amplio intervalo de interés son atrapados en forma simultánea. La trampa de iones tiene la capacidad de almacenar iones por periodos relativamente largos, hasta de 15 minutos para algunos iones estables. Luego se aplica una técnica llamada expulsión por selección de masas para expulsar en forma sucesiva los iones atrapados de acuerdo con sus masas haciéndolos llegar al detector.

**3.3.4. Analizador de tiempo de vuelo (TOF).** En un analizador de tiempo de vuelo típico la muestra es vaporizada e ionizada; seguidamente todos los iones de la muestra son acelerados de forma casi simultánea; acto seguido, los iones alcanzan una zona libre de campo, a lo largo de la cual se mueven a velocidad constante hasta alcanzar el detector. La separación de los iones en función de las masas se produce durante su recorrido hasta el detector, situado al final del tubo. Dado que todos los iones que entran en el tubo tienen la misma energía cinética, sus velocidades en él varían de manera inversa respecto a sus masas y por tanto, las partículas más ligeras llegan primero al detector que las pesadas. Los espectrómetros de tiempo de vuelo son de amplia utilización para el análisis de sustancias de muy elevado peso molecular.

### **3.4. DETECTORES**

El detector convierte el haz de iones en una señal eléctrica que puede ser procesada y almacenada. El detector más empleado es el multiplicador de electrones. El haz de iones incide sobre un cátodo, arrancando electrones. Después una serie de dínodos colocados a potenciales cada vez más altos amplifican la corriente de electrones.

El multiplicador de electrones es esencialmente igual a los tubos fotomultiplicadores utilizados para la detección de radiación. Este tipo de detector, utiliza la energía cinética de los iones que inciden sobre una placa que tiene su superficie recubierta por óxidos de tierras raras; al chocar los iones contra la placa, ésta emite una corriente de electrones que son acelerados hacia una segunda placa, de la que vuelven a arrancar electrones que son acelerados hacia una tercera placa y así sucesivamente.

### **3.5. SISTEMAS DE VACÍO**

Para que los procesos que tienen lugar en el interior del espectrómetro puedan llevarse a cabo con éxito, debe existir en el interior del espectrómetro un ambiente de alto vacío (del orden de  $10^{-5}$  torr). Dejando al margen las bombas rotatorias, necesarias para hacer el vacío previo, hay dos principales tipos de bombas de alto vacío: las difusoras y las turbomoleculares.

## **4. INTERPRETACION DE ESPECTROS DE MASAS**

Los espectros de masas proporcionan mucha información sobre la estructura de los compuestos analizados. Además de las posibilidades de identificación ya mencionadas por comparación de los espectros obtenidos, con los contenidos en una base de datos o librería, el espectro de masas es susceptible de ser interpretado. La información que ofrece el espectro de masas proviene de las reacciones químicas que experimentan las moléculas de la muestra

en estado excitado; en consecuencia, la interpretación de un espectro de masas requerirá de un conocimiento de las reacciones que pueden originarse en el espectrómetro, así como de los iones que estas reacciones pueden generar. El ion de mayor masa posible, será el ion molecular, que al ser detectado, originará en el espectro el llamado "pico molecular"; este pico molecular, suministrará información muy exacta sobre el peso molecular de la muestra. Una vez arrancado un electrón de la molécula, ésta se encuentra en un estado inestable y sus enlaces tienden a reordenarse/relajarse. La relajación del ion molecular produce gran cantidad de fragmentación apareciendo más especies ionizadas, resultando espectros de masas de gran complejidad, únicos para cada compuesto como una "huella dactilar" y que permiten la identificación inequívoca del compuesto original. En un espectro de masas se distinguen varios tipos de iones característicos que ayudan a la interpretación del espectro y consecuentemente a la identificación de la molécula que lo generó.

#### Tipos de iones característicos

a) El ion molecular: La formación del ion molecular, es con mucho el proceso primario de más importancia; los iones moleculares presentarán la misma masa que la molécula neutra, y se reflejarán en el espectro como pico molecular ( $M^+$ ); debido a la generación de este ion molecular, la medida de masas moleculares mediante espectrometría de masas, es la más exacta que se conoce. Como ya se ha dicho, el pico molecular suministra información acerca del peso molecular de la sustancia problema, y además sirve como punto de partida para la interpretación del espectro de masas; en consecuencia, debe tenerse siempre la mayor seguridad posible a la hora de identificarlo. Aunque desgraciadamente la seguridad de que un pico corresponda al ion molecular nunca es completa, el pico molecular deberá cumplir necesariamente la siguiente serie de requisitos:

- El pico molecular es el pico de masa más alta que pueda originarse a partir del compuesto, sin tener en cuenta los picos isotópicos.
- El ion molecular, es el ion que presenta un potencial de aparición más bajo, es decir, el pico que aparece a una mínima energía de los electrones de bombardeo; esta propiedad del ion molecular puede servir para identificar con bastante seguridad el pico molecular si se realizan varios espectros con diferentes energías de los electrones de bombardeo.
- El pico molecular presenta siempre masa par si la molécula no contiene nitrógeno, o si presenta un número par de átomos de nitrógeno; por el contrario, el pico molecular presentará masa impar si la molécula presenta un número impar de átomos de nitrógeno.
- Las diferencias de masa entre el pico molecular y las señales de los picos correspondientes a iones fragmento, deben ser "químicamente lógicas"; (esta regla se refiere a las señales que aparezcan relativamente próximas al pico molecular). Diferencias de masa "químicamente lógicas", pueden ser por ejemplo:

M - 1: Pérdida de un hidrógeno (H)

M - 2: Pérdida de H<sub>2</sub>

M - 15: Eliminación de un grupo metilo (CH<sub>3</sub>)

M - 17: Eliminación de un hidroxilo (OH)

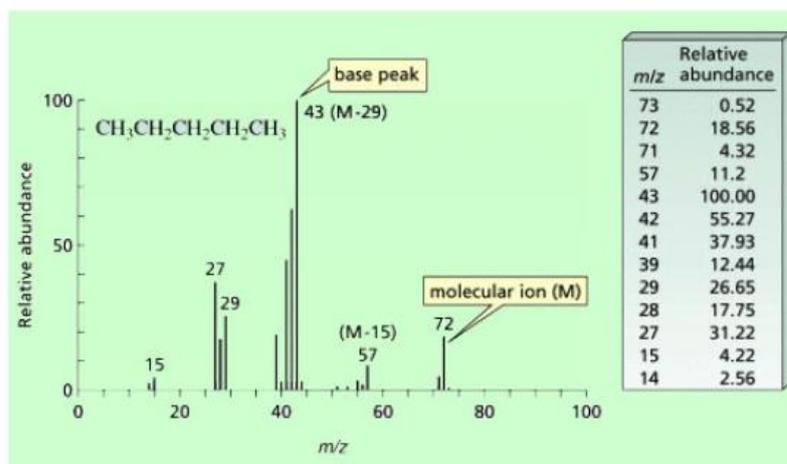
M - 18 Eliminación de agua (H<sub>2</sub>O)

M - 28: Eliminación de CO

M - 29: Eliminación de un grupo etilo (CH<sub>3</sub>-CH<sub>2</sub>-), etc.

Donde M es la masa del ion molecular

b) Pico base. El pico mayor del espectrograma de masa se llama pico base. Normalmente la altura de este pico se toma como valor cien. La intensidad de los demás picos se expresa en porcentajes de la intensidad del pico base.



c) Iones isotópicos. En la naturaleza, casi todos los elementos, están formados por mezclas de diferentes isótopos (Ej. carbono: C<sup>12</sup>, C<sup>13</sup> y C<sup>14</sup>, cloro: Cl<sup>35</sup> y Cl<sup>37</sup>, etc.); este hecho, reviste una gran importancia, ya que todos los compuestos serán mezclas de diversas composiciones isotópicas, existiendo las diversas composiciones isotópicas en una abundancia relacionada con la de los diversos isótopos de cada elemento. Las abundancias relativas de isótopos de los elementos más frecuentes encontrados en los compuestos orgánicos, se recogen en la Tabla siguiente

Debido a la existencia de diversas especies isotópicas, el espectrómetro de masas, no detectará un solo pico molecular, sino varios, que corresponderán a las diversas composiciones isotópicas del ion molecular. En el espectro, se denominará pico molecular al pico de masa "M", denominándose los picos M+ + 1, M+ + 2, etc. picos isotópicos. Por ejemplo, en el caso de existir cloro en la molécula, el pico isotópico M+ + 2, sería más intenso que el pico isotópico M+ + 1, siendo la intensidad del segundo pico isotópico de aproximadamente un tercio de la del pico molecular (ya que abundancia del Cl<sup>37</sup> es 32,5% respecto al Cl<sup>35</sup>). En caso de que exista más de un átomo de cloro, la abundancia relativa de cada especie, vendrá dada por la expresión: (a + b)<sup>2</sup>. Siendo a y b las abundancias relativas de los dos isótopos del cloro. Debido a los efectos isotópicos del cloro, las moléculas que presenten átomos de este elemento tendrán unas distribuciones características de los picos isotópicos de acuerdo con los átomos de cloro presentes en la molécula.

### Abundancia natural de los isótopos de algunos elementos comunes

Elemento <sup>a</sup>	Isótopo más abundante	Abundancia de otros isótopos relativa a 100 partes del más abundante <sup>b</sup>
Hidrógeno	<sup>1</sup> H	<sup>2</sup> H 0,015
Carbono	<sup>12</sup> C	<sup>13</sup> C 1,08
Nitrógeno	<sup>14</sup> N	<sup>15</sup> N 0,37
Oxígeno	<sup>16</sup> O	<sup>17</sup> O 0,04 <sup>18</sup> O 0,20
Azufre	<sup>32</sup> S	<sup>33</sup> S 0,80 <sup>34</sup> S 4,40
Cloro	<sup>35</sup> Cl	<sup>37</sup> Cl 32,5
Bromo	<sup>79</sup> Br	<sup>81</sup> Br 98,0
Sílice	<sup>28</sup> Si	<sup>29</sup> Si 5,1 <sup>30</sup> Si 3,4

El bromo, todavía presenta un caso más extremo que el del cloro, ya que debido a la abundancia relativa de los isótopos del bromo, el pico molecular irá acompañado de un segundo pico isotópico de prácticamente la misma intensidad (98 %), por lo que los compuestos monobromados son bastante fáciles de distinguir en los espectros de masas.

#### 5. ACOPLAMIENTOS

La espectrometría de masas es la técnica más utilizada para determinar molecularmente una sustancia, ya que aporta información cualitativa (información sobre la estructura y la masa de la molécula) y cuantitativa. Acoplar el detector de masas a las técnicas de separación (como la cromatografía) ha permitido analizar, cuantificar e identificar un gran número de compuestos diferentes.

Aunque la espectrometría de masas es una poderosa herramienta para la identificación de compuestos puros, es insuficiente para el análisis de mezclas. Por esta razón, se han desarrollado equipos en los que el espectrómetro de masas está acoplado a varios dispositivos efectivos con los llamados métodos acoplados.

a) Cromatografía-espectrometría de masas. La cromatografía de gases-espectrometría de masas se convirtió en una de las más poderosas herramientas para el análisis de mezclas orgánicas y bioquímicas complejas. En este caso, los espectros de los compuestos se recolectan a medida que salen de la columna cromatográfica. Estos espectros se almacenan en una computadora para el siguiente proceso. La espectrometría de masas se puede acoplar también a la cromatografía de líquidos para analizar muestras que tienen componentes no volátiles. Por tanto, se han tenido que perfeccionar métodos para eliminar el diluyente antes de introducir la muestra en el espectrómetro de masas. Las técnicas cromatográficas suponen la dilución de la muestra con una gran cantidad de fase móvil en las que van contenidos los

analitos que posteriormente debe ser eliminada, lo que incrementa en gran medida la probabilidad de introducir interferencias. En el caso del acoplamiento a la cromatografía líquida la configuración de un equipo se hace algo más compleja por cuanto se requiere una interfase adecuada para la eliminación del disolvente mediante calentamiento y aplicación de vacío.

b) Electroforesis capilar-espectrometría de masas. Este método acoplado es en una poderosa e importante herramienta para el análisis de grandes biopolímeros, como especies de proteínas, polipéptidos y de ADN. En la mayoría de las aplicaciones publicadas hasta el momento, el efluente del capilar pasa directamente a un dispositivo de ionización por electronebulización y después los productos entran en el masas (cuadrupolar) para su análisis.

## 6. APLICACIONES

Las aplicaciones principales de la espectrometría de masas y sus acoplamientos en el campo de la sanidad animal se hallan en la determinación de residuos de medicamentos veterinarios en matrices de origen animal y piensos. La legislación aplicable (Reglamento de la Comisión 808/2021) establece que la investigación de residuos se hará mediante el empleo de técnicas cromatográficas acopladas a sistemas de detección de masas. Tras la extracción previa de los analitos objeto de interés de la matriz mediante el adecuado tratamiento de la muestra, estos son separados mediante técnicas cromatográficas (gases o líquidos) y posteriormente detectados mediante espectrómetros de masas. No obstante la espectrometría de masas tiene otra serie de aplicaciones fundamentales como las que se describen a continuación.

### Análisis cualitativo identificación de compuestos:

- Identificación de compuestos puros: El espectro de masas de un compuesto puro proporciona diversos tipos de datos que son útiles para su identificación. El primero es el peso molecular del compuesto (correspondiente al primer ion generado ( $M^+$ ), se obtiene así el peso molecular con una precisión que no puede alcanzarse por ningún otro método; el segundo es que se puede deducir su fórmula a través del estudio de los diferentes fragmentos (picos) que aparece en el espectro de masas. Se trata de identificar la posible estructura de los fragmentos a través de tablas descritas para ello y a partir de ahí recomponer la molécula a modo de un puzle. Aunque rara vez es posible explicar todos los picos del espectro de ahí la complejidad.

La información espectral de las sustancias se puede almacenar en ficheros (librerías) y posteriormente ser utilizadas para realizar comparaciones (match) cuando se trata de identificar un compuesto en una muestra objeto de análisis. Las bibliotecas de espectros de masas más extensas (> 150 000 espectros) son asequibles comercialmente. Las bibliotecas pequeñas normalmente contienen de unos pocos cientos a unos pocos miles de espectros para aplicación a una determinada área, tal como residuos de pesticidas, drogas o muestras forenses. Esto donde realmente tiene

aplicación es con el acoplamiento a sistemas cromatográficos donde una vez separados los compuestos pueden ser identificados a través de sus espectros.

- Presencia de heteroátomos a partir de relaciones isotópicas. Heteroátomos son átomos distintos de C, H y O que pueden estar presentes en moléculas orgánicas como azufre, cloro, bromo, etc. Con tal de que el pico del ion molecular sea suficientemente intenso para que su altura y las alturas de los picos de los isótopos  $(M + 1)^+$  y  $(M + 2)^+$  puedan determinarse con precisión.

### **Análisis cuantitativo: determinación de concentraciones moleculares.**

Este tipo de análisis se lleva a cabo pasando la muestra a través de una columna cromatográfica y seguidamente por el espectrómetro. Durante el proceso cromatográfico se registra o monitoriza una  $m/z$  o  $M^+$  seleccionada; mientras no llegue ninguna sustancia con esa relación  $m/z$  al detector aparecerá una línea base plana. Cuando la citada molécula alcance el detector aparecerá el correspondiente pico cromatográfico indicándolo. La altura o el área de dicho pico serán proporcional a la cantidad de sustancia presente en la muestra.

## **7. CROMATOGRAFÍA. CONCEPTO**

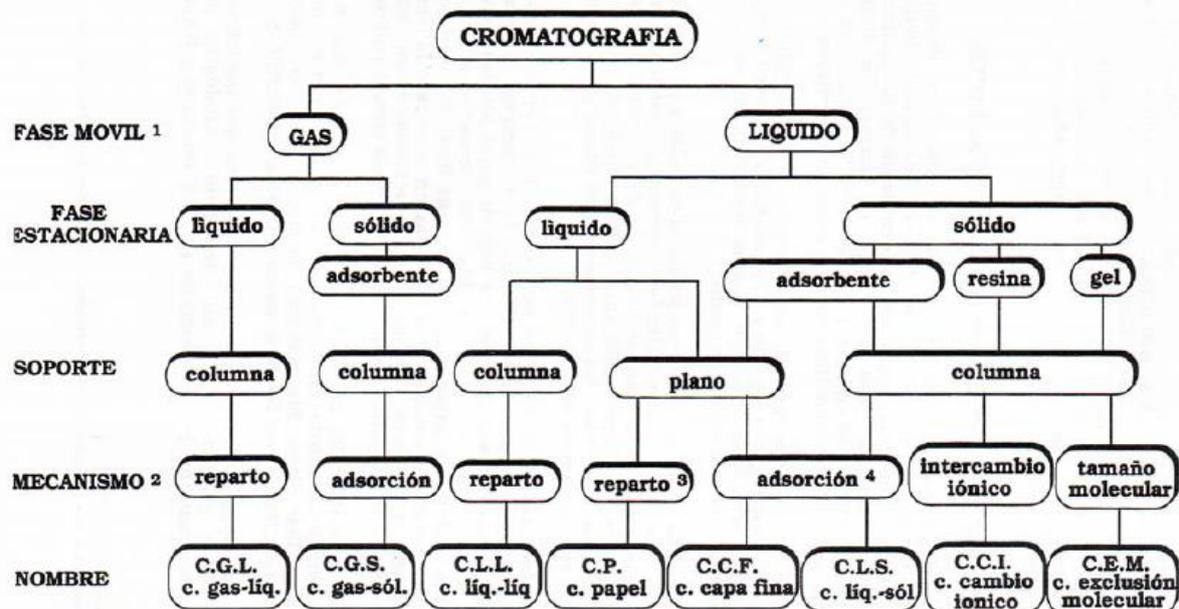
La etimología de la palabra cromatografía es curiosa. Por las palabras griegas que la forman significaría: "escritura en colores". El desarrollo de la cromatografía se debe al botánico ruso Mikhail S. Tswet estudiando los pigmentos naturales que se encuentran en las plantas (conocidos como carotenoides y clorofilas). Tswet empacó material adsorbente en una columna de vidrio vertical de unos cuantos centímetros de diámetro (2-3) rellena de un sólido (carbonato cálcico) con el que pretendía "filtrar" el extracto de clorofilas. Posteriormente, por dicha columna vertical vertió una disolución que contenía la mezcla de pigmentos provenientes de las hojas molidas de una planta. Pasados unos minutos, el material empacado en la columna había adquirido una coloración diferente por segmentos. Es decir, se había logrado la separación de los pigmentos naturales de la planta. En cada segmento de color definido había un pigmento diferente.

La cromatografía se define como:

*Una técnica analítica de separación basada en la migración diferencial de los analitos en un lecho o fase fija (fase estacionaria), impulsados por una fase en movimiento (fase móvil).*

La separación se da como resultado de la mayor o menor capacidad para ser retenidos los diferentes componentes de una muestra por la fase estacionaria, es decir; se basa en los repetidos procesos de interacción durante el movimiento de los componentes de una mezcla arrastrados por la fase móvil (en movimiento) a lo largo de la fase estacionaria (fija), produciéndose la separación debido a las diferentes afinidades de los componentes de la mezcla entre la fase estacionaria y la móvil. Atendiendo a la naturaleza de la fuerza impulsora en movimiento que empuja a los analitos la cromatografía se divide en cromatografía de gases

(es un gas el impulsor) y cromatografía de líquidos. En la figura siguiente se muestran los tipos de cromatografía atendiendo a las fases móviles y fijas:



## 8. CROMATOGRAFÍA DE GASES

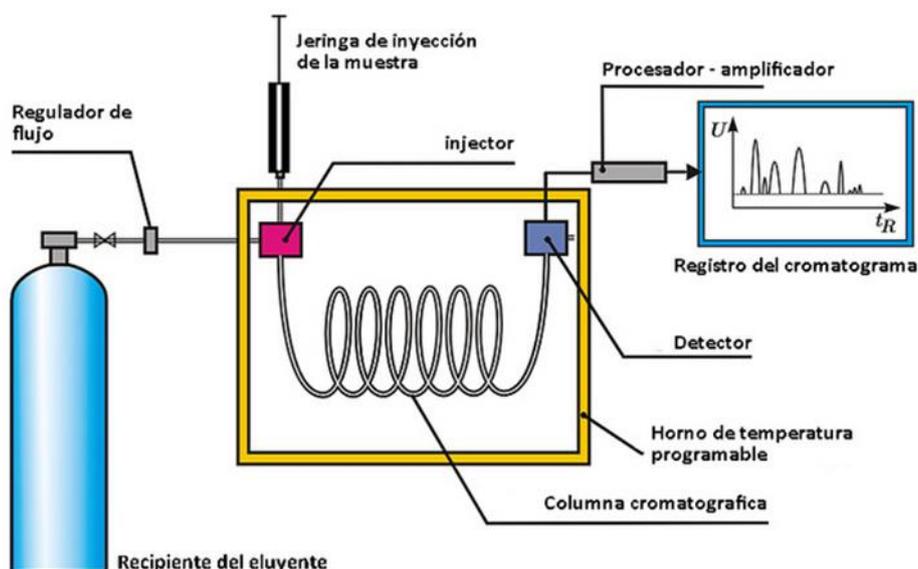
Su utilidad fundamental es para la separación de compuestos orgánicos volátiles (en un rango de temperaturas 30-500 °C). Es una técnica cromatográfica en la que la muestra se volatiliza y se inyecta en una columna cromatográfica contenida en un horno. La modificación de la temperatura del horno con el tiempo permite volatilizar los compuestos presentes en la muestra progresivamente y su movimiento a lo largo de la columna. La elución se produce empujados la fase móvil de gas inerte. A diferencia de otros tipos de cromatografía, la fase móvil no interactúa con las moléculas del analito; su única función es la de transportar el analito a través de la columna. Existen dos tipos de cromatografía de gases (GC): la cromatografía gas-sólido (GSC) y la cromatografía gas-líquido (GLC), siendo esta última la que se utiliza más ampliamente, y que se puede llamar simplemente cromatografía de gases (GC). En la GSC la fase estacionaria es sólida y la retención de los analitos en ella se produce mediante el proceso de adsorción. La GLC utiliza como fase estacionaria moléculas de líquido inmovilizadas sobre la superficie de un sólido inerte.

### 8.1. DESCRIPCIÓN DE UN CROMATÓGRAFO DE GASES

Un cromatógrafo de gases consta de varios módulos:

- gas portador (fase móvil),
- sistema de inyección (microjeringa) para depositar la muestra en la columna,
- Columna cromatográfica

- d) Horno termostático para mantener la columna a la temperatura apropiada (o la secuencia del programa de temperatura),
- e) Detector que “ve” los componentes de la muestra conforme eluyen de la columna, y
- f) Sistema de integración de la señal y procesador de datos (registrador).



### 8.1.1. GAS PORTADOR

El gas portador o fase móvil suele ser: He, o N<sub>2</sub> fundamentalmente aunque también se ha utilizado CO<sub>2</sub> e H<sub>2</sub>. La elección del gas está con frecuencia determinada por el tipo de detector que se utilice. Los gases portadores utilizados en cromatografía no afectan, en principio, a la separación ya que no tienen ninguna influencia sobre los procesos de sorción-desorción o de partición que se producen en la columna, por lo que no afectan a la selectividad de ésta.

### 8.1.2. MUESTREADOR AUTOMÁTICO

Un muestreador automático se encarga de tomar la muestra contenida en un vial (0,5-2ml) de un módulo donde se puede disponer de numerosas muestras (>50). El muestreador enjuaga la jeringa con una muestra nueva para lavar las trazas de la muestra anterior, toma una cantidad de muestra medida con precisión, y mediante el inyector la introduce en la columna. La operación que no requiere atención personal libera al operador para otras actividades.

### 8.1.3. SISTEMA DE INYECCIÓN

El sistema de inyección de un cromatógrafo es un punto extremadamente crítico, y la utilización de una técnica de inyección inadecuada o una mala elección del sistema de inyección pueden echar a perder completamente la capacidad de separación de una columna. El método más tradicional de inyección de muestra implica el uso de una microjeringa para inyectar una muestra líquida o gaseosa a través de un diafragma o “septum” de goma de silicona, en una cámara de vaporización instantánea situada en la cabeza de la columna. El modo estándar, adecuado para aproximadamente 95% de las aplicaciones de las columnas

empacadas (o empaquetadas), es la inyección directa. La muestra es inyectada con una jeringa hipodérmica a través de un séptum de goma (o hule) de silicona autosellante, a un alineador de vidrio (glass insert) contenido en un bloque metálico. Una vez inyectada la muestra, ésta es vaporizada de forma instantánea, mezclándose con el gas portador. El bloque se calienta a una temperatura que se fija en un valor suficientemente alto para convertir prácticamente en forma instantánea la muestra líquida en vapor. La muestra, una vez vaporizada, es arrastrada rápidamente por la corriente de gas portador en dirección a la columna. La cantidad de muestra inyectada es del orden de  $\mu\text{L}$  para líquidos y algo superior para gases. Existen fundamentalmente dos modos de inyección en un cromatógrafo de gases:

- a) Inyección con división de muestra (split). Este tipo de inyección es el más sencillo de los que se utilizan en cromatografía capilar. El inyector de “split”, consta básicamente de los mismos elementos que un inyector normal, con la única adición de un sistema de división de flujo a la salida de la cámara de mezcla. Por medio de este tipo de inyector, el flujo de gas portador que pasa a través del inyector (y por lo tanto también la muestra vaporizada), se divide en dos; una parte es introducida en la columna y la otra escapa fuera del sistema a través de una válvula de aguja que permite regular la proporción de gas que es introducido en la columna. Generalmente se inyecta una muestra de 1  $\mu\text{L}$  pero sólo entra al capilar 0.01  $\mu\text{L}$ ; el resto es desechado. Esta técnica impide la sobrecarga de la columna, pero desperdicia una porción significativa de la muestra reduciendo la sensibilidad.
- b) Inyección sin división “splitless”: la totalidad de la muestra inyectada llega a la columna, que se mantiene durante la inyección a una temperatura inferior al punto de ebullición del componente más volátil de la muestra. La totalidad de la muestra inyectada, lógicamente condensa en la cabeza de la columna, actuando en este caso el disolvente condensado en la columna a modo de trampa donde se concentran los componentes a analizar (efecto solvente). Transcurrido un tiempo adecuado, se abre en el inyector una válvula de purga con el fin de expulsar el disolvente vaporizado que pudiera quedar en el inyector; al mismo tiempo, se comienza un programa de calentamiento de la columna para realizar el análisis. La utilización de la técnica de “splitless” supone dos importantes ventajas. En primer lugar, dado que no existe división de muestra, permite un aumento notable de la sensibilidad, por lo que es muy adecuada para el análisis de trazas.
- c) Inyección en columna on-column. Este sistema posibilita la introducción de muestras directamente en el interior de columnas capilares.
- d) Desorción térmica. La muestra líquida/sólida se deposita sobre una superficie en una cámara termostaticada. Seguidamente es desorbida (volatilizada) a elevada temperatura bajo una corriente de gas portador. Una vez desorbidos los vapores de la muestra, estos son retenidos en una trampa criogénica hasta la finalización del proceso de desorción, efectuándose la inyección en este momento por medio de un calentamiento muy rápido de la trampa fría.
- e) Inyectores de espacio de cabeza. La técnica de análisis por espacio de cabeza es aplicable al análisis directo de contaminantes muy volátiles en muestras sólidas o líquidas. El fundamento de esta técnica consiste en analizar una alícuota de la

atmósfera que se encuentra en contacto con la muestra con el fin de determinar en ella la fracción vaporizada de los componentes que se encuentra en equilibrio con la muestra sólida o líquida. Para realizar un análisis por medio de esta técnica, la muestra se introduce en un vial herméticamente cerrado y se somete a una temperatura previamente fijada durante un tiempo suficiente para que las distintas fases de los compuestos a analizar alcancen el equilibrio. En esencia, un analizador de espacio de cabeza consta de un horno, convenientemente termostatzado, donde se mantienen las muestras a una temperatura generalmente muy elevada, y de un sistema de muestreo capaz de inyectar en el cromatógrafo una alícuota del vapor generado por la muestra que contiene el vial. Muy útil en el análisis de perfumes, de constituyentes orgánicos volátiles de muestras como orina, respiración y muestras ambientales.

- f) Pirolisis. En la técnica de pirolisis (o fragmentación térmica controlada) la muestra se introduce en un pirolizador (horno) que la calienta a temperatura muy elevada y suficiente para llevar a cabo su descomposición química. Se forman fragmentos volátiles que se introducen automáticamente en columna para su análisis.

#### **8.1.4. COLUMNA CROMATOGRÁFICA**

Al igual que sucede en todas las técnicas cromatográficas, la columna es el corazón del cromatógrafo de gases. Una columna para cromatografía de gases, está formada por un tubo, que puede ser de diversos materiales (preferiblemente inertes), dentro del cual se encuentra la fase estacionaria. Esta puede ser un sólido activo (cromatografía gas sólido), o con mayor frecuencia un líquido depositado sobre las partículas de un sólido portador (columnas empaquetadas o de relleno) o sobre las propias paredes del tubo (columnas tubulares abiertas). Existen dos tipos de columnas atendiendo a la disposición del relleno en su interior:

- a) Columnas empaquetadas. Las columnas empaquetadas consisten en un tubo (normalmente de vidrio o acero inoxidable) con un diámetro interno que varía entre 2 y 5 mm y de una longitud que oscila entre 1 y 5 m, enrollado de una forma adecuada para poderse introducirse en el interior del horno. En estas columnas el relleno ocupa todo el espacio interior.
- b) Columnas tubulares abiertas - Columnas capilares. Una columna tubular está formada por un tubo (normalmente de vidrio o sílice fundida) de un diámetro comprendido entre 0,2 y 0,8 mm, en cuya pared interna se dispone la fase estacionaria. Las columnas capilares ofrecen una elevada eficacia (son frecuentes valores de 30.000 a 50.000 platos frente a los 2.000 - 4.000 de una columna empaquetada. El plato teórico es una forma de medir la eficiencia de una columna), permitiendo la separación de mezclas muy complejas con relativa facilidad. Este tipo de columnas permiten conseguir buenas resoluciones sin recurrir a fases estacionarias de gran selectividad, lo que simplifica mucho el problema de la elección de la fase estacionaria (prácticamente todas las separaciones se pueden realizar con tres o cuatro columnas diferentes).

El relleno de las columnas consta de un soporte sólido sobre el que se deposita la fase estacionaria. La misión de los soportes sólidos utilizados en algunos tipos de columnas es la de proporcionar una superficie sobre la que se deposita la fase estacionaria líquida en forma de película uniforme. Como soportes, se han utilizado sólidos inertes de todo tipo, microbolas de vidrio, carbón grafitizado, metales, sílices, fluoropolímeros, polímeros porosos, etc. aunque los más utilizados son los soportes preparados a base de tierras de diatomeas sinterizadas (Chromosorb, Gas Chrom, etc.);

#### **8.1.5. FASE ESTACIONARIA**

La fase estacionaria tiene en cromatografía de gases un papel fundamental, ya que la fase móvil es cromatográficamente inerte y las separaciones son debidas exclusivamente a las interacciones específicas que se dan entre los componentes de la muestra y la fase estacionaria. En cromatografía de gases, pueden llevarse a cabo la mayoría de las separaciones utilizando unos cuantos tipos de fases estacionarias de uso frecuente como:

- a) Polisiloxanos: Los polisiloxanos o siliconas son, con mucho, el grupo de fases estacionarias de más amplia utilización debido a su elevada estabilidad térmica y a la posibilidad de modificar químicamente su estructura de base para obtener fases con diferentes polaridades y selectividades.
- b) Poliésteres: Los poliésteres utilizados con más frecuencia como fases estacionarias son los adipatos y succinatos de etilenglicol, dietilenglicol y butanodiol; particularmente, es muy utilizado el polietilenglicol succinato (PEGS): Los poliésteres son fases estacionarias moderadamente polares. Las columnas preparadas con este tipo de fases presentan el problema de su escasa estabilidad ya que los poliésteres son fácilmente hidrolizables, pueden reaccionar con algunos componentes de las muestras (por ejemplo aminas) y son muy sensibles a la oxidación.
- c) Polietilenglicoles: son fases estacionarias muy útiles para la separación de compuestos polares y con posibilidades de formación de enlaces de hidrógeno. Este tipo de fases estacionarias se preparan por polimerización del óxido de etileno.
- d) Fases estacionarias ligadas: En general, uno de los factores que influyen en la temperatura límite de utilización de las fases estacionarias, es la tendencia de éstas a ser arrastradas (desorbidas) por la corriente de gas portador a medida que la viscosidad de la fase va disminuyendo por efecto del aumento de temperatura fenómeno que se conoce como sangrado que da lugar a la aparición de picos no pertenecientes a la muestra que pueden interferir o enmascarar algún componente de la muestra. Una solución a este problema, consiste en inmovilizar químicamente la fase estacionaria sobre la superficie del soporte o la pared del tubo capilar. Las fases inmovilizadas ofrecen temperaturas de utilización más elevadas que las fases convencionales, teniendo además un menor nivel de sangrado a temperaturas elevadas, además las columnas contaminadas por componentes no volátiles de las muestras pueden ser regeneradas mediante un lavado con disolventes adecuados.

### 8.1.6. HORNO DE COLUMNA

La temperatura de la columna es una variable importante y ha de ser controlada con precisión. Por ello, normalmente se introduce dentro de un horno termostático que puede alcanzar temperaturas de hasta 300-500 °C. Posee un sistema de control digital que permite establecer gradientes de temperatura precisos en función del tiempo transcurrido desde la inyección de la muestra en la columna, de esta forma se pueden ir volatilizando los diferentes componentes de la muestra e ir avanzando de forma secuencial de manera que se favorezca su separación.

### 8.1.7. DETECTORES

Una vez que los componentes de la muestra han sido separados por la columna, se hace preciso el disponer a la salida de ésta de un sistema de detección, capaz de señalar la elución de un componente de la muestra y ofrecer, al mismo tiempo, una señal eléctrica proporcional a la cantidad de sustancia que pasa a través de él y que es transformada en un valor cuantitativo (área de pico o altura). Los detectores más importantes son:

- **Detector de ionización de llama:**

El detector de ionización de llama, es tal vez el más ampliamente utilizado en cromatografía de gases. Este tipo de detector es en la práctica de respuesta universal, ya que es selectivo hacia los compuestos que presenten enlaces C-H, por lo que son muy pocos los compuestos que no dan señal en él. El efluente de la columna se mezcla con hidrógeno y con aire para luego encenderse eléctricamente. La mayoría de los compuestos orgánicos cuando se pirolizan a la temperatura de una llama de hidrógeno/aire, producen iones y electrones que pueden generar una corriente eléctrica proporcional a la cantidad de muestra que se está quemando. La intensidad de la corriente eléctrica generada se transforma en un dato cuantitativo (área o altura). Este detector como es obvio es insensible al H<sub>2</sub>O, CO<sub>2</sub>, SO<sub>2</sub> y NO<sub>x</sub>.

- **Detector de conductividad térmica.**

Se basa en los cambios en la conductividad térmica de la corriente de gas portador ocasionados por la presencia de las moléculas de analito.

- **Detector termoiónico o de Nitrógeno- Fósforo (N-P):**

Es un detector selectivo de los compuestos orgánicos que contienen fósforo (P) y nitrógeno (N).

- **Detector de captura de electrones.**

En este caso el efluente de la columna pasa sobre un emisor  $\beta$ , como níquel-63 o tritio (adsorbido sobre una lámina de platino o titanio) que emite una corriente de electrones. En ausencia de especies orgánicas, resulta una corriente constante entre un par de electrodos. Sin embargo, la corriente disminuye en presencia de moléculas orgánicas que tiendan a capturar electrones. Este detector es de respuesta selectiva para compuestos con elevada afinidad electrónica siendo sensible a grupos funcionales electronegativos: halógenos (Cl, Br, I), peróxidos, quinonas y grupos nitro.

- **Detector fotométrico de llama o detector de emisión atómica.**

Se ha utilizado extensamente para el análisis de contaminantes del aire y del agua como los pesticidas y los hidrocarburos. Se trata de un detector selectivo que sobre todo es sensible a los compuestos que contienen P y S. En este detector, el eluyente se hace pasar a través de una llama hidrógeno/aire a baja temperatura, la cual convierte parte del fósforo a una especie HPO que emite bandas de radiación centradas alrededor de 510 y 526 nm. El azufre de la muestra se convierte simultáneamente en S<sub>2</sub>, el cual emite una banda centrada en 394 nm.

- **Detector de masas.**

Es el más universal de todos los detectores. Aplica todo lo indicado en la parte inicial de este tema por lo que se omitirá aquí.

## **8.2. ANALISIS CUALITATIVO EN CROMATOGRAFÍA DE GASES. ÍNDICE DE RETENCIÓN**

El índice de retención "I" fue propuesto por primera vez por Kovats en 1958 como un parámetro para caracterizar analitos a partir de los cromatogramas. El índice de retención para un soluto dado puede deducirse del cromatograma de una mezcla del soluto y de al menos dos alcanos normales (de cadena lineal metano, etano, propano, ..., hexano, ... dodecano... etc.) que tengan unos tiempos de retención tales, que el del soluto considerado quede entre los mismos. Los alcanos normales son los patrones en los que se basa la escala de índices de retención. Por definición, el índice de retención para un alcano normal es igual a 100 veces el número de carbonos del compuesto sin considerar el relleno de la columna, la temperatura u otras condiciones cromatográficas. Los índices de retención de un compuesto se deducen por interpolación a partir de un cromatograma de una mezcla del soluto de interés y dos o más alcanos patrón. Es una forma de conocer el comportamiento de un analito referido al comportamiento de la serie de los alcanos

## **9. CROMATOGRAFÍA LIQUIDA**

En ésta, un líquido (fase móvil) circula en íntimo contacto con un sólido u otro líquido inmisible (fase estacionaria); al introducir una mezcla de sustancias (analitos) en la corriente de fase móvil, cada analito avanzará a lo largo del sistema con una velocidad diferente que dependerá de su afinidad por cada una de las fases. Esto supone que después de terminado el recorrido de la muestra por la columna, cada una de las sustancias introducidas en el sistema eluirá con un tiempo diferente, es decir, estarán separadas.

La forma más habitual de clasificación es la realizada en base a la naturaleza de la fase estacionaria, ya que es ésta la que impone fundamentalmente el mecanismo de separación; de este modo, se pueden enumerar cuatro tipos de técnicas:

a) Cromatografía de adsorción (líquido-sólido): La fase estacionaria es un adsorbente y la separación se basa en repetidas etapas de adsorción-desorción.

b) Cromatografía de reparto/adsorción (las dos fases son líquidas; la fase estacionaria consiste en un relleno de sílice al que se encuentra enlazada químicamente una fase líquida C-18, C8 etc.); la separación en este caso se basa en un proceso de reparto o partición del soluto entre la fase móvil y la fase estacionaria (líquida también).

c) Cromatografía de intercambio iónico: Este tipo de cromatografía se da cuando la fase estacionaria presenta en su superficie grupos ionizados capaces de retener selectivamente a iones de signo contrario que circulan en la fase móvil.

d) Cromatografía de exclusión molecular: La fase estacionaria, en este caso, es un material poroso de tamaño de poro controlado, que permite la entrada en sus poros de ciertas moléculas de manera selectiva, dejando fuera otras de mayor tamaño gracias a lo que algunos compuestos de la muestra se retrasan frente a otros.

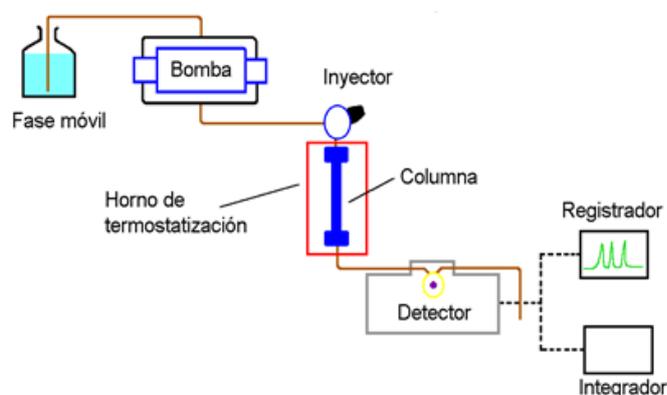
Otra división de los dos primeros tipos de cromatografía atendiendo a polaridad de la fase estacionaria:

a) Cromatografía de fase normal: La fase estacionaria presenta puntos activos de alta polaridad y las interacciones que se producen con el soluto son específicas del grupo activo. La fase estacionaria puede ser un sólido adsorbente (sílice o alúmina), o bien, un soporte (sílice) al que se unen químicamente moléculas orgánicas que presentan grupos funcionales de alta polaridad (ciano -CN, amino -NH<sub>2</sub>, etc.)

b) Cromatografía de fase reversa (inversa): La fase estacionaria tiene una naturaleza apolar (cadenas hidrocarbonadas (C-18, C-8, grupos fenilo, etc.) y las interacciones que se producen son procesos de reparto...; C-18: es una cadena hidrocarbonada de 18 carbonos. C-8: ídem de 8 carbonos.

## 9.1. COMPONENTES DE UN CROMATÓGRAFO LÍQUIDO

Los componentes básicos de un cromatógrafo de líquidos son:



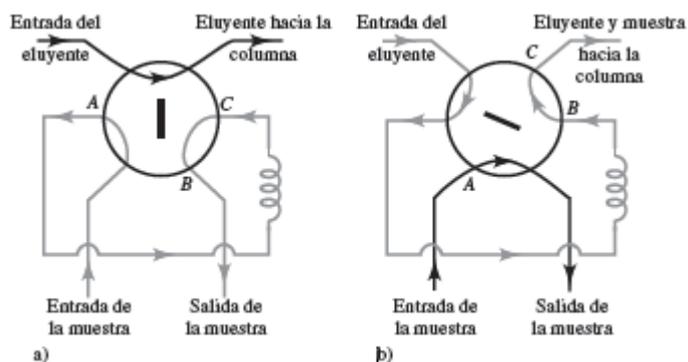
- 1) Bomba o dispositivo de suministro y mezcla de eluyentes.
- 2) Inyector
- 3) Columna
- 4) Detector y
- 5) Sistema de control, recogida y tratamiento de datos.

### 9.1.1. Bomba

La misión de la bomba es la de suministrar un caudal constante de la fase móvil a través de la columna. Habitualmente varía desde los 10  $\mu\text{l}/\text{min}$  hasta los 10  $\text{ml}/\text{min}$  (columnas microbore, analíticas y semipreparativas). En cromatografía de líquidos, es posible trabajar en dos modalidades:

- isocrático, cuando la fase móvil mantiene la misma composición durante la elución. Los componentes de la fase móvil se pueden mezclar bien a alta presión y bien a baja presión.
- en gradiente, cuando la composición de la fase móvil cambia según una función dependiente del tiempo habitualmente lineal. Es decir al principio del cromatograma (tras la inyección) la fase móvil es más rica en uno de los componentes (acuoso) y al final del otro (orgánico)

### 9.1.2. Sistemas de inyección



Existen dos tipos de inyectores manuales: los de jeringa y los de válvula (que son los más utilizados). Este sistema de inyección (figura) consiste en una válvula de seis vías, dos de las cuales están conectadas entre sí por medio de una espira ("loop"). La introducción de la muestra en la columna se lleva a cabo en dos etapas; la primera se

realiza a presión atmosférica, y consiste en cargar la muestra en la válvula con ayuda de una jeringa (a); en la segunda, mediante un giro de la válvula, se hace pasar el eluyente a través de la válvula hacia la columna (b).

### 9.1.3. Columna

La columna es el elemento fundamental de un cromatógrafo de líquidos, puesto que es en ella donde tiene lugar la separación; por lo tanto, resulta fundamental una correcta elección de la columna adecuada para cada separación. Las columnas más utilizadas en cromatografía de líquidos son las de relleno; estas columnas consisten en un tubo, generalmente de acero, relleno de una fase estacionaria adecuada al tipo separación que se pretende llevar a cabo. El diámetro interno varía entre 1 y 5 mm y su longitud varía entre 5 y 30 cm.

Las características de la columna que influyen sobre su capacidad de separación son:

- Diámetro interno
- Longitud
- Relleno
- Tamaño de partícula del relleno

**Diámetro:** La elección del diámetro interno de la columna se realiza en función de la cantidad de muestra a separar. Para las separaciones a escala analítica (algunos microgramos de muestra por inyección) se suelen usar columnas de pequeños diámetros (1 a 6 mm) mientras que en los trabajos a escala preparativa (donde se pretende coleccionar los analitos separados) se superan los 10 mm de diámetro interno.

**Longitud de la columna:** La eficacia de la columna depende, entre otros factores, de la longitud de la columna y, a igualdad de otros parámetros, mayores longitudes de la columna permitirán obtener mayores eficacias (mejores separaciones). Por otra parte, debe tenerse en cuenta que, a mayor longitud de la columna, la presión en cabeza se eleva considerablemente, por lo que hay que alcanzar un compromiso, a la hora de seleccionar la columna, entre eficacia y presión del sistema.

**Relleno:** Las fases estacionarias en cromatografía de líquidos o relleno, están constituidas generalmente por partículas de materiales rígidos o semirrígidos, como la sílice, aunque también es posible encontrar rellenos basados en polímeros sintéticos. Existe una amplia gama de formas, tamaños y diámetros de poro que permiten tener casi una columna específica para cada aplicación analítica.

**Tamaño de partícula:** El tamaño de partícula juega un papel importantísimo en la calidad y eficacia de la separación. Diámetros de partícula menores permitirán obtener una mayor eficacia de la separación. Cuanto menor sea el tamaño de partícula, la presión del sistema se incrementa de forma proporcionalmente inversa al cuadrado del tamaño de la partícula.

Aunque en cromatografía líquida la temperatura no es un factor tan crítico como en gases, hoy día los cromatógrafos suelen disponer de un horno para termostatar la columna (<60 °C). Su objetivo más que aumentar la eficiencia de la separación es mantener las condiciones de la separación constantes entre inyecciones de manera que la separación sea lo más reproducible entre muestras sucesivas.

#### **9.1.4. Detectores**

Un detector para cromatografía es un dispositivo que permite medir, a la salida de la columna, una propiedad física del eluyente, que deberá depender de la composición de éste. La detección en cromatografía se realiza en continuo. Seguidamente se describen los más habituales:

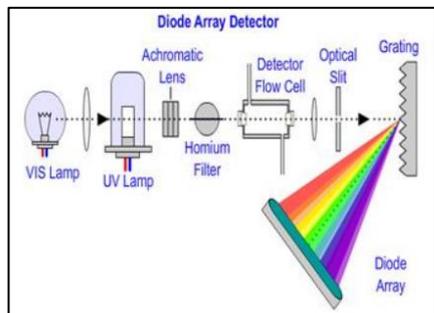
- **Detector de índice de refracción.**

Mide el cambio de índice de refracción cuando aparece la muestra eluida junto con la fase móvil. Resulta obvio que cuanto mayor sea la diferencia entre los índices de refracción de la muestra y de la fase móvil, mayor será el desequilibrio, por tanto, la máxima sensibilidad se obtendrá cuando exista una diferencia máxima entre los respectivos índices de refracción. Se han empleado en la determinación de azúcares.

- **Detectores de ultravioleta/visible**

Cuando se hace pasar una radiación electromagnética a través de compuestos que presentan determinados grupos funcionales, éstos experimentan una excitación electrónica a causa de la absorción de energía, a una longitud de onda que será específica para cada grupo funcional. La absorción de energía, se traduce en una disminución de la intensidad del haz luminoso que se ha hecho pasar a través de la muestra. En los detectores de absorción ultravioleta, la línea de base representa la máxima transmisión de luz, y cualquier desviación de ella indicará pérdida o absorción de radiación. La mayoría de los compuestos orgánicos pueden analizarse por cromatografía líquida. El 65 % de las muestras analizadas por cromatografía presentan alguna absorción en la zona de 254 nm y más del 90% absorben en algún punto del espectro que cubren los algo más sofisticados detectores de longitud de onda variable. Este hecho, junto con la relativa sencillez de su manejo, hace que el detector de UV sea el más útil y el más ampliamente utilizado de los detectores en cromatografía líquida. Existen varios tipos:

- a) Detectores de longitud de onda fija: La fuente luminosa emite la mayor parte de la energía a una longitud de onda fija de 253,7 nm ya que la mayoría de los compuestos que absorben en UV presentan cierta absorción esta longitud de onda. Hoy en día están casi en desuso.
- b) Detectores de longitud de onda variable: En estos detectores, se puede cambiar la longitud de onda de medida mientras que en otros puede programarse la longitud de onda de trabajo en función del tiempo; esto permite trabajar a diferentes longitudes de onda.



- c) Detector de diodos: La base del funcionamiento de los espectrofotómetros de matriz de diodos es simple; el haz de radiación que ha atravesado una cubeta de flujo continuo, a través de la que circula la fase móvil procedente de la columna cromatográfica, es dispersado por medio de una red de difracción fija, siendo recogidas simultáneamente todas las longitudes de onda dispersadas mediante una matriz

de fotodiodos (figura).

- d) Detectores de fluorescencia: El fenómeno de fluorescencia tiene lugar cuando compuestos que poseen determinados grupos funcionales específicos, se excitan con la energía de ciertas longitudes de onda y emiten radiación de mayor longitud de onda que la absorbida. En fluorescencia, la radiación emitida se mide normalmente en dirección perpendicular a la de incidencia del haz de excitación (con objeto de evitar interferencias). Los detectores de fluorescencia representan el tercer tipo de detectores más comúnmente utilizados en la moderna cromatografía líquida. Se emplea para los compuestos que presentan fluorescencia natural, así como para los que pueden convertirse en fluorescentes por medio de una reacción de derivatización simple. La detección por fluorescencia es más sensible que la de UV-Vis.

- **Detector electroquímico.**

Este tipo de detectores, están basados en la oxidación del analito eluido mediante un electrodo adecuado, registrándose la intensidad de la corriente generada que será proporcional a la cantidad de muestra que pasa por el detector.

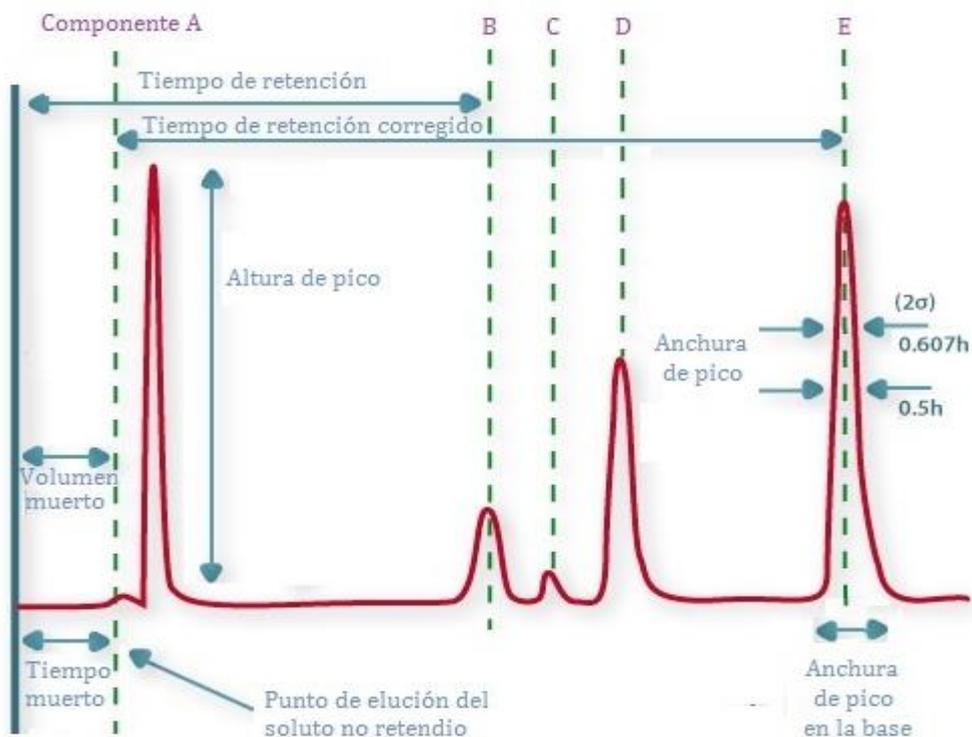
- **Detector de conductividad electrolítica:**

En los detectores de conductividad electrolítica se mide de manera continua la conductividad de la fase móvil que eluye de la columna, indicándose la presencia de un analito por medio de un cambio en la conductividad.

- **Detector de masas.**

Es el más universal y más ampliamente usado hoy día (aplica todo lo indicado en la primera parte de este tema)

## 10. PARÁMETROS DE INTERÉS EN CROMATOGRAFÍA



**Tiempo de retención ( $t_r$ ):** Tiempo que tarda en salir de la columna (eluir) un analito.

**Tiempo muerto ( $t_0$ ):** Tiempo que tarda en eluir un analito no retenido. Equivalente al volumen muerto de la columna

**Tiempo de retención corregido ( $t_r'$ ):** Diferencia entre el tiempo de retención de un analito y el tiempo muerto:

$$t_r' = t_A - t_0$$

**Altura (o Área) de pico:** Medida de la respuesta instrumental proporcional a la concentración del analito. A mayor concentración mayor altura (área)

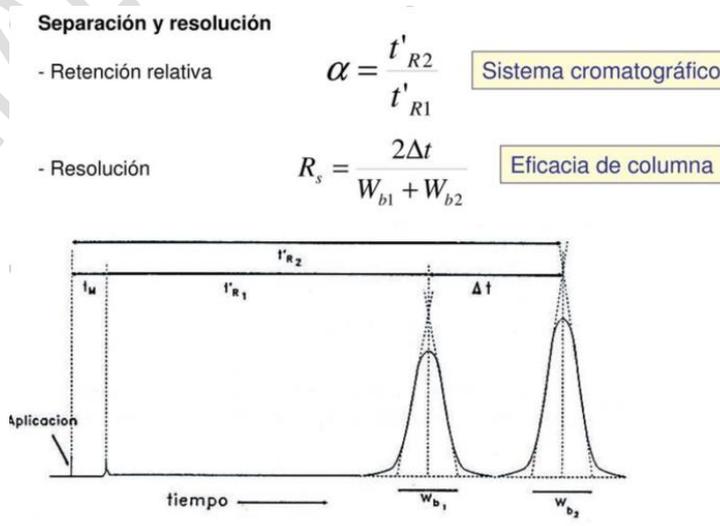
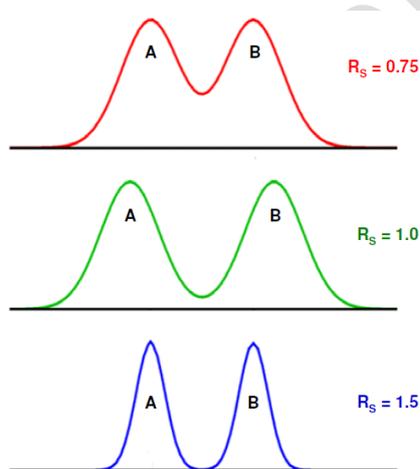
**Anchura de pico:** Grado de dispersión en la fase móvil del analito tras su paso por la columna. A mayor tiempo de paso (mayor retención) mayor ensanchamiento de banda (pico). Este parámetro se relaciona con la eficiencia de la separación (columna).

**Factor de capacidad (o factor de retención) (K):** El factor de retención mide la relación entre  $K = \left(\frac{t_A - t_0}{t_0}\right)$

el tiempo que las moléculas del analito están en la fase estacionaria y el que están en la fase móvil. Se usa para comparar las velocidades de migración de los solutos, y no depende de la forma de la columna o de la velocidad de flujo de la fase móvil. Lo ideal es que el valor de los factores de retención de los solutos de una muestra oscile entre 1 y 10. Valores mucho menores que la unidad indican que el analito sale de la columna en un tiempo próximo al tiempo muerto. Valores mucho mayores indican un tiempo de elución excesivamente largo.

$$R_s = \frac{t_{R2} - t_{R1}}{\frac{1}{2}(W_2 + W_1)}$$

**Resolución (Rs):** es el grado de separación de dos picos adyacentes se define como el incremento de tiempo entre los picos ( $t_2 - t_1$ ) dividido entre el ancho promedio de los mismos  $(W_2 + W_1)/2$ . Se considera que dos picos están bien resueltos (separados) cuando  $R_s > 1,5$ .



**Selectividad ( $\alpha$ )** (adimensional): Determina la separación entre picos y representa una relación de la retención relativa de dos compuestos que eluyen uno a continuación del otro. Un valor de igual a 1 representa tiempos de retención iguales y por lo tanto no existe separación. Un número más grande representa una columna más selectiva. Cuanto más alejado de "1", mayor separación entre los dos picos involucrados.

$$\alpha = \frac{t'_B}{t'_A}$$

## **11. METODOLOGÍA DE TRABAJO EN CROMATOGRAFÍA**

La metodología de trabajo habitual en cromatografía para el análisis de muestras desconocidas es la realización de una calibración mediante la preparación de patrones a diferentes concentraciones; establecimiento de la función de calibrado (área o altura) = a + b conc.) y posterior interpolación sobre dicha función de las muestras desconocidas para hallar su concentración. Sin embargo, se pueden obtener resultados más precisos incorporando una cantidad fija de una sustancia estándar interno tanto en las muestras como en los patrones. La relación de la intensidad de pico de las especies de analito y los estándares internos se representa entonces en función de la concentración de analito. El estándar interno tiende a reducir las imprecisiones que surgen de la manipulación, preparación e introducción (inyección) de la muestra en el sistema cromatográfico.

## **BIBLIOGRAFÍA**

Fundamentos de Química Analítica. Skoog, West y Holler. 4ª Edición.

Principios de análisis instrumental. Skoog Holler Crouch 7ª Ed. Cengage Learning

Espectrometría de masas. J. Seibl Editorial Alhambra, Barcelona, 1973

Mass spectrometry: a textbook. Jurgen H. Gross Ed. Springer

Técnicas analíticas de separación. M. Valcarcel Cases, A. Gómez Hens Ed. Reverté 1988

Espectroscopia ultraviolet-visible

[https://es.wikipedia.org/wiki/Espectroscopia\\_ultravioleta-visible](https://es.wikipedia.org/wiki/Espectroscopia_ultravioleta-visible)

MATERIAL NO OFICIAL

**MATERIAL PARA LA PREPARACIÓN DEL TEMA 21**

**VIROLOGÍA: MÉTODOS DE AISLAMIENTO Y CRECIMIENTO DE VIRUS.  
APLICACIONES EN LABORATORIOS DE SANIDAD Y GENÉTICA ANIMAL.**

*Este material no tiene carácter oficial, por lo que en ningún caso vinculará al Tribunal Calificador. Constituye, únicamente, un instrumento complementario que servirá de apoyo al opositor para enfocar cada uno de los epígrafes, pero nunca de forma exclusiva ni excluyente. El Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación no se hace responsable del contenido del mismo.*

*Los materiales no serán objeto de actualización constante.*

## **ÍNDICE**

### **1. VIROLOGÍA: MÉTODOS DE AISLAMIENTO Y CRECIMIENTO DE VIRUS.**

#### 1.1. INTRODUCCIÓN

#### 1.2. AISLAMIENTO EN ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN

#### 1.3. AISLAMIENTO EN HUEVOS EMBRIONADOS

##### 1.3.1. Vías de inoculación en embrión de pollo

#### 1.4. AISLAMIENTO EN CULTIVOS CELULARES

##### 1.4.1 Pasos a seguir para el aislamiento de virus en cultivos celulares

### **2. APLICACIONES EN LABORATORIOS DE SANIDAD Y GENÉTICA ANIMAL**

MATERIAL NO OFICIAL

## **1. VIROLOGÍA: MÉTODOS DE AISLAMIENTO Y CRECIMIENTO DE VIRUS. APLICACIONES EN LABORATORIOS DE SANIDAD Y GENÉTICA ANIMAL.**

### **1.1. INTRODUCCIÓN**

Los virus son la causa más frecuente de las enfermedades infecciosas en animales. Los virus son parásitos intracelulares que necesitan células vivas para propagarse. La detección e identificación de un agente es una prueba confirmativa de infección o enfermedad por un agente patógeno determinado. Existen muchos métodos analíticos directos e indirectos distintos, nos vamos a centrar en este tema en el aislamiento y crecimiento de los virus.

Los virus, a diferencia de los que sucede con la mayoría de las bacterias, hongos y protozoos, sólo pueden multiplicarse en el interior de células vivas, no pudiendo hacerlo en un medio nutritivo carente de células.

Los sistemas celulares utilizados para propagar los virus en el laboratorio a partir de tejidos, secreciones y/o excreciones son:

#### **Sistemas *In Vivo*:**

- Hospedador natural
- Otros hospedadores (animales de experimentación o de laboratorio)
- Huevos embrionados

#### **Sistemas *In Vitro*:**

- Cultivos celulares

El aislamiento depende en gran medida del tiempo que haya transcurrido desde que empezaron los signos clínicos, de la patogenia de la enfermedad y la concentración del agente patógeno en ciertos tejidos y/o líquidos. Por tanto, el éxito del diagnóstico dependerá del momento en que se tomen las muestras y del tipo de muestras que se obtengan (tejidos/lesiones afectados, raspados, hisopos, sangre y otros líquidos corporales), así como de las condiciones de almacenamiento y de la integridad de la muestra durante el transporte.

Para ciertas aplicaciones, puede ser adecuado analizar animales y/o muestras específicos (por ejemplo, para pruebas confirmativas), mientras que para otros propósitos (por ejemplo, el cribado), puede resultar eficiente y efectivo combinar las muestras de varios animales. La elección de la muestra adecuada exige un buen conocimiento de la enfermedad y del efecto de la matriz de la muestra en el agente patógeno (por ejemplo, hisopos cloacales o traqueales en el caso de la influenza aviar).

Las pruebas de detección de ácido nucleico (PCR) están sustituyendo cada vez más a los sistemas clásicos de aislamiento y detección de antígeno.

Para el aislamiento de virus se han utilizado:

## 1.2. AISLAMIENTO EN ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN

La inoculación de virus en los animales de experimentación puede producir una enfermedad con lesiones características, que se puede transmitir en serie, y es el método más antiguo para aislar y conservar el virus. Los animales se utilizan en investigaciones experimentales sobre virus oncógenos, para conocer la patogenia e inmunidad de las virosis y para la obtención de antisueros.

Es una técnica poco empleada por las dificultades de mantener un animalario, la laboriosidad de la inoculación y el peligro de difusión del virus con las excretas de los animales. Se emplea únicamente cuando se trata de propagar virus cuya replicación en los otros sistemas – embriones o cultivos celulares– no es posible.

Los animales más utilizados para este fin son los monos, las cobayas, los ratones lactantes, hámster, hurones, conejos y el pez cebra, que se utilizan esporádicamente para el aislamiento de un número limitado de virus y en general en laboratorios de investigación. También se pueden utilizar conejos, en el caso de mixomatosis y enfermedad Hemorrágica del conejo, que son el hospedador natural.

Las vías de inoculación más habituales son subcutánea, intramuscular, intraperitoneal, intracerebral e intranasal.

Tras inocular al animal con la suspensión de virus se observa diariamente para ver si aparecen signos de la enfermedad y/o lesiones visibles o incluso. Tras la muerte o la finalización del experimento, se examinan los tejidos infectados y las lesiones histopatológicas en busca de virus o sus consecuencias.

Se puede emplear la inoculación solo para el aislamiento primario de un virus o para virus difíciles o no posibles de cultivar en otros medios.

Para que los resultados obtenidos tengan significación científica es imprescindible disponer de animales perfectamente estandarizados tanto desde el punto de vista microbiológico (animales denominados SPF o libre de patógenos específicos) como desde el punto de vista genética. Solamente de esta manera obtendremos resultados reproducibles.

Por ejemplo, en el caso de la **Mixomatosis** cuando sea estrictamente necesario como es caracterizar la patogenicidad (el grado de virulencia, y si se trata de una forma clásica o amixomatosa) o para distinguir entre el VFC (Virus del Fibroma del Conejo) y el VMIX (Virus del Mixoma). El inóculo puede ser el líquido sobrenadante de una lesión homogeneizada (con antibióticos) o el producto de un cultivo celular. Aparecerá una lesión primaria en los puntos de inoculación a los 2–5 días, seguida de conjuntivitis. Si el animal sobrevive, la enfermedad puede confirmarse serológicamente pasados 15 días.

**En el caso de la EHC (Enfermedad Hemorrágica del conejo)** no se ha podido establecer ningún sistema eficiente de replicación in-vitro tanto para el VEHC ni el VSLPE (Virus del Síndrome de

la Liebre Parda Europea); por tanto, la inoculación en conejo sigue siendo la única forma de aislar, propagar y titular la infectividad del VEHC.

La EHC puede reproducirse utilizando suspensiones de hígado filtradas y tratadas con antibiótico, inoculadas por vía intramuscular, intravenosa u oronasal. Cuando la enfermedad es clínicamente evidente, los signos y lesiones halladas post-mortem son similares a los descritos en los casos de infección natural. Los animales que superan la enfermedad presentan una llamativa seroconversión que puede detectarse fácilmente a los 3–4 días post-infección.

Otro ejemplo sería el aislamiento del virus de la rabia en ratones lactantes de 3-4 días de edad. Estos animales, al no tener aún definido su sistema inmune, son más sensibles a la multiplicación del virus en sus tejidos. La confirmación de la multiplicación y aislamiento del virus se realiza por medio de inmunotinción o de PCR.

En la últimas décadas, la sociedad ha demandado un mayor transparencia en el uso de animales con fines experimentales. Como respuesta, las Administraciones Públicas han elaborado un marco normativo que regula todas las actuaciones relacionadas con el uso de animales de experimentación. El principio de las 3R's, de Reemplazo, Reducción y Refinamiento constituye el pilar sobre el que se debe fundamentar la experimentación animal. Por esta razón, estos métodos de aislamiento vírico están siendo sustituidos por métodos alternativos in vitro que proporcionan resultados válidos cumpliendo con los objetivos previstos.

### **1.3. AISLAMIENTO EN HUEVOS EMBRIONADOS**

Los huevos embrionados de aves son un valioso medio para el cultivo de virus, ya que son una fuente rica de células vivas, además de ofrecer una variedad de tejidos en los cuales el virus puede replicarse de acuerdo con su tropismo. Su bajo coste, la facilidad de manejo sin necesidad de equipo especializado o costoso, además de la presencia del cascarón que lo mantiene libre de contaminación externa, es un método conveniente para producir y mantener virus y para producir vacunas.

Las granjas productoras de huevo fértil deben poseer medidas de manejo y alimentación adecuadas que garanticen la viabilidad y resistencia del embrión. De preferencia deben obtenerse embriones libres de patógenos específicos (SPF), en caso de no ser así utilizar embriones de granjas libres de infecciones que puedan tener una transmisión vertical, sobre todo cuando se requiere cultivar virus aviares. Asimismo, deben proceder de granjas donde no vacunen contra antígenos iguales o relacionados con los virus en estudio, ya que los anticuerpos maternos encontrados en el saco vitelino pueden interferir en la réplica viral. A parte de los huevos embrionados de gallina se pueden utilizar huevos embrionados de otras especies como pato, pavo y codorniz.

Los virus pueden propagarse en las membranas extraembrionarias o en el propio embrión. El método de inoculación y la edad del embrión que se emplea, dependen del virus problema. Para comprobar si los huevos están embrionados o no se deben mirar al ovoscopio. Si están embrionados se marca la cámara de aire y el lugar donde está situado el embrión. La inoculación se efectúa mediante jeringa con aguja, a través de la membrana de la cáscara.

### **1.3.1. Vías de inoculación en embrión de pollo**

#### **- Membrana corioalantoidea:**

Para esta vía se utilizan embriones de 10 –12 días de edad, el volumen de inoculación es de 0.1 a 0.5 ml. La membrana corioalantoidea funciona como un órgano respiratorio y se encuentra muy vascularizada. Es apropiada para el cultivo de virus que provocan focos o pústulas fácilmente visible como el virus de la viruela aviar, laringotraqueítis aviar, influenza y en general los epiteliotropos. El virus de la Mixomatosis y el del Fibroma del Conejo pueden cultivarse también en la membrana corioalantoidea.

#### **- Cavity alantoidea:**

Para inocular esta vía se utilizan embriones de pollo de 9 a 12 días de edad, el volumen de inoculación es de 0,1 a 0,2 ml. Los virus que se replican en la CA son los virus de Newcastle, Influenza y Bronquitis infecciosa. Esta vía tiene la ventaja de la simplicidad de su técnica de inoculación y la facilidad de cosecha del líquido alantoideo, que resulta de gran utilidad cuando se necesitan preparar grandes cantidades de antígenos.

#### **- Cavity amniótica:**

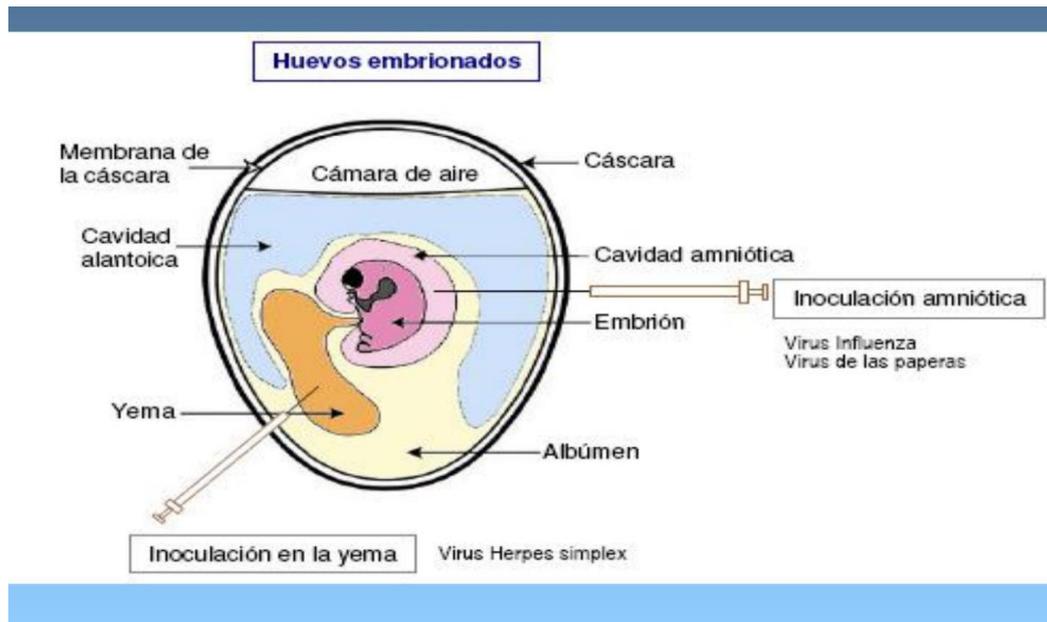
Para esta vía de inoculación se pueden emplear embriones de 7 a 15 días de edad, el volumen de inoculación es de 0,1 a 0,2 ml. La edad de los embriones depende del tipo de virus que se quiera replicar. Los virus de replicación lenta se benefician con la prolongación del período de incubación de los embriones.

#### **- Saco vitelino:**

Se emplean embriones de 5 a 8 días de edad, el volumen de inoculación es de 0,1 a 1,0 ml. El saco vitelino está formado por una membrana de células en constante crecimiento. A partir del día 12, el vitelo se deseca progresivamente y aumenta al mismo tiempo la fragilidad de la membrana. Durante las últimas 24 a 48 horas, el saco vitelino queda incluido en la cavidad abdominal. Se pueden replicar por esta vía el virus de la Bursitis Infecciosa, de la enfermedad de Marek, de la Encefalomiелitis aviar, de la Artritis aviar y las Clamidias.

#### **-Vía Intravascular o intravenosa:**

Se utilizan embriones de 9-12 días de edad y se inocular 0,1 ml por vía intravascular. Este proceso requiere pericia y práctica. Esta ruta se emplea para el aislamiento del virus de la lengua azul.



En todas las vías de inoculación los huevos se incuban en una cámara húmeda y la temperatura depende del tipo de microorganismo, por ejemplo 32–33,5°C el virus de la lengua azul, entre 35°C-37°C, la mayoría de los virus. En el caso de clamidias se incuban a 39°C.

Se observan diariamente al trasluz con el ovoscopio. Cualquier muerte embrionaria ocurrida en las primeras 24 horas post-inoculación se considera inespecífica. Los embriones que mueren entre los días 2 - 7 días y los que siguen vivos a los 7 días se enfrían a 4°C toda la noche antes de la recolección. Según la vía de inoculación se recoge el líquido alantoideo, amniótico, la membrana corioalantoidea, el saco vitelino o el embrión completo para realizar un macerado.

El crecimiento del virus se manifiesta por la muerte del embrión o presentar un aspecto hemorrágico; o bien, por la producción de hemaglutininas (en el caso de virus Influenza, virus de la Enfermedad de Newcastle, Bronquitis infecciosa aviar).

Si el primer pase es negativo deben realizarse hasta dos pases más en huevo embrionado.

En la actualidad ha quedado limitado al cultivo de los poxvirus y sobre todo, del virus de la gripe tanto para su aislamiento como para la producción de vacunas.

#### 1.4. AISLAMIENTO EN CULTIVOS CELULARES

El uso de técnicas de cultivo celular para la detección de virus permitió la reducción significativa del uso de animales de laboratorio. Los cultivos celulares se desarrollan a partir de muestras de tejido que son disgregadas por métodos mecánicos, químicos y enzimáticos para conseguir células apropiadas para el aislamiento de virus.

El crecimiento de células animales en medios artificiales favorables permite detectar la presencia de virus por cambios en las propiedades de las células y en ocasiones por la muerte celular.

Constituyen el método de elección para el desarrollo de la mayoría de virus y se utilizan para aislar e identificar virus en muestras clínicas, determinar su estructura, su replicación y su patogenicidad.

Los cultivos celulares son el producto de la colección de células animales de diferentes órganos, colocadas en condiciones especiales propicias para su sobrevivencia y multiplicación, manteniendo para esto todas sus funciones metabólicas de una manera semejante a las que tenía en el huésped.

Se entiende por **cultivo celular** al conjunto de técnicas que permiten el mantenimiento de células "*in vitro*", manteniendo al máximo sus propiedades fisiológicas, bioquímicas y genéticas. Debemos diferenciarlo de **cultivo de tejidos** que hace referencia al conjunto de técnicas que permiten la extracción de un órgano, tejido o grupo de células de su ubicación, para mantenerlo en un ambiente artificial y promover su crecimiento.

Cultivo de **Células**: Es el crecimiento *in vitro* de células no organizadas en tejidos, incluyendo el cultivo de células individuales, se han clasificado de acuerdo a su capacidad de anclaje (adherencia), y así han sido aisladas recientemente de un órgano determinado o si provienen de células que han sufrido modificación.

De acuerdo a su capacidad de adherencia o no a una superficie determinada pueden crecer formando monocapa (las células se adhieren al sustrato, creciendo y dividiéndose en una única capa celular) o en suspensión (Las células se multiplican en medio líquido sin adherirse a ningún sustrato), lo que está muy asociado con el tipo de célula de la cual derivan; por lo general; las células provenientes de órganos, crecen en monocapa; igualmente existen células que pueden crecer indistintamente tanto en monocapa como en suspensión, ejemplo son las células HeLa que son células transformadas derivadas de cultivos en monocapa.

Cuando el cultivo proviene de células que han sido disgregadas de un tejido original tomado de un órgano de un animal recién sacrificado, reciben el nombre de **Cultivo Primario**; cuando éste cultivo primario es sometido a procesos de transformación que le confiere capacidad ilimitada de multiplicación, reciben el nombre de **Líneas Celulares**.

**La Línea celular continua o estable** no tiene senescencia y crece indefinidamente. Son subcultivos y selección de cultivos secundarios, que sufren un proceso de transformación de forma espontánea o inducida. También se pueden originar a partir de tejidos tumorales.

Ejemplos de líneas celulares continuas:

- Células Hela (primera línea celular continua),
- Células de mamífero (VERO, BHK21),
- Células de peces (RTG, BF-2).
- BHK (Baby Hamster Kidney),
- VERO (African Green Monkey Kidney)

### **1.4.1 Pasos a seguir para el aislamiento de virus en cultivos celulares**

Para la preparación de los cultivos celulares, las células se obtienen de un fragmento de un órgano como el riñón, el pulmón, el hígado etc. que por trituración y posterior disgregación con tripsina, permite obtener células aisladas que se introducen en frascos con medios de cultivo adecuados. Los cultivos celulares, por tanto, están formados por células disgregadas que han perdido su organización tisular, a diferencia de los cultivos de tejidos u órganos en que se conserva esa estructura.

Como hemos dicho, las células en los frascos pueden estar en suspensión, es decir, libres en el medio de cultivo líquido o adosado a la pared del frasco. En el primer caso se trata de células en suspensión y en el segundo en monocapa.

En los laboratorios de Sanidad y Genética Animal para el diagnóstico de enfermedades se utilizan normalmente líneas celulares estables en monocapa.

Según el virus que se pretende aislar se utiliza uno u otro sistema celular.

#### **Toma de muestras**

Para el aislamiento de virus en cultivo celular, es fundamental conocer la patogenia de la enfermedad para seleccionar las muestras de tejidos, secreciones y/o excreciones que pueden contener el virus.

Por ejemplo, sangre EDTA en Orbivirus, heces para la Enfermedad vesicular porcina, cañón de pluma para Flavivirus, suero en las pestes, párpado para mixomatosis, ganglios, pulmón y encéfalo para Aujeszky, pulmón y ganglios para IBR.

#### **Preparación de las muestras**

Se prepara un homogeneizado de los tejidos con un stomacher o un magnalyser a la dilución 1:9 (1 gramo de tejido/ 9ml de PBS). Se clarifica por centrifugación, se recoge el sobrenadante, se filtra (0,45 µm - 0,22µm) y se añaden antibióticos para evitar la contaminación bacteriana.

En el caso de sangre con EDTA, que es la muestra de elección para aislar orbivirus, que se encuentran adheridos a las membranas de los eritrocitos; por lo cual; hay que romper estas células y recuperar el virus de las membranas, bien por ósmosis (utilizando agua estéril) o por sonicación.

#### **Inoculación de los cultivos celulares, adsorción y propagación**

El día previo a la infección se preparan los frascos con las células.

El día de la inoculación:

- Retirar **el medio** del cultivo
- Lavar **el cultivo** para eliminar restos de SFB (suero fetal bovino)

- Depositar **el inóculo**. Se usa un volumen pequeño para favorecer las probabilidades de unión virus-célula. La inoculación se realiza con el material concentrado y también puede ser diluido (1/10, 1/100) para evitar posibles citotoxicidades del inóculo.
- Incubar **durante 1–2h** en la condiciones establecidas para que se produzca la **adsorción**.
- Retirar el inóculo y añadir el volumen final de medio de cultivo según el tipo de recipiente usado suplementado con SFBI (suero fetal bovino inactivado).

Es fundamental llevar a cabo todo el procedimiento de forma estéril para impedir la contaminación de los cultivos.

- Incubar según las condiciones establecidas de la línea celular, para que se produzca la **proliferación** que engloba la penetración del virus en la célula, ensamblaje y maduración.

La última fase de salida que es el **reconocimiento de crecimiento viral** en el cultivo. Es el denominado Efecto Citopático (ECP) que son cambios morfológicos inducidos en células individuales o en grupos de células, producidos por la infección del virus, fácilmente reconocible al microscopio. También pueden aparecer cuerpos de inclusión intracitoplasmáticos y finalmente la lisis celular.

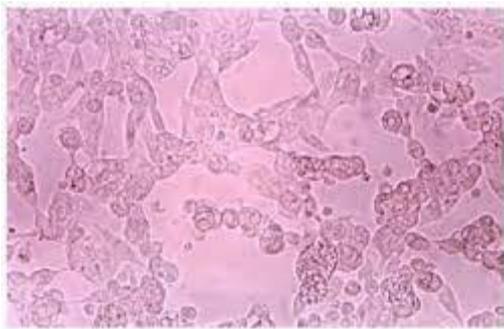


Figura 3. Efecto citopático del IBR en células MDBK, transcurridas 24 horas de la inoculación.

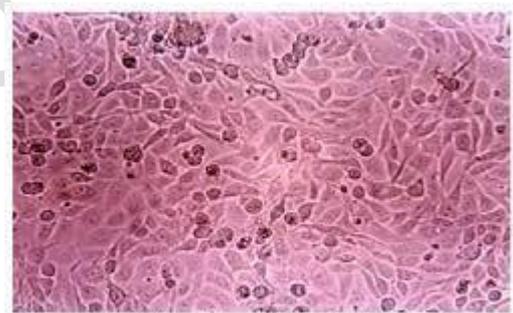


Figura 1. Cultivo celular confluyente de MDBK, antes de inoculación con las muestras sospechosas al virus HVB-1.

No todos los virus causan ECP como ocurre con el Virus de la Peste Porcina Clásica.

Hay otras técnicas para poner en evidencia la existencia de replicación viral en el cultivo o identificar el virus: La detección del desarrollo del virus puede reconocerse por las siguientes manifestaciones:

- **Hemadsorción (HAD)**. La prueba de la hemadsorción (HAD) está basada en el hecho de que los eritrocitos porcinos se adhieren a la superficie de los monocitos o macrófagos porcinos que están infectados por el VPPA, y que la mayoría de cepas del virus tienen un fenotipo HAD. Un resultado positivo en las pruebas HAD es definitivo para el diagnóstico de la PPA. Se ha aislado un pequeño número de virus “no hemadsorbentes”, en gran parte atenuados o avirulentos, aunque algunos producen PPA aguda típica. La prueba se realiza inoculando sangre o una suspensión de tejidos de animales sospechosos a cultivos primarios de leucocitos preparados a partir de sangre de cerdos nunca antes infectados o en cultivos celulares de macrófagos alveolares.

- **Marcado inmunológico.** Usar un anticuerpo marcado con **peroxidasa** que se una de forma específica a alguna proteína vírica presente en la membrana de las células infectadas (ej. Pestivirus) o por **Inmunofluorescencia** empleando un suero inmune marcado con una sustancia fluorescente.
- **Neutralización.** Se utiliza con antisueros específicos del virus; por ejemplo, en Orbivirus usando anticuerpos específicos de los diferentes serotipos del virus. Además de confirmar, sirve para tipar.
- **PCR cuantitativa.** Para cualquier virus. El valor de Ct entre la muestra y los sucesivos pases debe disminuir o mantenerse.

Hay cepas salvajes de algunos virus que normalmente son citolíticos, que infectan las células, pero no las lisan. Por otra parte, puede haber ECP y deberse a otro virus.

#### **Ventajas de los cultivos celulares:**

- Aumenta la cantidad de patógeno.
- Permite disponer del virus infeccioso para estudios de caracterización (biológica, genética, antigénica).
- Permite la detección de diferentes virus.

#### **Desventajas de los cultivos celulares:**

- Requiere instalaciones especiales en función del patógeno.
- Tiempo requerido para la detección es prolongado.
- Laboriosa.
- Relativamente limitado rango de virus pueden ser aislados en cultivo celular.

### **3. APLICACIONES EN LABORATORIOS DE SANIDAD Y GENÉTICA ANIMAL.**

Son numerosas las aplicaciones de los sistemas de aislamiento y crecimiento vírico en el ámbito de la Sanidad y genética animal:

- Aislamiento de Lyssavirus por inoculación intracraneal en ratones.
- Aislamiento viral en huevos embrionados de gallina en caso de un brote de:
  - Influenza Aviar
  - Enfermedad de Newcastle
  - Lengua Azul
- El aislamiento viral *in vitro* en cultivos celulares:

**Lengua Azul:** El aislamiento del virus se logra mejor mediante aislamiento primario (o amplificación) del virus en HGE, seguido de un pase por cultivo de células del clon C6/36 derivado del insecto *Aedes albopictus* (AA) o aislamiento primario en células derivadas de *Culicoides sonorensis* (libre de virus de lengua azul) y designadas KC o CuVa.

A continuación, estos dos pasos de amplificación van seguidos de un pase por líneas celulares de mamífero, como las de riñón de cría de hámster (BHK 21) o las de riñón de mono verde africano (Vero). Los pases por BHK21 y Vero permitirán una mayor replicación del virus y una confirmación visual del aislamiento del virus debido al efecto citopático (ECP). Ha habido ocasiones en las que no se ha observado ECP en línea celular de mamífero, pero en las que sí se ha visualizado el antígeno de lengua azul al teñir por inmunofluorescencia directa.

**IBR:** Resultan adecuadas las células primarias o secundarias de riñón, de pulmón o de testículos bovinos, las cepas celulares derivadas de pulmón fetal bovino, de cornetes nasales o de tráquea, y las líneas celulares establecidas, como la línea celular Madin–Darby de riñón bovino (MDBK) que es la que se utiliza en el laboratorio Central de Veterinaria.

**Fiebre del Nilo Occidental:** Las muestras para el aislamiento del virus incluyen el encéfalo y la médula espinal de caballos encefalíticos que hayan muerto, varios tejidos de las aves, como el corazón, el encéfalo o el hígado. Los virus pueden propagarse en cultivos celulares susceptibles, tales como riñón de conejo (RK-13) y células de riñón de mono verde africano (Vero), células de riñón de hámster neonato (BHK-21) o células de riñón de cerdo. Puede necesitarse más de un pase en cultivos celulares para observar el efecto citopático (EC). La confirmación del aislamiento de cepas de VNO se logra mediante tinción indirecta con anticuerpos fluorescentes de cultivos infectados o mediante métodos de detección del ácido nucleico.

**Fiebre del Valle del Rift.** Para el cultivo del virus de la FVR pueden utilizarse varias líneas celulares en monocapa, entre las que se incluyen células de riñón de mono verde africano (Vero), de riñón de hámster neonato (BHK), y células de mosquito AP61 (Digoutte et al., 1989).

Las muestras de elección para diagnóstico son: sangre completa no coagulada extraída de animales enfermos durante la fase febril de la enfermedad, así como bazo, pulmón y ganglios linfáticos de los que hayan muerto.

**Fiebre aftosa.** Los sistemas de cultivos celulares sensibles incluyen células primarias de tiroides bovino (de ternera), y células primarias de riñón de cerdo, ternero o cordero. También se pueden utilizar líneas celulares establecidas, como la BHK-21 (de riñón de hámster lactante) o la IB-RS-2.

**PPA.** se realiza la prueba de la hemadsorción (HAD)

**PPC.** El aislamiento del virus en cultivos celulares es un método más sensible pero más lento de diagnóstico de la PPC que la inmunofluorescencia con cortes congelados. Pueden utilizarse preparaciones de órganos, preparaciones de leucocitos o muestras de sangre total. El aislamiento se realiza en células PK-15. También pueden utilizarse otras líneas de células porcinas, pero debe demostrarse que son al menos tan sensibles como las células PK-15 para el aislamiento del VPC, y deben estar libres tanto de pestivirus como de anticuerpos contra pestivirus. En general, resulta ventajoso utilizar más de una línea de células porcinas para la inoculación, con el fin de aumentar la probabilidad de un resultado positivo. Dado que el cultivo del virus no causa un efecto citopático, su presencia debe constatarse mediante **inmunotinción**, que puede llevarse a cabo tras uno o dos pases del virus. Ello puede realizarse

comprobando si los cultivos presentan focos de fluorescencia, mediante FAT pasadas 24–72 horas, o bien mediante tinción con **inmunoperoxidasa** después de 3–4 días de incubación.

El tejido de las amígdalas es el más adecuado para el aislamiento del virus de cerdos que han muerto o han sido sacrificados con fines de diagnóstico. Como alternativa, también puede utilizarse bazo, riñón, íleon o ganglios linfáticos, o bien añadir estas muestras a las de amígdala. El suero fetal bovino (FBS) que se utilice en cualquier prueba de diagnóstico siempre debe estar libre de pestivirus y de anticuerpos contra pestivirus.

**Enfermedad vesicular porcina** se inocula una porción de la suspensión epitelial en monocapas de células IB-RS-2 u otras líneas celulares porcinas susceptibles. Para el diagnóstico diferencial (por ejemplo, la fiebre aftosa) se emplearán en paralelo sistemas de cultivos celulares bovinos. Por lo general, el virus de la EVP crece solamente en células de origen porcino.

**Enfermedad de Aujeszky** se emplean líneas celulares de riñón de cerdo (PK-15 o SK6). Se requieren hisopos buco-faríngeos, nasales o amígdalas de animales vivos y para el aislamiento post-mortem el ganglio trigémico es el más apropiado para aislar el virus.

**Mixomatosis** se realiza utilizando cultivos primarios de células de riñón de conejo (RK), o líneas celulares establecidas, como la RK-13, o bien, otras líneas celulares de mamífero, como Vero (riñón de mono verde africano).

## **BIBLIOGRAFÍA**

Manual de pruebas diagnósticas y vacunas para los animales terrestres y acuáticos.  
[www.oie.int](http://www.oie.int)

Página WEB del MAPA (Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación)  
[www.mapa.es](http://www.mapa.es)

OIE/FAO international reference laboratory for AI and ND Virus Isolation - Procedure for extraction of samples from Avian carcasses for Virus IsolationDetection / Isolation. APHA-RU

-Cultivos celulares como alternativa para el aislamiento y la producción de biológicos contra el Virus de Influenza. Luisa Fernanda Mancipe J, MV1, Gloria Ramírez N, Ph.D1, Jairo Jaime C, Ph.D1, Víctor Vera A., Ph.D1 1. Línea de Investigación en Microbiología y Epidemiología. Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia. Universidad Nacional de Colombia, Sede Bogotá. Publicación Científica en Ciencias Biomédicas - ISSN: 1794-2470 año - Vol.9 No. 15 - Enero - junio de 2011: 1-112

**MATERIAL PARA LA PREPARACIÓN DEL TEMA 22**

**BACTERIOLOGÍA: MÉTODOS DE SIEMBRA, INCUBACIÓN TINCIÓN Y PRUEBAS DE IDENTIFICACIÓN.**

*Este material no tiene carácter oficial, por lo que en ningún caso vinculará al Tribunal Calificador. Constituye, únicamente, un instrumento complementario que servirá de apoyo al opositor para enfocar cada uno de los epígrafes, pero nunca de forma exclusiva ni excluyente. El Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación no se hace responsable del contenido del mismo.*

*Los materiales no serán objeto de actualización constante.*

## **ÍNDICE**

### **1. INTRODUCCIÓN**

### **2. MÉTODOS DE SIEMBRA**

#### 2.1 PROCESAMIENTO DE LA MUESTRA

#### 2.2 MEDIOS DE CULTIVO

##### 2.2.1 Tipos de medios de cultivo

##### 2.2.2 Preparación de medios de cultivo

#### 2.3 TÉCNICA MICROBIOLÓGICA

##### 2.3.1 Métodos de siembra en placa

##### 2.3.1 Métodos de siembra en tubo

### **3. INCUBACIÓN**

#### 3.1 TEMPERATURA

#### 3.2 ATMÓSFERA

#### 3.3 HUMEDAD

#### 3.4 TIEMPO

### **4. MÉTODOS DE TINCIÓN**

#### 4.1 TIPOS DE TINCIONES

##### 4.1.1 Tinción por azul de metileno

##### 4.1.2 Tinción por fucsina

##### 4.1.3 Tinción de Gram

##### 4.1.4 Tinción de Ziehl-Neelsen

##### 4.1.5 Tinción Rodamina-Auramina

##### 4.1.6 Tinción de esporas

##### 4.1.7 Tinción de flagelos

##### 4.1.8 Tinción de cápsula

### **5. PRUEBAS DE IDENTIFICACIÓN**

#### 5.1 CARACTERÍSTICAS MACROSCÓPICAS

##### 5.1.1 Morfología

5.1.2 Hemólisis

5.2. CARACTERÍSTICAS MICROSCÓPICAS

5.2.1 Tamaño y forma

5.2.1 Presencia de estructuras

5.3 PRUEBAS BIOQUÍMICAS

5.3.1 Pruebas convencionales

5.3.2 Sistemas comerciales manuales o galerías multipuebas

5.3.3 Sistemas comerciales automatizados

MATERIAL NO OFICIAL

## 1. INTRODUCCIÓN.

La Bacteriología es la rama de la Microbiología que promueve el desarrollo de organismos procariotas (dominios Bacteria y Archaea) en condiciones de laboratorio con el objetivo de someterlos a su estudio, identificación y clasificación.

Aunque las primeras bacterias fueron observadas en el siglo XVII a través de un microscopio de lente simple, el nombre de bacteria no fue acuñado hasta el siglo XIX, a partir del término griego *bacterion* (bastón pequeño).

El médico alemán Robert Koch fue quien estableció la relación entre algunas enfermedades y estos organismos microscópicos, identificando las bacterias como las causantes de ciertos cuadros patológicos. El aislamiento de bacterias en cultivo puro permitió el estudio del agente causal de la tuberculosis (*Mycobacterium tuberculosis*) y el establecimiento de los conocidos postulados de Koch:

- 1) La bacteria patógena se aislará siempre de animales enfermos y nunca de animales sanos.
- 2) Cuando un animal está enfermo la bacteria debe aislarse en cultivo puro.
- 3) Si la bacteria se inocula a otro individuo debe reproducirse la enfermedad.
- 4) La bacteria debe aislarse nuevamente en cultivo puro.

Un cultivo axénico es un cultivo puro, es decir, contiene una sola especie microbiana procedente del mismo microorganismo o cepa.

En la naturaleza, los microorganismos generalmente se encuentran en poblaciones, en cultivos mixtos, formando parte de comunidades de gran complejidad. Uno de los objetivos más importantes en microbiología es aislarlos. El aislamiento de bacterias a partir de muestras naturales se realiza en medios de cultivo y ambiente controlado, con el objetivo de obtener un cultivo puro o axénico.

## 2. MÉTODOS DE SIEMBRA.

La siembra es el procedimiento por el cual se pone en contacto los microorganismos presentes en una determinada muestra con un medio de cultivo para que, en condiciones óptimas de temperatura y tiempo de incubación, puedan desarrollarse y multiplicarse in vitro.

Por tanto, los factores que intervienen en la siembra bacteriológica son los siguientes:

- Procesamiento de la muestra
- Medios de cultivo
- Técnica microbiológica

## 2.1. PROCESAMIENTO DE LA MUESTRA

Es el paso previo a la siembra mediante el cual se prepara la muestra en condiciones tales que permitan la máxima recuperación del microorganismo perseguido.

El procesamiento de muestras dependerá de la naturaleza de la misma y del microorganismo en estudio. En este sentido, es primordial el conocimiento de la patogenia de la enfermedad para seleccionar aquellas muestras de elección.

Por norma general, las muestras más empleadas para el cultivo microbiológico son:

- **Animal vivo:** sangre, hisopos nasofaríngeos, vaginales, rectales y auriculares, piel, leche, placenta, heces, orina.
- **Animal muerto:** nódulos linfáticos, pulmón, hígado, bazo, tejido mamario, testículo y otras vísceras.

Tras la toma de muestras, éstas se deben enviar al laboratorio lo antes posible para minimizar la pérdida de viabilidad bacteriana. Las muestras deben enviarse en condiciones de refrigeración para impedir la proliferación de flora contaminante que pueda enmascarar los resultados.

Una vez en el laboratorio, la siembra podrá ir desde la inoculación directa en los medios de cultivo hasta la preparación de un macerado que será lo que se siembre en los mismos.

En el caso de muestras líquidas podrá ser necesaria una centrifugación previa para descartar las fases en las que con menos probabilidad se encuentre el microorganismo buscado.

## 2.2. MEDIOS DE CULTIVO

El cultivo de microorganismos en el laboratorio involucra muchos factores. Los requerimientos de temperatura, oxígeno y humedad deben tenerse en cuenta. Algunos microorganismos son capaces de crecer fácilmente en un medio simple que no cumpla unas condiciones específicas. Sin embargo, otros son más exigentes y necesitan factores adicionales de crecimiento.

En cuanto a las propiedades que deben tener los medios de cultivo, se destaca:

- **Humedad:** indispensable para evitar la desecación.
- **Fertilidad:** capacidad para permitir el crecimiento bacteriano. Los materiales utilizados en la preparación de medios de cultivo suelen estar en la forma que mejor asimila la bacteria. En los medios de cultivo se suelen emplear:
  - Azúcares: como fuente de carbono (glucosa, lactosa, sacarosa, etc.)
  - Peptonas: como fuente de nitrógeno. La peptona consiste en una mezcla de proteasas, polipéptidos y aminoácidos y se obtiene por digestión enzimática de proteínas.
  - Extractos: son preparados de ciertos órganos o tejidos animales o vegetales obtenidos por calor (extractos de carne, de corazón, de cerebro, de levadura, de malta, etc.)
  - Fluidos corporales: sangre completa o desfibrinada, suero, plasma.

- **Concentración adecuada de hidrogeniones:** el crecimiento óptimo de las bacterias patógenas tiene lugar dentro de límites de pH muy estrechos, en torno a 6,5 y 7,5. Es frecuente añadir sistemas amortiguadores de pH, tales como fosfatos bisódicos o bipotásicos, para mantener el pH dentro del rango óptimo de crecimiento.

### 2.2.1 Tipos de medios de cultivo

Según su consistencia, los medios de cultivo pueden ser:

- **Líquido:** son los denominados caldos de cultivo.
- **Sólido:** al medio líquido se le puede añadir una sustancia solidificante sin alterar su valor nutritivo, siendo el agar el más ampliamente utilizado. El agar es un hidrato de carbono que se obtiene de un alga marina, siendo su punto de fusión de 98°C y de solidificación en torno a los 42°C. Los líquidos orgánicos como la sangre o el suero se coagulan a 60°C, pudiendo incorporarse al medio antes de la solidificación del agar. Otras variedades de medios sólidos consisten en medios espesos que se preparan con materiales coagulables como suero o proteína de huevo. Los medios sólidos se dispensan en placas de Petri o en tubos de superficie inclinada (en slant, en inglés).
- **Medio bifásico:** compuesto de una fase sólida y otra líquida. Al inclinar el frasco, el medio líquido cubre totalmente el medio sólido, realizando un subcultivo en el mismo cuantas veces se desee, sin necesidad de abrir la botella (Ej. Medio de Castañeda).

Según su composición, podemos diferenciar:

- **Medios basales:** proveen el crecimiento de bacterias no exigentes a nivel nutritivo y están constituidos principalmente por peptona y sales minerales. Ejemplos: agua de peptona, agar nutritivo, caldo nutritivo
- **Medios enriquecidos:** contienen extractos de tejidos, fluidos orgánicos y otros aditivos. Se emplean para el cultivo de microorganismos más delicados que no crecerían en un medio básico. El agar sangre o el agar chocolate son medios enriquecidos.
- **Medios diferenciales:** contienen sustancias o indicadores que diferenciarán unos microorganismos de otros. El agar sangre es también un medio diferencial, pues permite distinguir los microorganismos por su capacidad de producir diferentes tipos de hemólisis. Otros ejemplos son el agar MacConkey, que distingue los microorganismos que fermentan la lactosa de los que no lo hacen.
- **Medios selectivos:** son aquellos medios que contienen sustancias que inhiben el crecimiento de algunos microorganismos, permitiendo el desarrollo de otros. Los medios selectivos se consiguen añadiendo sustancias inhibitoras y antibióticos. El medio Salmonella-Shigella, para estos microorganismos, o el medio Farrell para Brucella son ejemplos de medios selectivos.
- **Medios de enriquecimiento:** son aquellos a los que se les incorpora sustancias que favorecen el crecimiento de un determinado grupo de microorganismos sin llegar a inhibir completamente el desarrollo del resto. Suelen ser medios líquidos. Un ejemplo es

el medio Selenita F, que inhibe el crecimiento de coliformes, mientras que permite el crecimiento de Salmonella.

### **2.2.2 Preparación de medios de cultivo**

Muchos laboratorios preparan sus medios de cultivo con productos secos o deshidratados que pueden adquirirse de conocidas firmas comerciales. Por otro lado, cada vez son más los fabricantes que preparan medios de cultivo listos para su uso. Si bien, habrá que tener en cuenta las ventajas y los inconvenientes de cada modalidad.

En el primer caso, se podrá obtener un ahorro considerable en el precio, además, el producto deshidratado cuenta con una caducidad bastante más prolongada que los medios preparados. Por el contrario, es necesario seguir meticulosamente un procedimiento adecuado para la preparación de medios que incluya un paso de autoclavado. La esterilización debe efectuarse a la más baja temperatura durante el tiempo más corto ya que el sobrecalentamiento puede aumentar la acidez del medio y puede degradar los azúcares. La medición del pH deberá efectuarse para asegurar que se encuentra en el rango deseado. Es necesario llevar a cabo controles de calidad que aseguren que la preparación del medio de cultivo se ha realizado correctamente. En este sentido, cualquier laboratorio de microbiología puede recurrir a las normas ISO del ámbito alimentario como guía para la correcta preparación y control de calidad de los medios de cultivo.

La adquisición de medios de cultivo preparados y listos para su uso ofrece la ventaja de que todos estos controles de calidad del producto final se llevan a cabo por parte del fabricante, quién expedirá un correspondiente certificado de análisis del lote.

## **2.3 TÉCNICA MICROBIOLÓGICA**

Para impedir la contaminación de los cultivos es necesario trabajar de forma aséptica de modo que se eviten contaminaciones no deseadas del cultivo. Esto se consigue utilizando material estéril (asas de siembra, hisopos, agujas, etc.) y trabajando en cabinas de flujo laminar que propicien un ambiente estéril. Si no se dispone de ellas, se utiliza un mechero Bunsen, que es capaz de crear un ambiente semi-estéril en la zona inmediata alrededor y debajo de la llama, de forma que los riesgos de contaminación disminuyen considerablemente.

### **2.3.1 Métodos de siembra en placa**

Siembra por inmersión: se coloca el inóculo en una placa de Petri y sobre el mismo se vierte el medio de cultivo previamente fundido.

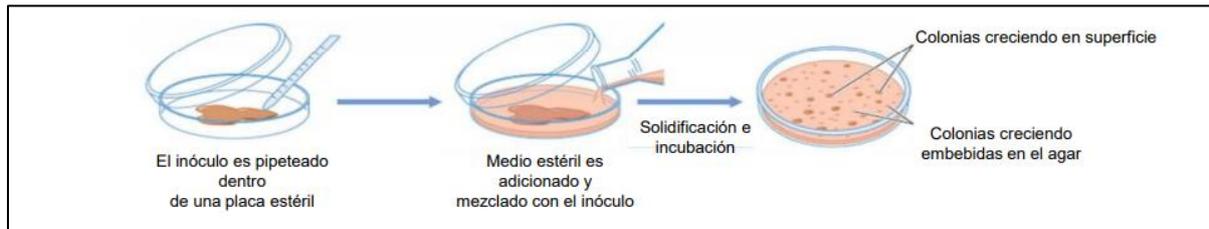


Imagen 1: <http://agro.unc.edu.ar/~microbiologia/wp-content/uploads/2014/04/Trabajo-Pr%C3%A1ctico-N%C2%BA-4.pdf>

Siembra en doble capa: se procede de la misma manera que por inmersión. Una vez solidificado el medio se vierte una cantidad extra de medio necesaria para cubrir la capa anterior.

Siembra en superficie: se vierte sobre una placa de Petri el medio de cultivo fundido, se deja solidificar y se coloca el inóculo sobre la superficie. Con ayuda de la espátula de Drigalsky, el hisopo o el asa de siembra, se extiende el inóculo hasta su absorción total por el medio de cultivo.

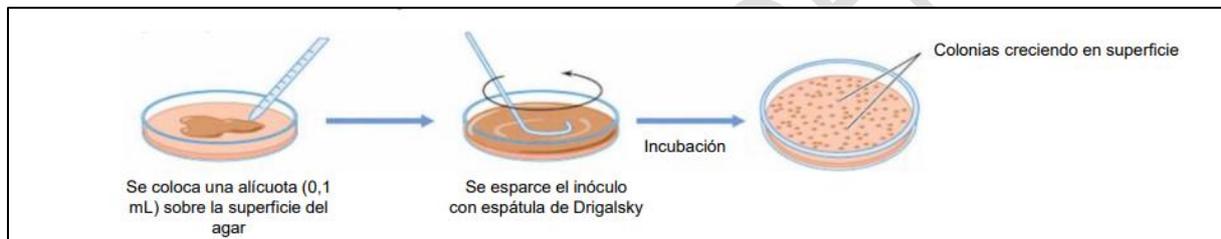


Imagen 2: <http://agro.unc.edu.ar/~microbiologia/wp-content/uploads/2014/04/Trabajo-Pr%C3%A1ctico-N%C2%BA-4.pdf>

Siembra en estría: se vierte sobre una placa de Petri el medio de cultivo fundido y se deja solidificar. Posteriormente se siembra tomando el inóculo a partir de un caldo o de otro cultivo en placa con un asa de siembra. En la siembra en estría por agotamiento, se procede tal y como se muestra en la imagen, flameando el asa entre cada estría. Este método se utiliza para obtener colonias aisladas.

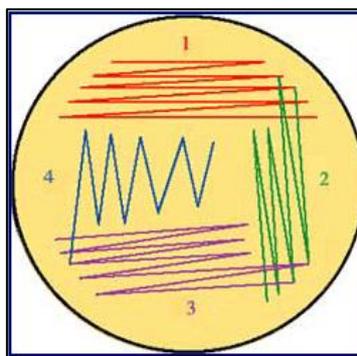


Imagen 3: [http://aulacida5.usal.es/aulavirtual/Demos/microbiologia/unidades/curso/UNI\\_02/imagenes/02050205.gif](http://aulacida5.usal.es/aulavirtual/Demos/microbiologia/unidades/curso/UNI_02/imagenes/02050205.gif)

Existen diversas variantes de la siembra en estría:

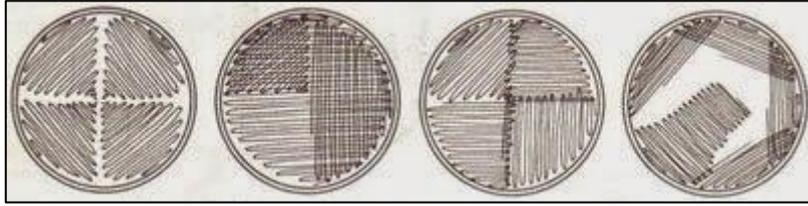


Imagen 4: <http://microbiologia3bequipo5.blogspot.com/2014/10/tecnicas-y-metodos-de-estriado-en-caja.html>

### 2.3.1 Métodos de siembra en tubo

Siembra por dilución: En este tipo de siembra se utiliza medio de cultivo líquido. Se toma el asa cargada con el inóculo y se diluye en el caldo, agitando cuidadosamente.

Siembra por estrías en superficie: Se utiliza medio de cultivo sólido en superficie inclinada (slants). Se siembra el material en la superficie del medio inclinado con el asa de siembra cargada con el inóculo y se siembra haciendo estrías desde la parte más profunda del tubo hacia el exterior.

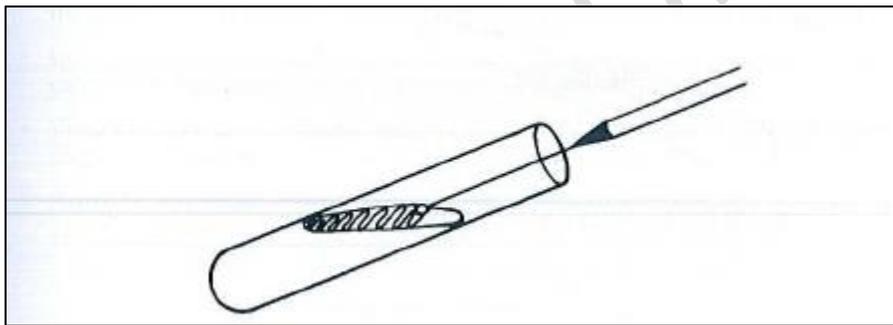


Imagen 5: <https://fiestadelosmicroorganismos.wordpress.com/2016/12/15/practica-7-2-diferentes-tecnicas-de-siembra-de-microorganismos-siembra-por-estria-en-tubos-con-medio-solido/>

Siembra por picadura: Se utiliza la aguja de siembra en tubos con medio sólido o semisólidos, generalmente sin inclinar. En este método, la aguja con el inóculo debe atravesar perpendicularmente el medio de cultivo. Este método se emplea para observar si los microorganismos poseen movilidad (los microorganismos móviles migran de la línea de siembra, mientras que los que no poseen esta capacidad crecen siguiendo la línea de siembra).

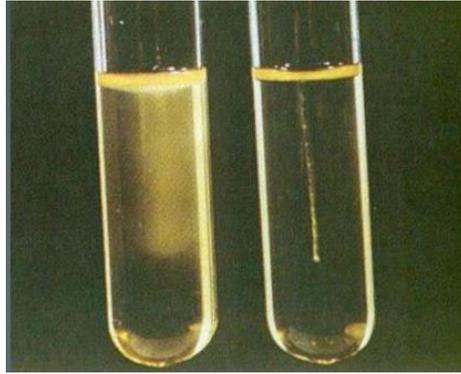


Imagen 6: <https://slideplayer.es/slide/12899855/>

### 3. INCUBACIÓN.

Los principales factores que intervienen en el proceso de incubación de las bacterias son:

- Temperatura
- Atmósfera
- Humedad
- Tiempo

Este proceso de incubación se lleva a cabo en equipos denominados incubadores, que permiten mantener las condiciones deseadas de temperatura, atmósfera y humedad para el desarrollo óptimo del cultivo.

#### 3.1. TEMPERATURA

Para todas las bacterias hay un valor de temperatura dentro del cual se inicia el crecimiento. Por debajo de este mínimo de temperatura cesa el crecimiento, pero sin que obligadamente se produzca la muerte. En la temperatura óptima, el crecimiento es más rápido. La temperatura máxima es aquella que cuando se sobrepasa, se inhibe el crecimiento y determina la muerte. Para las bacterias patógenas, la temperatura óptima de crecimiento oscila entre los 30°C y 37°, denominándose mesófilas. Los microorganismos cuya temperatura óptima es superior a 50°C se denominan termófilos y aquellos cuya temperatura óptima está por debajo de 20°C se denominan psicrófilos.

#### 3.2. ATMÓSFERA

Respecto a los requerimientos de oxígeno, las bacterias pueden dividirse en cinco grupos:

- Aerobias estrictas: requieren oxígeno libre para su crecimiento.
- Anaerobias facultativas: pueden vivir y multiplicarse con o sin oxígeno.
- Anaerobias estrictas: crecen solamente en ausencia de oxígeno libre.
- Microaerófilas: se desarrollan mejor con una concentración de oxígeno reducida.
- Capnófilas o carboxifílicas: se desarrollan mejor en una atmósfera de 5 a 10% de CO<sub>2</sub>.

### 3.3. HUMEDAD

El mantenimiento de la humedad es fundamental para asegurar la supervivencia del cultivo, sobre todo en cultivos sólidos en placa de Petri. Además, algunos microorganismos son más sensibles que otros a la desecación y será necesario crear un ambiente húmedo dentro del incubador. Esto se consigue añadiendo una cantidad de agua en una bandeja ubicada en la parte baja del incubador, aunque existen incubadores que llevan incorporado un reservorio para el agua.

### 3.4. TIEMPO

Cuando se introduce un microorganismo en un medio de cultivo, éste precisa cierto tiempo para adaptarse al medio. Esto se denomina “fase de latencia”, pero después el microorganismo comienza a multiplicarse rápidamente por fisión binaria en la “fase logarítmica” con un crecimiento exponencial. Transcurrido cierto tiempo y como consecuencia del agotamiento de los factores nutritivos del medio y de la acumulación de productos de desecho, la multiplicación se hace más lenta. Algunas bacterias mueren y aproximadamente el número de las que se multiplican equivale al número de las destruidas. Esta es la “fase estacionaria”, que es seguida por la de “declinación”, en la que el número de las que mueren excede considerablemente al número de las que se multiplican.

Estos tiempos variarán dependiendo del microorganismo cultivado, pudiendo ir desde horas, como en el cultivo de E.coli, hasta semanas o meses, como en el cultivo de algunas especies de micobacterias.

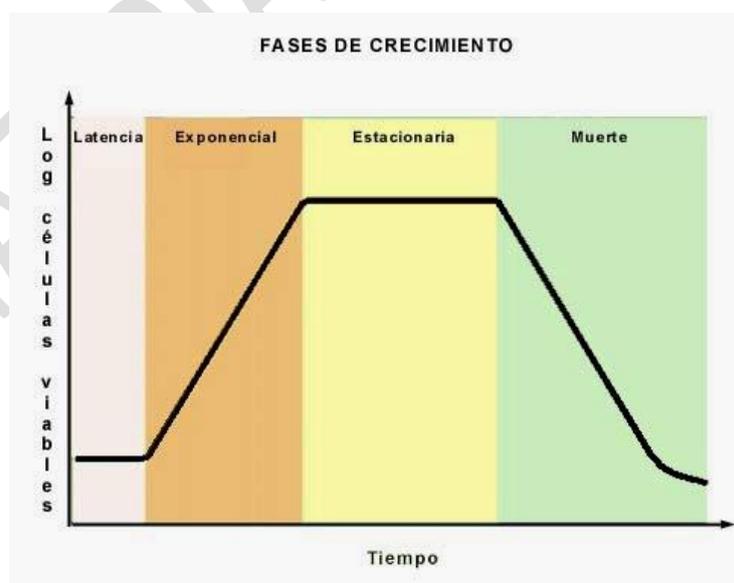


Imagen 7: <http://microbiologia3bequipo5.blogspot.com/2014/10/curva-del-crecimiento.html>

#### 4. MÉTODOS DE TINCIÓN.

Los diferentes métodos de tinción se utilizan para observar la morfología de las bacterias, ya que estas son difíciles de observar en preparaciones en fresco. Los microorganismos, concretamente las bacterias, pueden observarse directamente al microscopio de campo claro, sin embargo, debido al bajo contraste entre las células y su entorno, estos procedimientos se utilizan en ocasiones muy limitadas, como por ejemplo para la observación de la movilidad bacteriana. Mediante la tinción se proporciona contraste entre el microorganismo y el medio que la rodea, permitiendo diferenciar los distintos tipos morfológicos y realizar el estudio de estructuras propias de la célula bacteriana.

Para teñir una extensión de bacterias se procederá de la siguiente manera:

- **Preparación de la extensión:** en un portaobjetos se coloca una pequeña gota de solución salina o de agua y, tomando una pequeña cantidad del cultivo con un asa de siembra, se emulsiona el microorganismo en el líquido, realizando una extensión de alrededor de 1-2 cm<sup>2</sup> y se deja secar al aire.
- **Fijación:** con ayuda de un mechero bunsen y evitando el sobrecalentamiento del cristal, se pasa la extensión a través de la llama una o dos veces. Esta acción coagula las proteínas bacterianas y hace menos probable que la extensión se desprenda durante la tinción.
- **Tinción:** se aplicarán los colorantes previstos y durante el tiempo indicado según el procedimiento de tinción que se quiera realizar.

##### 4.1. TIPOS DE TINCIONES

Se han descrito un gran número de tinciones. La mayoría de los laboratorios adquieren los colorantes en soluciones listas para su uso.

Se denominan colorantes básicos si el cromóforo (porción coloreada) de la molécula está cargada positivamente (Ej. cristal violeta y azul de metileno). Bajo condiciones normales de crecimiento, la mayor parte de los procariontes tienen un pH interno próximo a la neutralidad (pH 7.0) y una superficie celular cargada negativamente, así los colorantes básicos son los más eficaces.

Por otro lado, los colorantes ácidos tienen un cromóforo cargado negativamente y son utilizados para teñir positivamente ciertos componentes como las proteínas.

- **Tinción simple:** se utilizan un solo tipo de colorante. Se aplican para la visualización de la forma, tamaño y tipo de agrupaciones entre bacterias. El azul de metileno es uno de los más utilizados. También se pueden utilizar la safranina, cristal violeta y tinta china.
- **Tinción diferencial:** se utilizan dos tipos de colorante, uno para la tinción propiamente dicha y otro que servirá de contraste. Estas tinciones permitirán además diferenciar las bacterias en grupos según el colorante que tomen las bacterias. Los ejemplos más conocidos son la tinción de Gram y la tinción de Ziehl-Neelsen.

- **Tinciones específicas:** son especiales para la observación de estructuras bacterianas como cápsula, flagelos, esporas, etc.
- **Tinción positiva:** las bacterias absorben el colorante y aparecen teñidas.
- **Tinción negativa:** se utilizan compuestos que no penetran en las células, sino que impregnan el medio circulante. Los microorganismos aparecen refringentes sobre un fondo negro.

Existen multitud de tinciones y modificaciones de estas mismas. A continuación se describen un pequeño número de métodos de tinción que pueden resultar de utilidad en un laboratorio de bacteriología.

#### **4.1.1. Tinción por azul de metileno**

Se tiñe durante un minuto con una solución acuosa de azul de metileno al 0,5%. Es una tinción simple y positiva. Todas las estructuras se tiñen de azul por igual.

#### **4.1.2. Tinción por fucsina**

Se tiñe durante 30 segundos con fucsina fenicada diluida al 1:10 con agua destilada. Es una tinción simple y positiva. Todas las estructuras se tiñen de rosa por igual.

#### **4.1.3. Tinción de Gram**

Esta tinción es un procedimiento de gran utilidad empleado en los laboratorios donde se manejan pruebas microbiológicas. Es definida como una tinción diferencial, ya que utiliza dos colorantes y clasifica a las bacterias en dos grandes grupos: bacterias Gram negativas y bacterias Gram positivas. Fue desarrollada por el científico danés Hans Christian Gram en 1884, siendo una de las tinciones más utilizadas universalmente debido a lo económico, sencillo y eficaz que resulta.

Los principios de la tinción de Gram están basados en las características de la pared celular de las bacterias, la cual le confiere propiedades determinantes a cada microorganismo. La pared celular de las bacterias Gram negativas está constituida por una capa fina de peptidoglicano y una membrana celular externa, mientras que las bacterias Gram positivas poseen una pared celular gruesa constituida por peptidoglicano, pero no cuentan con membrana celular externa; así pues, la composición química y el contenido de peptidoglicano en la pared celular de las bacterias Gram negativas y Gram positivas explica y determina las características tintoriales.

La tinción de Gram se basa en colocar como colorante primario **crystal violeta**, el cual tiene afinidad con el peptidoglicano de la pared bacteriana. Posteriormente, se coloca **lugol**, el cual sirve como mordiente e impide la salida del cristal violeta por la formación de un complejo cristal violeta yodo que satura los espacios del peptidoglicano de la pared bacteriana. En seguida, se coloca una mezcla de **alcohol-acetona**, la cual deshidrata la pared

bacteriana y cierra los poros de la misma, también destruye la membrana externa de las bacterias Gram negativas debido a que ésta es soluble a la acción de solventes orgánicos, como la mezcla de alcohol-acetona. Las bacterias Gram positivas, al contener una gran cantidad de peptidoglicano, retienen con mayor fuerza este complejo, mientras que las Gram negativas no lo pueden retener por tener menos cantidad de peptidoglicano. Por último, se coloca **safranina**, la cual funciona como un colorante secundario o de contratinción y sirve para teñir las bacterias que no pudieron retener el complejo cristal violeta-yodo.

Las bacterias Gram positivas se observan de color azul oscuro a morado, mientras que las Gram negativas se observan de color rosa a rojo. Sin embargo, no todas las bacterias se pueden teñir por esta técnica, ya que algunas carecen de pared celular (micoplasma) o su pared celular tiene una composición química diferente (micobacterias, que cuentan con una gran cantidad de ácidos micólicos).

#### **4.1.4. Tinción de Ziehl-Neelsen**

La tinción de Ziehl-Neelsen es la técnica comúnmente usada en el diagnóstico rutinario de tuberculosis. Es una técnica rápida, fácil y de bajo costo, lo que permite que se pueda realizar en casi cualquier laboratorio clínico. Esta tinción permite diferenciar a las bacterias en dos grupos: aquellos que son capaces de resistir la decoloración con alcohol-ácido y aquellos que no lo son.

El género *Mycobacterium* es el único miembro en la familia *Mycobacteriaceae* y está relacionado con otros géneros que contienen ácidos micólicos. Los ácidos micólicos junto con lípidos libres proveen a la célula de una barrera hidrofóbica.

La tinción se basa en colocar carbol-fucsina y calentar la preparación ligeramente para solubilizar las ceras, lípidos y otros ácidos grasos de la pared celular para que permita el paso libre del colorante, el cual tiene una enorme afinidad por los ácidos micólicos presentes en la pared. Al enfriar con agua, los componentes de la pared vuelven a solidificar, resistiendo la acción abrasiva del alcohol-ácido, y el azul de metileno se utiliza como contratinción. Una tinción positiva es aquella en la que se observan bacilos ácido-alcohol resistentes, los cuales son de color rojo fucsia.

#### **4.1.5. Tinción Rodamina-Auramina**

Los ácidos micólicos de las paredes celulares de las micobacterias poseen afinidad para los fluorocromos auramina y rodamina. Estos colorantes se fijan a las bacterias, que aparecen de color amarillo o naranja brillante contra un fondo verdoso. El permanganato de potasio, empleado como contraste, evita la fluorescencia inespecífica. Todos los microorganismos ácido-alcohol resistentes, se tiñen con estos colorantes. La observación debe realizarse en un microscopio de fluorescencia.

#### **4.1.6. Tinción de esporas**

En las tinciones de Schaeffer-Fulton y Wirtz-Conklin se usa verde de malaquita en contraste con safranina. La envuelta de la endospora es más compleja e impermeable que la envuelta de las células vegetativas. Sólo se puede teñir el contenido de la espora alterando su envuelta, por lo que se utiliza el colorante verde malaquita en caliente que, una vez que penetra en la endospora, permanece tras la posterior decoloración y contratinción con la safranina. Se visualizan las células rojas y las endosporas verdes.

#### **4.1.7. Tinción de flagelos**

Se pueden observar buenos resultados con la tinción de Walc-Pokrzywnicki. Permite teñir flagelos usando un mordiente para incrementar su grosor y hacerlos visibles al microscopio óptico. Para esta tinción a las células previamente fijadas, se le añade una mezcla de ácido tánico (mordiente) y del colorante rosanilina. El mordiente engruesa los flagelos y el colorante los define.

Otra técnica para la tinción de flagelos es el método de Leifson en el que se usa el colorante de Leifson (fucsina básica, ácido tánico y cloruro sódico), disponible comercialmente.

#### **4.1.8. Tinción de cápsula**

Existen diferentes métodos para poner de manifiesto la presencia de la cápsula.

Se puede realizar una tinción negativa con tinta china mezclando un asa de tinta china con un asa de suspensión del germen en una solución de glucosa. Colocando la mezcla en un extremo del portaobjetos se hará una extensión con ayuda de otro portaobjetos. Se deja secar y se fija con alcohol metílico. Por último se aplica una tinción de contraste, como el cristal violeta o la safranina. Los gérmenes aparecerán teñidos de azul o rosa, dependiendo del colorante utilizado, rodeados de un halo transparente, correspondiente a la cápsula, y sobre un fondo negro.

El método de Churchman utiliza el colorante de Wright (azul de metileno, que tiñe de color azul las partes ácidas de las células, y eosina, que tiñe las partes alcalinas). Se deja secar el colorante sobre la extensión fijada y se lava intensamente con agua. La cápsula se tiñe de rosa y la bacteria en azul.

## 5. PRUEBAS DE IDENTIFICACIÓN.

### 5.1. CARACTERÍSTICAS MACROSCÓPICAS

#### 5.1.1. Morfología

La morfología de las colonias es fundamental en la identificación preliminar y para la diferenciación de los microorganismos. Para la observación morfológica es preferible examinar colonias de cultivos frescos crecidas en medios no selectivos. En este paso de la identificación es muy importante el aislamiento de las bacterias en cultivo puro. Las colonias de una única especie se caracterizan por su tamaño, forma, consistencia, y a veces por su color. De este modo, se pueden encontrar colonias con morfología circular o irregular, con bordes lisos o dentados, cuya elevación puede ser mayor o menor, desde plana a convexa o incluso crecer hacia el interior del medio de cultivo. En cuanto a la textura, lisa o rugosa. En cuanto al color, las colonias pueden ser opacas o translúcidas. Algunos microorganismos producen una colonia pigmentada, lo que puede ser de ayuda en el proceso de identificación.

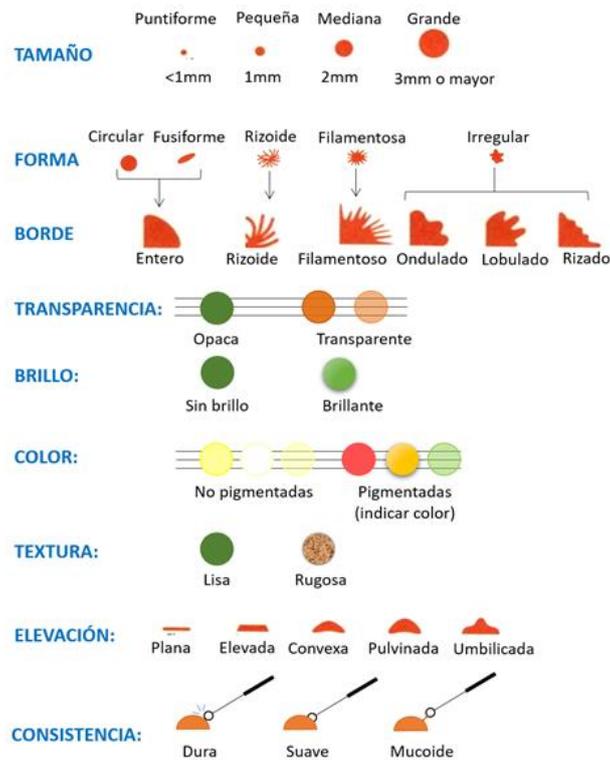


Imagen 8: <https://dingmicrolab.files.wordpress.com/2020/10/image-12.png>

### 5.1.2. Hemólisis

Algunas bacterias producen hemolisinas que causan la lisis de los hematíes en medios que contienen sangre. Esta hemólisis puede ser beta (zona clara alrededor de la colonia) o alfa (halo de color verdoso alrededor de la colonia).

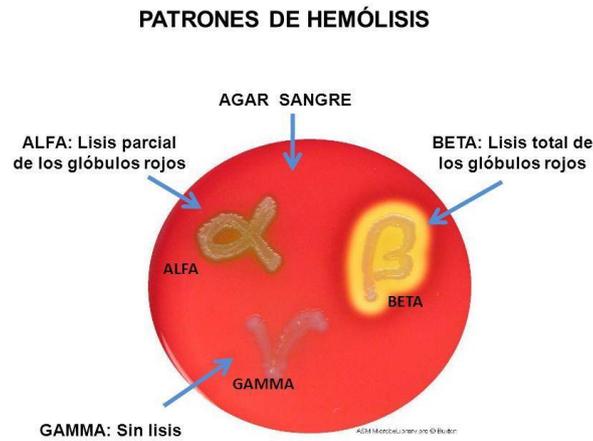


Imagen 9: <https://pbs.twimg.com/media/EF8UC7PWsAAAwbI.jpg>

Además de lo anterior, se deberá tener en cuenta toda la información recabada durante el proceso, teniendo en cuenta el origen de la muestra, las características de crecimiento en los medios de cultivo utilizados, requisitos de crecimiento en cuanto a la atmósfera, a la temperatura y al tiempo de incubación, etc. Todos estos datos servirán de gran ayuda a la hora de identificar un microorganismo.

## 5.2. CARACTERÍSTICAS MICROSCÓPICAS

El estudio microscópico en fresco y tras tinción revela la forma, la manera de agruparse, la estructura de las células y su tamaño. Las tinciones son el primer paso para la identificación bacteriana.

### 5.2.1. Tamaño y forma

Las bacterias pueden tener diferentes tamaños, desde menos de 1  $\mu\text{m}$  hasta 250  $\mu\text{m}$ .

**Cocos:** Micrococos, aparecen aislados y dispersos tras la división celular. Diplococos, aparecen por pares. Estreptococos, tienden a unirse formando cadenas. Estafilococos, aparecen en grupos irregulares, a veces de gran tamaño

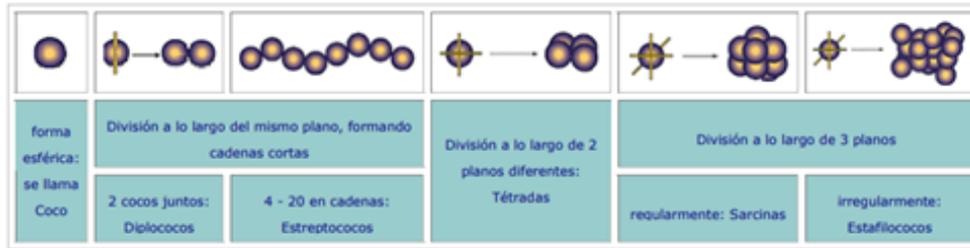


Imagen 10: <http://www.bio-nica.info/biblioteca/TincionBacterias.pdf>

**Bacilos:** existen grandes variaciones morfológicas, desde bacilos fusiformes, estreptobacilos, cocabacilos, bacilos filamentosos, bacilos curvos o vibrios, espirilos y espiroquetas.

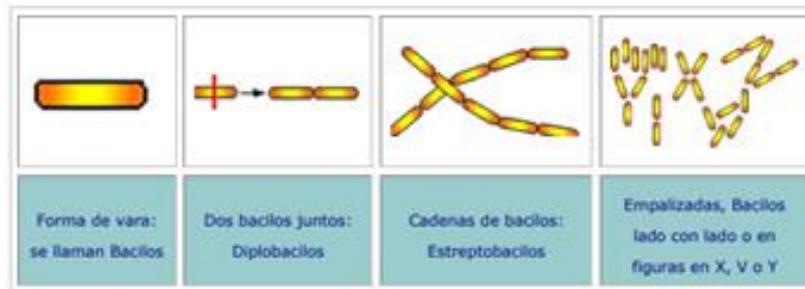


Imagen 11: <http://www.bio-nica.info/biblioteca/TincionBacterias.pdf>



Imagen 12: <http://www.bio-nica.info/biblioteca/TincionBacterias.pdf>

El término Pleomorfismo indica la adopción de diferentes formas en una misma especie.

### 5.2.2. Presencia de estructuras

**Cápsula:** presente en algunas bacterias en sus ambientes naturales, como *Klebsiella* spp., *Streptococcus pneumoniae* y *Clostridium perfringens* o *Bacillus anthracis*.

**Endosporas:** pueden ser ovales o esféricas y, según su posición dentro de la célula, centrales terminales o subterminales. Algunos bacilos Grampositivos tienen esta capacidad. Los géneros bacterianos de interés en medicina veterinaria que son capaces de formar endosporas son *Bacillus* y *Clostridium*.

**Flagelos:** algunos bacilos presentan flagelos que le otorgan movimiento. La posición y el número de flagelos puede servir para la identificación bacteriana.

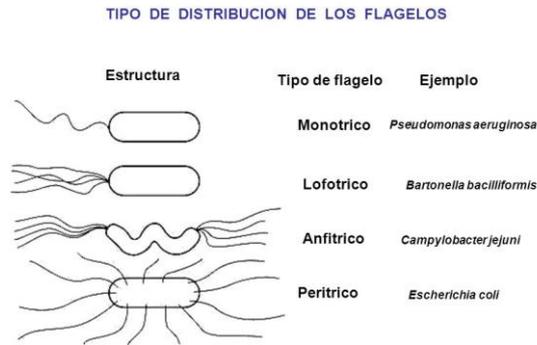


Imagen 13: <https://slideplayer.es/slide/3477201/12/images/5/Pseudomonas+aeruginosa.jpg>

### 5.3. PRUEBAS BIOQUÍMICAS

Las pruebas bioquímicas permiten determinar el perfil metabólico de las bacterias con el objetivo de lograr su identificación. Normalmente, se pone en contacto a la bacteria con un sustrato, bien directamente o incorporado al medio de cultivo.

La obtención de resultados óptimos durante las pruebas bioquímicas implica el uso de cultivos frescos y no envejecidos de la bacteria y la utilización de un medio de cultivo adecuado.

Algunas de estas pruebas son técnicas rápidas, que evalúan la presencia de una enzima preformada, y su lectura varía entre segundos y unas pocas horas.

Otras pruebas requieren para su lectura el crecimiento del microorganismo con una incubación previa de 18-48 horas. A este grupo pertenecen la mayoría de pruebas que detectan componentes metabólicos o las que determinan la sensibilidad de un microorganismo a una sustancia determinada.

#### 5.3.1. Pruebas convencionales

**Prueba de la catalasa:** Se emulsiona parte del cultivo con una solución de peróxido de hidrógeno al 30%. La efervescencia de oxígeno indica la presencia de catalasa.

**Prueba de la oxidasa:** Esta prueba permite determinar la presencia de enzimas oxidasas. La reacción de la oxidasa se debe a la presencia de un sistema citocromo-oxidasa. Se humedecen pequeñas tiras de papel de filtro en solución acuosa al 1% de tetrametil-p-fenilendiamina u oxalato. Se rasca parte del cultivo joven y se frota sobre el papel. La aparición de un color azul dentro de los 30 segundos es una reacción positiva a la oxidasa.

**Prueba ONPG:** La lactosa se fermenta únicamente cuando se hallan presentes  $\beta$ -galactosidasa y permeasa. La deficiencia de la última produce fermentación tardía, sin embargo, los gérmenes que no fermentan la lactosa no poseen  $\beta$ -galactosidasa. Para la

realización de la prueba, se siembra caldo ONPG (compuesto orgánico O-nitrofenil-  $\beta$ -D-galactopiranosido) que es incoloro. Si la bacteria posee las enzimas hidrolizantes ( $\beta$  - galactosidasa), el compuesto se transforma en ortonitrofenol, un derivado cromogénico de color amarillo.

**Prueba de la ureasa:** Esta prueba permite determinar la presencia de ureasa, que desdobra la urea en dos moléculas de amoníaco. Al producirse la reacción se produce una alcalinización del medio, que es detectada por un indicador de pH. Los medios más usados son el Caldo Urea de Stuart y el agar Urea de Christensen. En estos medios se produce una coloración rojiza a fucsia que indica la hidrólisis de la urea. Si no hay hidrólisis el medio permanece amarillo, con crecimiento de microorganismos.

**Producción de indol:** Esta prueba detecta la producción de indol procedente de la degradación del aminoácido Triptófano por acción de la enzima triptofanasa. El medio (rico en triptófano) se inocula con el cultivo. La aparición de un anillo color rojo cereza intenso en la superficie del caldo indica la presencia de indol (positivo). Si la reacción es negativa el anillo es amarillo.

**Prueba del amoníaco:** Se incuba el cultivo en caldo nutritivo o caldo peptonado durante cinco días. Se humedece un trozo de papel de filtro con reactivo de Nessler y se pone en la parte superior del tubo de cultivo. Se calienta el tubo al baño maría a 50-60°C. Si hay amoníaco presente el papel se ennegrece.

**Fermentación y oxidación de carbohidratos: Prueba de la reducción de nitratos:** Sirve para determinar la capacidad de un organismo de reducir los nitratos a nitritos. La aparición de un color rosa indica actividad nitrataza.

**Prueba del rojo de metilo:** Se siembra caldo glucosa fosfatado y se incuba con el germen. Se añaden algunas gotas de solución de rojo de metilo. Mediante esta prueba se comprueba la capacidad de un microorganismo de producir y mantener estables los productos terminales ácidos de la fermentación de la glucosa por la vía de la fermentación ácido-mixta. Un color rojo indica que el pH ha disminuido por debajo de 4,5. La reacción negativa viene dada por una coloración amarilla.

**Reacción de Voges Proskauer (VP):** La prueba de Voges Proskauer consiste en determinar la capacidad que tiene un microorganismo para producir el metabolito acetilmetil carbinol (acetoína) como producto intermediario derivado del metabolismo de la glucosa (fermentación butanodiólica). En presencia del oxígeno del aire y de álcali, la acetoina es oxidada a diacetilo, que generará un color rojizo al añadirle  $\alpha$ -naftol e hidróxido potásico.

**Producción de sulfuro de hidrógeno:** Se siembra un tubo de caldo nutritivo. Se coloca una tira de papel de filtro impregnado con acetato de plomo en la parte superior del tubo, sosteniéndolo allí con un tampón de algodón graso. Se incuba y se examina el ennegrecimiento del papel en aquellos cultivos que producen sulfuro de hidrógeno.

**Ensayo de fermentación y oxidación de carbohidratos:** Se utilizan medios de cultivo que contienen un carbohidrato, alcohol o glucósido fermentable y un indicador que señala la producción de ácido. Para demostrar la formación de gas, si el medio es líquido, se coloca un

tubo invertido (tubo de Durham). En los medios sólidos se observan burbujas y rotura del medio. En la Prueba de Hugh y Leifson (HL), la producción de ácido se evidencia por el cambio de color de púrpura a amarillo. Los microorganismos fermentadores producen ácido tanto en el tubo incubado en condiciones de anaerobiosis como en el que se incubaba en condiciones de aerobiosis. Los microorganismos oxidadores (respiradores) sólo lo producen en el tubo incubado en condiciones aerobias. Para ensayos con estafilococos y micrococos se utiliza la modificación de Baird-Parker.

**Hidrólisis de la esculina:** Se siembra medio de esculina o medio de Edwards y se incuba durante la noche. Los gérmenes que hidrolizan la esculina ennegrecen el medio.

**Prueba de la coagulasa:** La prueba de la coagulasa se usa para diferenciar el *Staphylococcus aureus* de los *Staphylococcus coagulasa* negativos. La posesión de la enzima coagulasa que coagula el plasma es una propiedad casi exclusiva de *S. aureus*. Esta prueba se puede realizar de dos formas (en portaobjetos, detecta la coagulasa ligada; en tubo, detecta la coagulasa libre).

**Prueba de la fenilalanina:** Se siembra agar fenilalanina y se incuba durante toda la noche. Se vierten unas gotas de solución de cloruro férrico de manera que una coloración verde indica la desaminación de la fenilalanina a ácido pirúvico.

**Prueba de la DNAsa:** Esta prueba se utiliza para estudiar la capacidad que poseen ciertas bacterias para hidrolizar el ADN produciendo una mezcla de mono y polinucleótidos. Se siembra el germen sobre agar DNA-sa y se incuba. Tras la incubación se inunda la placa con solución 1N de ácido clorhídrico que precipita el ácido nucleico inalterado. Un halo claro alrededor de la siembra indica una reacción positiva.

**Licuefacción de la gelatina:** Se siembra medio de agar gelatina. Se incuba con el germen y posteriormente se cubre la placa con solución saturada de sulfato amónico. Aparecen halos alrededor de la siembra en aquellos gérmenes que producen gelatinasa.

**Pruebas de descarboxilasa:** Las descarboxilasas son un grupo de enzimas capaces de atacar el grupo carboxilo de los aminoácidos para formar aminas con desprendimiento de CO<sub>2</sub>. Este proceso se realiza en anaerobiosis. Las descarboxilasas se activan en medio ácido. Cada descarboxilasa es específica de un aminoácido. Lisina, ornitina y arginina son los tres aminoácidos comúnmente utilizados para tipificación bioquímica. El punto final de los tres procesos es la alcalinización del medio y el desprendimiento de CO<sub>2</sub>. Si a un medio con indicador de pH se le añade el aminoácido correspondiente al enzima estudiado, y posteriormente se inocula el microorganismo, el viraje del indicador de pH indicará la alcalinización del medio y por tanto la presencia del enzima estudiado.

**Utilización de citrato:** Se siembra un medio sólido (de Simmons o de Christensen) o un medio líquido (Koser). Estos medios contienen citrato de sodio y fosfato de amonio como fuentes de carbono y de nitrógeno respectivamente. Sólo las bacterias capaces de metabolizar el citrato podrán multiplicarse en estos medios. En algunos casos, el crecimiento será aparente por un cambio de color del indicador de pH que se añade al medio.

**Prueba del malonato:** Pone de manifiesto la capacidad que poseen determinadas bacterias de utilizar el malonato de sodio como única fuente de carbono, con la consiguiente alcalinización del medio. La utilización del malonato viene indicada por crecimiento y un cambio de color en el medio de verde a azul. Los microorganismos que no utilizan el malonato pero sí fermentan glucosa hacen que el indicador cambie de verde a amarillo.

**Hidrólisis de la arginina:** Se incuba un cultivo en caldo de arginina durante 24-48 horas y se añaden unas gotas del reactivo de Nessler. Una coloración parda indica la hidrólisis.

**Hidrólisis de la caseína:** Se utiliza agar leche desnatada y se observa la transparentación alrededor de las colonias de los gérmenes que hidrolizan la caseína.

**Prueba del Manitol:** Sirve para detectar si los gérmenes son capaces de fermentar el manitol liberando productos ácidos que serán detectados gracias al indicador rojo de fenol que cambiará a color amarillo.

**Prueba de la fosfatasa:** Algunas bacterias pueden descomponer los ésteres fosfóricos. Para evidenciar esta capacidad, se siembra en una placa de agar fosfato fenolftaleína y se incuba toda la noche. A continuación, se expone el cultivo a los vapores de amoníaco de forma que las colonias productoras de fosfatasa se vuelven rosadas.

Muchas de las pruebas anteriormente descritas están disponibles de forma comercial en tiras de papel o en discos de papel. Las tiras o los discos vienen impregnados con el sustrato de la reacción metabólica. En el sistema de tiras, se frota una pequeña cantidad de cultivo en la tira de papel y se observa el resultado. Con el sistema de discos de papel, los discos se colocan en la placa sobre el medio de cultivo previamente sembrado y tras la incubación se observan zonas de inhibición o alteraciones de color.

### **5.3.2 Sistemas comerciales manuales o galerías multipuebas**

Se trata de celdillas aisladas con sustrato liofilizado que se inoculan individualmente y que permiten realizar simultáneamente entre 10 y 50 pruebas bioquímicas. Los resultados de las pruebas se expresan de forma numérica (los resultados de las pruebas se agrupan de tres en tres, de manera que el resultado de cada trío de pruebas queda reducido a un dígito). Cada especie está definida por un código numérico, resultado de la codificación de las reacciones a las pruebas que se hubieran utilizado. Para codificar el dígito de un trío de pruebas se establece el siguiente sistema:

- Si una prueba cualquiera es negativa, se le asigna un valor de 0.
- Si la primera prueba es positiva, se asigna un valor de 1.
- Si la segunda prueba es positiva, se asigna un valor de 2.
- Si la tercera prueba es positiva, se asigna un valor de 4.

El código numérico se obtiene sumando los valores de las tres pruebas. Los límites inferior y superior del código son 0 y 7 respectivamente. Ante un microorganismo problema, no tenemos más que buscar el código numérico y comprobar a qué bacteria pertenece. Estos

son algunos de los sistemas disponibles en el mercado: API (bioMérieux), Enterotube (BBL), Oxi/Ferm Tube (BD), RapIDsystems y MicroID (Remel), BiochemicalIDsystems (Microgen), etc.

### **5.3.3. Sistemas comerciales automatizados**

Hay en el mercado galerías multipuebas, como las descritas en el apartado anterior pero cuya inoculación, incubación y lectura se efectúan de modo automatizado. También hay paneles en los que además de encontrarse los sustratos para el desarrollo de pruebas bioquímicas, se encuentran diversos antimicrobianos a distintas concentraciones, con lo que se realiza simultáneamente la identificación y antibiograma del microorganismo objeto de estudio. Existen distintos paneles para distintos grupos de microorganismos. La inoculación y la lectura de estos paneles se suele hacer de forma automática, incorporándose los datos obtenidos en un ordenador, el cual proporciona con un índice alto de fiabilidad la identificación del microorganismo. Estos son algunos de los sistemas en paneles comerciales más extendidos disponibles en el mercado: MicroScan, Vitek, ATB, Pasco, Wider, Phoenix, etc.

## **BIBLIOGRAFÍA**

Baker F. J. (1970). Manual de técnica bacteriológica. Editorial Acribia Zaragoza.

Jarvis J.D. (1976). Bacteriología clínica básica. Editorial El Manual Moderno, S. A.

Collins C.H. y Lyne P.M. (1989). Métodos microbiológicos. Editorial Acribia, S. A.

Germán Bou y cols. (2011). Métodos de identificación bacteriana en el laboratorio de microbiología. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2011;29(8):601–608.

Luis Esaú López-Jácome y cols. (2014). Las tinciones básicas en el laboratorio de microbiología. *Investigación en Discapacidad*. Vol. 3, Núm. 1 Enero-Marzo 2014 pp 10-18.

MATERIAL NO OFICIAL

**MATERIAL PARA LA PREPARACIÓN DEL TEMA 23**

**CULTIVO CELULARES: CONCEPTO, TIPOS Y APLICACIONES EN LABORATORIOS DE SANIDAD ANIMAL.**

*Este material no tiene carácter oficial, por lo que en ningún caso vinculará al Tribunal Calificador. Constituye, únicamente, un instrumento complementario que servirá de apoyo al opositor para enfocar cada uno de los epígrafes, pero nunca de forma exclusiva ni excluyente. El Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación no se hace responsable del contenido del mismo.*

*Los materiales no serán objeto de actualización constante.*

## **ÍNDICE**

### **1. CULTIVOS CELULARES: CONCEPTO, TIPOS.**

#### 1.1. INTRODUCCIÓN

#### 1.2. CONCEPTO

#### 1.3. TIPOS

##### 1.3.1. Cultivo primario

##### 1.3.2. Cultivo secundario o línea primaria

##### 1.3.3. Línea celular continua o estable

#### 1.4. REQUERIMIENTOS DE UN CULTIVO CELULAR

##### 1.4.1. Sustrato del cultivo

##### 1.4.2. Fase gaseosa

##### 1.4.3. Propiedades físicas y químicas

##### 1.4.4. Condiciones fisiológicas

#### 1.5. CONDICIONES DE TRABAJO CON CULTIVOS CELULARES Y EQUIPOS

#### 1.6. MANTENIMIENTO DE CULTIVOS CELULARES

##### 1.6.1. Subcultivo

##### 1.6.2. Métodos de disgregación celular

##### 1.6.3. Almacenamiento de cultivos celulares

#### 1.7. CONTROL DE CALIDAD

##### 1.7.1. Control de reactivos y material

##### 1.7.2. Control de origen e integridad de las líneas celulares

##### 1.7.3. Control de contaminaciones microbianas

##### 1.7.4. Control medioambiental

### **2. APLICACIONES EN LABORATORIOS DE SANIDAD ANIMAL.**

#### 2.1. TÉCNICAS DE MULTIPLICACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE VIRUS EN CULTIVOS CELULARES.

#### 2.2. TÉCNICAS DE AISLANMIENTO DE VIRUS EN CULTIVOS CELULARES

#### 2.3. TÉCNICA DE IDENTIFICACIÓN DE VIRUS POR INMUNOFLUORESCENCIA

#### 2.4. TÉCNICA DE SERONEUTRALIZACIÓN DEL VIRUS

#### 2.5. HIBRIDOMAS

## 1. CULTIVOS CELULARES: CONCEPTO, TIPOS.

### 1.1. INTRODUCCIÓN.

El cultivo de tejidos se desarrolló a partir de los últimos años del siglo XIX como una continuación de las técnicas de la embriología. Wilhem Roux mantuvo en el año 1885 células de embrión de pollo en solución salina durante unos días.

No obstante, se considera al **zoólogo americano R. G. Harrison** como el **iniciador de los cultivos de tejidos animales**, ya que, en 1907 fue el primer científico que **empleó técnicas in vitro para el estudio de fenómenos in vivo** realizando cultivos de médula espinal embrionaria de anfibios. De esta manera pudo observar el crecimiento de los axones de los neuroblastos, y estableció que el axón se formaba por expansión a partir del cuerpo neuronal y no por fusión de una cadena de células. El cultivo se realizaba en una gota de linfa del anfibio que colgaba de un cubreobjetos sobre una cámara sellada.

Hasta llegar a lo que conocemos actualmente como cultivos celulares, se tuvieron que superar y buscar soluciones a diferentes dificultades que surgían a medida que se avanzaba en su desarrollo, así:

La **primera limitación para alcanzar el establecimiento de cultivos fue lograr un medio nutritivo adecuado**. Para ello Burrows (1910) empleó plasma de pollo para nutrir los explantes de tejidos embrionarios de pollo. Este medio se reveló mucho mejor que los anteriormente probados, lo que le permitió observar el crecimiento del tejido nervioso, corazón y piel.

Burrows y Carrel demostraron que **la vida del cultivo se podía prolongar mediante subcultivos**. Los medios empleados fueron plasma suplementado con extractos de embrión. En 1913 Carrel demostró la posibilidad de **mantener en cultivo células extraídas de un animal, embrión de pollo, durante un periodo de tiempo superior al de la vida de éste**. Mantuvo en cultivo células de pollo durante 34 años. Gran parte del éxito en el mantenimiento de los cultivos se debió al desarrollo del denominado **frasco de Carrel**.

Entre los años 1920 y 1940 se desarrollaron diferentes estrategias de obtención de cultivos y de mantenimiento de las **condiciones estériles**, pero no se consiguieron grandes avances. Fue a partir de los años 40, con el aislamiento de los primeros **antibióticos**, y su utilización con cultivos celulares cuando se permitió el desarrollo de numerosas aplicaciones.

### 1.2. CONCEPTO.

#### **Definición:**

Actualmente se entiende por **cultivo celular** al conjunto de **técnicas que permiten el mantenimiento de las células 'in vitro', manteniendo al máximo sus propiedades fisiológicas, bioquímicas y genéticas**.

Dependiendo del grado de preservación de la estructura del tejido o del órgano de origen y de su duración hablaremos de diferentes tipos de cultivos: de órganos, explantes, primarios o secundarios.

El término general de **cultivo de tejidos** se utiliza para definir al conjunto de técnicas que permiten la extracción de un órgano, un tejido o un grupo de células de su ubicación, para mantenerlo en un ambiente artificial y promover su crecimiento. Dependiendo del grado de preservación de la estructura del tejido o del órgano de origen y de su duración hablaremos de tres tipos de cultivos de tejidos:

A. Cultivo de órganos:

Se coloca el órgano sobre una rejilla situada en la interfase líquido-gas de un medio del que obtiene los nutrientes y al que puede liberar los desechos. Este tipo de cultivo permite mantener, al menos en parte, la arquitectura característica del tejido "in vivo". Se conservan las interacciones histológicas y, gracias a ello, este tipo de cultivo permite mantener los tipos celulares diferenciados, por lo que representan una buena réplica del tejido de origen. Sin embargo, no crecen mucho (la proliferación celular se limita a las células embrionarias de la periferia) y no se pueden propagar. Se necesita un nuevo explante para cada experimento lo que supone mucho más trabajo y una limitada reproducibilidad de la muestra. Cuantificar es difícil y la cantidad de material que se puede cultivar es reducida.

B. Explantes primarios:

Se coloca un fragmento de tejido o de órgano en la interfase sólido-líquido de un soporte de vidrio o de plástico. Las células se adhieren a la superficie y las células de la periferia del explante pueden migrar y proliferar por la superficie del soporte.

C. Cultivo celular:

Se produce el aislamiento y disgregación de las células de los tejidos, ya sea por métodos enzimáticos o mecánicos, para su siembra y mantenimiento en condiciones controladas.

En la actualidad los cultivos celulares son los más empleados fundamentalmente por la posibilidad de propagación, así como por las ventajas en la cuantificación, caracterización y repetibilidad de las muestras.

### 1.3. TIPOS.

En función de determinadas características relacionadas con el crecimiento y mantenimiento celular, diferenciaremos los siguientes tres tipos de cultivos celulares:

#### 1.3.1. Cultivo primario.

Se denominan así a aquellos cultivos preparados directamente a partir de un tejido u órgano. Pueden iniciarse con o sin fraccionamiento previo para separar los distintos tipos celulares. En estos cultivos las células están vivas, conservan sus características originales y su proliferación

es limitada. Pueden ser removidas del recipiente de cultivo para formar cultivos secundarios o líneas primarias.

*Ejemplos de cultivo primario:* neuronas, hepatocitos obtenidos de hígado adulto, linfocitos.

### 1.3.2. Cultivo secundario o línea primaria.

Se obtiene a partir del subcultivo de un cultivo primario. En estas condiciones las células suelen multiplicarse hasta cubrir la superficie del recipiente de cultivo, formando una monocapa. Como consecuencia del contacto entre las células se detiene temporalmente su proliferación, hasta que se realiza un subcultivo a un recipiente con medio fresco. Estos subcultivos se podrán prolongar durante semanas o meses. En este periodo, las células frecuentemente mostrarán distintas propiedades según su origen.

*Ejemplos de cultivo secundario:* cultivo de epitelio aislado (fibroblastos dérmicos), células endoteliales del cordón umbilical.

### 1.3.3. Línea celular continua o estable.

Normalmente, las líneas celulares tienen una vida finita que, según el tipo de célula, se puede prolongar entre 20 y 100 generaciones. Superado ese límite, las células entran en una etapa que se denomina **senescencia** en la que pierden su capacidad de proliferar y mueren. Por ejemplo, los fibroblastos humanos normales se dividen solamente entre 25 y 40 veces en cultivo, antes de detenerse. La capacidad limitada de proliferación puede ser el resultado de un acortamiento progresivo de los telómeros (porción de ADN que se encuentra en los extremos de los cromosomas), o puede ser una consecuencia de la activación de mecanismos denominados “puntos de control” (check points) del ciclo celular.

Sin embargo, algunas células (como las células de roedores y las células tumorales) evitan la senescencia y dan lugar a líneas celulares continuas o estables, que **crecen indefinidamente**. Estas células pueden surgir de forma espontánea (exposición a radiaciones ionizantes o a carcinógenos químicos) o inducida (infección vírica o transfección de ADN) y son el resultado de un cambio genotípico denominado “transformación”.

En 1952 se obtuvo la primera línea celular continua humana. Son las denominadas células HeLa, células extraídas a partir de un tumor de cuello de útero de una paciente afroamericana que se llamaba Henrietta Lacks.

En el laboratorio de sanidad animal las líneas con las que se trabaja proceden de mamíferos, peces y mosquitos, dependiendo del virus en estudio. Ejemplos de líneas celulares más utilizadas se muestran en la siguiente tabla.

LÍNEA CELULAR	LINEA CELULAR (nombre completo)	DESCRIPCIÓN LINEA CELULAR (propiedades crecimiento/origen)	ESPECIE DE ORIGEN de la línea celular	MORFOLOGÍA DE CÉLULA
VERO 76	african green monkey kidney	células adherentes en monocapa de riñón de cercopithecus aethiops	mono verde africano	epitelial
BHK-21 (CLONE 13)	baby hamster kidney	células adherentes de riñón de misocricetus auratus (neonato)	hamster, syriam goldem	fibroblástica
RK 13	rabbit kidney cell line rk13	células adherentes de riñón de conejo	conejo	epitelial
RTG-2	Rainbow trout gonad	células de tejido gonadal de oncorhynchus mykiss (trucha arco iris)	trucha arco iris/salmc	fibroblástica

Generalmente es más fácil adquirir una determinada línea celular que establecerla experimentalmente. Las dos colecciones o bancos de líneas celulares más importantes son: American Type Culture Collection (ATCC) y European Collection of Cell Cultures (ECACC).

#### 1.4. REQUERIMIENTOS DE UN CULTIVO CELULAR

Las células para vivir fuera del organismo del que originariamente formaban parte necesitan un medio que les proporcione todo lo necesario. Estos requerimientos vienen recogidos en los cuatro puntos siguientes:

##### 1.4.1. Sustrato del cultivo.

Hace referencia al soporte sobre el que crecen las células. La mayor parte de las líneas celulares crecen en forma de monocapa unidas a un soporte más o menos sólido. El crecimiento en suspensión está usualmente restringido a algunas líneas celulares especialmente de células hematopoyéticas y tumores ascíticos. Según si la línea celular precise o no unirse al sustrato para proliferar se dice que es dependiente (adherida) o independiente (suspensión) de anclaje.

Los tipos de sustrato más empleados en la actualidad son los siguientes:

- **Vidrio:** Tiene como ventajas su escaso coste y su facilidad de limpieza y esterilización. Asimismo, es especialmente útil para su posterior observación al microscopio por su calidad óptica.
- **Plástico desechable:** Muy empleado en la actualidad como material desechable estéril por irradiación. El plástico más empleado es el poliestireno, de buena calidad óptica. Debido a que este plástico es hidrofóbico requiere un tratamiento mediante irradiación-gamma, químico, o mediante descargas eléctricas que produzca una superficie hidrofílica. El tratamiento es característico de los diferentes suministradores, y por ello los productos varían en calidad de uno a otro.

- Microsoportes ("microcarriers"). Se trata de soportes plásticos (poliestireno), de sephadex o poliácridamida en forma de pequeñas bolas ("beads") a las que se unen las células dependientes de anclaje. Estas bolas con las células adheridas se mantienen en suspensión.
- Sustratos metálicos. Se han desarrollado técnicas para crecer células de glia en sustratos metálicos, de paladio (Westermarck, 1978) o en discos de acero (Birnie y Simmons, 1967).
- Matrices tridimensionales. Son sustratos en los que las células penetran, estableciendo una distribución tridimensional: geles de colágeno (Douglas y col., 1980), esponja de celulosa sola (Leighton y col., 1951), o recubierta de colágeno (Leighton y col., 1968), o "gelfoam". En estas matrices muchos tipos celulares crecen y se establecen de una manera análoga a como lo hacen en el tejido de origen: células epiteliales de mama se organizan en disposición tubular, mientras que las células del carcinoma de mama lo hacen de una forma mucho más desordenada (Yang y col., 1981).
- Superficies tratadas con componentes de la matriz extracelular. La adherencia y crecimiento de las células en un frasco mejora en muchos casos si la superficie ha sido tratada con el medio de crecimiento de otro cultivo, debido a la presencia de colágeno o fibronectina liberada por las células, o bien sobre superficies recubiertas de proteínas de matriz extracelular (fibronectina, colágeno, vitronectina, Matrigel, etc..).
- "Feeder layers". Se ha descrito previamente que algunos tipos celulares para crecer en cultivo y expresar sus características diferenciadas precisan de suplementos específicos. Una manera de obtener estos suplementos es la de hacerlos crecer sobre los restos de monocapas de otros tipos celulares.

El material más utilizado como sustrato es el plástico desechable, en forma de diferentes tipos de recipientes. Los más comunes son:

- Placas de Petri (ventiladas). Disponibles en 3 tamaños: 3,5, 6,0 y 10 cm de diámetro son las más empleadas cuando se trata de crecer las células para usar directamente en experimentos. No es recomendable, por su escasa estanqueidad, emplearlas para el mantenimiento de líneas.
- Multiplacas. Es una variante de las placas de Petri. Placas de varios pocillos, desde 6 a 96 pocillos.
- Frascos de Roux (botellas ventiladas o no). Disponibles en diferentes tamaños, son recomendables para el mantenimiento de las líneas y la producción de células, o bien para el crecimiento de células en suspensión.
- "Roller bottles". Se trata de tubos, con una cara plana sobre la que se fija el cultivo, y que se incuban en los incubadores dotados de "roller". Existen variantes con una gran superficie de adhesión (espirales de plástico...) y que se destinan a la producción de gran número de células.

### 1.4.2. Fase gaseosa.

Los componentes más significativos de la fase gaseosa son el oxígeno y el dióxido de carbono:

- Oxígeno. Es imprescindible para la vida de las células. Las necesidades de oxígeno para la mayor parte de los cultivos celulares están cubiertas con la tensión atmosférica, aunque existen cultivos, especialmente los cultivos de órganos que requieren una tensión de oxígeno superior (del 95%).
- Dióxido de carbono. El dióxido de carbono juega un complejo papel en el medio de cultivo debido a que influye en la regulación del pH del mismo. Cada medio tiene una concentración recomendada de bicarbonato y tensión de CO<sub>2</sub> para alcanzar el pH correcto.

### 1.4.3. Propiedades físicas y químicas.

Las características físico-químicas del medio vienen definidas por:

- pH y capacidad tamponadora. El pH óptimo de crecimiento para la mayoría de las líneas celulares es de 7,4 (aunque existen pequeñas variaciones). El indicador de pH que se suele emplear es rojo fenol, que presenta color rojo a pH 7,4, naranja a pH 7,0, amarillo a pH 6,5, azul-rojo a pH 7,6 y púrpura a pH 7,8. El medio de cultivo debe estar tamponado, a fin de evitar los cambios bruscos de pH. La solución tamponadora más empleada sigue siendo el tampón bicarbonato, que equilibra el CO<sub>2</sub> atmosférico
- Osmolaridad. Muchas células en cultivo tienen una amplia tolerancia frente a la osmolaridad del medio, creciendo bien en el rango de 260 a 320 mOsm/kg, con pequeñas variaciones dependiendo de la especie considerada. Es recomendable emplear medios ligeramente hipotónicos para compensar la evaporación durante el periodo de incubación, especialmente en incubadores sin control de la humedad del ambiente.
- Temperatura. La temperatura tiene gran influencia en la tasa de crecimiento de las células, de ahí la importancia de un buen control de ésta en la incubación. Influye asimismo en el pH del medio.  
Ejemplos: Las células de mamífero se incuban a 37°C, las células de mosquito a 28-30°C y las células de peces se incuban a 22-25°C.
- Viscosidad. La viscosidad del medio viene determinada fundamentalmente por el contenido en suero y tiene poca influencia sobre el crecimiento. Sí es importante para evitar el daño celular en la agitación del cultivo (menor daño a más viscosidad) y durante la tripsinización.
- Tensión superficial. La tensión superficial se ha de mantener lo suficientemente baja para evitar la formación de espuma.
- Humedad. Los cultivos deben tener una humedad relativa del 95%-98% para evitar su desecación.

#### 1.4.4. Condiciones fisiológicas.

Hacen referencia a la composición del medio. Este medio debe ser capaz de reemplazar el medio natural del que proceden las células y suministrarles los nutrientes necesarios para realizar sus funciones de crecimiento, metabolismo y división celular.

Todo medio de cultivo está formado por los siguientes elementos:

- Soluciones salinas equilibradas (BSS). Una solución salina equilibrada es una mezcla de sales inorgánicas, incluyendo habitualmente bicarbonato sódico, y suplementada con glucosa.
- Aminoácidos. Los requerimientos pueden variar de una línea celular a otra. Un suplemento común es el de glutamina.
- Vitaminas. La limitación de vitaminas se manifiesta en la supervivencia de las células y en la reducción de la tasa de crecimiento más que en la densidad celular.
- Glucosa. Es la fuente de energía en muchos medios.
- Otros suplementos orgánicos de bajo peso molecular. Como lípidos, piruvato, etc.
- Hormonas y factores de crecimiento (suero). En los medios no definidos suele aportarlos el suero. Los tipos de suero empleados son suero de ternera ("calf serum", CF), suero bovino fetal ("fetal calf serum", FCS), suero de caballo ("horse serum", HS) y suero humano ("human serum", HuS). El más usado es el suero de ternera, mientras que el suero bovino fetal es usado en líneas más exigentes, y el suero humano en líneas humanas. La utilización de suero es problemática pues:
  - a pesar de que la composición del suero es conocida, existen gran cantidad de componentes presentes en cantidades variables en éste que pueden influir notablemente en el cultivo (hormonas, factores de crecimiento...)
  - el suero varía de lote a lote, y cada uno se puede emplear como máximo 1 año, probablemente deteriorándose a lo largo de ese tiempo, a pesar del almacenamiento a baja temperatura.
  - cada cambio de lote de suero requiere realizar una serie de controles tediosos y costosos.
  - si se cultivan varios tipos celulares cada uno puede requerir un lote diferente, lo que complica el almacenamiento e incrementa los costes.
- Antibióticos y antifúngicos, para evitar el crecimiento de bacterias y hongos. Los más utilizados son penicilina, estreptomycin, gentamicina, fungizona y anfotericina-B

Algunos ejemplos de los principales medios empleados y sus aplicaciones se citan a continuación:

- Medio Basal de Eagle (BME). Medio elemental con sólo los aminoácidos esenciales. Se necesita siempre la suplementación con suero bovino fetal al 10 %. Crecimiento de fibroblastos de ratón y células HeLa.

- Medio Mínimo Esencial de Eagle (MEM). Es el medio de uso más corriente, contiene más aminoácidos y en mayor concentración que el BME. Se usa para cada casi todo tipo de cultivos y requiere la adición de suero (10%).
- RPMI 1640. Medio diseñado para el crecimiento de linfoblastos y líneas celulares leucémicas en suspensión. Tiene un amplio rango de aplicaciones con suplementos adecuados.
- Medio MEM modificado por Dulbeco (DMEM). Contiene cuatro veces la concentración de aminoácidos y vitaminas que el BME. Se usa para la selección de hibridomas suplementado con HAT<sup>1</sup> o HT.

### 1.5. CONDICIONES DE TRABAJO CON CULTIVOS CELULARES Y EQUIPOS

La característica principal que define el trabajo en el laboratorio de cultivos celulares es el **mantenimiento de la asepsia**. La tasa de crecimiento de las células en los cultivos es muy inferior al de los contaminantes habituales: hongos, levaduras, bacterias y micoplasmas, por ello para el mantenimiento adecuado de los cultivos es vital evitar la aparición de cualquier microorganismo indeseado.

Las condiciones de asepsia se consiguen aplicando los siguientes principios básicos:

- Cuidar la localización del laboratorio en el que se va a trabajar con cultivos celulares. Debe ser una zona de trabajo localizada en una zona tranquila y que no sea de mucho tránsito de personal.
- La ropa de trabajo debe ser específica para trabajar en esa zona. Utilizar los correspondientes EPIs para el manejo de cultivos y realizar siempre unas buenas prácticas de laboratorio.
- Se requiere la utilización de unos determinados equipos, de los que se debe conocer su correcto funcionamiento y tener establecido un programa de mantenimiento y limpieza.
- Mantener una limpieza y desinfección correcta de los equipos y de las zonas de trabajo, para ello debe tenerse diseñado un plan de limpieza y utilizar desinfectantes específicos que no dañen los cultivos celulares.

El laboratorio de cultivos celulares contará con los siguientes equipos:

a) **Cabinas de flujo laminar**: Su función consiste en mantener el área libre de partículas y contaminantes que puedan acceder al cultivo. Esto se consigue mediante un dispositivo mecánico que fuerza el paso del aire a través de un filtro de gran superficie (filtro HEPA). En concreto para trabajar con cultivos celulares se utiliza una Cabina de seguridad biológica (CSB) de Clase II, que protegen el producto, al personal y al medio ambiente.

---

<sup>1</sup> Para aislar los hibridomas, se utiliza el medio selectivo HAT, que permite únicamente el crecimiento de los hibridomas. Este medio contiene tres componentes: aminopterina, que inhibe la síntesis de nucleótidos por la vía de novo; hipoxantina, precursor de las bases púricas; y timidina, precursor de pirimidinas

b) Incubador: Según las necesidades de las células, proporcionarán o no también CO<sub>2</sub>. Las células en cultivo son capaces de soportar sin daños importantes variaciones de temperatura, siempre que sean por debajo de la temperatura corporal del animal del que proceden.

c) Baño termostático: Se utiliza para atemperar todos los medios y reactivos que van a estar en contacto con las células.

d) Microscopio invertido de contraste de fases: Se utiliza para realizar el control morfológico del cultivo. Tiene dos características diferenciales que vienen marcadas por las características de los cultivos celulares en estudio:

- En primer lugar, el hecho de que las muestras a observar se encuentren en recipientes de un cierto grosor (frascos, placas que contienen los cultivos celulares) hace que un microscopio convencional no sea adecuado (por su pequeña distancia focal), por lo que se han desarrollado microscopios de diseño original, en los cuales la fuente de iluminación y los objetivos se encuentran invertidos respecto a la platina de un microscopio óptico convencional.
- En segundo lugar, el hecho de que la muestra a estudiar no tenga color, es decir, se trata de muestras vivas y con poco contraste, hace que el microscopio se equipe con el dispositivo de contraste de fases (diafragmas anulares a nivel del condensador y placa de fases entre las lentes del objetivo). De esta forma el contraste de la imagen aumenta y la calidad obtenida es muy superior.

e) Equipos de frío:

- Neveras (4°C) para el almacenamiento de medios y reactivos.
- Congeladores de -20°C para el almacenamiento de suero, aditivos (glutamina, antibióticos) y soluciones enzimáticas (tripsina, colagenasa,...).
- Congeladores de -80°C para el almacenamiento a largo plazo de los aditivos del medio (suero, glutamina, antibióticos,...) y de sustancias especialmente sensibles (factores de crecimiento, mitógenos, inductores,...).
- Unidad de almacenamiento en nitrógeno líquido (-196°C), para el almacenamiento de las líneas celulares.

f) Equipos de esterilización: La necesidad de asepsia para el cultivo de células se extiende no sólo al medio en que se realiza el trabajo sino muy especialmente a los recipientes que contactan con el cultivo, a los medios líquidos o sólidos, y a los instrumentos que puedan entrar en contacto con éste en algún momento de su manipulación (pipetas, puntas de pipeta automática, pinzas, tubos, material variado de vidrio...). Para esterilizar todo este material, de variada naturaleza se emplean una serie de métodos: irradiación con radiación gamma o rayos X, esterilización por gas, autoclavado, filtración, ... El laboratorio de cultivos celulares debe disponer de: equipo de filtración y autoclave.

g) Equipos de uso general: Equipo de purificación de agua, pipetus, pipetas monocanales y multicanales, centrífuga.

h) Material desechable estéril: pipetas serológicas, tubos de diferentes volúmenes, frascos tratados para cultivos celulares, placas tratadas para cultivos celulares, puntas de diferentes volúmenes con filtro y sin filtro.

## 1.6. MANTENIMIENTO DE CULTIVOS CELULARES

Una vez conocidos los requerimientos de los cultivos celulares y la forma en la que se debe trabajar con ellos, explicaremos cómo se realiza el mantenimiento de estos.

### 1.6.1. Subcultivo

El cultivo celular requiere un cambio de sustrato donde está adherido cuando ha alcanzado una determinada confluencia (formación de monocapa) para que el cultivo se pueda seguir propagando. Para ello las células se tienen que disgregar.

### 1.6.2. Métodos de disgregación celular

Técnicas que consisten en separar las células entre sí y de un sustrato manteniendo la viabilidad celular. Para conseguirlo es necesario romper la malla de proteínas que forman la matriz extracelular que las mantiene unidas mediante procesos que separen las moléculas proteicas de la matriz extracelular (por ej. secuestrando los iones calcio que permiten la unión), o bien rompiendo proteolíticamente (mediante la acción de proteasas) las mismas proteínas.

Generalmente los métodos empleados se pueden clasificar en tres categorías:

- Mecánicos (por ejemplo cortar, picar, cribar, rascar, etc...). En cultivos celulares se emplean con frecuencia los métodos de rascado ("scrapping") de la placa para arrancar las células adheridas.  
Ejemplo: Células KC de mosquito se desprenden del frasco con raspador, no con tripsina que no tiene efecto sobre ellas.
- Químicos. Generalmente se trata de la adición de soluciones en las que no hay iones divalentes o bien de agentes quelantes de estos iones. En cualquier caso, se reduce la concentración de los iones que estabilizan las uniones de las proteínas de la matriz extracelular y de éstas con los receptores celulares.
- Enzimáticos. Tratamiento del tejido o del cultivo celular con soluciones de proteasas activas (colagenasa, dispasa, tripsina, elastasa, papaína, pronasa, hialuronidasa, etc...)

Sin embargo, en la práctica se suelen emplear técnicas que combinan dos o tres métodos. La elección de uno u otro procedimiento dependerá fundamentalmente de la naturaleza y cantidad de tejido o cultivo disponible y del uso previsto de las células obtenidas.

### **1.6.3. Almacenamiento de cultivos celulares**

El almacenamiento de cultivos celulares durante largos periodos de tiempo requiere de métodos para que las bajas temperaturas no les dañen.

El mejor método de conservación es **la congelación en nitrógeno líquido** de las células, que permite mantener las células congeladas por debajo de los  $-130^{\circ}\text{C}$ , durante largos periodos de tiempo. El nitrógeno está a una temperatura de  $-196^{\circ}\text{C}$  en fase líquida y en la fase de vapor está entre  $-178^{\circ}\text{C}$  y  $-150^{\circ}\text{C}$ .

Para una óptima congelación de las células, comúnmente se usa un crioprotector (DMSO o glicerol). A continuación, la temperatura de congelación deberá disminuir lentamente, a una velocidad de  $1^{\circ}\text{C}/\text{minuto}$  para evitar los efectos perjudiciales de la formación de cristales de hielo del agua dentro de la célula. Una vez alcanzados los  $-80^{\circ}\text{C}$  se pasarán al tanque de nitrógeno líquido.

## **1.7. CONTROL DE CALIDAD**

El trabajo con cultivos celulares requiere hacerlo en condiciones de esterilidad, como ya se ha comentado anteriormente. Por eso es importante controlar las situaciones que puedan romper esas condiciones óptimas, como pueden ser las malas prácticas de laboratorio por parte del personal, incluyendo una inadecuada utilización de los EPIs, un mantenimiento de las CSB e incubadores deficiente, la conservación de los reactivos a una temperatura errónea o no haber realizado un control previo de los reactivos empleados, entre otros.

Por eso resulta fundamental realizar un control de la calidad de los cultivos celulares, dirigidos a detectar posibles contaminaciones y posibles problemas aparecidos tras su incorrecta manipulación. Para asegurar la calidad de los cultivos con los que se trabaja, controlaremos los siguientes campos:

### **1.7.1. Control de reactivos y material**

Se debe garantizar la calidad de todos los reactivos y materiales utilizados en los laboratorios que trabajan con cultivos celulares. Para ello, cada laboratorio deberá establecer unos procedimientos e instrucciones relacionados con la gestión de los reactivos y el personal deberá conocerlos y seguirlos.

Todos los reactivos que el laboratorio adquiera preparados deberán venir acompañados de los certificados de calidad del fabricante. Hay reactivos que deben tener un control adicional por ser potenciales fuentes de contaminación, como son el suero fetal bovino (SFB) que puede

estar contaminado con el virus de la Diarrea Vírica bovina (Bovine viral diarrhoea virus (BVDV)) y la tripsina, que, al ser de origen porcino, pueden ser una fuente de *Mycoplasma hyorhinis*.

Por otra parte, el material plástico utilizado en cultivos celulares debe cumplir unas especificaciones técnicas determinadas, siendo requisito imprescindible que esté tratado para que facilite la adhesión de las células, igualmente deberá ir acompañado de su certificado de análisis.

### 1.7.2. Control de origen e integridad de las líneas celulares.

Es importante adquirir líneas celulares de fuentes reconocidas, como son las colecciones acreditadas, de las que hemos hablado en otro apartado. Esto nos permitirá conseguir:

- Líneas celulares libres de contaminaciones.
- Líneas completamente caracterizadas y autenticado su perfil de ADN y la especie de la que proceden.
- Contar con una detallada información que acompaña a las líneas celulares una vez que se adquieren y que nos ayudará a trabajar y mantener correctamente la línea celular.

### 1.7.3. Control de contaminaciones microbianas.

Las contaminaciones microbianas más frecuentes pueden ser producidas por:

- Bacterias y hongos. Suele tratarse de infecciones groseras, detectables a simple vista o al visualizar el cultivo en el microscopio. Lo que se aprecia es un aumento de la turbidez y un cambio en el color del medio debido a un cambio en el pH.
- Virus. Hay líneas celulares que se encuentran persistentemente infectadas con virus. Es importante conocerlo y valorar su posible interferencia en los trabajos desarrollados. Cuando adquirimos una línea celular, esta información viene recogida en la documentación que le acompaña.
- Mycoplasma spp.: Son más pequeños que las bacterias (0.3 µm de diámetro), no poseen pared celular. Su capacidad de sintetizar nutrientes es limitada, por ello dependen de los nutrientes que les proporciona su hospedador. En el caso de los cultivos celulares compiten con las células por los nutrientes del medio de cultivo. Su presencia es difícil de detectar, no se observan al microscopio, y por ello requiere el uso de técnicas especiales, entre las que se encuentra la detección por PCR. Las especies más frecuentes que contaminan los cultivos celulares son *M.hyorhinis*, *M.arginini*, *M. orale*, *M. fermentans* y *Acholeplasma laidlawii* y su procedencia, en la mayoría, está en el propio técnico de laboratorio, en el SFB o en la solución de tripsina de origen porcino.

Los efectos de la infección por *Mycoplasma spp.* son insidiosos, producen disminución del crecimiento celular, cambios en la morfología de las células, aberraciones cromosómicas y alteraciones en el metabolismo celular, entre otros.

Es importante tener en cuenta que los *Mycoplasma spp.* sobreviven en nitrógeno líquido, y aunque no son capaces de proliferar en este entorno, si pueden contaminar otros

cultivos almacenados también en nitrógeno líquido y, además, una vez que se descongelen seguirán estando contaminados.

Debido a las particularidades que presenta esta infección, pasando inadvertida, es necesario tener un procedimiento para el control rutinario de los cultivos, así como procedimientos de actuación en caso de detectar un cultivo contaminado.

#### **1.7.4. Control medioambiental.**

Para garantizar la calidad de los cultivos celulares es fundamental trabajar en un área ausente de contaminación ambiental. Para ello se realizarán los siguientes controles:

- Control de superficies de trabajo: El control microbiológico de superficies nos proporciona información sobre la cantidad de microorganismos presentes sobre una superficie de trabajo.
- Control de ambiente: El aire, además de partículas en suspensión, es portador de bacterias en forma vegetativa o esporulada y de esporos de hongos, por lo que puede ser causa de contaminaciones de los cultivos celulares. Por tanto, es necesario que el laboratorio mantenga unas perfectas condiciones higiénicas durante la manipulación de los cultivos celulares, ya que cuanto más limpia esté un área, menor será el número de microorganismos presentes en el aire de la misma.

Este control se realizará siempre después de limpiar las zonas de trabajo. Junto al control ambiental se establecerá un Plan de limpieza tanto de superficies de trabajo como de equipos (CSB, Incubadores, baños) que es lo que nos asegurará que el trabajo se desarrolla en unas correctas condiciones higiénicas.

## **2. APLICACIONES EN LABORATORIOS DE SANIDAD ANIMAL.**

La utilización de cultivos celulares en los laboratorios de sanidad animal está relacionada con el diagnóstico de enfermedades víricas, ya que los virus necesitan de una célula huésped para crecer y replicar su material genético, y por lo tanto para su supervivencia es necesario infectar una célula para obtener copias del virus inicial. Muchos virus pueden ser expandidos en diferentes líneas celulares continuas. Para reconocer el crecimiento de los virus en el cultivo se usará, en general, el efecto citopático (ECP) que el virus produce en el cultivo, excepto en el caso de los Pestivirus, que no producen ECP, en los que se utilizará la medida indirecta proporcionada por las técnicas de PCR.

Así utilizaremos cultivos celulares en las siguientes técnicas de diagnóstico laboratorial:

### **2.1. TÉCNICAS DE MULTIPLICACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE VIRUS EN CULTIVOS CELULARES.**

Para conocer la cantidad de virus que contiene el cultivo celular inoculado, puede recurrirse a métodos físicos, como el conteo directo de partículas virales aplicando técnicas de microscopía electrónica. Pero este método es técnicamente complejo y además no considera la actividad biológica de las partículas virales.

Los métodos biológicos, en cambio, miden la presencia de infectividad sin tener en cuenta el número de partículas presentes en la preparación. Entre estos métodos usaremos la cuantificación de la infectividad en cultivo celular mediante el “Método de titulación por el Punto Final”. Para reconocer el crecimiento de los virus en el cultivo se usará, en general, el efecto citopático (ECP) que el virus produce en el huésped inoculado. En el caso de los Pestivirus se utilizará el marcado inmunológico directo con anticuerpos específicos conjugados con Peroxidasa. Como estos métodos de visualización (ECP o marcado inmunológico) son de “todo o nada”, para poder hacer una cuantificación deben utilizarse varias réplicas de la muestra.

En el “Método de titulación por el Punto Final” debido a la forma sigmoidea que presenta la curva “Dosis – Respuesta”, en las zonas de respuesta máxima y mínima no puede asignarse unívocamente un porcentaje de efecto a una determinada dosis. Por eso debe trabajarse en una zona de diluciones tal que, a una pequeña variación en la dilución, le corresponda una variación claramente detectable en la respuesta. Por esa razón se elige la zona correspondiente al 50% del efecto, y el título de la muestra se expresa como “Dosis Infeccivas 50%” (DI50), que representa la dosis que produce respuesta en el 50% de las réplicas.

Como el 50% del efecto buscado no corresponde generalmente de forma exacta a una de las diluciones de trabajo, es necesario hacer una interpolación matemática para definirla. Existen varios métodos empleados para este fin, como son el Reed and Muench o el Spearman – Kärber.

## **2.2. TÉCNICAS DE AISLAMIENTO DE VIRUS EN CULTIVOS CELULARES**

El aislamiento de virus que originan diferentes enfermedades en los animales se lleva a cabo mediante la inoculación de muestras problema en cultivos celulares. Las muestras para analizar del animal problema procederán de los órganos diana en los que el virus se localiza cuando produce la enfermedad (variará por tanto con la enfermedad y la especie animal). Los cultivos celulares serán también elegidos en función del virus y de la especie animal en estudio.

Finalmente, tanto si se produce ECP como si no, la confirmación del antígeno vírico en los cultivos se realizará con pruebas de PCR.

La técnica de aislamiento se considera no solo una técnica de diagnóstico, sino una herramienta para conseguir tener los virus en suspensión y propiciar posteriores estudios haciendo uso de él (epidemiología molecular) así como usarlo en otras técnicas de diagnóstico (seroneutralización).

En el caso del virus de la Peste Porcina Africana (VPPA), en principio no replica en ninguna de las líneas celulares continuas establecidas, por lo que cultivos primarios de monocitos y macrófagos son los sistemas in vitro que se utilizan para aislar y multiplicar VPPA, tratando de imitar una infección natural. Para la cuantificación del virus producido, se utiliza el efecto característico de la hemoadsorción (HAD), consistente en la adhesión de los hematíes del

cerdo alrededor de los leucocitos que han sido infectados por VPPA, presentando una imagen al microscopio de mórula o corona (roseta) de eritrocitos alrededor de los leucocitos.

Para las cepas de VPPA que no sean hemoadsorbentes (y también para las hemoadsorbentes), se puede cuantificar en base al efecto citopático (ECP) que produce el virus sobre el cultivo celular. En ambos casos, el título se determinará de acuerdo al método Reed and Muench y el aislamiento se confirmará por PCR.

### **2.3. TÉCNICA DE IDENTIFICACIÓN DE VIRUS POR INMUNOFLUORESCENCIA**

Se basa en la identificación de virus en cultivos celulares infectados y fijados por medio de tinciones inmunofluorescentes.

Esta técnica es utilizada para la identificación del virus de la rabia, virus de enfermedades de peces como los virus de la Septicemia Hemorrágica Viral (SHV), Necrosis Hematopoyética Infecciosa (NHI), Necrosis Pancreática Infecciosa (NPI) y/o Viremia Primaveral de la Carpa (VPC), así como de aquellos virus susceptibles de estudio frente a los que existan anticuerpos marcados con fluorocromos, en cultivos celulares infectados y fijados.

La Inmunofluorescencia (IF) consiste en revelar antígenos presentes en una estructura celular o tisular, mediante la incubación de las células o tejidos con un antisuero específico previamente conjugado con un compuesto fluorescente o fluorocromo, generalmente fluoresceína, que emiten luz (fluorescente) al exponerlos a luz ultravioleta.

### **2.4. TÉCNICA DE SERONEUTRALIZACIÓN DEL VIRUS**

La seroneutralización para la detección de anticuerpos específicos frente a un determinado virus se basa en que los anticuerpos neutralizantes que pueda contener la muestra de suero (del animal en estudio), enfrentados directamente contra una concentración previamente determinada del virus específico, puede prevenir los efectos que ese virus produce en un cultivo celular.

Si una muestra de suero enfrentada a un virus específico no presenta efecto, queda demostrada la existencia de anticuerpos neutralizantes, siempre y cuando los controles de células, de virus, de suero positivo y negativo, y el testigo de suero cumplan los criterios de aceptación.

El virus estándar que se usa en la neutralización deberá estar titulado en la misma línea celular que se vaya a usar en el procedimiento.

### **2.5. HIBRIDOMAS**

Producción de anticuerpos monoclonales, que son soporte de muchas técnicas de diagnóstico.

## **BIBLIOGRAFÍA**

R. Ian Freshney (2010). Culture of Animals Cells. A Manual of Basic Technique and Specialized Applications, 6th Edition, John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey.

NTP 902 (Nota Técnica de Prevención año 2011): Riesgo biológico: evaluación y prevención en trabajos con cultivos celulares.

Cultivos celulares. Cultek. 2018. [https://nanopdf.com/download/cultivos-celulares\\_pdf](https://nanopdf.com/download/cultivos-celulares_pdf)

Fundamental Techniques in Cell Culture a Laboratory Handbook. SIGMA (2018)  
<https://www.culturecollections.org.uk/media/161749/ecacc-lab-handbook-fourth-edition.pdf>

MATERIAL NO OFICIAL

**MATERIAL PARA LA PREPARACIÓN DEL TEMA 24**

**ANTICUERPOS POLICLONALES Y MONOCLONALES: CONCEPTO, TIPOS Y APLICACIONES EN LABORATORIOS DE SANIDAD Y GENÉTICA ANIMAL**

*Este material no tiene carácter oficial, por lo que en ningún caso vinculará al Tribunal Calificador. Constituye, únicamente, un instrumento complementario que servirá de apoyo al opositor para enfocar cada uno de los epígrafes, pero nunca de forma exclusiva ni excluyente. El Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación no se hace responsable del contenido del mismo.*

*Los materiales no serán objeto de actualización constante.*

## **ÍNDICE**

### **1. INTRODUCCIÓN**

- 1.1. SISTEMA INMUNE INNATO Y ADQUIRIDO
- 1.2. INMUNIDAD CELULAR Y HUMORAL

### **2. CONCEPTO**

- 2.1. CARACTERÍSTICAS
- 2.2. ESTRUCTURA

### **3. TIPOS**

- 3.1. ISOTIPOS
- 3.2. ANTICUERPOS MONOCLONALES Y POLICLONALES
  - 3.2.1. Definiciones
  - 3.2.2. Producción de anticuerpos
  - 3.2.3. Diferencias entre anticuerpos monoclonales y policlonales

### **4. FUNCIONES**

- 4.1. AGLUTINACIÓN – NEUTRALIZACIÓN DEL ANTÍGENO
- 4.2. OPSONIZACIÓN Y FAGOCITOSIS MEDIADA POR ANTICUERPOS
- 4.3. CITOTOXICIDAD ADCC (CITOTOXICIDAD DEPENDIENTE DEL ANTICUERPO)
- 4.4. HIPERSENSIBILIDAD INMEDIATA DESENCADENADA POR IgE
- 4.5. INMUNIDAD EN LAS MUCOSAS MEDIADA POR IgA
- 4.6. TRANSFERENCIA DE INMUNIDAD PASIVA AL FETO Y AL NEONATO POR IgG E IgA
- 4.7. ACTIVACIÓN DEL COMPLEMENTO

### **5. APLICACIONES EN LABORATORIOS DE SANIDAD ANIMAL Y GENÉTICA**

- 5.1. DIAGNÓSTICO SEROLÓGICO
- 5.2. DIAGNÓSTICO INMUNOHISTOQUÍMICO
- 5.3. SEROPERFILES Y SEGUIMIENTO DE LA RESPUESTA INMUNE

## 1. INTRODUCCIÓN

El término inmunidad significa protección frente a la enfermedad infecciosa. Las células y moléculas responsables de la inmunidad constituyen el sistema inmune y la respuesta global y coordinada frente a sustancias extrañas es la respuesta inmunitaria. Constantemente, nuestro organismo está expuesto a microorganismos (bacterias, virus, hongos y parásitos). Muchos de estos agentes son capaces de originar enfermedades graves.

El sistema inmune de los vertebrados está formado por una amplia red de células y moléculas que tienen un fin común: distinguir entre lo propio y lo extraño. Su función primaria es la de proteger contra los microorganismos y sus claves son **especificidad, adaptación y memoria**.

### 1.1. SISTEMA INMUNE INNATO Y ADQUIRIDO

Los mecanismos de la inmunidad pueden ser agrupados en dos grandes categorías: el **sistema inmune innato o inespecífico**, que provee una primera defensa y de carácter general contra cualquier elemento reconocido como extraño, y el **sistema inmune adquirido o específico** que reconoce moléculas o agentes específicos (antígenos) generando una respuesta dirigida contra ellos. Los mecanismos de las respuestas inmunitarias innata y adquirida forman un sistema integrado de defensa en el que existe una cooperación funcional de numerosas células y moléculas, entre los que se encuentran:

- Barreras físicas y químicas: piel, mucosas y sus secreciones.
- Células: granulocitos (neutrófilos, eosinófilos, basófilos), linfocitos, monocitos / macrófagos.
- Anticuerpos o inmunoglobulinas.
- Citoquinas, sistema del complemento y el complejo mayor de histocompatibilidad.

### 1.2. INMUNIDAD CELULAR Y HUMORAL

Las respuestas inmunitarias específicas se producen tras la exposición del individuo a un agente extraño (antígeno). Los mecanismos que actúan en este tipo de respuestas son de dos tipos dependiendo del componente del sistema que participa en la respuesta.

Cuando la respuesta inmunitaria específica actúa mediante moléculas (**anticuerpos**) que reconocen y eliminan los agentes extraños (antígenos), recibe el nombre de **inmunidad humoral**. Mientras que cuando participan **células** (linfocitos T), la respuesta se denomina **inmunidad celular**.

Por otro lado, podemos nombrar también la **inmunidad pasiva**, que hace referencia a la transferencia de inmunidad adquirida o específica a un individuo mediante el empleo de **vacunas** o la **administración de inmunoglobulinas (Ig)** como por ejemplo Igs maternas a través de la placenta o el calostro.

## 2. CONCEPTO

### 2.1. CARACTERÍSTICAS

Las glucoproteínas plasmáticas o séricas se pueden clasificar por sus características de solubilidad en albúminas y globulinas, estas últimas (globulinas) pueden separarse aún más por migración al ser sometidas a un campo eléctrico, mediante electroforesis, dando lugar a tres fracciones:

- a) Albúminas
- b) Globulinas, que se dividen en:
  - Alfa-globulinas: contiene proteínas séricas con función no inmunitaria.
  - Beta-globulinas: contiene algunos isotipos de Ac y componentes del Complemento.
  - **Gamma-globulinas:** contiene la mayor parte de los **Anticuerpos**.

Los anticuerpos (Ac) o Inmunoglobulinas (Ig), engloban a una familia de glucoproteínas producidas por los linfocitos B que se encuentran en la sangre y en fluidos biológicos de todos los mamíferos pudiendo estar en dos formas:

- a) **Unidos a membrana**, concretamente a la membrana de los linfocitos B (**Receptor BcR**).
- b) **En secreción**, en respuesta a la estimulación antigénica.

Todas las respuestas inmunitarias se inician cuando se reconocen los antígenos extraños; esta da como resultado la **activación de los linfocitos B** a través de su receptor BcR que reconocen específicamente al antígeno (epítipo) y que se transforman en **células plasmáticas** que secretan los Ac específicos frente al correspondiente Ag específico y termina en el desarrollo de mecanismos que median la función fisiológica de la respuesta, es decir la eliminación del antígeno.

La respuesta inmunitaria puede ser de 2 tipos: (figura 1)

#### a) Respuesta primaria

Cuando el antígeno penetra por primera vez en el organismo, genera una **respuesta inmune primaria**. Primero hay un período de latencia en el que no se producen Acs pero después de unos días aparecerán **anticuerpos IgM** en la sangre hasta alcanzar un máximo a los 10-15 días para, más tarde, casi desaparecer.

#### b) Respuesta inmune secundaria

Si se produce un segundo contacto con el antígeno, se producirá una respuesta **secundaria**, más rápida, intensa y prolongada. Casi no habrá período de latencia, se producirán más **anticuerpos (principalmente de tipo IgG)** que durarán mucho más tiempo en la sangre, incluso varios años.

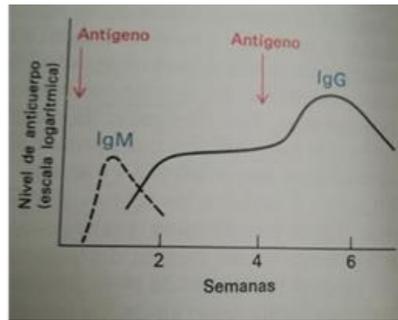


Figura 1. respuesta primaria y secundaria frente a un antígeno.  
Fuente: L. Stryer.

La unión del antígeno (Ag) con el anticuerpo (Ac) es semejante a la que se establece entre una enzima y su sustrato. **Estas interacciones se deben a enlaces no covalentes** (enlaces de hidrógeno, interacciones electrostáticas, de Van der Waals e hidrófobas).

## 2.2. ESTRUCTURA (Figura 2)

Todas las Igs o Acs poseen una estructura básica similar (monómero) de 150 kd. En 1959 Rodney Porter demostró que la IgG puede escindirse en tres fragmentos de 50 kd cada uno por la acción proteolítica limitada del enzima papaína. Estos fragmentos se denominan:

- **Fab** (Fragment antigen binding) son dos y cada uno puede unir a un antígeno.
- **Fc** (fracción cristalizable), esta región es la que se une a las células o moléculas y es la efectora de las funciones biológicas tales como la fijación del complemento.

Entre ambos fragmentos se encuentra la bisagra, que le da flexibilidad y le permite abrirse para unir a dos antígenos distantes. El monómero está formado por cuatro cadenas de aminoácidos:

- **Dos cadenas pesadas H (heavy)**, idénticas unidas entre sí por enlaces covalentes. Hay cinco tipos de cadenas H: gamma (IgG), alfa (IgA), mu (IgM), delta (IgD) o épsilon (IgE).
- **Dos cadenas ligeras L (light)** unidas a las anteriores. Hay dos tipos de cadenas L: kappa (K) y lambda ( $\lambda$ )

Cada cadena L está unida a una cadena H por un puente disulfuro y las cadenas H están unidas entre sí, al menos por un puente disulfuro.

Tanto la cadena pesada H como la de la ligera L de las Igs constan de **regiones o dominios**, originados por los plegamientos de las cadenas y se componen de:

- Regiones constantes (C)** carboxi-terminal. Sus secuencias de aminoácidos se conservan entre las Igs; se encuentran en las porciones Fab y Fc. Por su extremo terminal **se unen a las células**.

**Regiones variables (V)** N-terminal. Sus secuencias de aminoácidos difieren de una Ig a otra. Únicamente se encuentran en la porción Fab. Cada una de estas regiones V

contiene tres **regiones de hipervariabilidad** independientes, que se ensamblan espacialmente para formar **el sitio de unión al antígeno**.

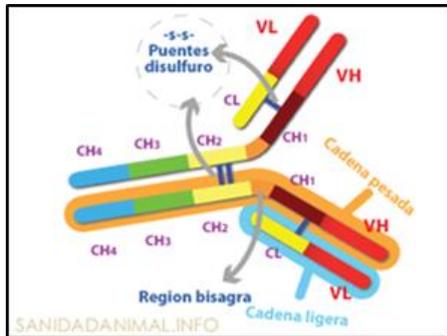


Figura 2. Estructura de las inmunoglobulinas.

Fuente: Sanidad animal.info

### 3. TIPOS

#### 3.1. ISOTIPOS/CLASIFICACIÓN

Los anticuerpos se clasifican en diferentes isotipos dependiendo de las diferencias de sus regiones constantes de las cadenas pesadas ( $\mu, \gamma, \epsilon, \alpha, \delta$ ) que formaran las inmunoglobulinas (IgM, IgG, IgE, IgA e IgD) con funciones diferentes.

Se han identificado cuatro subclases para las IgG y dos para la IgA. Variaciones en las regiones constantes (uniones S-S de las cadenas), originan diferencias funcionales entre los anticuerpos de una misma clase. (por ejemplo: la capacidad para unir al complemento es mayor para la IgG<sub>3</sub> y nula para la IgG<sub>4</sub>; las IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2</sub> e IgG<sub>3</sub> cruzan la placenta).

Las inmunoglobulinas, a su vez, pueden ser **monoméricas**, están constituidas por un monómero (IgD, IgE e IgG), o **poliméricas**, (IgA y IgM). La IgA puede ser monomérica, dimérica o trimérica. La IgM puede tener hasta cinco unidades (pentámero).

Entre sus características principales podemos destacar:

#### Ig A

Protege en forma importante a los epitelios, es la inmunoglobulina que más producen los tejidos linfoides submucosos y por consiguiente la que se encuentra en mayor concentración en las secreciones. En ellas se encuentra como dímero o trímero.

#### Ig D

Esta molécula se encuentra en la superficie del linfocito B y es un marcador de su madurez. Actúa además como receptor de antígenos y transmisor de señales hacia el interior de la célula. Circula en cantidades muy pequeñas.

#### Ig E

Se encuentra en cantidades muy pequeñas en la circulación, pero tiene gran importancia por su participación en los trastornos alérgicos. Las células cebadas, basófilos y plaquetas tienen receptores para IgE, ésta se une a ellos y funciona como receptor del antígeno y/o del

alérgeno. La unión Ag-IgE libera a los mediadores responsables de inflamación y alergia. Aumenta también, durante las invasiones parasitarias.

### **Ig G**

Es la que circula en mayor cantidad y la que más aumenta en una respuesta secundaria. Representa más del 70 % de las Igs séricas totales. Las diferentes subclases se presentan en proporciones muy diferentes, así la IgG<sub>1</sub> es la subclase más frecuente seguida de la IgG<sub>2</sub>. Cruza la placenta ayudada por el receptor FcRn que expresan las células del trofoblasto, por lo que protege al individuo al nacer y durante los primeros meses. Activa al complemento y favorece la fagocitosis (opsoniza). Neutraliza patógenos con gran efectividad. Se une a un gran número de células (macrófagos, plaquetas, etc.) que expresan receptores para ella, con la posibilidad de activarlas.

### **Ig M**

Esta inmunoglobulina es la primera que aparece en la escala filogenética, la primera que se expresa en la superficie del linfocito B y la que predomina en la respuesta inmune primaria. Representa del 5 al 10 % de las Igs séricas totales. Por ser la de mayor tamaño (pentámero) puede unir varios antígenos y es la principal activadora del complemento. Esta Ig se caracteriza también por poseer capacidad neutralizante, precipitante, y aglutinante.

## **3.2. ANTICUERPOS POLICLONALES Y MONOCLONALES**

### **3.2.1. Definiciones**

Los **anticuerpos policlona**les, se pueden definir como colecciones de inmunoglobulinas **producidas por diferentes linajes de linfocitos B** que, aunque reconocen un mismo antígeno, reaccionan frente a **distintos epít**opos del mismo.

Mientras que los **anticuerpos monoclonales**, son **producidos por un único clon de linfocitos B**, es decir además de reconocer un mismo antígeno, sólo reconocen el **mismo epít**opo del mismo.

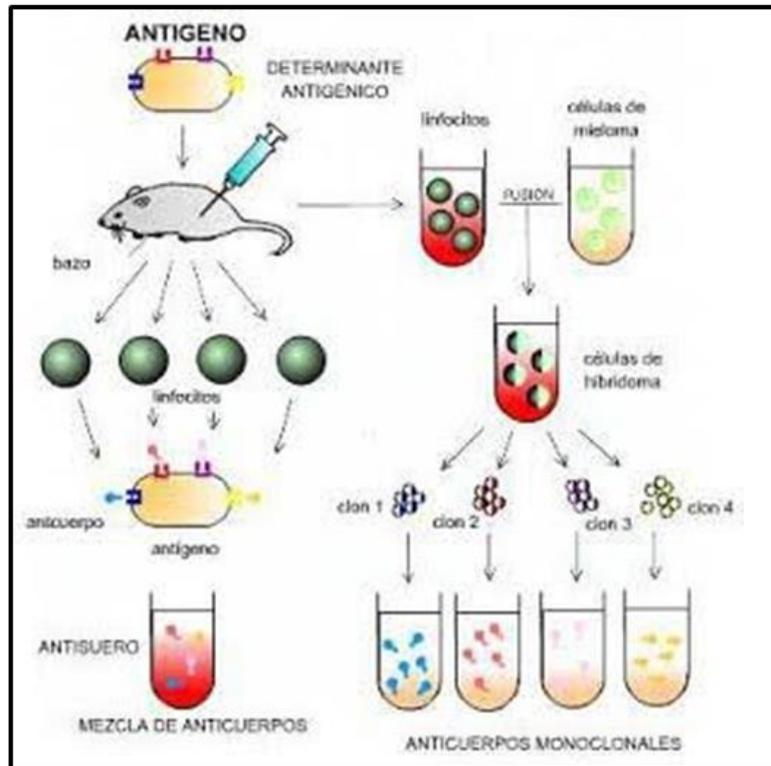
### **3.2.2. Producción de anticuerpos (Figura 3)**

La **producción de anticuerpos policlona**les implica la preparación del antígeno (péptido, proteína, molécula, etc.) que estimule una respuesta inmune y su posterior inyección en animales de laboratorio (ratones, ratas, conejos...) para provocar niveles elevados de expresión de anticuerpos específicos del antígeno en el suero, que después deben ser recolectados y purificados.

Una forma de purificar los anticuerpos policlonales del suero del animal es mediante la aplicación de perlas magnéticas recubiertas del antígeno, por métodos de precipitación o por cromatografía.

Figura 3. Producción de Ac monoclonales vs. Policlonales

Fuente: <http://www.iqb.es/monografia/fichas/f002.jpg>



Pero fue a partir de 1975, fecha en la se puso en marcha la **tecnología del hibridoma**, por Köhler y Milstein, hecho por el cual recibieron el premio Nobel de Fisiología y Medicina. Esta tecnología supuso un importante avance, ya que permitió **obtener anticuerpos específicos capaces de reconocer a un único epítipo o determinante antigénico y producirlos de forma ilimitada**.

El procedimiento comienza con la **inmunización de un ratón** con el antígeno de interés, tras lo cual, **se extraen los linfocitos B a partir del bazo del animal y se fusionan con células neoplásicas de mieloma**.

De esta manera se obtiene una célula de fusión, un **hibridoma**, que combina ciertas ventajas de sus progenitores, **la capacidad de producir grandes cantidades de un único anticuerpo**, propia de los linfocitos B y **la capacidad de multiplicarse indefinidamente**, característica de las células neoplásicas.

A continuación, se seleccionan los hibridomas capaces de producir los anticuerpos deseados y se produce la expansión del clon de mayor interés. Finalmente se procede a la purificación de los anticuerpos obtenidos. De esta manera se obtiene una fuente casi inagotable de anticuerpos producidos por un clon celular, que derivan de un único linfocito B, y que son por tanto idénticos y específicos de epítipos individuales.

### 3.2.3. Diferencias entre anticuerpos monoclonales y policlonales

El empleo de anticuerpos monoclonales o policlonales en los diferentes ensayos dependerá de la aplicación prevista, de la técnica y de tipo de proteína o agente que queramos detectar, para ello a continuación se describen una serie de diferencias entre ellos, lo cual no implica que unos presenten mayor calidad que otros:

- **Anticuerpos Monoclonales**

**Ventajas:**

- Especificidad: al reconocer un único epítipo, su especificidad es mayor, disminuyendo la probabilidad de reacciones cruzadas y el ruido de fondo de los ensayos.
- Reproducibilidad: No presentan variabilidad entre los lotes, por lo que los resultados en cada ensayo son altamente reproducibles.
- Cantidad: Los hibridomas son líneas celulares inmortales con capacidad de producir cantidades ilimitadas de anticuerpos altamente específicos.

**Inconvenientes:**

- Producción: el desarrollo de hibridomas requiere un plazo de tiempo más largo, implicando un mayor coste y el uso de tecnología más compleja.
- Intolerancia a cambios en el antígeno: al reconocer un único epítipo, en el caso de que éste sufra alguna modificación en la muestra a estudiar, dejará de reconocerlo.
- Especificidad: la alta especificidad que presentan los anticuerpos monoclonales puede convertirse en un inconveniente en aquellos casos en los que se buque, por ejemplo, la detección de varias proteínas con distinto grado de homología.

- **Anticuerpos Policlonales**

**Ventajas:**

- Afinidad: al estar formados por una mezcla de Acs. que reconocen diferentes epítopos de una misma proteína, presentan alta afinidad por el antígeno, lo que permite amplificar la señal en el caso de proteínas con bajos niveles de expresión o en bajas cantidades en la muestra a analizar.
- Tolerancia a cambios en el antígeno: al reconocer distintos epítopos, son mucho menos sensibles que los Ac. monoclonales a los pequeños cambios que pueda sufrir la proteína diana como resultado de polimorfismos, desnaturalización, etc.
- Robustez: debido a su capacidad de unirse a distintos epítopos del antígeno diana, los resultados obtenidos son más robustos.
- Producción: es relativamente rápido y sencillo, implicando un menor coste.

**Inconvenientes:**

- **Reproducibilidad:** al implicar el uso de diferentes animales para la producción de lotes, éstos pueden presentar mayor variabilidad, dificultando la reproducibilidad de los ensayos.
- **Especificidad:** al no ser específicos, pueden dar lugar a reactividad cruzada e incremento de la señal de fondo.

#### 4. FUNCIONES

Los anticuerpos o inmunoglobulinas (Ig), mediadoras de la respuesta humoral, tras su unión frente al antígeno ponen en marcha diferentes **funciones efectoras** como:

##### 4.1. AGLUTINACIÓN – NEUTRALIZACIÓN DEL ANTÍGENO

Los anticuerpos son bivalentes, es decir, poseen dos lugares de reconocimiento de antígeno. Esto permite la **aglutinación** del mismo, para su mejor eliminación. Además, cuando se recubre toda la superficie del patógeno con moléculas de anticuerpos, se produce un fenómeno denominado **neutralización**.

##### 4.2. OPSONIZACIÓN Y FAGOCITOSIS MEDIADA POR ACS

La unión de un antígeno a la inmunoglobulina produce una serie de cambios alostéricos en su extremo Fc que hacen adquieran la propiedad de **unirse a receptores** (FcγRI, FcγRII y FcγRIII), que se encuentran en la **membrana de macrófagos y polimorfonucleares**. A este fenómeno se le denomina opsonización. Al producirse esta unión, los macrófagos se activan, iniciándose el fenómeno de fagocitosis y subsiguiente destrucción de los complejos antígeno-anticuerpo por los procesos líticos intracelulares, propios de la acción de los enzimas contenidos en los lisosomas de estas células.

##### 4.3. CITOTOXICIDAD ADCC (CITOTOXICIDAD DEPENDIENTE DEL ANTICUERPO)

Los linfocitos **citotóxicos o Natural Killer** expresan receptores de baja afinidad para Fc IgG (FcγRIII) que solo se unen a IgG agregada en superficies reconocidas por los anticuerpos provocando así la destrucción de las células portadoras de antígeno.

##### 4.4. HIPERSENSIBILIDAD INMEDIATA DESENCADENADA POR IgE

Los **mastocitos y los basófilos** expresan receptores para Fc IgE (FcεRI) de alta afinidad a los que se pueden unir las IgE que los activa produciendo su degranulación con liberación de histamina y otras sustancias vasoactivas que darán lugar a procesos de hipersensibilidad.

#### 4.5. INMUNIDAD EN LAS MUCOSAS MEDIADA POR LA IgA

La IgA es transportada a través de las barreras mucosas y es secretada a la luz intestinal donde neutraliza posibles patógenos o toxinas derivadas de ellos.

#### 4.6. TRANSFERENCIA DE INMUNIDAD PASIVA AL FETO Y AL NEONATO POR LA IgG Y LA IgA

Los mamíferos durante la vida fetal o recién nacidos no son capaces de responder eficazmente a los agentes infecciosos; las IgG maternas son capaces de atravesar la placenta y pasar a la sangre del feto debido a que las madres en periodo de lactancia secretan IgA (e IgG en algunas especies) al calostro y a la leche. Estas IgAs protegen la cavidad gastrointestinal y educan al sistema inmune del neonato que es capaz de captar mediante receptores específicos inmunoglobulinas de la luz intestinal y transferirlas a la sangre.

#### 4.7. ACTIVACIÓN DEL COMPLEMENTO

Cuando la inmunoglobulina que se une a un antígeno es **IgM o IgG**, en sus extremos Fc se producen ciertos cambios gracias a los cuales éstas adquieren la propiedad de fijar y **activar uno de los componentes del complemento**. Las fracciones activas del complemento poseen diferentes acciones de gran importancia en la defensa del organismo, una de las cuales es la lisis celular.

### 5. APLICACIONES EN LABORATORIOS DE SANIDAD ANIMAL Y GENÉTICA

El desarrollo de la biología molecular y la producción de anticuerpos monoclonales ha permitido disponer, en los últimos años, de técnicas y herramientas de gran utilidad y aplicabilidad en la sanidad y genética animal, entre ellas podemos destacar:

#### 5.1. DIAGNÓSTICO SEROLÓGICO

Permite la detección específica de la inmunidad frente a los patógenos y sus enfermedades mediante el empleo de Acs frente a distintos antígenos de interés, para ello se dispone de diferentes técnicas basadas en la interacción Ag-Ac; las más ampliamente utilizadas son:

- **Técnicas inmunoenzimáticas:** donde el Ac está marcado con una enzima para poder visualizar la unión Ag-Ac. Entre ellas podemos destacar.
  - **ELISA (*Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*)**, se lleva a cabo en una placa de microtitulación de 96 pocillos. En la actualidad existe una gran variedad de kits de diagnóstico de fácil realización e interpretación para la identificación de Acs frente a las enfermedades animales como Aujeszky, Peste porcina clásica, peste porcina africana, IBR, Lengua azul, Leucosis bovina enzoótica etc.

- **Inmunoelctrotransferencia o Westernblot o Immunoblotting**, utiliza como soporte membranas de nitrocelulosa a las que han sido transferidas las proteínas antigénicas que previamente han sido separadas por un campo eléctrico (electroforesis). Es una técnica muy empleada como método de confirmación para las Encefalopatías espongiformes transmisibles (EETs).
- **Seroneutralización (SN)**, técnica que permite medir la capacidad de un suero para neutralizar a los antígenos. Los ensayos SN son muy sensibles y específicos, miden el título de anticuerpos neutralizantes tras la infección o la vacunación. La cuantificación del título puede basarse en la presencia o la ausencia del efecto citopático o en la evidencia de infección viral mediante una técnica inmunorreactiva. Es útil para evaluar el nivel de reactividad cruzada serológica entre los antisueros vacunales y los aislados víricos para evaluar y correlacionar la protección cruzada. Ampliamente utilizada en la detección de Ac frente a virus como el de la Lengua azul o el de West Nile.

## **5.2. DIAGNÓSTICO INMUNOHISTOQUÍMICO**

En el ámbito de la histología, las técnicas de inmunohistoquímica permiten la identificación de la interacción Ag-Ac en tejidos o en cultivos celulares; es una técnica inmunoenzimática donde el Ac está conjugado con una enzima o con fluorocromos y posteriormente, dicha unión, es visualizada al microscopio. Ejemplos de su aplicabilidad son: la detección de la proteína priónica en las encefalopatías espongiformes transmisibles, la Enfermedad Hemorrágica del conejo, así como para cualquier enfermedad en la que hay Ac comerciales disponibles.

## **5.3. SEROPERFILES Y SEGUIMIENTO DE LA RESPUESTA INMUNE**

Los seroperfiles se basan en la detección de los anticuerpos circulantes con el fin de poder obtener información sobre la situación de los animales de una explotación en ese momento, o en estados previos. Estos estudios son cada día más utilizados para el control sanitario de las explotaciones: **conocer la situación sanitaria, elegir el mejor momento para vacunar, controlar los programas vacunales y evitar la entrada de enfermedades en la explotación.**

## **BIBLIOGRAFÍA**

Regueiro J.R., López C., González S. & Martínez E. (2011) Inmunología. Biología y Patología del Sistema Inmune. 4ª Edición. Editorial Médica Panamericana, Madrid. (2011).

Ian Tizard. Introducción a la Inmunología Veterinaria. 8ª edición. Elsevier. 2009.

Abbas AK, Lichtman, Pillai S. Cellular and molecular immunology. Philadelphia. Saunders Elsevier. 6th edition. 2007.

L. Stryer. (1998). Bioquímica. 3ª edición. Editorial Reverté. S.A. 1988.

Vivian Turner. Activación de las células B y formación de centros germinales. Instituto Roslin y Escuela Royal (Dick) de Ciencias Veterinarias, Universidad de Edimburgo. British Society for immunology. <https://www.immunology.org/es>

García Merino A. Anticuerpos monoclonales. Aspectos Básicos. Neurología. Vol, 26 (5) 2011 (301-306).

**MATERIAL PARA LA PREPARACIÓN DEL TEMA 25**

**TÉCNICAS INMUNOENZIMÁTICAS: CONCEPTO, TIPOS Y APLICACIONES  
EN LABORATORIOS DE SANIDAD Y GENÉTICA ANIMAL.**

*Este material no tiene carácter oficial, por lo que en ningún caso vinculará al Tribunal Calificador. Constituye, únicamente, un instrumento complementario que servirá de apoyo al opositor para enfocar cada uno de los epígrafes, pero nunca de forma exclusiva ni excluyente. El Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación no se hace responsable del contenido del mismo.*

*Los materiales no serán objeto de actualización constante.*

## **ÍNDICE**

### **1. INTRODUCCIÓN**

### **2. ENSAYO INMUNOSORBENTE LIGADO A ENZIMA (ELISA)**

2.1. FUNDAMENTO

2.2. ELISA DIRECTO

2.3. ELISA INDIRECTO

2.4. ELISA SANDWICH

2.5. ELISA DE BLOQUEO/ COMPETICIÓN

2.6. QUIMIOLUMINISCENCIA

2.7. PRUEBA ELISPOT

2.8. LECTURA E INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

### **3. WESTERN BLOTTING**

### **4. INMUNOHISTOQUÍMICA**

MATERIAL NO OFICIAL

## 1. INTRODUCCIÓN

El organismo animal dispone de un sistema de defensa ante el posible ataque de agentes invasores que pueden suponer una amenaza y que se denominan de manera general agentes patógenos. Más concretamente, una de las barreras que compone el sistema inmune es la que se denomina **inmunidad adquirida**, una compleja herramienta basada en la capacidad del organismo invadido para reconocer al agente patógeno invasor, combatirlo y generar información de memoria para reconocer a ese agente en un ataque posterior y actuar de manera más rápida y eficaz. Para ello, la inmunidad adquirida usa receptores para reconocer microorganismos invasores extraños, que son diferentes para cada caso.

Una rama del sistema inmune se dirige a los patógenos extracelulares o exógenos, empleando para combatirlos unas proteínas denominadas anticuerpos que son producidas por los linfocitos B; este tipo de respuesta inmune se llama humoral, porque los anticuerpos se encuentran en los fluidos orgánicos (o “humores”).

La otra rama del sistema se dirige contra los patógenos intracelulares o endógenos, que invaden las células, disponiendo de células especializadas que destruyen las células infectadas o anómalas; es la denominada respuesta inmune mediada por células.

En ambos casos, cuando un **antígeno**<sup>1</sup> entra en el organismo, primero debe ser atrapado y procesado de manera que pueda ser reconocido como extraño. Si es reconocido como tal, esa información deberá llegar, según el caso, al sistema productor de anticuerpos o al responsable de la respuesta celular.

Pues bien, las técnicas inmunológicas se basan en la **especificidad** de la interacción de las moléculas que intervienen tanto en la respuesta inmune mediada por anticuerpos (humoral) como en la respuesta inmune de tipo celular, activadas por exposición a un agente patógeno, ya sea por infección o por vacunación. Algunas son cualitativas de manera estricta y otras son cuantitativas.

Las técnicas inmunológicas basadas en la respuesta inmune mediada por anticuerpos se basan en el reconocimiento específico y en la estabilidad de la unión antígeno-anticuerpo (= Ag-Ac). Esta interacción Ag-Ac se parece a la interacción enzima-sustrato se caracteriza por ser una unión:

- Reversible, formada por enlaces no covalentes.
- Específica<sup>2</sup>, por interacción complementaria (aunque en algunos casos, puede darse reactividad cruzada<sup>3</sup> con otro antígeno).

<sup>1</sup> Antígeno: sustancia extraña al organismo capaz de estimular la respuesta inmune de éste.

<sup>2</sup> Especificidad: capacidad del Ac para discriminar e interactuar diferencialmente con un Ag de estructura similar.

<sup>3</sup> Reacción cruzada: la que tiene lugar cuando un Ac se une a un Ag distinto porque tiene una estructura relacionada pero no similar.

Cuando tiene lugar la unión Ag-Ac podemos distinguir dos etapas: una primera interacción no detectable a simple vista y una segunda reacción que puede ocasionar cambios visibles, como es el caso de la aglutinación y de la precipitación. La reacción primaria ocurre siempre, pero que tenga lugar la secundaria depende de numerosos factores, como por ejemplo, la proporción en que se enfrentan Ag y Ac, por lo que no siempre tiene lugar.

Las **técnicas serológicas** pueden clasificarse en tres tipos:

- Pruebas de unión primaria= miden directamente la unión Ag-Ac.
- Pruebas de unión secundaria= miden los cambios físicos tras la formación de inmunocomplejos.
- Pruebas terciarias: miden el efecto protector real de los anticuerpos en un animal.

La medición de las interacciones Ag-Ac con fines diagnósticos se denomina **serología** y engloba un grupo de técnicas que son de gran aplicación en Sanidad Animal, ya sea a nivel individual o de colectividades, para el diagnóstico de enfermedades, la vigilancia del grado de respuesta inmunitaria humoral y la identificación de moléculas de interés biológico o médico.

Centrándonos en las pruebas basadas en la interacción primaria Ag-Ac, al no ser detectable a simple vista, necesitamos sistemas indicadores para poder hacerla visible. Para ello, necesitaremos marcar químicamente o bien el Ag o bien el Ac involucrados en dicha interacción.

Entre las pruebas de reacción primaria existentes, podemos hacer visibles uniones Ag-Ac mediante uno de los siguientes sistemas indicadores:

- Marcador fluorescente = Inmunofluorescencia
- Marcador radioactivo= Radioinmunoanálisis (RIA)
- El marcador es un metal pesado= Inmuncromatografía
- Marcador enzimático: las técnicas inmunoenzimáticas, objeto de este tema.

Vamos a comentar ahora algunos aspectos de manera general:

- Para realizar el marcado molecular, en primer lugar hay que **purificar** la molécula a marcar. Esto puede hacerse por diversos métodos como filtración molecular, cromatografía o separación en gradiente de densidad mediante ultracentrifugación. El posterior marcado no debe alterar la unión Ag-Ac.
- El diagnóstico que se consigue mediante las distintas técnicas puede considerarse directo (detección de Ag en la muestra) o indirecto (=detección de Ac presentes en diferentes matrices, como suero, leche,...).

- Las técnicas primarias se desarrollan en pasos o etapas con **incubaciones intermedias** en las que se produce la reacción Ag-Ac.
- Muchas técnicas requieren **lavados intermedios** entre incubaciones y es muy importante realizarlos correctamente para arrastrar el material reactivo que no haya reaccionado y no se haya unido y así evitar interferencias en el resultado.
- En ocasiones será necesario añadir una **solución de frenado** para detener la reacción enzimática.

Las técnicas inmunoenzimáticas incluyen el uso de **conjugados enzimáticos** como marcadores, moléculas marcadas que presentan tanto actividad inmunológica como enzimática. Las enzimas conjugadas actúan sobre un sustrato, desencadenando una reacción que puede generar color visible, luz o fluorescencia. Las enzimas, más utilizadas son: peroxidasa de rábano, fosfatasa alcalina, luciferasa, glucosa-6-P-deshidrogenasa.

Existen tres grandes grupos de técnicas inmunológicas:

- **ELISA**
- **Western Blotting**
- **Inmunomarcación**

## 2. ENSAYO INMUNOSORBENTE LIGADO A ENZIMA (ELISA)

Este tipo de ensayo también se conoce como enzimoanálisis (EIA) y su principio es similar al RIA pero empleando una enzima en lugar de un marcador radiactivo, resultando por ello más seguras y menos costosas. Se puede emplear tanto para detectar Ag como Ac.

### 2.1. FUNDAMENTO

Debido a su sencillo y rápido procedimiento, los inmunoensayos ELISA son uno de los más utilizados en investigación y diagnóstico para la identificación y/o cuantificación de analitos de naturaleza proteica, como péptidos, proteínas, anticuerpos y hormonas. Esta técnica suele desarrollarse en microplacas de poliestireno con pocillos de fondo plano, de manera que el fondo de los pocillos se tapiza (ya sea con Ag o con Ac) para que las posteriores uniones con formación de inmunocomplejos queden inmovilizadas en el fondo de los pocillos y no se arrastren con los lavados, para posteriormente evidenciarlas con la reacción enzimática, mediante el uso de un colorímetro o un espectrofotómetro.

Se determina la concentración del Ag o del Ac mediante el uso de uno de ellos inmovilizado en fase sólida y el otro en solución. Puede ser cualitativo y cuantitativo.

### PASOS GENERALES EN UN ELISA

1. Tapizado del pocillo con Ag o Ac, según el tipo de ELISA.
2. Adición de la muestra problema.
3. Unión del Ag o Ac específico (que buscamos en la muestra) al Ag o Ac inmovilizado en el fondo del pocillo.
4. Lavado del pocillo para eliminar el material que no se ha unido.
5. Adición del conjugado marcado con la enzima.
6. Unión del Ac secundario al Ag o Ac.
7. Lavado del pocillo para eliminar el exceso de enzima no unida.
8. Adición del sustrato específico de la enzima empleada.
9. Unión del sustrato a la enzima.
10. Coloración.
11. Frenado.
12. Lectura e interpretación.

Para la realización de la técnica, se precisa el empleo de diversos equipos, como pipetas de precisión para dispensación de reactivos y equipos de lectura fotométrica para leer el resultado obtenido en los pocillos. Algunas etapas pueden automatizarse, como es el caso de los lavados.

Los ELISAs pueden desarrollarse en el propio laboratorio, aunque ya hay muchos disponibles comercialmente para diferentes enfermedades y propósitos.

De manera general se incluyen controles positivos y negativos en el análisis, que están asociados a unos criterios de validación del ensayo y que se suelen emplear como referencia para calcular el valor relativo obtenido en cada pocillo de muestra problema.

En función de la manera en que se produzcan las interacciones antígeno-anticuerpo, los ensayos ELISA pueden clasificarse en las siguientes categorías:

#### **2.2. ELISA DIRECTO**

El ELISA directo es el ensayo ELISA más simple y rápido de todos, donde un anticuerpo primario marcado con una enzima se unirá directamente al antígeno de interés permitiendo la detección y/o cuantificación del mismo.

El procedimiento simplificado sería el siguiente:

- 1º El antígeno se inmoviliza sobre una placa

2º Se añade un anticuerpo primario marcado con una enzima que se unirá al antígeno de interés

3º Se añade el sustrato que al reaccionar con la enzima proporcionará una señal visible que permitirá la detección y/o cuantificación del antígeno de interés.

### **2.3. ELISA INDIRECTO**

Ampliamente utilizado, está basado en el uso de microplacas de fondo tapizadas con Ag específico frente a los Acs que buscamos en la muestra problema. Como Ag se pueden utilizar proteínas virales, parasitarias o bacterianas e incluso virus completos, pero cada día es más frecuente adsorber exclusivamente las proteínas de interés inmunológico. Generalmente dichas placas ya vienen tapizadas en los kits comerciales, por lo que en ese caso, el paso de tapizar las placas no sería necesario.

A continuación, añadimos la muestra problema; generalmente se emplea suero, pero en algunos casos pueden emplearse otras matrices, como por ejemplo, leche. Una vez añadida la muestra, incubamos la microplaca bajo condiciones previamente establecidas (tiempo, temperatura, humedad...). Durante esa incubación, si la muestra contiene anticuerpos específicos frente al antígeno que tapiza el fondo del pocillo, ambas moléculas se unirán y quedarán inmovilizadas en el fondo.

De este modo, tras lavar los pocillos, sólo quedarían adheridos los anticuerpos que se unieron al antígeno y el resto de material no unido se habrá arrastrado.

La posible presencia de Acs inmovilizados se evidenciaría al añadir conjugado específico anti especie/grupo de especies (ej Conjugado anti-rumiante). Se trata de una anti-globulina ligada a una enzima que se unirá a los Acs específicos que estén inmovilizados, de modo que todo el conjugado que no se haya unido durante la incubación, será eliminado en los siguientes lavados de los pocillos.

A su vez, la presencia del conjugado inmovilizado se evidencia al añadir una solución que contiene el sustrato de la enzima que forma parte del conjugado, de modo que, si al añadir el sustrato hay presente enzima en el pocillo, tendrá lugar una reacción enzimática que generará color en el pocillo. La intensidad de color que se desarrolla es proporcional a la cantidad de Ac presentes en el suero analizado y se mide mediante fotometría o espectrofotometría.

### **2.4. ELISA SÁNDWICH**

**ELISA tipo sándwich** sirve tanto para detectar Ac como Ag, aunque la modalidad más empleada es para detectar y cuantificar un antígeno específico. Los pocillos de las placas de poliestireno se recubren con un Ac específico que actuará como Ac de captura del Ag que buscamos. Después se añade la solución de Ag(muestra problema) a analizar a cada pocillo y el Ac de captura se unirá al Ag presente en la solución problema.

A partir de este paso, distinguimos dos modalidades:

**Doble o DAS:** Double Antibody Sandwich, en el que después de lavar, se adiciona un Ac marcado específico que también se une al Ag (Ac de detección). Tras la incubación, se lavan de nuevo las placas para eliminar el Ac sin unir y continuamos con los pasos de adición de sustrato, solución de frenado y lectura.

**HADAS o Heterólogo:** El Ac de detección no está marcado, y para evidenciarlo necesitamos añadir (tras el correspondiente paso de lavado) un anticuerpo anti especie marcado, que se unirá a los Ac de detección que hayan quedado inmovilizados.

Es importante que el Ac de captura y el de detección sean de diferentes especies y que la antiglobulina específica de especie se use para visualizar el Ac de detección. Así evitaremos resultados de falsos positivos causados por la unión de la antiglobulina al Ac de captura en ausencia de Ag. En este análisis, la intensidad de color de la reacción se relaciona directamente con la cantidad de Ag unida. Se denomina tipo sándwich debido a la formación de capas de Ac-Ag-Ac.

## **2.5. ELISA DE COMPETICIÓN**

Es una variante más compleja de la técnica ELISA, también conocido como ELISA de inhibición debido al uso de un antígeno de referencia que competirá con el antígeno de la muestra por unirse al anticuerpo primario. También puede emplearse haciendo competir anticuerpos de la muestra problema con una cantidad conocida de anticuerpos de referencia. Muy empleada para detectar cantidades bajas del analito de interés.

En esta técnica (en ejemplo de búsqueda de Ag), previamente al análisis, el pocillo está recubierto con un Ac específico. En una única reacción, se depositan en el pocillo la muestra a analizar y el Ag marcado con una enzima, compitiendo así los Ag por los sitios de unión de los Ac, por lo que la cantidad de Ag marcado unido al pocillo es inversamente proporcional a la concentración de antígeno en la muestra problema. Esta técnica es más rápida que otras pruebas de ELISA, y puede ser muy sensible si se permite que el Ag de la muestra reaccione con el Ac antes de añadir el Ag marcado.

También se denomina ELISA de bloqueo, haciendo referencia a la capacidad de bloqueo de los puntos de unión al fondo del pocillo y puede emplearse para detectar anticuerpos en la muestra problema.

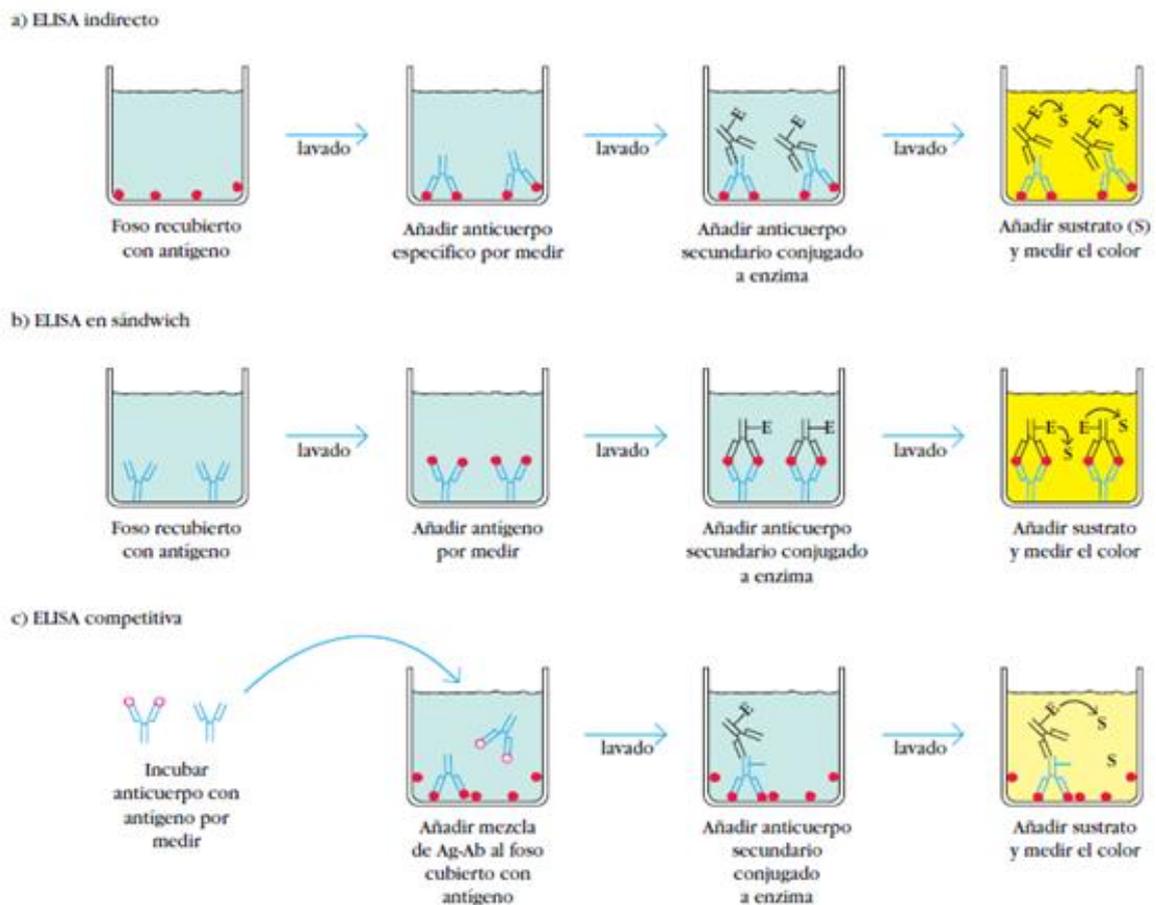
Actualmente existe la posibilidad de sustituir el conjugado anti-especie para la detección de IgGs y es la utilización de proteína A o G marcada con peroxidasa.

## **2.6. QUIMIOLUMINISCENCIA**

La luz que se produce por quimioluminiscencia durante determinadas reacciones químicas constituye una alternativa conveniente y muy sensible para las mediciones de absorbancia en ELISA. Las versiones de ELISA que recurren a la quimioluminiscencia usan un sustrato

luxógeno (que genera luz) en lugar del sustrato cromógeno de las reacciones ELISA ordinarias. Por ejemplo, la oxidación del compuesto luminol por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y la enzima peroxidasa de rábano picante (HRP) produce luz.

La luz que se genera durante las reacciones luxógenas puede detectarse en virtud de su capacidad de exponer película fotográfica. La medición cuantitativa de la emisión de luz puede hacerse por medio de un luminómetro. La ventaja de las pruebas de quimioluminiscencia sobre las cromógenas es la mejoría de la sensibilidad. En general el límite de detección puede incrementarse cuando menos 10 veces si se cambia de un sustrato cromógeno a uno luxógeno, y más de 200 veces cuando se adicionan agentes de realce.

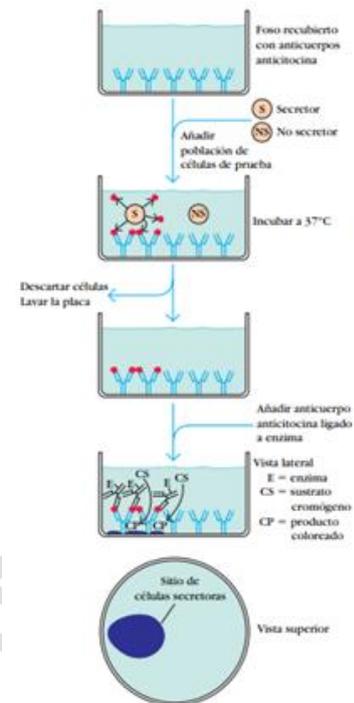


**Figura 1.** Las variaciones en la técnica del ensayo de inmunosorbente ligado a enzima (ELISA) permiten determinar anticuerpo o antígeno. Cada prueba puede utilizarse de manera cualitativa o cuantitativa mediante la comparación con curvas estándar elaboradas con concentraciones conocidas de anticuerpo o

antígeno. El anticuerpo puede determinarse con ELISA indirecto (a), en tanto que el antígeno puede determinarse por ELISA en sándwich (b) o ELISA competitivo (c). En este último, que es un ensayo tipo inhibición, la concentración de antígeno es inversamente proporcional al color que se produce.

## 2.7. 4<sup>PRUEBA ELISPOT</sup>

Una modificación de la prueba ELISA llamada ELISPOT permite la detección cuantitativa del número de células en una población que produce anticuerpos específicos contra un antígeno determinado o un antígeno contra el que se dispone de un anticuerpo específico (fi g. 6-11). En este método las placas se recubren con el antígeno (antígeno de captura) reconocido por el anticuerpo de interés o con el anticuerpo (anticuerpo de captura) específico para el antígeno cuya producción se valora. Luego se añade a las placas recubiertas una suspensión de la población celular que se investiga y se incuba. Las células se asientan en la superficie de la placa, y las moléculas secretadas reactivas a las moléculas de captura son unidas en la cercanía de las células secretoras, lo que produce un anillo de complejos antígeno-anticuerpo alrededor de cada célula que sintetiza la molécula de interés. A continuación, la placa se lava y un anticuerpo unido a enzima específico para el antígeno secretado o para la especie (p. ej., anticonejo de cabra) del anticuerpo secretado se añade y deja unir. El revelado ulterior del ensayo por la adición de un sustrato cromógeno o luxógeno adecuado indica la posición de cada célula productora de anticuerpo o de antígeno como un punto de color o luz.



**Figura 2** En la prueba ELISPOT, un pozo se recubre con anticuerpo contra el antígeno de interés, en este ejemplo una citocina; luego una capa de una suspensión de la población celular que se piensa que contiene algunos miembros que sintetizan y secretan la citocina se coloca en el fondo del pozo y se incuba. La mayoría de las moléculas de citocina secretadas por una célula particular reaccionan con los anticuerpos cercanos unidos al pozo. Después del periodo de incubación, se lava el pozo y se añade un anticuerpo anticitocina marcado con enzimas. Tras eliminar por lavado el anticuerpo no unido, se añade un sustrato cromógeno que forma un producto insoluble de color. Este último (púrpura) se precipita y forma una mancha sólo en las áreas del pozo en que se depositaron células que secretan citocina. El recuento de las manchas de colores permite determinar cuántas células que secretaban citocina estaban presentes en la suspensión celular adicionada.

## 2.8. LECTURA E INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

Para llevar a cabo el paso de lectura se disponen de varias opciones. La más sencilla es la **comparación visual** por parte del técnico que realiza el análisis, del pocillo problema respecto al color resultante en los pocillos control. Es la opción más económica, y también la más subjetiva, pudiendo dificultar la interpretación de muestras próximas al punto de corte de positividad establecido. Lo más habitual es emplear colorímetros, y también unos equipos ópticos denominados **lectores de microplacas o espectrofotómetros ELISA**, que permiten la automatización de la lectura y, por tanto, su objetividad.

Tras el tiempo de incubación del sustrato y, generalmente, la adición de solución de parada, es muy importante homogeneizar el contenido de los pocillos mediante agitación suave y proceder seguidamente a la lectura de los pocillos. Esta homogeneización resulta de gran importancia, considerando que los colorímetros de microplaca solamente leen el centro exacto del pocillo, y si el contenido no está homogeneizado, el lector no estará midiendo la verdadera DO resultante. Del mismo modo, debemos asegurarnos que no se han formado burbujas en los pocillos que puedan alterar la lectura.

<sup>4</sup> Fuente imagen: "Inmunología de Kuby" 6ª Ed.

Para ensayos colorimétricos, la tasa de desarrollo de color es proporcional, dentro de un cierto rango, a la cantidad de conjugado enzimático presente. Los resultados finales de la lectura colorimétrica se reflejan numéricamente mediante valores de **absorbancia o densidad óptica** que se obtendrán a la longitud de onda más adecuada para la coloración final alcanzada, pues el producto de la reacción coloreado absorbe luz en el espectro visible.

Los **espectrofotómetros** ELISA, al igual que los espectrofotómetros UV-visible, miden la cantidad de luz que transmite o absorbe una muestra para diferentes longitudes de onda. Asimismo, como los espectrofotómetros UV-visible, también están compuestos por una fuente de iluminación, un monocromador y un detector.

En primer lugar, un lector de microplacas dispone habitualmente de una fuente de iluminación de tungsteno con un rango que se extiende desde los 400nm a los 700nm.

En segundo lugar, el monocromador, que es el componente que permite separar el espectro de iluminación y proporcionar un haz de energía a una longitud de onda determinada, ha de calibrarse periódicamente en longitud de onda para cuando ésta es crítica o afecta a las medidas que se realizan.

Finalmente, otro de los componentes que requiere de una calibración periódica es el detector. Este componente es el que se encarga de transformar la señal recibida (fotones) y convertirla en señal eléctrica. La intensidad de la señal eléctrica se registra por un sistema que lo traduce a valores de absorbancia o densidad óptica.

En consecuencia, no cabe duda de la importancia de un buen funcionamiento de estos equipos.

Para ello, se recomienda realizar calibraciones internas de los espectrofotómetros ELISA mediante las microplacas, con las que se calibran la escala de longitud de onda y la escala fotométrica. Una microplaca tiene forma rectangular y dimensiones aproximadas de 12.5cm por 8.5cm. Habitualmente se denominan también placas patrón y contienen 96 pocillos distribuidos en 8 filas y 12 columnas. Cada una de estas columnas representa un valor concreto de absorbancia a diferentes longitudes de onda. Por otra parte, algunos modelos de microplacas presentan también columnas para poder realizar la calibración de la escala de longitud de onda. En estos casos, dichas columnas contienen un filtro de óxido de holmio con una serie de picos de absorbancia determinados.

Como ocurre con otros equipos y patrones, las propias microplacas han de ser calibradas periódicamente para garantizar una medición correcta. Esta calibración se realiza tanto en absorbancia como en longitud de onda. Para la primera de estas calibraciones, es decir la que se encarga de la escala fotométrica o calibración en absorbancia, el laboratorio acreditado por ENAC a tal fin se encarga de realizar el procedimiento que permite medir la exactitud o la corrección que presenta el equipo en lo que respecta a valores de absorbancia para diferentes longitudes de onda. Por otra parte, en cuanto a la calibración de la escala de longitud de onda es la que permite evaluar la capacidad del componente monocromador del espectrofotómetro para separar una longitud de onda determinada del resto del espectro de iluminación

### 3. WESTERN BLOT, INMUNOBLOTTING O INMUNOELECTROTRANSFERENCIA

Es posible la identificación de una proteína específica (Ag proteico) en una mezcla compleja de proteínas mediante una técnica conocida como **Western blotting**, así denominada por su similitud con Southern blotting, que detecta fragmentos de DNA, y con **Northern blotting**, que detecta mRNA.

Es una prueba de unión primaria en tres etapas. En la primera, una mezcla de proteínas se separa por medios electroforéticos en un gel, de manera que cada componente se separa del resto en una banda única. El gel empleado es de SDS-poliacrilamida (SDS-PAGE), un gel en placa con infusión de dodecilsulfato sódico (SDS), un agente de disociación. El criterio de separación puede establecerse en base a peso molecular, estructura, hidrofobicidad...

La segunda etapa consiste en el “blotting” o transferencia: las bandas de proteínas se transfieren mediante electroforesis a una membrana de nitrocelulosa de inmovilización. Esto se consigue colocando la membrana en la parte superior del gel y, a su vez, colocamos ambas entre esponjas saturadas con tampón. El “sándwich” formado, se apoya entre dos hojas de plástico rígido y se humedece con un tampón amortiguador. Es entonces, cuando hacemos pasar la corriente eléctrica entre las esponjas, y las bandas de proteínas se transfieren del gel a la membrana sin perder resolución.

Por último, en la tercera etapa, usamos un análisis inmunoenzimático (en ocasiones se sustituye por radioinmunoanálisis). Las bandas individuales de proteína se identifican al inundar la membrana de nitrocelulosa del siguiente modo:

- O bien añadimos un antisuero específico, lavamos tras la incubación y añadimos una solución de antiglobulina marcada enzimáticamente;
- O bien añadimos directamente anticuerpos marcados con enzimas, específico para la proteína de interés.

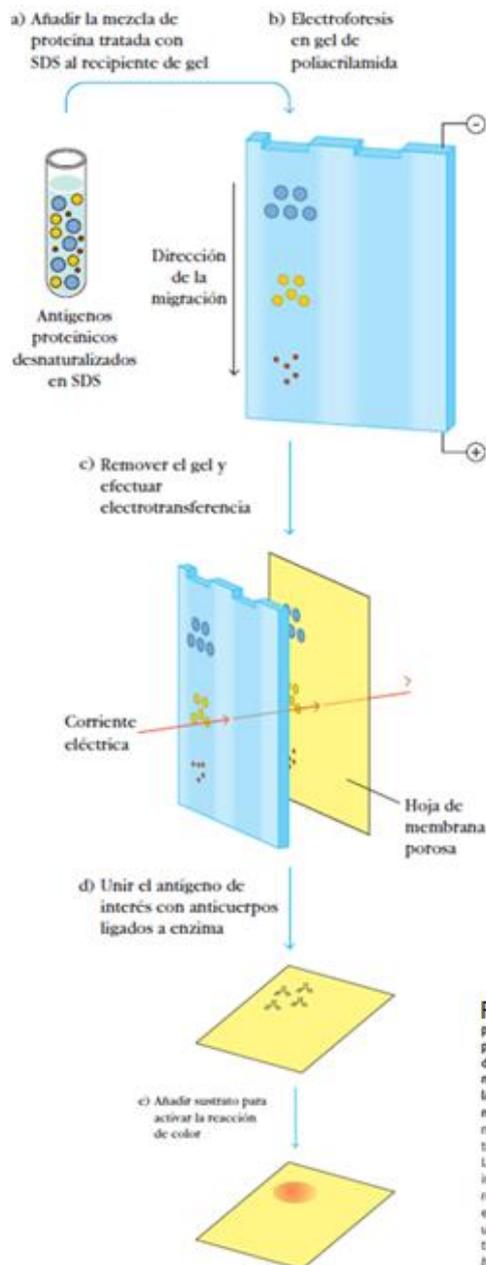
**\*La membrana con las proteínas inmovilizadas debe tratarse antes de añadir los anticuerpos para bloquear las zonas con ausencia de proteínas y así evitar la unión no específica de los Acs.**

Los complejos Ag-Ac que se forman en la banda que contiene la proteína reconocida por el anticuerpo, se visualizan con la adición de un sustrato cromógeno que produce un producto de color intenso e insoluble origina la aparición de una banda de color en el sitio del antígeno blanco. Puede lograrse una sensibilidad mucho más alta si se usa un compuesto quimioluminiscente aunado a agentes de realce adecuados para producir luz en el sitio del antígeno.

En caso de radioinmunoanálisis, si un anticuerpo radiactivo se unió a la proteína de interés, es posible determinar su posición en la mancha (blot) exponiendo una placa de rayos X a la membrana, un procedimiento que se conoce como autorradiografía. La banda marcada se identifica por el oscurecimiento de la emulsión fotográfica.

La técnica de Western blotting también puede identificar un anticuerpo específico en una mezcla. En este caso los antígenos conocidos de peso molecular bien definido se separan

mediante SDS-PAGE y transfieren a nitrocelulosa. Las bandas separadas de antígenos conocidos se prueban luego con la muestra que se sospecha contiene anticuerpo específico para uno o más de estos antígenos. La reacción de un anticuerpo con una banda se detecta mediante el empleo de anticuerpo secundario radiomarcado o ligado a enzima específico para la especie de los anticuerpos en la muestra en estudio.

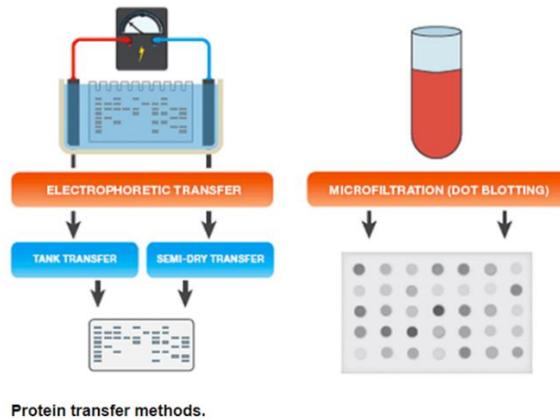


**Figura 3** La técnica de Western blotting, una mezcla proteínica a) se trata con SDS, un detergente desnaturalizador potente, b) luego se separa mediante electroforesis en un gel de SDS-poliacrilamida (SDS-PAGE) que discrimina los componentes según su peso molecular; los componentes de peso molecular más bajo migran más rápido que los de peso molecular más alto. c) El gel se retira del aparato y se aplica a una hoja de nitrocelulosa o nylon que une proteínas, y las proteínas y el gel se transfieren a la hoja mediante el paso de una corriente eléctrica. d) La adición de anticuerpos unidos a enzima detecta el antígeno de interés y e) la posición de los anticuerpos se observa mediante una reacción ELISA que genera un producto insoluble de color intenso el cual se deposita en el sitio de la reacción. De otra manera puede utilizarse un ELISA quimioluminiscente para generar luz que se detecta con facilidad al exponer una pieza de película fotográfica a la blot (mancha).

5

<sup>5</sup> Fuente imagen: "Inmunología de Kuby" 6ª Ed.

## Protein Transfer Methods



6

Figura 4. Esquema transferencia de proteínas

Existe una variante llamada **dot blot**. En esta técnica se hace pasar la solución antigénica a través de una membrana de nitrocelulosa, de forma que cualquier proteína se une a la misma. La presencia del antígeno se determina mediante la adición de un antisuero específico y una antiglobulina marcada con una enzima, en este orden. Después de la incubación con el sustrato de la enzima, la presencia de un punto (dot) coloreado indica una reacción positiva. Es posible poner puntos de muchos anticuerpos monoclonales diferentes en una sola membrana de nitrocelulosa, que después se incuban con una mezcla compleja de antígenos marcados. Después de lavar y desarrollar el color, se pueden visualizar las concentraciones relativas de muchos antígenos diferentes.

### Aplicaciones en Laboratorios de Genética y Sanidad Animal

En el LCV se realizan, entre otros, los siguientes ensayos:

- Detección de proteína priónica resistente a la proteinasa K de las Encefalopatías Espongiformes Transmisibles mediante inmunotransferencia (Western blot). Muestra: sistema nervioso central de bovino.
- Discriminación de cepas de EEB mediante purificación de proteína priónica resistente a la proteinasa K e inmunotransferencia con varios anticuerpos
- Discriminación de Encefalopatías Espongiformes Transmisibles mediante purificación de proteína priónica resistente a la proteinasa K e inmunotransferencia (método CEA)
- Detección de anticuerpos frente al virus de la Peste Porcina Africana (PPA) mediante inmunotransferencia (Western blot)

<sup>6</sup> Fuente imagen: <https://www.bio-rad.com/es-es/applications-technologies/protein-blotting-methods?ID=LUSPPSESH>

#### 4. INMUNOHISTOQUÍMICA (IHQ)

Es un conjunto de técnicas basado en el uso de inmunoglobulinas marcadas con enzimas para localizar antígenos específicos en cortes de tejido, basándose en las interacciones Ag-Ac. También se denomina “Inmunomarcado”, pues marcamos la ubicación del Ag de interés en el tejido. La observación de los inmunocomplejos formados en el tejido en estudio se observa mediante microscopía gracias a la adición de sustrato específico para la enzima empleada en el conjugado.

Es una técnica que gracias a la oferta comercial de anticuerpos y a la estandarización de su protocolo se ha convertido en un método sencillo, rápido y muy potente. Se basa en la gran especificidad y alta afinidad que tienen los anticuerpos para reconocer a moléculas y unirse a ellas.

Pueden utilizarse diversas enzimas, pero la más empleada es la peroxidasa de rábano picante, seguida de la fosfatasa alcalina. En general los marcadores enzimáticos no son visibles directamente al microscopio óptico, por lo que requieren un proceso de revelado, consistente en reacciones histoquímicas cuyo fundamento es que un cromógeno adquiere un determinado color por acción del marcador enzimático. Los principales cromógenos son la diaminobenzidina de color marrón, cloronaftol, de color negro y aminoetilcarbazol de color rojo.

Para realizar estos métodos adecuadamente se requieren conocimientos en tres disciplinas: histología, inmunología y química.

Las técnicas se realizan de forma similar a los análisis de inmunofluorescencia, distinguiéndose la variante directa y la indirecta.

##### **Técnica directa**

En la prueba de inmunoperoxidasa directa, el corte del tejido se trata con el anticuerpo primario conjugado con una enzima. Tras un paso de lavado para eliminar el material no unido, se incuba con una solución del sustrato apropiado de la enzima. El Ac unido se detecta por el desarrollo de un depósito de color marrón en el sitio de unión del Ac. Es un método rápido, pero poco específico.

##### **Técnica Indirecta**

En la prueba indirecta existen dos anticuerpos, el Ac primario se une específicamente al antígeno y el Ac secundario se une al Ac primario que está marcado con la enzima. Es una reacción enzimática, en la cual la enzima actúa sobre un sustrato dando una coloración en el tejido donde se ubique el antígeno que estamos buscando. Esta técnica tiene una importante ventaja sobre las de inmunofluorescencia, ya que los tejidos teñidos pueden examinarse con un microscopio óptico.

Dentro de los métodos indirectos, al principio se empleó el denominado **peroxidasa-antiperoxidasa** (PAP): Este complejo está constituido por dos moléculas de inmunoglobulinas y tres de peroxidasa; es necesario que se desarrolle el complejo

peroxidasa antiperoxidasa y obtener anticuerpos por inmunización de animales de la misma especie que los utilizados en la obtención del anticuerpo primario.

Además, es preciso aplicar tratamientos complementarios en cortes histológicos, con el objeto de resaltar la reacción inmunológica específica. Uno de estos procesos consiste en el bloqueo de la actividad peroxidásica endógena, puesto que ciertas estructuras tisulares, como es el caso de eritrocitos, granulocitos, macrófagos, entre otras, poseen actividad peroxidásica, se suelen emplear soluciones en base a metanol y peróxido de hidrógeno al 0,3%, o también con tratamientos con ácido clorhídrico y ácido peryódico.

Otro tratamiento complementario es el desenmascaramiento de grupos antigénicos, que se basa en que al utilizar formol para la fijación se producen puentes de unión de tipo cruzado entre los componentes protéicos, que pueden ocultar algunos antígenos o hacerlos inaccesibles al anticuerpo primario, haciéndose necesario devolver la actividad antigénica eclipsada mediante el tratamiento enzimático con tripsina.

El background o tinción de fondo, es un problema serio cuando no hay la suficiente experiencia en el manejo de la técnica; se debe a difusión extracelular de antígenos, a la persistencia del medio de inclusión (deficiente desparafinado), al uso de anticuerpos mal purificados o a la unión de anticuerpos mediante el complemento o la región Fc. Esta tinción inespecífica definitivamente genera dificultades para una correcta delimitación de las áreas correctamente positivas. Algunos autores recomiendan utilizar una dilución óptima de los anticuerpos primarios.

El revelado de la reacción peroxidásica se realiza mediante la producción de un precipitado insoluble local, el cual se forma cuando reacciona la peroxidasa con el peróxido de hidrógeno, complejo que posteriormente va a reaccionar sobre uno de los cromógenos descritos anteriormente.

Actualmente es más frecuente usar el método del **complejo avidina-biotina-peroxidasa** (ABC;). La biotina es una vitamina de muy bajo peso molecular, perteneciente al complejo B; tiene una notable afinidad con la avidina, la cual es una glicoproteína que comúnmente se encuentra en la clara de huevo.

Estas dos moléculas se unen de una manera irreversible y muy rápida; esta unión es un millón de veces mayor que la mostrada por la unión antígeno-anticuerpo. Debe considerarse que el complejo ABC se halla formado por una red tridimensional de múltiples moléculas de peroxidasa biotinadas y entrelazadas con la avidina.

Las ventajas de esta técnica son el ahorro de reactivos, mínima tinción de fondo y, lo más importante, una elevada sensibilidad que se explica por el proceso de amplificación que ocurre al corresponder a un lugar de unión antigénica múltiples moléculas de peroxidasa activa. Pero es de importancia considerar que ciertos tejidos como hígado, riñón y sistema nervioso contienen biotina y sustancias de estructura afín, las cuales pueden fijar el complejo ABC, produciendo resultados equivocados (falso positivo), por lo que es necesario bloquear dichas sustancias antes de realizar la técnica.

El método indirecto permite una mayor versatilidad de la técnica y mayor intensidad de señal frente a una misma cantidad de antígeno. El procedimiento parte de secciones de tejido previamente fijado. Inmediatamente después se incuban en una solución de bloqueo que satura los posibles sitios de unión inespecífica, gracias a una alta concentración de proteína como la albúmina de suero bovino. Tras cada paso de unión de anticuerpos o del complejo avidina-biotina-peroxidasa se procede a lavar los cortes en una solución tamponada de fosfato (tampón fosfato), en la que también van disueltos los anticuerpos. La reacción de la peroxidasa convierte unos sustratos, la diaminobencidina y el peróxido de hidrógeno, en un producto insoluble y coloreado visible con el microscopio óptico.

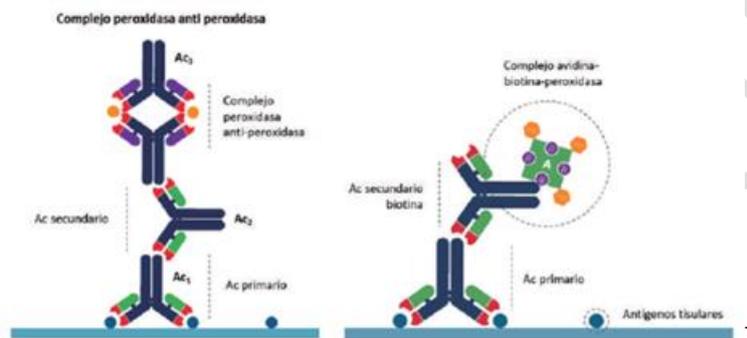


Figura 5. Esquema técnicas inmunohistoquímicas

### **Aplicaciones en Laboratorios de Genética y Sanidad Animal**

En los Laboratorios de Sanidad Animal del Ministerio se realizan ensayos de histopatología e inmunohistoquímica para el diagnóstico de enfermedades infecciosas animales.

Podemos destacar:

- LCV: Diagnóstico de Encefalopatías Espongiformes Transmisibles (EETs) mediante inmunohistoquímica
- LCV: Detección de anticuerpos frente al virus de la Peste Porcina Africana (PPA) mediante inmunoperoxidasa
- LCSA: Inmunohistoquímica de ABC para tuberculosis

<sup>7</sup> Fuente imagen: <https://revistamedicina.net/ojsanm/index.php/Medicina/article/view/1587/2034>

## 5. BIBLIOGRAFÍA

Introducción a la Inmunología Veterinaria”, 8ª Edición. Tizard, I-R.

Microbiología e inmunología on line

GUIA DE TÉCNICAS INMUNOLÓGICAS 2019. Inmunología - Departamento de Microbiología, Parasitología e Inmunología. Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires.

Anexo técnico de acreditación LCV:

[https://www.mapa.gob.es/es/ganaderia/temas/laboratorios/13anexotecnicoacreditacionlcv\\_692\\_le1530\\_rev13011021\\_tcm30-522272.pdf](https://www.mapa.gob.es/es/ganaderia/temas/laboratorios/13anexotecnicoacreditacionlcv_692_le1530_rev13011021_tcm30-522272.pdf)

Anexo técnico de acreditación LCSA:

[https://www.mapa.gob.es/es/ganaderia/temas/laboratorios/650\\_le946rev16\\_tcm30-560492.pdf](https://www.mapa.gob.es/es/ganaderia/temas/laboratorios/650_le946rev16_tcm30-560492.pdf)

Inmunología de Kuby, 6ª Edición. Thomas J. Kindt, Richard A. Goldsby y Barbara A. Osborne. Editorial McGraw Hill.

<http://biotech-spain.com/es/articles/tipos-de-elisa-conoces-las-diferencias/>

Protocolo ELISA bloqueo

<https://ingenasa.euofins-technologies.com/media/4252/10bruk3-protocolo-bi.pdf>

<https://www.laboratorioeyco.com/tecnica-elisa-en-que-consiste-usos-y-equipos-empleados-para-su-medida-los-lectores-de-microplacas-en-los-espectrofotometros-elisa/#queequiposeutiliza>

Inmunohistoquímica

<https://mmegias.webs.uvigo.es/6-tecnicas/5-inmuno.php>

[http://web.uchile.cl/vignette/avancesveterinaria/CDA/avan\\_vet\\_simple/0,1423,SCID%253D10219%2526ISID%253D478%2526PRT%253D10207,00.html#:~:text=T%C3%A9cnica%20del%20complejo%20avidina%20biotina,en%20la%20clara%20de%20huevo.](http://web.uchile.cl/vignette/avancesveterinaria/CDA/avan_vet_simple/0,1423,SCID%253D10219%2526ISID%253D478%2526PRT%253D10207,00.html#:~:text=T%C3%A9cnica%20del%20complejo%20avidina%20biotina,en%20la%20clara%20de%20huevo.)

**MATERIAL PARA LA PREPARACIÓN DEL TEMA 26**

**OTRAS TÉCNICAS INMUNOLÓGICAS: CONCEPTO, TIPOS Y APLICACIONES  
EN LABORATORIOS DE SANIDAD Y GENÉTICA ANIMAL.**

*Este material no tiene carácter oficial, por lo que en ningún caso vinculará al Tribunal Calificador. Constituye, únicamente, un instrumento complementario que servirá de apoyo al opositor para enfocar cada uno de los epígrafes, pero nunca de forma exclusiva ni excluyente. El Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación no se hace responsable del contenido del mismo.*

*Los materiales no serán objeto de actualización constante.*

## **ÍNDICE**

### **1. INTRODUCCIÓN**

### **2. PRUEBAS DE UNIÓN PRIMARIA: Concepto y tipos**

#### **2.1. INMUNOFLUORESCENCIA**

2.1.1. Pruebas de Inmunofluorescencia directa

2.1.2. Pruebas de Inmunofluorescencia indirecta

2.1.3. Inmunoanálisis de fluorescencia de partículas

2.1.4. Citometría de flujo con fluorescencia

#### **2.2. RADIOINMUNOANÁLISIS**

2.2.1. RIA directo o competitivo

2.2.2. RIA indirecto o no competitivo

#### **2.3. INMUNOCROMATOGRAFÍA**

### **3. PRUEBAS DE UNIÓN SECUNDARIA**

3.1. PRECIPITACIÓN

3.2. AGLUTINACIÓN

3.3. FIJACIÓN DE COMPLEMENTO

3.4. NEUTRALIZACIÓN

### **4. TÉCNICAS INMUNOLÓGICAS DE BASE CELULAR**

4.1. IN VIVO

4.2. IN VITRO

## 1. INTRODUCCIÓN

El organismo animal dispone de un sistema de defensa ante el posible ataque de agentes invasores que pueden suponer una amenaza y que se denominan de manera general agentes patógenos. Más concretamente, una de las barreras que compone el sistema inmune es la que se denomina **inmunidad adquirida**, una compleja herramienta basada en la capacidad del organismo invadido para reconocer al agente patógeno invasor, combatirlo y generar información de memoria para reconocer a ese agente en un ataque posterior y actuar de manera más rápida y eficaz. Para ello, la inmunidad adquirida usa receptores para reconocer microorganismos invasores extraños, que son diferentes para cada caso.

Una rama del sistema inmune se dirige a los patógenos extracelulares o exógenos, empleando para combatirlos unas proteínas denominadas anticuerpos que son producidas por los linfocitos B; este tipo de respuesta inmune se llama humoral, porque los anticuerpos se encuentran en los fluidos orgánicos (o “humores”).

La otra rama del sistema se dirige contra los patógenos intracelulares o endógenos, que invaden las células, disponiendo de células especializadas que destruyen las células infectadas o anómalas; es la denominada respuesta inmune mediada por células.

En ambos casos, cuando un **antígeno**<sup>1</sup> entra en el organismo, primero debe ser atrapado y procesado de manera que pueda ser reconocido como extraño. Si es reconocido como tal, esa información deberá llegar, según el caso, al sistema productor de anticuerpos o al responsable de la respuesta celular.

Pues bien, las técnicas inmunológicas se basan en la **especificidad** de la interacción de las moléculas que intervienen tanto en la respuesta inmune mediada por anticuerpos (humoral) como en la respuesta inmune de tipo celular, activadas por exposición a un agente patógeno, ya sea por infección o por vacunación. Algunas son cualitativas de manera estricta y otras son cuantitativas.

Las técnicas inmunológicas basadas en la respuesta inmune mediada por anticuerpos se basan en el reconocimiento específico y en la estabilidad de la unión antígeno-anticuerpo (= Ag-Ac). Esta interacción Ag-Ac se parece a la interacción enzima-sustrato se caracteriza por ser una unión:

- Reversible, formada por enlaces no covalentes.
- Específica<sup>2</sup>, por interacción complementaria (aunque en algunos casos, puede darse reactividad cruzada<sup>3</sup> con otro antígeno).

---

<sup>1</sup> Antígeno: sustancia extraña al organismo capaz de estimular la respuesta inmune de éste.

<sup>2</sup> Especificidad: capacidad del Ac para discriminar e interactuar diferencialmente con un Ag de estructura similar.

<sup>3</sup> Reacción cruzada: la que tiene lugar cuando un Ac se une a un Ag distinto porque tiene una estructura relacionada pero no similar.

Cuando tiene lugar la unión Ag-Ac podemos distinguir dos etapas: una primera interacción no detectable a simple vista y una segunda reacción que puede ocasionar cambios visibles, como es el caso de la aglutinación y de la precipitación. La reacción primaria ocurre siempre, pero que tenga lugar la secundaria depende de numerosos factores, como por ejemplo, la proporción en que se enfrentan Ag y Ac, por lo que no siempre tiene lugar.

Las **técnicas serológicas** pueden clasificarse en tres tipos:

- Pruebas de unión primaria= miden directamente la unión Ag-Ac.
- Pruebas de unión secundaria= miden los cambios físicos tras la formación de inmunocomplejos.
- Pruebas terciarias: miden el efecto protector real de los anticuerpos en un animal.

La medición de las interacciones Ag-Ac con fines diagnósticos se denomina **serología** y engloba un grupo de técnicas que son de gran aplicación en Sanidad Animal, ya sea a nivel individual o de colectividades, para el diagnóstico de enfermedades, la vigilancia del grado de respuesta inmunitaria humoral y la identificación de moléculas de interés biológico o médico.

Por otro lado, existen otro grupo de **técnicas inmunológicas** que permiten la valoración de la respuesta inmunitaria celular, incluyendo cómo se separan las células que intervienen en la respuesta inmunitaria del resto de componentes de la sangre y las técnicas que valoran la funcionalidad de las mismas. Ejemplos: estudios de la funcionalidad de fagocitos y linfocitos, producción de citoquinas (como gamma interferón)...

## **2. PRUEBAS DE UNIÓN PRIMARIA: CONCEPTO Y TIPOS**

Como hemos mencionado anteriormente, la interacción primaria Ag-Ac no es detectable a simple vista, por lo que necesitamos sistemas indicadores para poder hacerla visible. Para ello, necesitaremos marcar químicamente o bien el Ag o bien el Ac involucrados en dicha interacción.

Entre las pruebas de reacción primaria existentes, podemos hacer visibles uniones Ag-Ac mediante uno de los siguientes sistemas indicadores:

- Marcador fluorescente = Inmunofluorescencia
- Marcador radioactivo= Radioinmunoanálisis (RIA)
- El marcador es un metal pesado= Inmunocromatografía
- Marcador enzimático: las técnicas inmunoenzimáticas quedan recogidas en otro tema específico del temario, por lo que no las explicaremos en el este tema.

Vamos a comentar ahora algunos aspectos de manera general:

- Para realizar el marcado molecular, en primer lugar hay que **purificar** la molécula a marcar. Esto puede hacerse por diversos métodos como filtración molecular, cromatografía o separación en gradiente de densidad mediante ultracentrifugación. El posterior marcado no debe alterar la unión Ag-Ac.
- El diagnóstico que se consigue mediante las distintas técnicas puede considerarse directo (detección de Ag en la muestra) o indirecto (=detección de Ac presentes en diferentes matrices, como suero, leche,...).
- Las técnicas primarias se desarrollan en pasos o etapas con **incubaciones intermedias** en las que se produce la reacción Ag-Ac.
- Muchas técnicas requieren **lavados intermedios** entre incubaciones y es muy importante realizarlos correctamente para arrastrar el material reactivo que no haya reaccionado y no se haya unido y así evitar interferencias en el resultado.

### **2.1. INMUNOFLUORESCENCIA (IFAT= IMMUNOFLUORESCENCE ANTIBODY TEST)**

Para este tipo de técnica se emplean colorantes fluorescentes o fluorocromos como marcadores químicos. El más común es el isotiocianato de fluoresceína (=FITC), un compuesto de color amarillo que puede unirse químicamente a los Ac sin afectar a su reactividad (el Ac marcado se denomina conjugado).

Cuando se le aplica una luz ultravioleta invisible o una luz azul a 290 y 145 nm (= nanómetros), el FITC reemite una luz visible de color verde brillante a 525 nm, que se puede ver con facilidad empleando un microscopio de fluorescencia. Dependiendo del fluorocromo que se utilice, cambia el color de la luz que emite (naranja/rojo, azul,...).

Los anticuerpos marcados con fluorocromos pueden emplearse tanto en pruebas de inmunofluorescencia directa como indirecta.

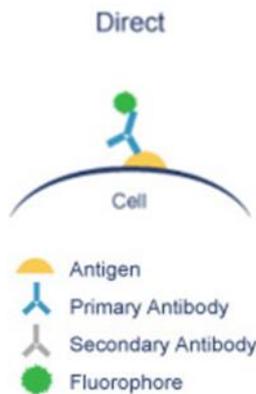
Al igual que la mayoría de las técnicas de fluorescencia, un problema muy significativo en esta técnica es el fotoblanqueo, es decir, la pérdida de la actividad fluorescente causada por la exposición a la luz. Esta pérdida de actividad puede ser controlada reduciendo la intensidad o el tiempo de exposición a la luz, incrementando la concentración de fluoróforo, o empleando fluoróforos más robustos.

Las técnicas de tinción por inmunofluorescencia para la marcación de estructuras subcelulares se encuentra limitada a su uso en células fijadas (muertas) ya que los anticuerpos no son capaces de atravesar las membranas íntegras de las células vivas. Sin embargo, sí es posible detectar proteínas o moléculas en suspensión en el sobrenadante, en la periferia (membrana) y proximidades de una célula viva, esto posibilita marcar células vivas siempre que no se requiera ver su estructura interna.

### **Pruebas de inmunofluorescencia directa**

Este tipo de prueba se emplea para identificar la presencia de un antígeno en una muestra o tejido. Para ello, debemos marcar con el fluorocromo el anticuerpo específico que irá dirigido a la bacteria o virus que queremos buscar.

Por otro lado, debemos fijar a una superficie (en muchos casos, un portaobjetos de vidrio) el tejido o el frotis donde vamos a buscar el microorganismo.



**Figura 1**

<sup>4</sup>El siguiente paso es añadir el antisuero marcado al material fijado al portaobjetos e incubar. Terminada la incubación, hay que lavar concienzudamente para eliminar todo el reactivo no fijado, y se examina el portaobjetos con iluminación de campo oscuro en un microscopio de luz ultravioleta. En caso de que la bacteria o el virus que buscamos en el tejido esté presente, el anticuerpo marcado se habrá fijado al portaobjetos y observaremos un brillo fluorescente gracias al fluorocromo que habíamos conjugado con el anticuerpo.

En caso de ausencia del patógeno que buscamos en el tejido o frotis fijado al portaobjetos, los anticuerpos marcados se arrastrarían en el lavado al no haberse fijado, y al microscopio observaríamos un campo oscuro o algo rojizo, pero totalmente

apagado, sin brillo.

Esta técnica permite detectar un número bajo de microorganismos en una muestra.

### **Aplicaciones en Laboratorios de Sanidad y Genética Animal**

La IF directa se puede emplear para detectar, por ejemplo, *Mycobacterium avium* paratuberculosis en heces, o *Listeria monocytogenes* en tejidos con lesiones. También se puede emplear para detectar virus en un cultivo celular o en tejidos tomados de animales enfermos; por ejemplo, el virus de la rabia en los encéfalos de animales infectados o el virus de la leucemia felina en leucocitos infectados.

El Laboratorio Central de Veterinaria (LCV) de Algete, usa la IF directa en el diagnóstico de la campilobacteriosis genital bovina, ya sea para detectar el agente sobre muestras de esmegma prepucial o bien para identificar aislados.

También realiza la identificación de virus mediante inmunofluorescencia en las siguientes enfermedades de los peces: Septicemia Hemorrágica Viral (SHV) Necrosis Hematopoyética Infecciosa (NHI), Necrosis Pancreática Infecciosa (NPI) y Viremia Primavera de la Carpa (VPC).

El Laboratorio Central de Sanidad Animal (LCSA) de Santa Fe, usa la IF directa como el paso final de la titulación de anticuerpos antirrábicos postvacunales. El virus de la rabia no

<sup>4</sup> Figura 1 obtenida en el siguiente enlace:

<http://www.iib.unsam.edu.ar/archivos/docencia/licenciatura/biotecnologia/2017/BioCel/1504124326.pdf>

produce efecto citopático, no altera el aspecto de las células al infectarlas, de modo que, para evidenciar su presencia en el cultivo celular, fijamos las células y añadimos conjugado fluorescente anti-virus rábico.

### **Pruebas de inmunofluorescencia indirecta (=IFI)**

Estas pruebas se utilizan principalmente para detectar Ac en el suero de un individuo; en algunos libros se recoge también utilidad para identificar antígenos específicos en los tejidos o en cultivos celulares. La IFI se emplea en el diagnóstico de muchas enfermedades infecciosas y parasitarias.

Para medir los niveles de anticuerpos, el antígeno concreto (presente en un frotis, o en cortes de tejidos o en un cultivo celular) se coloca en un portaobjetos y se fija. A continuación, añadiremos el suero problema o sospechoso de contener anticuerpos frente a ese antígeno, y lo dejaremos incubar durante un tiempo. Tras la incubación, lavaremos bien el portaobjetos, para arrastrar todo lo que no se haya fijado, y añadiremos el conjugado (= Ac marcado con fluorocromo= se trata de una antiglobulina anti-Ac de la especie en la que estamos diagnosticando).

Ejemplo: si estamos estudiando si un perro tiene anticuerpos frente a leishmaniosis, usaremos conjugado anti-canino, que buscará fijarse a los anticuerpos de perro que se hubiesen unido al antígeno de *Leishmania spp* fijado al portaobjetos). Tras una segunda incubación, volveremos a lavar el, arrastrando todo lo que no se haya unido. Al observar con el microscopio de fluorescencia, la presencia de fluorescencia indicaría que hay anticuerpos en el suero analizado. Existe la posibilidad de realizar diluciones seriadas del suero problema. Esto permite titular el suero, determinando qué dilución es la última a la que se aprecia fluorescencia.

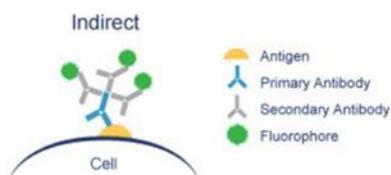


Figura 2

<sup>5</sup>La prueba de IFI tiene dos ventajas sobre la técnica directa: la fluorescencia será considerablemente más brillante que en la directa porque pueden unirse varias antiglobulinas marcadas a un mismo Ac del individuo y, en segundo lugar, se puede determinar la clase del Ac específico si se usan antiglobulinas específicas para cada clase de inmunoglobulinas (Ig M, Ig G...).

### **Aplicaciones en Laboratorios de Sanidad y Genética Animal**

El LCSA emplea IFI para serodiagnóstico de algunas enfermedades, como leishmaniosis, toxoplasmosis y *Brucella canis*.

<sup>5</sup> Figura 2 obtenida en el siguiente enlace:

<http://www.iib.unsam.edu.ar/archivos/docencia/licenciatura/biotecnologia/2017/BioCel/1504124326.pdf>

## Inmunoanálisis de fluorescencia de partículas

Los análisis de inmunofluorescencia pueden automatizarse y cuantificarse mediante el inmunoanálisis de partículas. Consiste en recubrir dichas partículas con Ag conocido y enfrentrarlas al suero problema en una incubación; tras el correspondiente lavado, puede continuarse la técnica mediante dos vías:

- De manera indirecta: usando, al igual que hemos visto antes, un conjugado fluorescente anti-especie, que se fije a los Ac que hubiesen quedado unidos a las partículas con Ag.
- Como un análisis de tipo competitivo: usando Ac marcados específicos del Ag, de modo que sólo podrán unirse al Ag si quedaron “huecos libres” de la incubación anterior, es decir, cuantos más Ac marcados se fijen a las partículas, más negativa es la muestra problema (= si se inhibe la unión de los marcados, es porque en la incubación anterior había Ac del suero problema).

## Citometría de flujo con fluorescencia

Aunque hablaremos de la citometría de flujo más adelante, en su apartado correspondiente, resulta conveniente mencionar aquí que existe una variante en la que se emplean Ac monoclonales fluorescentes para la detección de Ag de superficie celular mediante un láser de luz que identifica específicamente las células marcadas. Esta subpoblación se puede caracterizar y contar. Esta variante permite analizar simultáneamente la expresión de múltiples Ag de superficie celular si empleamos al mismo tiempo Ac marcados con diferentes fluorocromos.

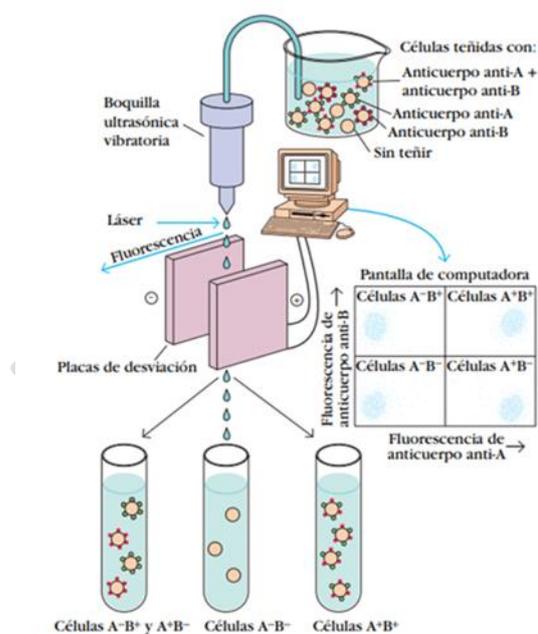


FIGURA 3

**Separación de células marcadas con fluorocromo en el citómetro de flujo.** En el ejemplo que se muestra, una población mixta de células se tiñó con dos anticuerpos: uno específico para el antígeno de superficie A y el otro específico para el antígeno de superficie B. Los anticuerpos anti-A se marcaron con fluoresceína (verde) y los anticuerpos anti-B con rodamina (rojo). Las células teñidas se cargan en la cámara de muestra del citómetro. Las células se expulsan, una a la vez, de una boquilla pequeña vibratoria que genera microgotitas, cada una de las cuales contiene no más de una célula aislada. Conforme sale de la boquilla, cada gotita recibe una carga eléctrica pequeña y la computadora que controla el citómetro de flujo puede detectar con exactitud cuando pasa una gotita generada por la boquilla a través del haz de luz láser que excita el fluorocromo. La intensidad de la fluorescencia emitida por cada gotita que contiene una célula se vigila con un detector y se muestra en una pantalla de computadora. Como la computadora sigue la posición de cada gotita, es posible determinar cuándo una gotita particular llegará entre las placas de desviación. La aplicación de una carga momentánea a las placas de desviación cuando una gotita pasa entre ellas hace posible desviar el trayecto de una gotita particular hacia uno u otro vaso de reunión. Ello permite seleccionar una población de células en subpoblaciones que tienen diferentes perfiles de marcadores de superficie.

Cada punto representa una célula en la pantalla de la computadora. Las células que caen en el panel inferior izquierdo tienen niveles de fondo de fluorescencia y se juzga que no reaccionaron con anticuerpo anti-A o anti-B. Las que aparecen en el panel superior izquierdo reaccionaron con anti-B, pero no con anti-A, y las del panel inferior derecho reaccionaron con anti-A pero no con anti-B. El panel superior derecho contiene células que reaccionan tanto con anti-A como con anti-B. En los ejemplos que aquí se muestran, las subpoblaciones A<sup>+</sup>B<sup>-</sup> y A<sup>-</sup>B<sup>+</sup> se seleccionaron cada una hacia tubos separados. La tinción con anticuerpos fluorescentes anti-A y anti-B permite distinguir cuatro subpoblaciones: A<sup>+</sup>B<sup>-</sup>, A<sup>-</sup>B<sup>+</sup>, A<sup>+</sup>B<sup>+</sup> y A<sup>-</sup>B<sup>-</sup>.

6

<sup>6</sup> Fuente Figura 3: Libro “Inmunología de Kuby 6ª Ed. McGraw Hill. Thomas J. Kindt, Richard A. Goldsby y Barbara A. Osborne. (enlace: <https://oncousd.files.wordpress.com/2015/06/inmunologia.pdf>)

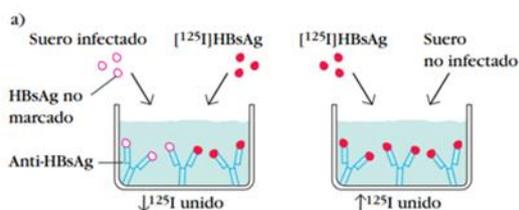
## 2.2. RADIOINMUNOANÁLISIS (RIA)

Esta técnica emplea radioisótopos como marcadores para evidenciar las uniones Ag-Ac. Como ventajas, mencionar que se trata de una técnica extremadamente sensible, fácil y rápida. Por otro lado, el RIA tiene también ciertas desventajas: los isótopos radiactivos tienen una vida media corta, son potencialmente peligrosos y requieren dispositivos de detección que resultan bastante costosos, sin olvidar la necesidad de eliminar el material radiactivo con la máxima seguridad.

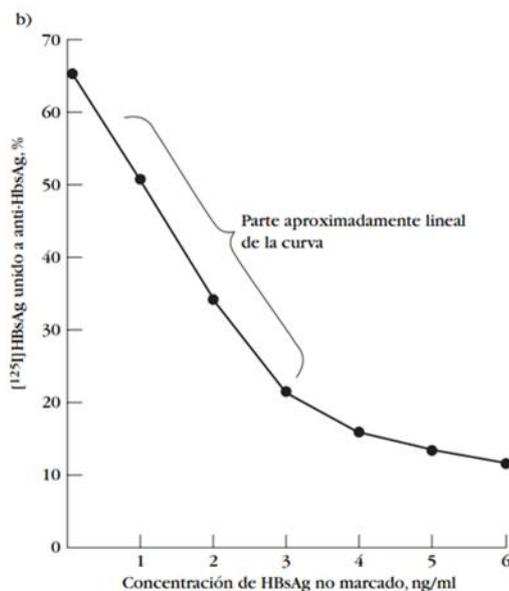
En un principio fue creada para determinar las concentraciones de complejos de insulina y antiinsulina en pacientes diabéticos y pronto se amplió su uso a medición de hormonas, proteínas séricas, fármacos y vitaminas. Podemos diferenciar dos tipos de técnica:

### RIA directo o competitivo

Estas pruebas son tan sensibles, que se emplean, por ejemplo, para detectar cantidades trazas de fármacos. En estos ensayos se emplea Ag radiomarcado, siguiendo el siguiente principio:



**Figura 4** Radioinmunoensayo (RIA) de fase sólida para detectar virus de hepatitis B en muestras de sangre. a) Fosforos de microtítulo se cubren con una cantidad constante de anticuerpo específico para HbsAg, el antígeno de superficie en viriones de hepatitis B. A continuación se añaden una muestra de suero y  $[^{125}\text{I}]\text{HBsAg}$ . Tras la incubación, el sobrenadante se extrae y la radiactividad de los complejos antígeno-anticuerpo se mide. Si la muestra está infectada, la cantidad del marcador unido es menor que en los testigos con suero no infectado. b) Se obtiene una curva estándar añadiendo concentraciones crecientes de HbsAg no marcado a una cantidad fija de  $[^{125}\text{I}]\text{HBsAg}$  y anticuerpo específico. La gráfica de porcentaje de antígeno marcado unido contra concentración de antígeno no marcado permite determinar la concentración de HbsAg en muestras de suero desconocidas mediante el uso de la parte lineal de la curva.



<sup>7</sup>Cuando el Ag (o el fármaco) marcado con un isótopo radiactivo (ej: titrio, carbono 14, yodo 125...) se mezcla con su Ac específico, tendría lugar la formación de inmunocomplejos que pueden precipitarse y extraerse de la solución, de manera que cualquier radiactividad que quede en el sobrenadante es debida al Ag sin unir. Si el Ag no marcado se añade a la mezcla antes del Ac, los dos Ag (marcado y no marcado) competirán entre sí por los sitios de unión del Ac; parte del Ag marcado no conseguirá unirse al Ac, aumentando la radiactividad del sobrenadante. Si primero se construye una curva estándar utilizando cantidades conocidas de Ag no marcado, podrá medirse la cantidad de Ag de una muestra a analizar por referencia a dicha curva estándar.

<sup>7</sup> Fuente Figura 4: Libro "Inmunología de Kuby 6ª Ed. McGraw Hill. Thomas J. Kindt, Richard A. Goldsby y Barbara A. Osborne. (enlace: <https://oncousd.files.wordpress.com/2015/06/inmunologia.pdf>)

## RIA indirecto o no competitivo

Se trata de un tipo de RIA usado con frecuencia para medir IgE específicas de Ag en animales alérgicos prueba RAST= radioalergosorbent test). En esta técnica, los discos de celulosa impregnados de Ag se sumergen en el suero a analizar, de manera que cualquier Ac específico se unirá a dicho Ag. Después de lavar para eliminar los Ac sin unir, el disco se sumerge en una solución que contiene antiglobulina (=AC anti-inmunoglobulina; ej: anti-IgE) marcada con un isótopo radiactivo. Esta antiglobulina sólo quedará fijada al disco si hay IgE unida al Ag del disco, de manera que la radiactividad que emite el disco es una medida del nivel de actividad del Ac IgE específico del suero.

## 2.3. INMUNOCROMATOGRAFÍA

El uso de esta técnica está aumentando progresivamente porque permite hacer los análisis aún más rápidos y fáciles de leer en un solo paso. Utiliza conjugado marcado con metales pesados: oro coloidal (color rosa) o selenio coloidal (color azul), de modo que se marca la molécula complementaria a la que se busca en la muestra problema (Ej: en caso de buscar Ac, podemos marcar el Ag complementario o bien un anticuerpo monoclonal anti-especie).

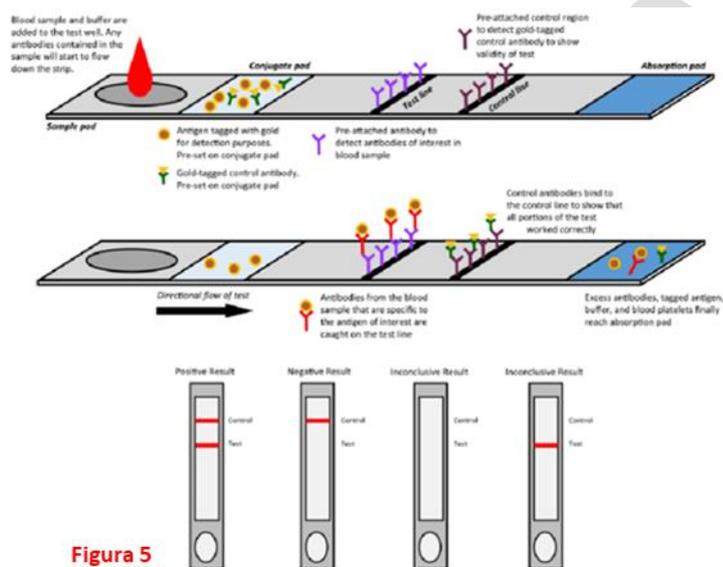


Figura 5

presente en la muestra. En su recorrido, primero pasa a través de una zona TEST, una banda donde se han inmovilizado moléculas complementarias a la que buscamos. Si la muestra contiene el Ac o Ag que buscamos (ya unido al conjugado de la almohadilla), se unirá formando inmunocomplejos que quedarán inmovilizados en esa banda y el conjugado unido dará color a la banda. Así, en caso de un resultado positivo, se desarrolla una línea azul o rosa (según el metal con el que se haya marcado) en la zona de detección. El resto de la muestra continúa fluyendo y alcanza la zona CONTROL, formada por anticuerpos que se unirán al conjugado libre que no ha quedado retenido en la zona de captura. Esta línea indica que el ensayo ha funcionado bien, porque se colorea siempre, con muestras positivas

<sup>8</sup>Generalmente se usa en su forma más sencilla, existiendo numerosas variantes en función de la molécula diana y de los reactivos que se incluyen en las bandas. Se basa en permitir que la muestra problema (Ej: suero) fluya a través de una banda porosa, normalmente ayudada por la adición de una solución tampón. La almohadilla de dispensación suele contener conjugado, que se unirá al Ac o Ag específico, en caso de estar

<sup>8</sup> Fuente Figura 5: [https://www.researchgate.net/figure/Figura-10-Fundamento-tecnico-de-la-inmuncromatografia-lateral-ICT-Test-rapido\\_fig2\\_344460714](https://www.researchgate.net/figure/Figura-10-Fundamento-tecnico-de-la-inmuncromatografia-lateral-ICT-Test-rapido_fig2_344460714)

y negativas. Si no aparece, el ensayo no se considera válido. Muchos dispositivos incorporan un prefiltro para poder emplear sangre entera (Ej: detección Ag microfilarias) o heces (detección *Giardia*) de manera que las partículas más gruesas queden retenidas y no interfieran en el resultado.

### 3. PRUEBAS DE UNIÓN SECUNDARIA

Las reacciones Ag-Ac normalmente se siguen de una REACCIÓN SECUNDARIA. Así, si los Ac se combinan con Ag solubles en solución, los inmunocomplejos resultantes pueden precipitar. Los Ac unidos a Ag particulados (Ej: una bacteria o un glóbulo rojo), pueden hacer que se formen grumos o se aglutinen. Si un Ac es capaz de activar al complemento y el Ag está sobre una superficie celular, puede provocar la lisis de la célula. Todos esos cambios de las reacciones secundarias pueden visualizarse fácilmente, de ahí su empleo en muchos análisis serológicos diferentes. Generalmente son técnicas más económicas y sencillas que el grupo basado en la interacción primaria.

#### 3.1. PRUEBAS DE PRECIPITACIÓN

Se produce cuando el Ag es soluble. Podemos distinguir entre:

- Inmunoprecipitación en medio líquido.
- Inmunoprecipitación en medio sólido:
  - Inmunodifusión
    - Doble en placa
    - Simple en placa
    - Simple/Doble en tubo
  - Técnicas electroforéticas

### Inmunoprecipitación en medio líquido

<sup>9</sup>Si mezclamos una solución de un Ag soluble con un antisuero potente, la mezcla resultante se vuelve turbia en pocos minutos y después flocula (= se aglutinan las sustancias coloidales presentes en el agua, facilitando de esta forma su decantación). Aproximadamente en una hora se deposita un precipitado en el fondo del tubo, formado por los complejos Ag-Ac. A bajas concentraciones de Ag no se forma ningún precipitado evidente, y según aumentamos la cantidad de

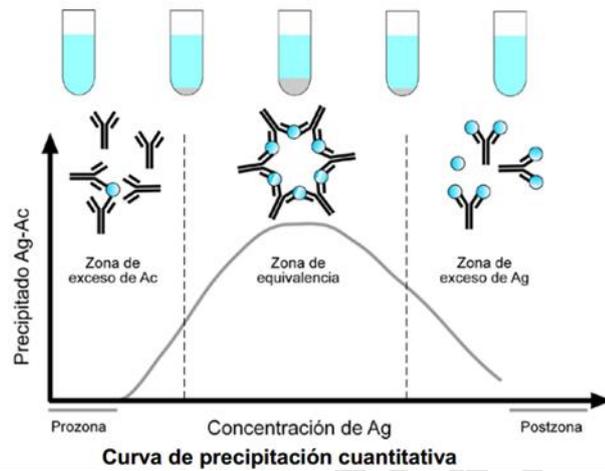


Figura 6

Ag, se forman cantidades cada vez mayores de precipitado, hasta que la cantidad es máxima (= el cociente entre Ag y AC es óptimo, lo que se denomina zona de equivalencia: tanto Ag como Ac están completamente unidos y ninguno de ellos pueden detectarse en el sobrenadante). Pero a partir de ese punto, si seguimos añadiendo Ag, la cantidad de precipitado disminuye gradualmente, hasta el punto en que en los tubos con un gran exceso de Ag no se observa precipitado alguno.

Este hecho se debe a que los Ac son generalmente bivalentes, por lo que pueden unir de forma cruzada solo dos epitopos (=puntos de unión en superficie) a la vez, mientras que los Ags complejos son generalmente multivalentes y poseen muchos epitopos. Cuando hay un exceso de Ac, cada molécula de Ag queda cubierta por moléculas de Ac, evitando la reacción cruzada y, por tanto, la precipitación. Cuando los reactivos están en proporciones óptimas, el cociente Ag/Ac es tal que se forman numerosos enlaces cruzados, formándose una especie de malla que conforme se va extendiendo se vuelve insoluble, y finalmente precipita. En las mezclas con exceso de Ag, cada molécula de Ac se une a dos moléculas de Ag y ya no pueden formarse más enlaces cruzados; como estos complejos son pequeños y solubles, no se produce precipitación. El conocimiento del proceso nos permite elaborar curvas de precipitación cuantitativas, para posteriormente usarla de referencia en relación con los resultados obtenidos en la muestra analizada. Se trata de una técnica clásica, de uso infrecuente en la actualidad.

<sup>9</sup> Fuente Figura 6: Compendio de guiones para clases teóricas en la asignatura Inmunología en Veterinaria III: técnicas inmunológicas (<http://revistareduca.es/index.php/reduca/article/viewFile/721/883>)

## Inmunoprecipitación en medio sólido

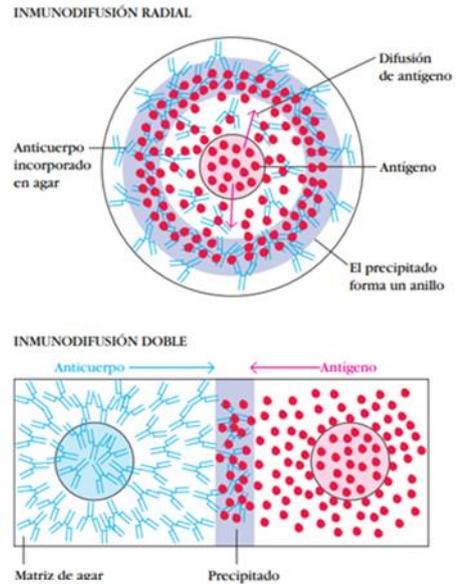
Utiliza un soporte sólido gelificado en el que difunden Ag y Ac.

### Inmunodifusión

<sup>10</sup>También llamada difusión en gel, resulta un método simple de demostración de la precipitación de un Ag por un Ac. En una capa de agar se perforan pocillos redondos, de unos 5 mm de diámetro, con una separación aproximada de 1 cm. Un pocillo se llena con un Ag soluble y el otro con un antisuero; los reactivos difunden en forma radial, de modo que donde los reactivos se encuentran entre sí en concentraciones óptimas, aparece una línea blanca opaca de precipitado. Si las soluciones utilizadas contienen varios antígenos y anticuerpos diferentes, es poco probable que los componentes alcancen las proporciones óptimas en la misma posición exactamente, por lo que se producirá una línea de precipitado diferente para cada grupo de Ag y Ac que interactúan.

<sup>11</sup>**Doble en placa:** esta prueba puede utilizarse para determinar la reacción entre antígenos. Si se disponen dos pocillos de Ag y uno de Ac, y se observarán las líneas que se formen entre cada pocillo de Ag y el del Ac: si estas dos líneas se unen, probablemente los dos Ag son idénticos; si se cruzan, son completamente diferentes. Otra opción es que se unan con la formación de un “ramal”, lo que indica una identidad parcial (=un Ag posee epítopos no presentes en el otro).

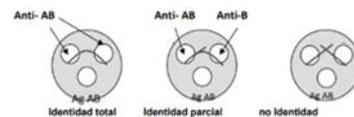
La prueba de Coggins es un método de difusión en gel empleado para detectar Ac frente al virus de la anemia infecciosa equina en el suero de caballo; en esta prueba, un extracto de bazo de caballo infectado o un Ag de un cultivo celular, reacciona con el suero de caballo en gel de agar; si aparece línea de precipitado, el suero problema es positivo. Una prueba similar se usa para identificar bóvidos positivos al virus de la leucosis bovina.



**Figura 7** Diagramas de la inmunodifusión radial (método de Mancini) y la inmunodifusión doble (método de Ouchterlony) en un gel. En ambos casos se forman complejos insolubles grandes en el agar en la zona de equivalencia, visibles como líneas de precipitación (regiones púrpura). En la inmunodifusión radial sólo el antígeno (rojo) se difunde, en tanto que en la inmunodifusión doble se difunden tanto el anticuerpo (azul) como el antígeno (rojo).

**Figura 8**

o Doble en placa: Ac y Ag difunden en el gel. Pueden observarse 3 patrones (Fig. 13):



<sup>10</sup> Fuente Figura 7: Libro "Inmunología de Kuby 6ª Ed. McGraw Hill. Thomas J. Kindt, Richard A. Goldsby y Barbara A. Osborne. (enlace: <https://oncouasd.files.wordpress.com/2015/06/inmunologia.pdf>)

<sup>11</sup> Fuente Figura 8: Compendio de guiones para clases teóricas en la asignatura Inmunología en Veterinaria III: técnicas inmunológicas (<http://revistareduca.es/index.php/reduca/article/viewFile/721/883>)

El LCV usa la IDGA (=InmunoDifusión en Gel de Agar) para:

- Detección de anticuerpos frente al virus de la Anemia infecciosa equina.
- Leucosis enzoótica bovina
- Influenza aviar (detecta Ac tipo A)

El LCSA ha empleado esta técnica durante bastante tiempo para diagnóstico de *Brucella canis* en muestras de suero de perro.

### Inmunodifusión radial (= simple en placa)



Figura 14. Inmunodifusión simple en placa (radial).

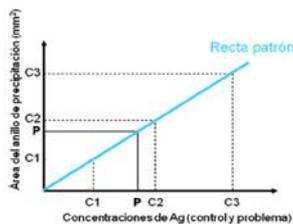


Figura 9 Curva estándar para determinar la concentración de la solución antigénica problema.

<sup>12</sup>En esta variante concreta, el agar se prepara incorporándole un antisuero específico, de modo que en los pocillos sólo se dispensarían las muestras donde queramos detectar Ag. En caso positivo, la solución antigénica dispensada se difundirá por el agar y se formará una línea de precipitado en forma de anillo alrededor del pocillo. El área de este anillo es proporcional a la cantidad de Ag presente en el pocillo; por tanto, se puede construir una curva estándar a partir de

concentraciones conocidas de Ag, y se pueden analizar con exactitud las soluciones desconocidas comparando los diámetros de los anillos con la curva estándar.

**Difusión simple en tubo:** se establece un gradiente de concentración sólo para uno de los reactivos

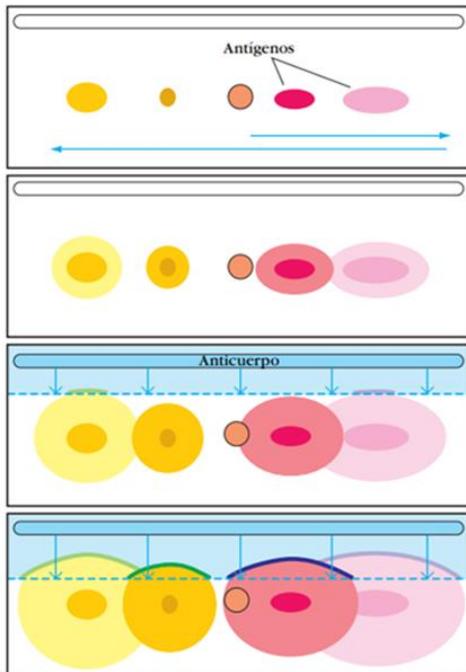
**Difusión doble en tubo:** el gradiente de concentraciones es para el Ag y el Ac.

### Inmunolectroforesis y técnicas relacionadas

Aunque las técnicas convencionales de difusión en gel originan una línea de precipitación separada para cada sistema Ag-Ac de una mezcla, a menudo es difícil separar todos los componentes de una mezcla compleja. Una forma de aumentar la resolución del sistema es separar la mezcla antigénica por electroforesis antes de realizar la inmunodifusión. Esta técnica se denomina inmunolectroforesis y suele usarse para identificar proteínas en los

<sup>12</sup> Fuente Figura 9: Compendio de guiones para clases teóricas en la asignatura Inmunología en Veterinaria III: técnicas inmunológicas (<http://revistareduca.es/index.php/reduca/article/viewFile/721/883>)

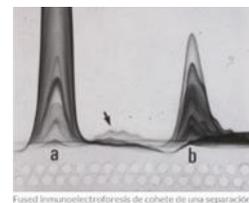
líquidos corporales a través de arcos de precipitación. Preferentemente se realiza en geles de agarosa y consiste en el siguiente procedimiento:



**Figura 10** Inmunoelectroforesis de una mezcla de antígeno. Un preparado de antígeno (anaranjado) se somete primero a electroforesis, que separa los antígenos componentes con base en la carga. Luego se añade antisuero (azul) a cuencos en uno o ambos lados de los antígenos separados y se permite que se difundan; con el tiempo se forman líneas de precipitación (arcos de color) en los que interactúan anticuerpo y antígeno específicos.

<sup>13</sup>La mezcla antigénica se somete a electroforesis en una dirección. Después, se corta en el agar un surco paralelo a esta línea de las proteínas separadas, al que se añade un antisuero frente al suero entero (que contiene la mezcla antigénica) y se deja que difunda lateralmente. Cuando los Ac que difunden encuentran al Ag específico, se forman líneas curvas de precipitado, de manera que se forma un arco de precipitación por cada uno de los constituyentes de la mezcla antigénica. Así, permite diferenciar las proteínas de un suero normal en 25 a 40 líneas de precipitación diferentes. Esta técnica se emplea para identificar la ausencia de una proteína normal del suero, como en animales con deficiencia congénita de alguno de los componentes del complemento. También se usa para detectar cantidades excesivas de un componente individual, como por ejemplo en casos de animales afectados por un mieloma.

<sup>14</sup>Si en lugar de permitir que el Ag difunda de manera pasiva por agar con antisuero, como ocurría en la inmunodifusión radial, aplicamos electroforesis y llevamos el Ag al interior del agar, el halo de precipitado que se formaría alrededor adquiriría forma de cohete (la longitud del cohete es proporcional a la cantidad de Ag depositado en cada pocillo). Esta variante se denomina “electroforesis en cohete”.



**Figura 11**

### 3.2. PRUEBAS DE AGLUTINACIÓN

Como los Ac son bivalentes, pueden establecer enlaces cruzados con Ag particulados, como una bacteria o un glóbulo rojo extraño, originando un agrupamiento o aglutinación. No todos los Ac tienen la misma capacidad de provocar aglutinación: los IgM, por ejemplo, son más eficientes que los IgG. Si se añade un exceso de Ac a una suspensión de Ag particulados, al igual que lo que hemos visto en la precipitación, cada partícula puede estar tan recubierta por Ac que se inhibe la aglutinación; esta falta de reactividad debido a las altas concentraciones de Ac se denomina efecto prozona. Otra causa para la formación de

<sup>13</sup> Fuente Figura 10: Libro “Inmunología de Kuby 6ª Ed. McGraw Hill. Thomas J. Kindt, Richard A. Goldsby y Barbara A. Osborne. (enlace: <https://oncouasd.files.wordpress.com/2015/06/inmunologia.pdf>)

<sup>14</sup> Fuente Figura 11: <https://hmong.es/wiki/Immunoelectrophoresis>

prozona es la presencia de Ac que no son capaces de aglutinar, denominados Acs incompletos.

Este tipo de técnica es más sensible que la precipitación, y puede usarse como ensayo cualitativo o semicuantitativo:

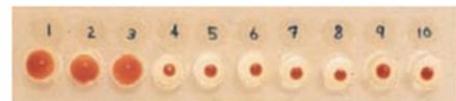
- **Aglutinación rápida:** es una prueba cualitativa que consiste en mezclar Ag y Ac y observar la aglutinación. Ej: determinación de grupos sanguíneos, test de Coombs para la anemia hemolítica autoinmune, serodiagnóstico de enfermedades...
- **Aglutinación lenta:** es una prueba cuantitativa, empleada para titular el suero (conocer su título= la dilución máxima a la que el suero es positivo). Las distintas diluciones se enfrentan a una cantidad fija de Ag.
- **Pruebas de antiglobulina:** cuando es necesario analizar la presencia de Ac no aglutinantes en la superficie de partículas (bacterias, glóbulos rojos...), se puede emplear una prueba de antiglobulina directa; las partículas lavadas se mezclan con una antiglobulina, si hay Ac en su superficie, se producirá aglutinación.
- **Aglutinación pasiva:** ya que la aglutinación es más sensible que la precipitación, a veces resulta útil convertir un sistema de precipitación en uno aglutinante; esto se consigue uniendo químicamente un Ag soluble a partículas inertes, como bacterias, eritrocitos o látex [recordar que la relación entre precipitación y aglutinación es, esencialmente, consecuencia del tamaño de la partícula antigénica (las partículas grandes aglutinan; las pequeñas y las moléculas solubles precipitan)]. Los eritrocitos son las mejores partículas para este fin, las pruebas de este tipo en las que se usan se denominan pruebas de hemaglutinación pasiva.

- <sup>15</sup>**Hemaglutinación vírica:** algunos virus pueden unirse a eritrocitos de mamíferos y aves y provocar su aglutinación. Esta hemaglutinación inducida por virus puede ayudar a caracterizar virus desconocidos.

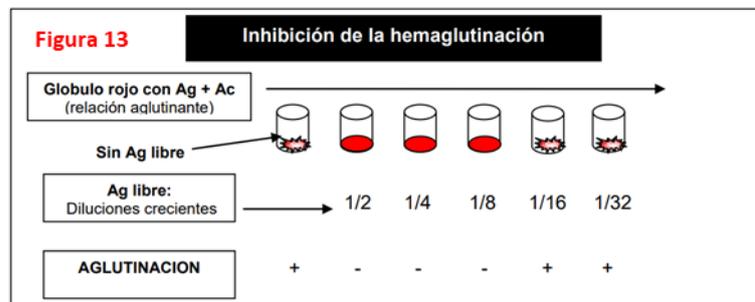
- <sup>16</sup>**La inhibición de la hemaglutinación vírica por Ac**

hace posible identificar un virus específico o cuantificar los niveles de Ac en el suero. Para calcular la cantidad de antígeno en una muestra, se incuban cantidades constantes de la partícula aglutinante sensibilizada con el Ag de interés (Ag particulado), con

cantidades constantes y aglutinantes del Ac específico. A esta mezcla, capaz de aglutinar,



**Figura 12** Demostración de hemaglutinación utilizando anticuerpos contra glóbulos rojos de oveja (SRBC). El tubo testigo (10) sólo contiene SRBC, que se asientan en un "botón" sólido. Los tubos experimentales 1 a 9 contienen un número constante de SRBC más diluciones seriadas al doble de suero anti-SRBC. El patrón de diseminación en la serie experimental indica hemaglutinación positiva en el tubo 3. [Louisiana State University Medical Center/MIP. Cortesía de Harriet C. W. Thompson.]



<sup>15</sup> Fuente Figura 12: Libro "Inmunología de Kuby 6ª Ed. McGraw Hill. Thomas J. Kindt, Richard A. Goldsby y Barbara A. Osborne. (enlace: <https://oncousd.files.wordpress.com/2015/06/inmunologia.pdf>)

<sup>16</sup> Fuente Figura 13: "Guía técnicas inmunológicas 2019".

se enfrenta con cantidades variables de Ag libre como competidor. A partir de una determinada concentración de Ag libre, se producirá una inhibición de la aglutinación por competición del Ag libre por el Ac (que de esta manera no podrá unirse al Ag particulado para aglutinar).

El LCV emplea estas técnicas para el diagnóstico de las siguientes enfermedades:

- Detección de anticuerpos frente a *Leptospira* spp. mediante la prueba de aglutinación microscópica (MAT).
- Serotipado de *Salmonella* spp.
- Detección y titulación de virus con capacidad hemaglutinante mediante la prueba de hemaglutinación: Influenza aviar, Influenza equina, Influenza porcina, Enfermedad de Newcastle, Enfermedad hemorrágica del conejo.
- Caracterización de virus hemaglutinantes mediante la prueba de inhibición de la hemaglutinación: Influenza aviar, Influenza equina, Influenza porcina, Enfermedad de Newcastle.
- Detección de anticuerpos frente a virus hemaglutinantes mediante la prueba de inhibición de la hemaglutinación: Influenza aviar, Influenza equina, Influenza porcina, Enfermedad de Newcastle, Enfermedad Hemorrágica del conejo.
- Microaglutinación en placa: diagnóstico de micoplasmosis.

El LCSA realiza las siguientes técnicas:

- Serodiagnóstico de brucelosis mediante aglutinación rápida con antígeno Rosa de Bengala.
- Aglutinación rápida en tarjeta para serodiagnóstico de *Trypanosoma evansi* (CATT/T.evansi).
- Serotipificación de *Brucella* spp: se emplean sueros monoespecíficos anti-A y anti-M (para cepas lisas) y anti-R (para cepas rugosas) que aglutinan las cepas en función de variaciones en la estructura del LPS de la membrana.

### 3.3. FIJACIÓN DE COMPLEMENTO

El complemento es un constituyente normal de la sangre y permanece en el suero fresco. De manera simplificada, podríamos decir que el complemento es un conjunto de proteínas capaces de activarse ante la presencia de uniones Ag-Ac, dando lugar a que se generen complejos de ataque a membrana capaces de lisar las membranas celulares. Si se trata de la membrana celular de un eritrocito a la que se une el Ac, la rotura de membrana del

glóbulo rojo (=GR) se denomina hemólisis. Este fenómeno se aprovecha y se emplea como sistema revelador para evidenciar las uniones Ag-Ac.

La prueba de fijación de complemento (=FC) se realiza en dos fases, utilizando como soporte una microplaca con fondo en U:

- Fase 1 o reacción principal: se mezclan a partes iguales en cada pocillo
  - el suero problema (previamente inactivado mediante calor, para eliminar el complemento que de manera natural está presente en el suero y evitar que se falseen los resultados). Para titular los sueros, se preparan diluciones seriadas, utilizando un pocillo para cada dilución.
  - el Ag específico, a su dilución óptima de trabajo
  - el complemento, a su dilución óptima de trabajo (para ello, hay que titularlo previamente). El más eficiente en las pruebas hemolíticas es el complemento de cobaya, que es el que suele usarse.

Durante la incubación, si hay Ac específicos frente al Ag empleado, se unirán entre sí; el complemento detectará estas uniones y se fijará a ellas.

- Fase 2: se añade el sistema hemolítico, compuesto por glóbulos rojos de ovino recubiertos de Ac específicos (hemolisina) obtenidos en conejo, que actuará como sistema revelador.

Durante esta incubación el complemento libre de la incubación anterior se unirá a los complejos GR-hemolisina y provocará hemólisis, que se observa fácilmente porque el pocillo se tiñe de rojizo. Para facilitar la lectura de los pocillos se centrifuga la microplaca tras la segunda incubación y se coloca sobre un espejo de aumento.

El grado de hemólisis de las distintas diluciones permite conocer si el suero problema es negativo y, en caso de ser positivo, hasta qué dilución, estableciendo su título en la dilución más alta en la que se observa hemólisis igual o mayor al 50%. [Recuerda que la interpretación es inversa: a más hemólisis, menos positivo es el suero → menos

complemento se activó durante la fase 1, porque había menos AcJ.

### Reacción de Fijación de Complemento: resultado positivo

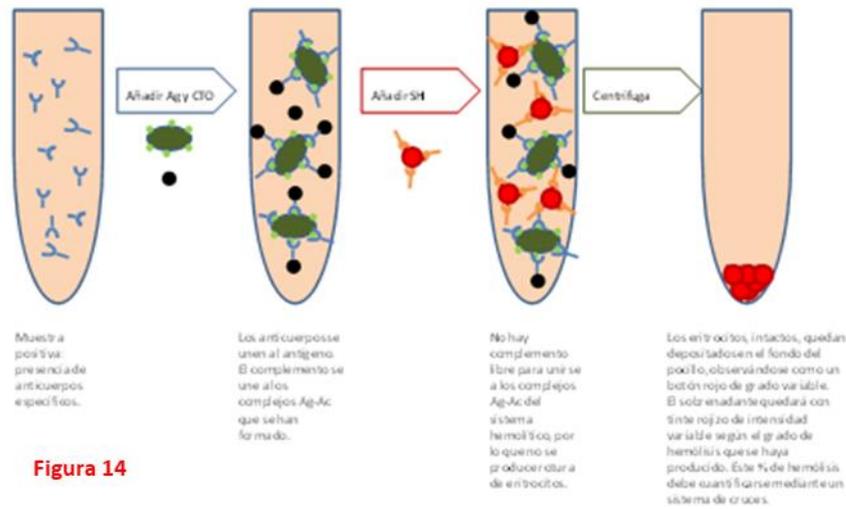


Figura 14

### Reacción de Fijación de Complemento: resultado negativo

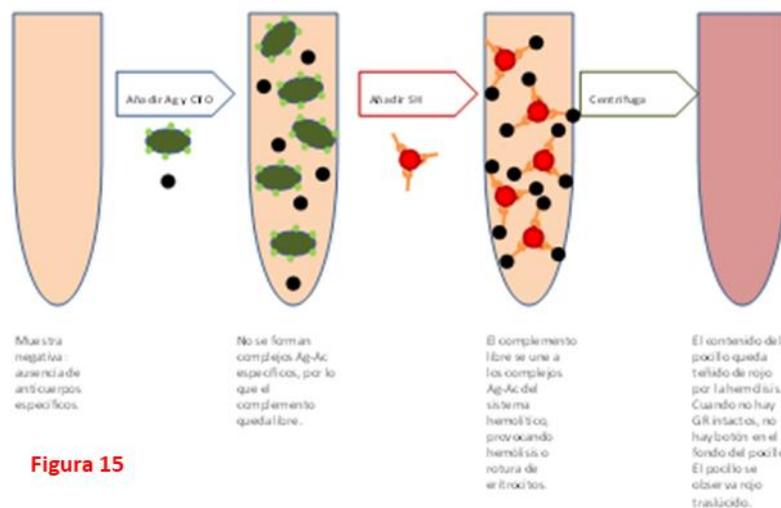


Figura 15

### Aplicaciones en Laboratorios de Sanidad y Genética Animal

LCV Algete	LCSA Santa Fe
Peste equina africana.	Perineumonía contagiosa bovina (PCB).
Muermo.	Brucelosis (B. abortus, B. melitensis y B. suis).
Durina.	Epididimitis contagiosa del carnero (B. ovis).
Piroplasmosis equina.	Fiebre Q.
Psitacosis.	

Además del uso habitual del complemento que acabamos de ver, este reactivo también puede emplearse en pruebas de citotoxicidad, atendiendo a su capacidad de hacer daño a las membranas celulares. De esta forma, se pueden determinar los Ac frente a Ag de superficie celular mediante la reacción de las células diana con los Ac y el complemento, y estimando la muerte celular resultante.

### **3.4. PRUEBAS DE NEUTRALIZACIÓN**

Las pruebas de neutralización estiman la capacidad del Ac para neutralizar la actividad biológica del Ag cuando se mezcla con él in vitro. Estas pruebas pueden emplearse para identificar toxinas bacterianas, como la toxina  $\alpha$  de Clostridium perfringens o toxina  $\alpha$  estafilocócica.

Se puede impedir que los virus infecten células si previamente los mezclamos con Ac específicos, que se combinan con ellos y bloquean sus puntos de unión. Esto se emplea para identificar virus desconocidos o para cuantificación de Ac antivíricos específicos. Son pruebas muy específicas y muy sensibles.

#### **Aplicaciones en Laboratorios de Sanidad y Genética Animal**

El LCV realiza, entre otros, los siguientes ensayos:

- Detección de anticuerpos específicos frente al virus de la Peste Porcina Clásica (PPC) y diagnóstico diferencial con otros pestivirus mediante neutralización.
- Detección de anticuerpos frente al virus de la enfermedad vesicular porcina (EVP) mediante neutralización.
- Serotipificación de Anticuerpos frente a virus del género Orbivirus mediante neutralización.
- Detección de anticuerpos específicos frente al virus de la Fiebre Aftosa mediante neutralización.
- Detección de anticuerpos específicos frente al virus de la Estomatitis vesicular mediante neutralización.
- Detección de anticuerpos frente a flavivirus mediante microneutralización.
- Detección de anticuerpos frente al serotipo 1 del Herpesvirus equino mediante Seroneutralización.
- Detección de anticuerpos frente al virus de la Arteritis viral Equina mediante Seroneutralización.

El LCSA realiza la titulación de anticuerpos postvacunales frente al virus de la rabia mediante seroneutralización (FAVN Test= Fluorescence Antibody Virus Neutralisation Test).

Existe una variante de este tipo de pruebas que se realiza totalmente in vivo, denominada en conjunto **pruebas de protección**: aquí, las propiedades protectoras de un antisuero específico se miden administrándolo en diluciones crecientes a un grupo de animales problema; después, a esos mismos animales se les inocula una dosis estándar del patógeno o la toxina. Por razones de bienestar animal, este tipo de técnicas se están sustituyendo en la medida de lo posible por técnicas alternativas que ofrezcan resultados con la misma fiabilidad.

#### 4. TÉCNICAS INMUNOLÓGICAS DE BASE CELULAR

La inmunidad celular está mediada por distintas células del sistema inmunitario, principalmente linfocitos T y macrófagos, y en menor medida, células natural killer (NK), neutrófilos y basófilos. En este sistema juegan un papel importante las citoquinas, que son proteínas secretadas que median las interacciones celulares y regulan la proliferación y secreciones celulares, modulando múltiples aspectos del sistema inmune. Destacar un tipo de citoquina, el interferón; y más concretamente, el interferón gamma (G-IFN), citoquina producida por los linfocitos T y natural killer (NK), que activa la respuesta celular, amplificándola a través de una cadena de reacciones celulares y que se verá involucrada en algunas técnicas inmunológicas.

La valoración de la respuesta celular sirve para conocer el estado inmunitario de los individuos, pudiéndose emplear dos tipos de técnicas:

##### 4.1. TÉCNICAS IN VITRO

Estudian la funcionalidad de los diferentes tipos celulares implicados en la inmunidad celular.

La muestra de elección es un poco de sangre periférica con anticoagulante, pero se pueden usar muestras tomadas postmortem de órganos y tejidos linfoides.

Las técnicas que emplean células sanguíneas requieren en primer lugar el aislamiento e identificación de las células cuya función se quiere averiguar; dicha separación se puede realizar a través de varios métodos:

- Métodos físicos: como aislamiento mediante centrifugación, separación por adhesión selectiva...
- Estudio de marcadores y Ag de membrana: Citometría de flujo, separación de Ag de membrana (de tipo magnético, por afinidad de columnas...).

El citómetro de flujo es un instrumento que permite bombear una suspensión de células por un tubo muy estrecho, de forma que las células pasan en una fila en línea, de una en una. Un haz de láser se dirige directamente al flujo de células y se observa el efecto de cada célula en el haz de luz; se puede medir el tamaño de la célula usando para ello la dispersión frontal del haz de luz; mientras que la dispersión lateral permite medir la rugosidad de la superficie celular y su complejidad interna. Combinando ambas dispersiones se pueden identificar todos los leucocitos (=glóbulos blancos) presentes en una muestra de sangre, de manera rápida y con una alta eficacia. Recordar que podemos usar este instrumento para algo más, combinándolo con el empleo de marcadores fluorescentes, como hemos visto al principio del tema.

Para medir la funcionalidad de las células inmunitarias pueden hacerse diferentes pruebas que varían según la población celular. Para linfocitos T cabe destacar:

a.1. Pruebas de proliferación celular: basadas en que los linfocitos que reconocen un determinado Ag se estimulan y proliferan.

a.2. Determinación de la producción de citoquinas (IFN- $\gamma$ ):

La producción de citoquinas evidencia la funcionalidad de los linfocitos Th (la h viene de "helper"), e incluso se podría identificar la subpoblación (Th1 o Th2).

- Cabe destacar en este apartado la **Prueba del Interferón  $\gamma$** : consiste en detectar mediante un ELISA tipo sándwich la cantidad de IFN- $\gamma$  producido por los linfocitos Th1 tras su estimulación con el Ag, sabiendo que sólo se estimularan los linfocitos que anteriormente ya hayan tenido contacto previo con ese Ag. La estimulación se realiza sobre muestras de sangre entera con heparina y se analiza posteriormente el plasma de dicha muestra. Esta técnica presenta ciertas ventajas, especialmente en animales y especies de difícil manejo, pero no sustituye a la intradermotuberculinización (prueba de hipersensibilidad retardada).

- ELISPOT: sirve para medir los linfocitos T secretores de una determinada citoquina mediante una modificación del ELISA de captura.

- Detección de citoquinas intracelulares por citometría de flujo: permite determinar el perfil de citoquinas producidas por un tipo celular mediante una variante de la citometría de flujo que permite la entrada de Ac al interior de la célula.

a.3. Ensayos de citotoxicidad: valoración de la funcionalidad de linfocitos T CD8+ o citotóxicos y de las células NK, empleando para ello células diana cultivadas previamente con cromo radiactivo, de modo que si dichas células defensivas son capaces de lisar la célula diana, podemos medir la radiactividad liberada.

#### **4.2. TÉCNICAS IN VIVO**

Estudian la función de los linfocitos T, responsables de la hipersensibilidad retardada. Incluye pruebas como la **reacción de la tuberculina**.

Prueba de hipersensibilidad retardada: Esta prueba constituye el método de referencia para la detección de la tuberculosis bovina. Consiste en medir el espesor de la piel, inyectando tuberculina bovina por vía intradérmica en la zona medida y midiendo toda posible hinchazón posterior en el punto de inyección 72 horas después. La prueba comparativa de la tuberculina intradérmica con tuberculina bovina y aviar se utiliza principalmente para diferenciar entre animales infectados con *M. bovis* y animales sensibilizados a la tuberculina debido a una exposición a otras micobacterias o géneros relacionados. La decisión relativa a si utilizar la prueba simple o la comparativa en general se basa en la prevalencia de la infección por tuberculosis y en el nivel de exposición ambiental a otros microorganismos que causen sensibilización. Debido a que su especificidad es mayor y a que son más fáciles de estandarizar, los productos derivados de proteína purificada (PPD) han sustituido las tuberculinas de medios sintéticos concentradas por calor. La dosis recomendada de PPD bovino en ganado bovino es de al menos 2.000 Unidades Internacionales (UI) y en la prueba comparativa de la tuberculina, las dosis no deben ser inferiores a las 2.000 UI cada vez. Las reacciones se interpretan en base al método analítico utilizado.

## **BIBLIOGRAFÍA**

Introducción a la Inmunología Veterinaria, 8ª Edición. Tizard, I-R.

Manual de las Pruebas de Diagnóstico y de las Vacunas para los Animales Terrestres **2021 (acceso en línea)**

Microbiología e inmunología on line

<https://www.microbiologybook.org/Spanish-immuno/immuno-span.htm>

Anexo técnico de acreditación LCV

[https://www.mapa.gob.es/es/ganaderia/temas/laboratorios/13anexotecnicoacreditacionlcv\\_692\\_le1530\\_rev13011021\\_tcm30-522272.pdf](https://www.mapa.gob.es/es/ganaderia/temas/laboratorios/13anexotecnicoacreditacionlcv_692_le1530_rev13011021_tcm30-522272.pdf)

Anexo técnico de acreditación LCSA

[https://www.mapa.gob.es/es/ganaderia/temas/laboratorios/650\\_le946rev16\\_tcm30-560492.pdf](https://www.mapa.gob.es/es/ganaderia/temas/laboratorios/650_le946rev16_tcm30-560492.pdf)

Inmunología de Kuby, 6ª Edición. Thomas J. Kindt, Richard A. Goldsby y Barbara A. Osborne. Editorial McGraw Hill.

Guía de técnicas inmunológicas 2019. Facultad de Medicina. Universidad de Buenos Aires.

**MATERIAL PARA LA PREPARACIÓN DEL TEMA 27**

**TÉCNICAS MICROSCÓPICAS: CONCEPTOS, TIPOS Y APLICACIONES EN  
LABORATORIOS DE SANIDAD Y GENÉTICA ANIMAL**

*Este material no tiene carácter oficial, por lo que en ningún caso vinculará al Tribunal Calificador. Constituye, únicamente, un instrumento complementario que servirá de apoyo al opositor para enfocar cada uno de los epígrafes, pero nunca de forma exclusiva ni excluyente. El Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación no se hace responsable del contenido del mismo.*

*Los materiales no serán objeto de actualización constante.*

## **ÍNDICE**

### **1. INTRODUCCIÓN**

### **2. MICROSCOPIOS**

#### **2.1. ASPECTOS GENERALES**

2.1.1. Historia

2.1.2. Funcionamiento

#### **2.2. COMPONENTES DE UN MICROSCOPIO**

#### **2.3 PARÁMETROS DE LAS CARACTERÍSTICAS ÓPTICAS**

### **3. TIPOS DE MICROSCOPIOS**

#### **3.1 MICROSCOPIOS ÓPTICOS**

3.1.1. De luz visible

3.1.2. De luz ultravioleta

3.1.3. De fluorescencia

3.1.4. De luz polarizada

#### **3.2. MICROSCOPIOS ELECTRÓNICOS**

3.2.1. Microscopio electrónico de barrido

3.2.2. Microscopio electrónico de transmisión

#### **3.3. OTROS TIPOS**

3.3.1. Microscopio confocal

3.3.2. Microscopio de campo oscuro

3.3.3. Microscopio de contraste de fases

### **4. APLICACIONES EN LABORATORIOS DE SANIDAD Y GENÉTICA ANIMAL**

#### **4.1. APLICACIONES DIAGNÓSTICAS**

4.1.1. Aplicadas a los cultivos celulares

4.1.2. Aplicadas a las técnicas histológicas

4.1.3. Aplicadas a las técnicas microbiológicas

#### **4.2. OTRAS APLICACIONES**

4.2.1. Aplicadas a la investigación

## 1. INTRODUCCIÓN

La capacidad del ojo humano es limitada a la hora de estudiar lo pequeño, el ojo humano es únicamente capaz de distinguir objetos que tienen un tamaño real del orden de 0.1mm de diámetro, hay una inmensa cantidad de células y microorganismos que influyen significativamente en la vida del hombre y de los animales y que por ello, exigen ser estudiadas en favor de un mayor conocimiento y mejora de la calidad de vida.

Mientras que una célula eucariota típica suele tener unas dimensiones que oscilan entre 10 y 50 micrómetros ( $\mu\text{m}$ .  $1 \mu\text{m}=10^{-6} \text{ mm}$ ). Además, si queremos estudiar la ultraestructura celular hay que tener en cuenta que el grosor de una membrana celular es de unos 7 nanómetros. Todo ello implica que necesitamos aparatos que nos permitan aumentar al imagen de las muestras para discriminar estructuras tisulares diminutas como son las células o sus compartimentos. Estos aparatos se llaman microscopios.

Gracias a los avances y el progreso en el campo de la microscopía, el hombre ha sido capaz de ver organismos y estructuras que a simple vista serían invisibles, y con ello efectuar descubrimientos decisivos en el campo de la microbiología, relacionados con las transformaciones de la materia orgánica, la investigación de enfermedades humanas y animales.

Comenzaremos por comprender el significado etimológico de la palabra microscopio, deriva del griego "mikrós", que significa pequeño, y de "skopeo", que significa observar. De manera que microscopio significa "la observación de lo pequeño". La **microscopía** es la técnica que utiliza los microscopios como instrumentos para observar los objetos y seres de tamaño extremadamente pequeño.

## 2. MICROSCOPIOS

### 2.1. ASPECTOS GENERALES

#### 2.1.1. Historia

La historia del microscopio empieza con la invención del microscopio compuesto, es decir, con la idea de combinar más de una lente para observar objetos de forma aumentada. Acorde con esta definición, la historia del microscopio empezaría a finales del siglo XVI, posiblemente con el diseño de Zacharias Janssen.

Sin embargo, no fue hasta finales del siglo XVII cuando Antonie Van Leeuwenhoek dio un paso importante en el campo de la microscopía al descubrir una nueva técnica de fabricación de lentes que le permitió alcanzar aumentos de hasta 200x. Los microscopios construidos por van Leeuwenhoek eran microscopios simples, es decir, de una sola lente. Su avanzada técnica de fabricación le permitía obtener lentes de gran aumento a la vez que evitaba las aberraciones de la luz que tenían todos los microscopios compuestos del momento. Esto lo permitió observar el mundo a un nivel de aumento inalcanzado hasta la fecha.

A medida que el microscopio fue ganando popularidad, el número de empresas dedicadas a la fabricación de microscopios fue aumentando. En 1776 el británico Jeremiah Sisson construyó el primer revólver para microscopios que permitía cambiar el objetivo con el que se observaba la muestra. Este elemento fue introducido en seguida por los fabricantes más importantes de microscopios.

Uno de los descubrimientos más importantes en la materia fue demostrar que la resolución del microscopio óptico es proporcional a la longitud de onda de la luz. Gracias a este descubrimiento, se pudo calcular que la mínima distancia que puede distinguirse en un microscopio óptico es aproximadamente 0.25 micrómetros. Por este motivo, si quiere construirse un microscopio capaz de distinguir distancias menores a 0.25 micrómetros es necesario iluminar la muestra con señales de baja longitud de onda (lo cual incluye a los rayos UV, rayos X e incluso electrones).

Sin embargo, el mejor avance en el campo de la microscopía durante el siglo XX fue el microscopio electrónico. En este microscopio la muestra es iluminada con un haz de electrones un lugar de con luz visible. El primer prototipo de microscopio electrónico fue construido en 1931. Dado que la longitud de onda de un electrón puede llegar a ser 100.000 más pequeña que la de la luz, el microscopio electrónico es capaz de alcanzar una resolución increíblemente superior a la del microscopio óptico.

Otros desarrollos importantes del siglo XX han estado relacionados con la forma de iluminar la muestra en los microscopios ópticos. Esto ha dado lugar al microscopio de contraste de fases, al microscopio de contraste por interferencia diferencial y al microscopio de fluorescencia.

### **2.1.2. Funcionamiento**

El aumento de un microscopio es una de sus características esenciales que define su calidad y el tipo de muestras que se podrán observar. El aumento total de un microscopio indica en qué medida éste puede aumentar la imagen de la muestra observada.

En el caso del microscopio óptico compuesto, el aumento de la muestra se produce en dos etapas, primero en las lentes del objetivo y a continuación en las lentes del ocular. De este modo, es necesario conocer el aumento de estas dos partes del microscopio para conocer el aumento total que se obtiene. El aumento total del microscopio se puede calcular fácilmente multiplicando el aumento del objetivo por el aumento del ocular.

Este proceso de aumento se puede explicar en base a la naturaleza de las lentes, que no son más que cuerpos con la capacidad de desviar los rayos de luz. En el caso de las lentes convergentes, los rayos que inciden de forma paralela son desviados de modo que convergen en un punto llamada foco. Al mirar un objeto a través de este tipo de lentes, este efecto de convergencia genera una imagen virtual de manera que el objeto es observado a mayor tamaño que el original.

El principio óptico de un microscopio se basa en aplicar este proceso con dos lentes. La imagen intermedia que se genera entre el objetivo y el ocular recibe el nombre de imagen real.

Debido a la difracción de la luz, los microscopios ópticos están limitados a un aumento máximo de 1.500x. En términos físicos, esta limitación es una consecuencia de la longitud de onda de la luz. En el caso de los microscopios electrónicos, la muestra no es iluminada con luz sino con electrones. Este permite iluminar la muestra con longitudes de onda 100.000 veces más pequeñas que en el caso del microscopio óptico. Esto se traduce en unos aumentos muy superiores que pueden llegar a 10.000.000x.

## 2.2 COMPONENTES DE UN MICROSCOPIO

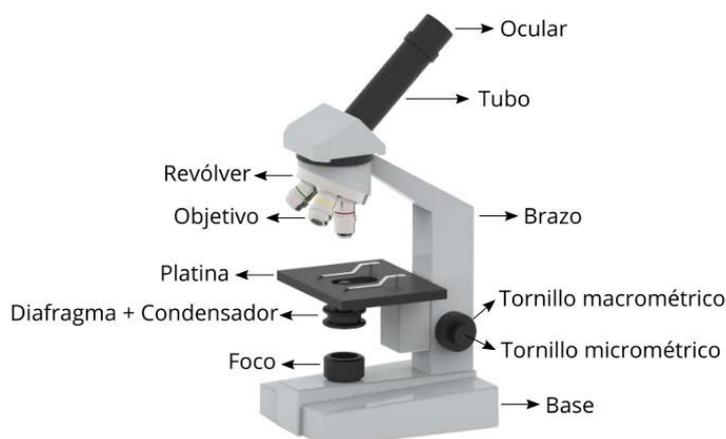
Las partes de un microscopio se pueden clasificar entre las que pertenecen a su sistema mecánico, las que pertenecen a su sistema óptico y el sistema de iluminación.

Dentro del **sistema mecánico** se incluyen todos los elementos estructurales que dan estabilidad al microscopio y mantienen los elementos ópticos correctamente alineados. Estos elementos incluyen la base o pie, el brazo, la platina, las pinzas, el tornillo macrométrico, el tornillo micrométrico, el revólver y el tubo.

**Soporte**, base o pie: Pieza maciza y pesada que asegura la estabilidad del aparato y sirve de soporte. Sostiene un brazo inclinado del cual salen tanto la platina como el tubo del microscopio.

**Platina:** Pieza metálica donde se colocan las preparaciones a observar. La forma es variada, puede ser fija o móvil. Posee en el centro una abertura circular, por la que pasarán los rayos luminosos procedentes del sistema de iluminación. Posee un movimiento de traslación vertical que permite enfocar el objetivo mediante dos movimientos: uno rápido mediante un tornillo macrométrico y otro lento mediante un tornillo micrométrico.

**Tubo:** Es donde está instalado el sistema óptico. Está constituido por dos tubos, uno más externo en el que está el ocular y otro más interno donde está el objetivo. Este último se llama también revolver y es una pieza giratoria que se utiliza para intercambio rápido de objetivos en una disposición circular.



Por su parte, **el sistema óptico** incluye todos los elementos necesarios para generar y desviar la luz en las direcciones necesarias y así acabar generando una imagen aumentada de la muestra. En el sistema óptico se incluye la fuente de luz, el condensador, el diafragma, el objetivo y el ocular.

**Objetivo:** Su función es la de amplificación del objeto. Está formado por varias lentes para corregir aberraciones, siendo la parte óptica más próxima al objeto. Produce una imagen real y lo más amplificada posible del objeto, al tiempo que capta el mayor número posible de rayos luminosos procedentes del objeto.

Podemos hablar de objetivos en seco como aquellos en los que entre la lente y la preparación solo hay aire.

Los objetivos de inmersión son aquellos en los que entre la lente y la preparación existe un líquido de índice de refracción más elevado que el del aire, pueden ser agua, aceite de cedro, etc. Estos objetivos son de mayor aumento y poseen mayor poder de definición y de resolución.

Hoy en día los microscopios ópticos poseen un tambor o revólver donde se encuentran varios objetivos. Cada uno de ellos posee lentes que permiten diferentes aumentos. Las magnificaciones de los objetivos más usados suelen ser de 4x, 10x, 20x, 40x y 100x. Rotando el revólver se puede seleccionar el objetivo y por tanto el aumento al que queremos observar la preparación. Aparte de los aumentos, los objetivos tienen una serie de características para mejorar la imagen. Así, pueden ser acromáticos, de fluorita o apocromáticos, los cuales corrigen alteraciones cromáticas, de campo plano que eliminan la curvatura del campo de observación, de contraste de interferencia, etcétera.

Cuando se usan objetivos de 100 aumentos (100x) es necesario emplear un líquido denominado aceite de inmersión, que se añade entre el objetivo y la muestra. Esto es debido a que la refracción de la luz es alta en el aire y provoca alteraciones en la imagen que se manifiestan cuando se usan objetivos con esta capacidad de aumento. El aceite de inmersión reduce enormemente esta refracción permitiendo imágenes mucho más nítidas.

**Ocular:** Es la parte más cercana al ojo; Están formados por dos lentes que se encuentran separadas por un diafragma. Actúa como una simple lupa amplificando la imagen real que forma el objeto y además corrige algunas de las aberraciones residuales de la imagen formada por el objetivo.

Puede ser monocular, binocular y triocular que posibilita el fotografiar el objeto de estudio.

**Condensador:** Es una lente o sistema de lentes situada debajo de la platina y que permite concentrar la luz en la muestra que se observa.

Existen distintos tipos de condensadores, dependiendo de las necesidades y requerimientos de nuestra observación: de campo oscuro, acromático, abbe, etc.

**Diafragma.** Se sitúa entre la fuente luminosa y el condensador. Permite aumentar el contraste de la muestra y la profundidad de campo, es decir, el espesor de la muestra que está enfocado.

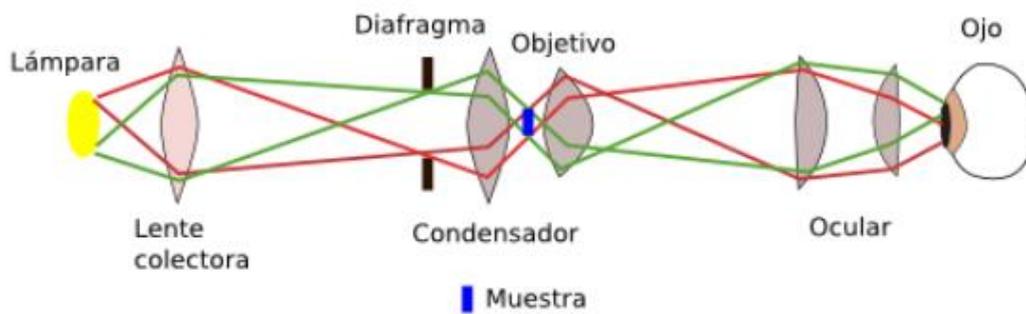
Además, se compone del **sistema de iluminación**. La **fuente de luz** es muy importante ya que una correcta iluminación de la preparación que deseamos observar es una condición necesaria para poder realizar una buena observación. Podemos obtener la fuente de luz a través de un

espejo situado debajo de la platina, que recoge la luz natural y la eléctrica o a través de lámparas incorporadas al pie del microscopio.

El haz de luz procedente de una lámpara se refleja mediante el espejo, que es cóncavo, hasta llegar al condensador, pasando por el diafragma siendo el encargado de regular la entrada de luz al condensador, que puede abrirse o cerrarse para mejorar la nitidez de la imagen.

El enfoque de la muestra se consigue variando la distancia de la muestra a la lente del objetivo. Esta distancia depende de los aumentos que produzca el objetivo, mayor distancia cuanto menores aumentos, y del tipo de objetivo. La distancia se controla mediante dos ruedas denominadas **macrométrico y micrométrico**, respectivamente. La primera permite movimientos ascendentes y descendentes amplios de la platina y la segunda ajustes finos.

Actualmente, las numerosas innovaciones tecnológicas en los campos de la informática y la electrónica han influido notablemente en el mundo de la microscopía. Ésta ha mejorado mucho con la utilización de nuevos accesorios como cámaras fotográficas, vídeos o videoimpresoras que es necesario tener en cuenta a la hora de hablar de los componentes del microscopio.



Recorrido de la luz desde la fuente, pasando a través de los diferentes lentes de un microscopio básico, hasta el observador.

## 2.3 PARÁMETROS DE LAS CARACTERÍSTICAS ÓPTICAS

Existen una serie de parámetros que definen las características ópticas de los microscopios compuestos:

- **Poder de amplificación:** vendrá definida por las distancias focales y diámetros de las lentes objetivo y ocular, y será el producto de ambas amplificaciones:

$$A_{\text{total}} = A_{\text{objetivo}} \times A_{\text{ocular}}$$

- **Poder de resolución:** es la capacidad de un microscopio para distinguir dos puntos adyacentes. Depende de la longitud de onda de la luz polarizada y de una cualidad intrínseca del objetivo llamada apertura numérica (AN). Ésta depende a su vez del índice de refracción del medio que existe entre objetivo y objeto a observar y también es función del ángulo de penetración de los rayos luminosos en la lente.

- **Poder de definición:** es la capacidad de producir imágenes libres de aberraciones. Depende del tipo y cantidad de lentes empleadas.
- **Poder de penetración:** es la capacidad para mostrar imágenes de distintos planos del objeto. Es directamente proporcional a la longitud del tubo del microscopio, e inversamente proporcional a la distancia focal de la lente.

### 3. TIPOS DE MICROSCOPIOS

Una vez vistos los aspectos generales más destacados de los microscopios es preciso señalar que existen distintos tipos de microscopios y también muchos criterios para clasificarlos. No obstante, como primer gran criterio se puede fijar la clase de microscopio según el tipo de iluminación que nos permite diferenciar entre los microscopios ópticos y los electrónicos.

#### 3.1. MICROSCOPIOS ÓPTICOS

De esta forma, en el microscopio óptico la muestra es iluminada mediante **luz visible**. Esto significa que existe un foco de luz apuntando hacia la muestra. Esa misma luz es conducida a través del objetivo y del ocular hasta llegar a formar la imagen en el ojo del observador. Este es el tipo de microscopio más habitual pero su resolución está limitada por la difracción de la luz. El aumento máximo que se puede obtener con este tipo de microscopio alcanza alrededor de 1.500x.

Sin embargo, se han desarrollado diferentes tipos de microscopios ópticos en los que, en lugar de emplear luz visible, se emplea **otras fuentes de luz** a diferentes longitudes de onda. Entre estos tipos se encuentran los microscopios de luz ultravioleta, de fluorescencia y de luz polarizada.

##### 3.1.1. De luz visible

Este es el microscopio más habitual en un laboratorio. Está formado por dos lentes convergentes. Una de las lentes está próxima al objeto, y es la que llamamos lente objetivo, que forma una imagen real, invertida y ampliada del mismo objeto en un plano situado dentro del foco de la segunda lente. Esta segunda lente es la más próxima al ojo del observador y se llama lente ocular, da origen a una nueva imagen virtual, derecha y ampliada, pero invertida con relación al objeto.

Se usan para observaciones generales, características celulares y tisulares. Es necesario la coloración o tinción y secciones finas de 5-10  $\mu\text{m}$ .

##### 3.1.2. De luz ultravioleta

Los microscopios de luz ultravioleta iluminan la muestra, como el nombre indica, con luz ultravioleta. La luz UV permite una resolución mejor y, por tanto, mayor ampliación que la

que se obtiene con el microscopio óptico de luz visible. Este tipo de luz tiene una longitud de onda más corta que la luz visible.

La longitud de onda se encuentra en un rango de 180-400 nm frente a los 400-700 nm de la luz visible. Si tenemos en cuenta que a menor longitud de onda, mayor es el poder de resolución, la luz UV duplica el poder de resolución.

La ventaja principal de utilizar esta técnica es que puede alcanzarse una resolución mejor que con luz visible. Además, el contraste obtenido en la muestra es distinto que en los microscopios de luz visible de forma que con el microscopio de luz ultravioleta se pueden observar muestras que, de lo contrario, aparecerían como transparentes.

### **3.1.3. De fluorescencia**

Los microscopios de fluorescencia son aquellos que utilizan las propiedades de fluorescencia para generar una imagen de la muestra. Se usa para observar sustancias fluorescentes denominadas fluoróforos.

Una molécula fluorescente es aquella que es capaz de captar radiación electromagnética con una longitud de onda determinada y emitir otra radiación electromagnética con otra longitud de onda diferente, normalmente dentro del espectro de la luz visible.

Los fluoróforos se utilizan como marcadores para la detección de otras moléculas tisulares, normalmente mediante la técnica de inmunofluorescencia.

Los usados en microscopía absorben en el rango de la luz ultravioleta, normalmente producida por una lámpara de mercurio, y emiten en el rango de la luz visible.

Para seleccionar el rango de longitud de onda con que serán iluminados se utilizan filtros específicos localizados entre la fuente y la muestra que sólo dejan pasar un determinado rango de frecuencias.

Con un tambor de filtros se consigue iluminar la muestra con diferentes rangos de ondas electromagnéticas y por tanto activar selectivamente a diferentes fluoróforos.

La microscopía de fluorescencia nos permite usar más de un fluoróforo para detectar varias moléculas tisulares de forma simultánea siempre que el espectro de absorción y emisión de estos fluoróforos no se solape, puesto que entonces sería imposible discriminarlos

Para ello, la muestra es habitualmente iluminada con una lámpara xenón o con una lámpara de vapor de mercurio. Estos microscopios incorporan además filtros de luz para aislar la luz correspondiente a la muestra.

### **3.1.4. De luz polarizada**

Los microscopios de luz polarizada son también conocidos como microscopios petrográficos. Este microscopio es en realidad un tipo de microscopio óptico al que se le han añadido

dos polarizadores. Esto significa que la onda de luz utilizada para observar la muestra tiene una dirección de oscilación concreta. Este tipo de microscopio es muy útil para observar estructuras cristalinas de rocas y minerales.

Se construyen a partir de un microscopio ordinario, colocando un polarizador entre la fuente de luz y el condensador, y un analizador entre el objeto y el ocular.

Se utilizan para la observación de sustancias birrefringentes (doble refracción). Al hacer rotar el objeto birrefringente con relación a los filtros cruzados, éste se verá brillante sobre un campo oscuro.

Esta técnica emplea un sistema especial de iluminación, basado en la propiedad que tienen algunas sustancias de filtrar todos los planos de vibración de la luz, excepto aquel que coincide con su eje óptico.

La más corriente de estas sustancias polarizantes es el *espató de Islandia*, que se corta de un modo especial, y se monta para formar lo que es conocido como prisma de Nicol.

Dos prismas de Nicol, dispuestos de tal modo que uno está entre la fuente de luz y el objeto a examinar (prisma polarizador), y el otro se sitúa entre el objeto y la lente ocular (prisma analizador), constituyen el mecanismo de iluminación de los microscopios de luz polarizada. Solo dejarán pasar luz polarizada cuando, por rotación, se hagan coincidir sus ejes ópticos.

Cualquier microscopio normal con la adición de un prisma polarizador y un prisma analizador puede ser utilizado para trabajos con luz polarizada. Sobre todo se utiliza para la observación de estructuras moleculares, orgánulos citoplasmáticos.

### 3.2. MICROSCOPIOS ELECTRÓNICOS.

Cuando se quieren observar estructuras celulares que están por debajo del límite de resolución del microscopio óptico, como algunos orgánulos, membranas, estructuras citosólicas, complejos moleculares de la matriz extracelular o virus, se recurre al microscopio electrónico.

Se inventó en la primera mitad del siglo XX y su aplicación a la histología desveló las estructuras celulares más pequeñas denominadas en su conjunto ultraestructura celular. Por tanto, observar ultraestructuralmente a la célula significa observarla con el microscopio electrónico.

Este tipo de microscopio tiene un límite de resolución más pequeño que 1nm gracias a que no usa la radiación electromagnética de la luz visible sino la alta frecuencia de un haz de electrones que incide sobre la muestra, y permite aumentos de varios millones de veces. El microscopio electrónico no usa lentes sino imanes que concentran los haces de electrones emitidos por un filamento. Los electrones impactan contra la muestra dentro de una **cámara de vacío**.

Normalmente son aparatos grandes puesto que el viaje de los electrones tiene que ocurrir en vacío. Por eso, aparecen grandes tubos dentro de los cuales se crea y manipula el haz de electrones.

Existen diferentes tipos de microscopio electrónico pero su principio de funcionamiento se basa siempre en capturar los electrones dispersados u omitidos por la muestra y así poder reconstruir una imagen.

Las distintas partes de que consta un microscopio electrónico se agrupan en:

- **Cañón.** Es donde se genera el haz de electrones. Está compuesto por un cátodo, que será un filamento de tungsteno, un cilindro, que contiene el filamento de tungsteno, y un ánodo, que es una placa circular con una abertura central y a través del cual pasa el haz de electrones.
- **Las lentes magnéticas.** Tienen forma helicoidal con muchas vueltas, a través de la cual pasa una corriente eléctrica de aproximadamente un amperio, creándose un campo magnético. Hay tres clases: lente condensadora, concentra el haz de electrones sobre ella; lente objetivo, determina el poder de resolución y el contraste de la muestra; y lente proyectora, magnifica la imagen.
- **Pantalla fluorescente.** Ciertos metales tienen la capacidad de fluorescencia, emitiendo luz visible al ser bombardeados por un haz de electrones. En esto se basa la microscopía electrónica para hacer visible la imagen electrónica.
- **Sistema de vacío.** La distancia entre el cañón y la placa fotográfica que recogerá la imagen es de aproximadamente 1 nm, por lo que en el interior de la columna debe haber un alto vacío para favorecer el movimiento electrónico. Este vacío se produce mediante bombas rotativas y bombas difusoras.
- **Sistema de refrigeración.** Es imprescindible tanto para las bombas de vacío como para las lentes magnéticas, para evitar un sobrecalentamiento

La ventaja principal de este tipo de microscopio es que puede obtenerse un nivel de aumento muy superior al del resto de microscopios. Sin embargo, es necesario preparar la muestra y colocarla en una cámara de vacío de modo que no es posible observar muestras biológicas vivas. Los dos tipos de microscopio electrónicos principales son el microscopio electrónico de barrido y el microscopio electrónico de transmisión.

### **3.2.1. Microscopio electrónico de barrido**

En el microscopio electrónico de barrido es necesario que los electrones impacten contra la muestra. En este caso, los electrones no iluminan toda la muestra simultáneamente, sino que se hace un escaneado recorriendo los distintos puntos de la muestra.

Cuando los electrones impactan con la muestra estos pierden parte de su energía debido a distintas interacciones. Parte de su energía inicial se transforma en calor o en emisiones de rayos X. Además, se produce también la emisión de electrones que se desprenden de la superficie de la muestra. Estos electrones se conocen como electrones secundarios.

El principio de funcionamiento de los microscopios electrónicos de barrido se basa en medir alguna de estas propiedades para extraer información de la muestra observada.

Generalmente, esto consiste en medir la cantidad de electrones secundarios que emite la superficie cuando es bombardeada con un haz de electrones.

La muestra se barre con el haz de electrones y los electrones reflejados por un punto de la superficie son captados por una pantalla receptora que creará una imagen en una pantalla digital. La imagen completa se formará cuando el haz recorra toda la superficie de la muestra y se consiga información de cada uno de los puntos. Es decir, se escanea la muestra, y de ahí el nombre de microscopio de barrido o en inglés "scanning". Este permite observar el objeto en forma tridimensional y daña mucho menos la muestra analizada. A medida que el haz de electrones barre rápidamente sobre la muestra, las moléculas de ésta son excitadas a altos niveles energéticos, de forma que emiten electrones secundarios que son los que se emplean en la formación de la imagen.

Esta técnica de microscopía es muy útil para observar los detalles de la superficie de microorganismos. Es habitual realizar una preparación de la muestra depositando primero una capa de metal sobre la muestra. De esta forma, existen más electrones secundarios que pueden desprenderse cuando se aplica el haz principal de electrones. Este proceso de preparación es en general más sencillo que el que se debe realizar para la microscopía electrónica de transmisión.

El aumento que alcanza este tipo de microscopios es menor que el que se puede obtener con un microscopio electrónico de transmisión. Sin embargo, la información tridimensional que proporciona esta técnica lo convierte en un instrumento muy útil para determinados tipos de muestras.

Los microscopios electrónicos de barrido sirven para observar superficies tisulares. Las muestras que se observan no son secciones, sino porciones de órganos con superficies de interés. Se pueden observar superficies de secciones hechas con un vibratomo o con un criostato, pero no aquellas que han sido incluidas en resina o parafina.

### **3.2.2. Microscopio electrónico de transmisión**

Por su parte, en los microscopios electrónicos de transmisión se utilizan los electrones que atraviesan la muestra.

En primer lugar, los electrones son conducidos hacia la muestra mediante las lentes electromagnéticas. Cuando los electrones impactan contra la muestra, algunos de ellos consiguen atravesarla y otros son dispersados. Los electrones que pueden pasar al otro lado de la muestra son capturados por un detector dando lugar así a una imagen.

La cantidad de electrones que atraviesa la muestra sin desviarse varía en función de las características internas de la muestra. Dicho de otro modo, hay partes de la muestra que presentan más transparencia a los electrones que otras. Esto da lugar a zonas más oscuras (menos electrones atraviesan la muestra y llegan al detector) y zonas más claras (más electrones atraviesan la muestra y llegan al detector).

Para utilizar esta técnica es necesario preparar la muestra para que sea muy delgada. De lo contrario, demasiado espesor impide que los electrones puedan atravesarla.

En este tipo de microscopio se produce el haz de electrones en un filamento de tungsteno que funciona como cátodo. Los electrones se condensan mediante electroimanes y se focalizan sobre una sección de tejido. Las secciones de tejido deben ser muy finas, se denominan ultrafinas (de unas decenas de nanómetros), para permitir que sean atravesadas por los electrones y para conseguir imágenes nítidas.

Previamente las secciones deben ser tratadas con metales pesados como el osmio, el plomo y el uranio.

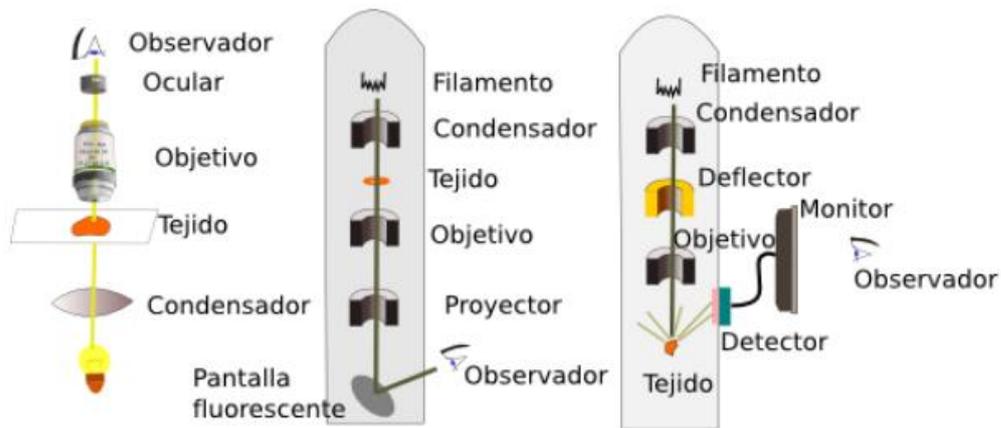
La función de estos metales es similar a las tinciones usadas en el microscopio óptico, dar color, pero sólo en tonalidades de grises, a las estructuras celulares ya que se concentran fundamentalmente en membranas y en los complejos macromoleculares.

Los electrones que chocan con estos metales rebotarán y no cruzarán el tejido. Aquellos que consigan atravesar el tejido chocarán contra una pantalla fluorescente que emitirá un destello luminoso tras cada choque.

Esa imagen emitida por la pantalla fluorescente es la que podemos observar nosotros. Por ello las imágenes observadas con el microscopio electrónico son siempre en blanco y negro, aunque posteriormente se pueden colorear con un ordenador.

Esta técnica de microscopía es muy útil para visualizar los detalles internos de una muestra, por ejemplo, estructuras cristalinas. A nivel conceptual esta técnica es similar a realizar una radiografía de la muestra.

La principal limitación que tiene esta técnica es que no permite extraer información de la superficie de la muestra. Es decir, no permite observar detalles como la forma o rugosidad de la muestra que se observa. Para observar este tipo de características es necesario utilizar la microscopía electrónica de barrido.



Comparativa de la composición básica de un microscopio óptico (izquierda), electrónico de transmisión (centro) y electrónico de barrido (derecha).

### 3.3. OTROS TIPOS

Además de los microscopios anteriormente presentados, existen multitud de técnicas de microscopía adicionales optimizadas para distintos tipos de muestras. Entre ellos, merece la pena mencionar el microscopio confocal, el de campo oscuro y el de contraste de fases.

#### 3.3.1. Microscopio confocal

El microscopio confocal es un tipo de microscopio de fluorescencia. Sin embargo, a diferencia con el microscopio de fluorescencia convencional, la muestra se ilumina punto a punto de forma sucesiva y se reconstruye la imagen al final del proceso. Este proceso de escaneado de la muestra es similar al que se produce en los microscopios electrónicos de barrido, ofreciendo muchos más detalles sobre la estructura de la muestra de estudio.

#### 3.3.2. Microscopio de campo oscuro

Hay objetos y estructuras celulares que por su transparencia son difíciles de observar con los métodos corrientes de iluminación de la microscopía de campo claro. En estos casos es más importante el aumento del contraste entre el objeto y el fondo que la propia resolución del microscopio; este aumento de contraste puede llevarse a cabo mediante la iluminación en campo oscuro.

Este sistema emplea un condensador especial que produce un cono vacío de luz de tal modo que la observación se realiza sobre un fondo completamente oscuro.

La microscopía de campo oscuro consiste en iluminar la muestra oblicuamente. De este modo, los rayos de luz que llegan al objetivo no provienen directamente del foco de luz, sino que han sido dispersados primero por la muestra. Gracias a esta modificación es posible ver muestras

que de otro modo no serían visibles debido a su transparencia. También tiene la ventaja que no requiere teñir la muestra para aumentar su contraste y poder observarla.

La célula o el objeto a observar, aparece como una partícula brillante. Este sistema es muy útil para la observación de células vivas, microorganismos sin teñir suspendidos en líquido.

### **3.3.3. Microscopio de contraste de fases**

En los microscopios de contraste de fases se aprovecha de la propiedad de que la luz viaja a distintas velocidades dependiendo del medio de propagación. De esta forma, en el microscopio de contraste de fases la luz atraviesa la muestra con distintas velocidades en distintas secciones. Este efecto es amplificado para generar la imagen de la muestra.

El contraste de fase produce una imagen con áreas brillantes y oscuras altamente contrastadas, contra un fondo gris neutro.

De esta forma se visualizan mejor las estructuras internas de la célula, bacterias y el estudio en general de preparaciones de densidad homogénea y transparente en las que la baja capacidad de absorción hace que la imagen obtenida no presente diferencia de luminosidad entre sus elementos, permaneciendo prácticamente invisibles los detalles.

Mediante esta técnica no hace falta utilizar tintes y, por lo tanto, pueden observarse células vivas. Se emplea para ver muestras sin teñir o acuosas, así como células vivas, por ejemplo en cultivos celulares.

## **4. APLICACIONES EN LABORATORIOS DE SANIDAD Y GENÉTICA ANIMAL.**

Con relación a las aplicaciones de las técnicas microscópicas, son muchas las técnicas en las que se emplean microscopios, dado que se trata de un instrumento básico en el laboratorio. Estas aplicaciones son debidas a que los microscopios permiten la observación directa de agentes patógenos presentes en las muestras a nivel microscópico o bien, a que posibilitan detectar ciertos efectos a este nivel que son realizados como consecuencia de una alteración sobre las muestras de distinta naturaleza.

En este contexto, las aplicaciones más relevantes de las técnicas microscópicas en los laboratorios de sanidad y genética animal van dirigidas hacia el diagnóstico de enfermedades animales, pero también otras como la investigación.

### **4.1. APLICACIONES DIAGNÓSTICAS**

Sin lugar a duda, en un laboratorio de sanidad y genética animal, las aplicaciones diagnósticas son de las más importantes puesto que posibilitan la consecución de los programas sanitarios dirigidos a la vigilancia, control y erradicación de las enfermedades animales.

Dentro de todo el abanico de técnicas analíticas desarrolladas en un laboratorio, las que emplean microscopios tienen aplicación en aquellas técnicas que sea precisa la visualización de muestras a nivel microscópico e incluyen los cultivos celulares, las técnicas histológicas, las microbiológicas y otras de naturaleza inmunológica.

La **preparación de la muestra** para estudiarla al microscopio óptico es diferente según la naturaleza del material que se quiera observar, *in vivo*, *in vitro*, observación de morfología y estructuras que no se modifiquen cuando sobreviene la muerte celular, etc.

Para el estudio *in vivo* suelen utilizarse técnicas de contraste de fases ~~y contraste interferencial~~. Estudio de protozoos, hongos, caracteres de movilidad bacteriana y morfológica (hay que tener en cuenta que hay determinadas bacterias que al secarse se alteran) agrupación, y estructuras de resistencia (quistes) de parásitos. No precisa tratamiento pero sí de la máxima limpieza y asepsia.

Pueden prepararse muestras en fresco, preparaciones húmedas para observar organismos acuáticos como algas o larvas. Se pone una gota del líquido que los contiene sobre el portaobjetos y se pone el cubreobjetos con cuidado para que no aparezcan burbujas de aire. La técnica de gota utiliza un portaobjetos excavado sobre los que se pone el cubreobjetos, que lleva adherido la gota del líquido que ha de ser observado. De este modo se puede observar el movimiento de los microorganismos en medio líquido sin que estén sometidos a la presión entre portaobjetos y cubreobjetos.

No obstante también se puede hacer una coloración vital en la que realmente no se tiñen las estructuras celulares sino que ocurre una acumulación en determinadas zonas de la célula. Al ser los colorantes sustancias tóxicas se deben emplear concentraciones bajas. Los colorantes vitales son azul de metileno, rojo neutro, rojo congo y verde Jannus.

Para estudios *in vitro* hay que recurrir a técnicas que implican pasos de fijación, inclusión, corte y tinción para observar secciones de tejidos lo suficientemente transparentes visibles en el microscopio óptico.

#### 4.1.1. Aplicadas a los cultivos celulares

El uso de cultivos celulares es una importante herramienta en el diagnóstico directo de enfermedades de naturaleza vírica. Esta técnica consiste en inocular la muestra de análisis a líneas celulares concretas y comprobar qué efecto tiene la muestra sobre las células. Este efecto se conoce como **efecto citopático** y precisa del uso de microscopios.

Los cultivos celulares pueden emplearse igualmente para realizar técnicas inmunológicas que consisten en la identificación, directa o indirecta, de determinados agentes infecciosos por medio del uso de fluoróforos que son visualizados en un microscopio de fluorescencia gracias a la especificidad antígeno-anticuerpo.

En este sentido, la **inmunofluorescencia** directa consiste en la captura de antígenos concretos procedentes de agentes infecciosos por medio del uso de anticuerpos específicos marcados fluorescentemente. De la misma forma, la inmunofluorescencia indirecta, realizada a partir

de muestras de suero, hace posible la identificación de anticuerpos específicos frente a determinadas enfermedades infecciosas también gracias al uso de otros anticuerpos específicos marcados.

Este tipo de técnicas se emplean para el diagnóstico de enfermedades víricas tales como la Fiebre del Nilo Occidental, la Peste Porcina Africana o la enfermedad de Newcastle.

#### 4.1.2. Aplicadas a las técnicas histológicas

Por su parte, las técnicas histológicas persiguen observar la estructura de diferentes tejidos a nivel microscópico. En el ámbito del diagnóstico, estas técnicas hacen posible la identificación de estructuras anormales (**histopatología**) debido a un proceso patológico que bien puede ser de naturaleza infecciosa, como sucede con los priones, u oncológica, entre otros.

Estas técnicas precisan de la tinción de las estructuras tisulares para que su visualización a microscopio sea más sencilla y determinante. En este sentido, existen diferentes tipos de tinciones según qué estructuras queramos visualizar.

Entre las más populares está la hematoxilina/eosina y también otras que se apoyan en las técnicas inmunológicas y que se basan en la identificación de agentes patológicos gracias a la especificidad antígeno/anticuerpo, donde los anticuerpos van marcados de manera que su visualización al microscopio es más evidente; se trata de las técnicas de **inmunohistoquímica**.

#### 4.1.3. Aplicadas a las técnicas microbiológicas

De manera similar a lo que sucede con la histología, existen técnicas microbiológicas que consisten en observar el microorganismo directamente sobre muestras biológicas o bien a partir de cultivos.

La identificación de microorganismos al microscopio es factible gracias a características concretas como la forma o el tamaño. Asimismo, existen tinciones específicas que facilitan la **identificación de microorganismos** concretos al microscopio. Uno de los ejemplos es la identificación de micobacterias por medio de una tinción de Ziehl-Neelsen que pone en evidencia que estas bacterias son ácido-alcohol resistentes.

De la misma forma, los microscopios también son empleados para detectar agentes infecciosos en muestras biológicas como sangre o heces. A modo de ejemplo, podemos mencionar la identificación de protozoos como *Babesia* o *Theileria* en muestras de sangre de equinos para detectar la piroplasmosis.

Por otra parte, la evolución de los microscopios ha promovido una mayor sensibilidad a la hora de identificar distintos microorganismos o agentes infecciosos. Sirva de ejemplo mencionar que la OIE recoge como método de diagnóstico de referencia para el Scrapie, cuyo agente etiológico es una proteína priónica patógena, la observación de fibrillas específicas mediante microscopía electrónica (SAF – *Scrapie Associated Fibrils*).

El microscopio electrónico de barrido también facilita mucho la identificación por especie de microorganismos como ácaros u otro tipo de artrópodos con interés diagnóstico.

No obstante, en la actualidad casi todas estas modalidades de identificación de microorganismos han sido sustituidas por métodos moleculares que resultan más sencillos, rápidos y fiables.

## **4.2. OTRAS APLICACIONES**

### **4.2.1. Aplicaciones en la investigación**

Más allá de las aplicaciones diagnósticas de los microscopios, la investigación requiere de este instrumento para el desarrollo de numerosas técnicas. Entre ellas, todas las anteriormente mencionadas que pueden ser realizadas con fines de investigación.

Asimismo, la creación de organismos modificados genéticamente con objetivo de investigar diferentes efectos requiere el uso de microscopios. Concretamente, la transducción de construcciones genéticas a líneas celulares se realiza con la ayuda de fluoróforos que facilitan la selección de células que han incorporado la modificación.

## **BIBLIOGRAFÍA**

Mundo microscopio. <https://www.mundomicroscopio.com/>

Manual de microscopia. Historia, descripción y uso del microscopio óptico. (AUXILAB, S.L., Material para laboratorio.

MATERIAL NO OFICIAL

**MATERIAL PARA LA PREPARACIÓN DEL TEMA 28**

**TÉCNICAS HISTOLÓGICAS: CONCEPTO, TIPOS Y APLICACIONES EN  
LABORATORIOS DE SANIDAD Y GENÉTICA ANIMAL**

*Este material no tiene carácter oficial, por lo que en ningún caso vinculará al Tribunal Calificador. Constituye, únicamente, un instrumento complementario que servirá de apoyo al opositor para enfocar cada uno de los epígrafes, pero nunca de forma exclusiva ni excluyente. El Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación no se hace responsable del contenido del mismo.*

*Los materiales no serán objeto de actualización constante.*

## **ÍNDICE**

### **1. CONCEPTO**

- 1.1. DEFINICIÓN
- 1.2. ETAPAS DE LA TÉCNICA HISTOLÓGICA
  - 1.2.1. Tallado
  - 1.2.2. Fijación
  - 1.2.3. Procesado e Inclusión
  - 1.2.4. Corte
  - 1.2.5. Tinción
  - 1.2.6. Observación al Microscopio

### **2. TIPOS**

- 2.1. HISTOLÓGICAS BÁSICAS
  - 2.1.1. Fundamentos
  - 2.1.2. Ejemplos de técnicas histológicas básicas
- 2.2. ENZIMÁTICAS
  - 2.2.1. Fundamento
  - 2.2.2. Ejemplos de técnicas histológicas enzimáticas
- 2.3. INMUNOHISTOQUÍMICAS
  - 2.3.1. Fundamento
  - 2.3.2. Tipos de técnicas inmunohistoquímicas
- 2.4. HIBRIDACIÓN IN SITU
  - 2.4.1. Fundamento
- 2.5 LECTINAS

### **3. APLICACIONES EN LABORATORIOS DE SANIDAD Y GENÉTICA ANIMAL**

## 1. CONCEPTO

### 1.1. DEFINICIÓN

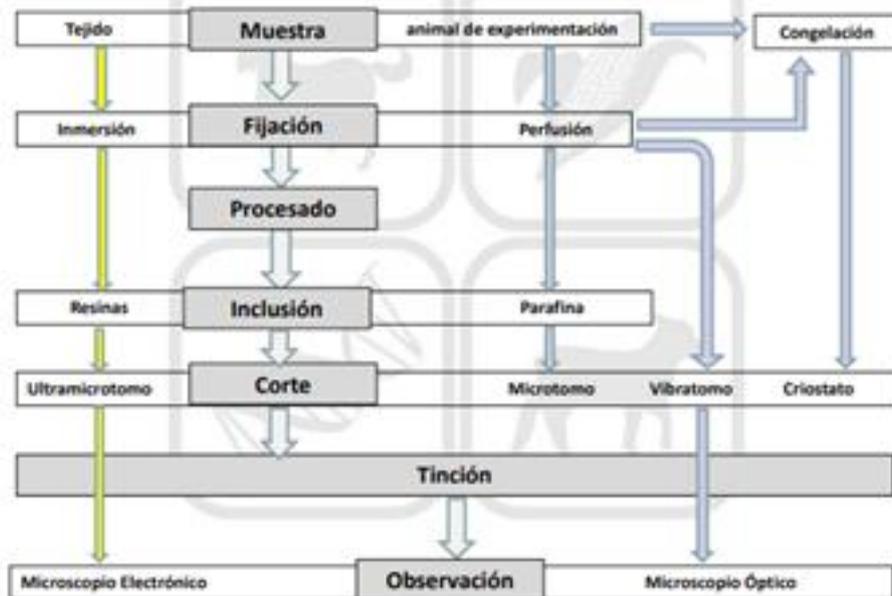
El término **Histología** procede del griego y significa: "ἵστός/*histós*, "tejido", y λογία/*logía*, "tratado, estudio, disciplina", por lo que se puede definir la **Histología** como la disciplina que estudia **todo lo relacionado con los tejidos: su estructura, desarrollo y sus funciones**.

La **técnica histológica**, se puede definir como el conjunto de **procedimientos** aplicados a un material biológico (animal o vegetal) con la finalidad de **condicionarlo y conferir** las condiciones óptimas para poder **observar, examinar y analizar** sus componentes morfológicos mediante el empleo del **microscopio**.

### 1.2. ETAPAS DE LA TÉCNICA HISTOLÓGICA

Para llevar a cabo una técnica histológica requiere de diferentes etapas o pasos que según el orden de realización son (figura 1):

Figura 1. Esquema Resumen. Etapas de la técnica histológica



#### 1.2.1. Tallado

Consiste en la descripción macroscópica de la muestra y la selección de las áreas representativas, sobre las que se va a realizar el estudio. Las muestras objeto de dicho estudio son: biopsias, órganos procedentes de necropsias, frotis celulares etc.

### 1.2.2. Fijación

Una vez seleccionado el tejido o muestra representativa objeto de estudio y antes de poder realizar la técnica histológica, ésta debe ser sometida a un proceso denominado de fijación mediante la **inmersión del tejido en un líquido fijador** o por **perfusión** donde éste se aplica por inyección vascular con la finalidad de:

- **Mantener** la estructura tisular y química lo más inalterada posible
- **Detener el proceso post-mortem** (muerte celular, degradación enzimática, putrefacción y autólisis).
- Rapidez y buen **poder de penetración**.
- **Endurecer** y dar mayor consistencia al tejido.
- No producir **artefactos tisulares**.
- **Insolubilizar** los componentes del tejido.

#### Tipos de Fijadores

Los fijadores empleados se pueden clasificar en:

**a) Físicos:** mediante el empleo de calor o frío

- **Por calor:**
  - como puede ser el empleo de la llama de mechero, muy utilizada en extensiones y frotis para citología.
- **Por frío:**
  - Congelación -20C, -80°C
  - Hielo seco/nieve carbónica
  - Nitrógeno líquido /isopentano

**b) Químicos:** mediante el empleo de diferentes reactivos químicos (simples) o combinaciones de ellas (compuestos) (carnoy, Boui, Zeenker). Existe una gran variedad, pero algunos de los más comúnmente empleados son:

- **Formaldehído, formol o formalina:** es más empleado en la rutina histológica, se suele emplear a una concentración del 4%.
- **Alcoholes** (metanol, etanol), para la fijación de muestras de citología (frotis y extensiones).
- **Glutaraldehído y tetróxido de osmio**, cuando se trabaja con microscopía electrónica.

### 1.2.3. Procesado e Inclusión

#### a) Procesado

Una vez fijado el tejido o muestra de elección, debe ser sometido a un proceso de **deshidratación con la finalidad de extraer el agua de la muestra**. Esto se consigue haciendo pasar la muestra por una batería gradual de etanoles en orden de graduación creciente (50°C, 70°C, 80°C, 95°C y alcohol absoluto) y un posterior aclaramiento, en el que sustituimos el agente deshidratante por una sustancia miscible con la parafina, como es el xileno. En aquellos casos en los que la muestra haya sido fijada por medios físicos (congelación), este paso no se realiza.

#### b) Inclusión

A continuación se procede a la **inclusión** de la muestra que tiene por finalidad **endurecer el tejido y darle la consistencia necesaria** antes de proceder a la realización de las técnicas histológicas. Este proceso se lleva a cabo mediante la **infiltración de la muestra** con sustancias líquidas que sin afectar a las características del tejido y tras un proceso de polimerización o enfriamiento se solidifican confiriendo al tejido la dureza necesaria para entre otros:

- **La obtención de cortes**, con un grosor de  $\mu\text{m}$  a  $\text{nm}$ , sin que el tejido se rompa o deteriore.
- **El almacenamiento** de las muestras durante largos periodos de tiempo.

Los principales medios de inclusión son:

- **Parafina** cuando las muestras han sido fijadas en formol. Sustancia de tipo céreo compuesta por mezclas de hidrocarburos saturados con un punto de fusión entre 40 y 70°C.
- **OCT**, (mezcla comercial de alcohol polivinílico y poletilenglicol), si el tejido ha sido congelado, indicado en biopsias.
- **Resinas epoxídicas**, si la muestra va a ser estudiada por microscopía electrónica.

### 1.2.4. Corte

Una vez incluida la muestra o tejido, el paso siguiente consiste en la **realización de cortes histológicos** lo suficientemente finos para poder ser visualizados al microscopio; para ellos se emplea el **micrótopo**: [*mīkr(o)*- μικρός gr. 'pequeño' + *-tomo-* -τομος gr. 'cortador']; instrumento mecánico con el que se realizan secciones de espesor **micrométrico ( $\mu\text{m}$ )**.

Una vez realizados los cortes, son depositados en los denominados portaobjetos, soportes o placas de cristal sobre los cuáles se lleva a cabo la tinción o técnica histológica correspondiente.

En función del medio de inclusión del tejido y el grosor del corte histológico, existen diferentes tipos de micrótomos (Figura 2):

Figura 2. Tipos de micrótomos



### 1.2.5. Tinción

La tinción histológica es el procedimiento empleado para visualizar un tejido mediante el empleo de uno o varios colorantes de modo simultáneo o sucesivo. Este procedimiento consta de una serie de etapas:

- **Etapas de la tinción**

- Desparafinado (mediante el empleo de xileno en aquellos tejidos fijados en formol e incluidos en parafina).
- Hidratación (empleando una batería de etanoles decrecientes).
- Lavado en agua.
- Tinción.
- Lavado en agua.
- Deshidratación (batería de etanoles crecientes).
- Clarear (mediante el empleo de xileno en aquellos tejidos fijados en formol e incluidos en parafina).

- Montaje: consiste en el empleo de **medios de montaje** que se depositan sobre la sección del tejido y se cubre con un cubre-objetos para evitar la desecación del tejido y poder ser visualizado al microscopio, conservado y almacenado a Tª ambiente.

Hay diferentes **tipos de medios de montaje**:

- **No acuosos**: Eukitt, Bálsamo del Canadá, Permount, Vectamount (para tejido fijado parafina).
- **Acuosos**: Glicerol /PBS (para tejido en fresco)

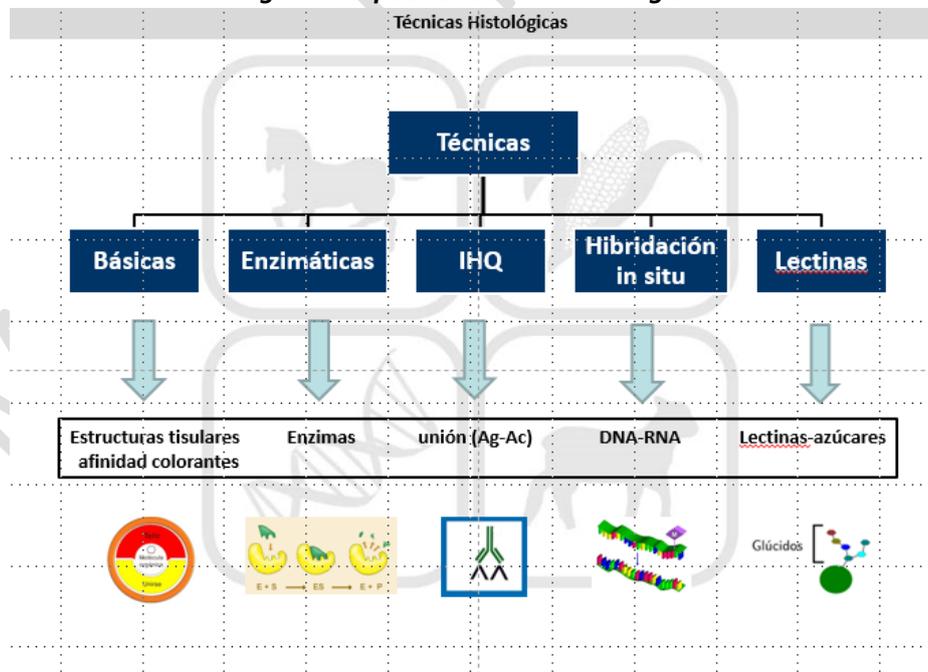
### 1.2.6. Observación al Microscopio

Es el paso final donde se observa al microscopio los resultados de la técnica histológica empleada. Para llevar a cabo este paso existen diferentes microscopios (óptico, electrónico, confocal, invertido...) los cuáles son objeto de otro tema de este temario por lo que no son desarrollados en este tema.

## 2. TIPOS

Hay una gran variedad de técnicas histológicas (Figura 3), pudiendo ser clasificadas según el cuadro adjunto en:

**Figura 3. Tipos de técnicas histológicas**



## 2.1. TÉCNICAS HISTOLÓGICAS BÁSICAS

### 2.1.1. Fundamento

Se basan en el empleo de **COLORANTES** para poner de manifiesto las estructuras y morfología del tejido. Las principales características de un colorante para poder ser empleado en una técnica histológica son la **capacidad de teñir o colorear el tejido** y de **unirse a estructura celulares mediante afinidades químicas**.

Los colorantes se pueden **clasificar según su origen y naturaleza** en **naturales** como por ejemplo Hematoxilina, Orceína y **artificiales** como Azul de metileno, Safranina.

Los colorantes también pueden **ser clasificados en función de su carga neta**, como: **básicos o catiónicos** (Azul de metileno, verde de metilo, etc.), **ácidos o aniónicos** (Eosina, azul de anilina etc), **sin carga** (sitiocianatos) y de su **estructura química**: nitrados (ácido pícrico), derivados del Xanteno (Eosina Y) etc.

Son varios los **mecanismos de acción** (Tabla 1) por los cuáles el colorante es capaz de colorear o teñir el tejido así como su unión a estructuras celulares es realizado a través de:

**Tabla 1. Mecanismo de acción de los colorantes**

Mecanismo	Efecto
Difusión	Penetración y coloración de estructuras tisulares
Actividad enzimática	Precipitación de una sustancia
<b>Relaciones electrostáticas</b>	<b>Ácido-Base</b>
Enlaces coordinados, mordientes y quelantes	Aumentan la reactividad del tejido estableciendo una interacción con el tejido colorante
Enlaces covalentes	Isotiocianos-Sustrato
Puentes de hidrógeno	Colorante sustrato e soluciones no acuosas
Fuerzas de van der Waals	Interacciones hidrofóbicas: coloración de lípidos
Impregnaciones	El colorante forma agregados insolubles que quedan retenidos en el tejido gracias a la malla molecular creada en el proceso de fijación

### 2.1.2. Ejemplos técnicas histológicas básicas

Existe una gran variedad de técnicas histológicas en función de aquello que queramos detectar (lípidos, bacterias, elementos de la sangre etc....); como por ejemplo:

#### a) Hematoxilina & Eosina (H&E)

La técnica de Hematoxilina & Eosina (H&E) es la técnica más utilizada en anatomía patológica ya que permite visualizar la arquitectura tisular y por consiguiente la identificación de la lesiones histológicas de las enfermedades animales.

Su fundamento (ácido-base), se basa en el empleo de dos colorantes: hematoxilina y eosina; la **hematoxilina**, colorante natural obtenido de una planta leguminosa *Haematoxylum campechelanun* (palo de Campeche) da una coloración azul, es un **colorante básico que tiñe estructuras ácidas (ADN, ARN)**, poniendo de manifiesto los núcleos de las células; mientras que la **eosina**, derivado halogenado del xanteno, auto-fluorescente y soluble en alcohol, da una coloración rosácea; es un **colorante ácido que tiñe estructuras básicas de la célula (citoplasma y matriz extracelular)**.

#### **b) Tinción de PAS (ácido periódico-reactivo de Schiff)**

Se emplea para la detección de polisacáridos (glucógeno, mucopolisacáridos), membranas basales y fibras reticulares del tejido conjuntivo. El colorante empleado es el Reactivo de Schiff.

Previamente se emplea el ácido peryódico que rompe la unión de los átomos de carbono formando grupos aldehído, a continuación estos grupos aldehídos reaccionan con el reactivo de Schiff dando un color púrpura intenso. Los glúcidos se tiñen de rosa intenso a fucsia y los núcleos se tiñen de azul oscuro.

#### **c) Tinción de Gram**

Es un tipo de tinción que se realiza para la identificación de bacterias. Según la distribución del peptidoglicano de la pared celular que las envuelve, se tiñen de una forma u otra.

Así, las bacterias que no se tiñen (Figura 4) mediante esta técnica se denominan Gram negativas. Están formadas por una pared más fina formada por menos capas de peptidoglicano y una segunda membrana rica en lípidos (que repele la tinción Gram), al microscopio aparecen incoloras.

Las Gram positivas tienen una pared celular mucho más gruesa, (Figura 4b) formada por un gran número de capas de peptidoglicanos entre las que se inserta la tinción Gram, dando un color violeta intenso al microscopio y se clasifican como Gram +.

Figura 4a. Esquema de la tinción de Gram

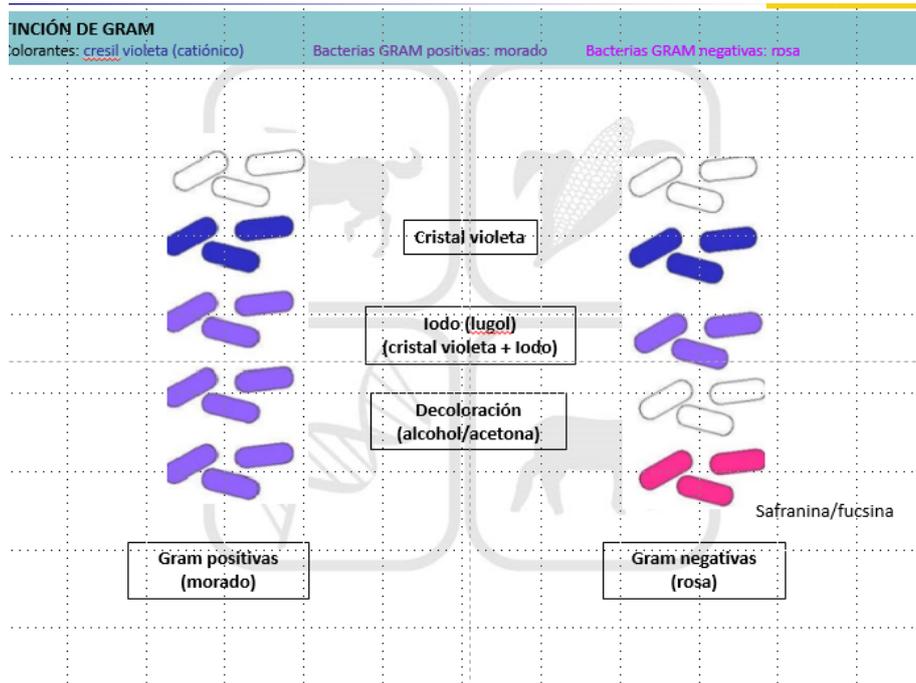
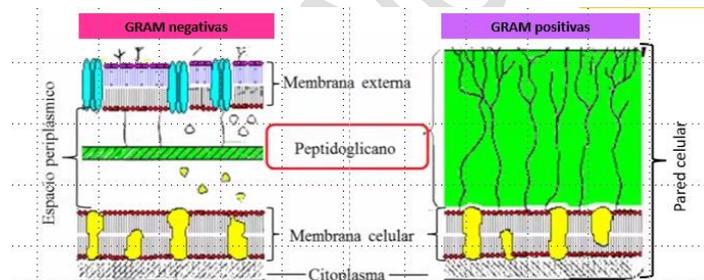


Figura 4b. Estructura pared celular de bacterias



## 2.2. TÉCNICAS HISTOLÓGICAS ENZIMÁTICAS

### 2.2.1. Fundamento

Se emplean para la **detección de enzimas del tejido, en concreto, su actividad enzimática**, se detecta el producto de la reacción de la actividad enzimática y no la enzima. Se utiliza un reactivo de captura, un colorante o un metal pesado, para atrapar o fijar el producto de la reacción de la enzima mediante precipitación en el sitio de la reacción.

### 2.2.2. Ejemplos de Técnicas histológicas enzimáticas

Se suelen emplear cuando se trabaja con tejido muscular y entre ellas podemos citar:

- NADH (nicotin-adenina deshidrogenasa).
- ATPasas (ATPasas miosínicas).
- COX (citocromo oxidasa) -SDH (succinato deshidrogenasa).

## 2.3. TÉCNICAS INMUNOHISTOQUÍMICAS (IHQ)

### 2.3.1 Fundamento

Son técnicas inmunológicas que se basan en la interacción antígeno (Ag) anticuerpo (Ac), se puede definir un Ag como una molécula capaz de producir una respuesta del sistema inmunitario (SI) y un Ac o inmunoglobulina como aquella proteína producida por el SI (linfocitos B) en respuesta a un Ag.

Las principales características de la unión Ag-Ac son:

- Unión reversible mediante enlaces no-covalentes.
- Débil, disminuyen con la distancia.
  - Puentes de hidrógeno
  - Fuerzas de Van der Waals
  - Enlaces hidrófobos
  - Fuerzas electrostáticas (enlaces iónicos)

Se emplean para identificar la distribución de un Ag en los tejidos; en las técnicas de IHQ el resultado de la interacción Ag-Ac es una precipitación y para poder visualizar esta unión, se utilizan fluorocromos, enzimas, partículas electrodensas o isótopos radiactivos que ponen de manifiesto dicha unión para poder ser observada al microscopio.

### 2.3.2. Tipos

Las técnicas de IHQ (Figura 5) se pueden clasificar en:

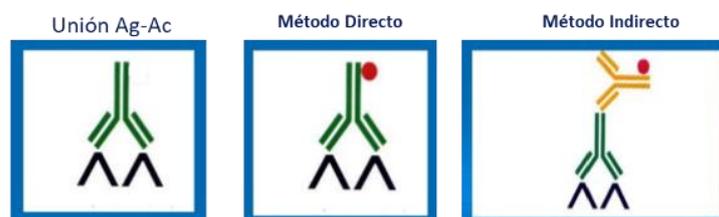
#### a. Inmunohistoquímica directa

El Ag presente en la muestra se pone de manifiesto mediante el empleo de **un Ac primario** (monoclonal o policlonal) marcado (fluorocromos, enzimas, partículas electrodensas o isótopos radiactivos). Es un procedimiento de un solo paso y con poca sensibilidad.

#### b. Inmunohistoquímica indirecta

Presenta una mayor sensibilidad que la IHQ directa, primeramente se emplea un **Ac primario** específico frente al Ag de interés y a continuación se emplea **un Ac secundario** frente al Ac primario y marcado o conjugado.

**Figura 5. Técnicas de Inmunohistoquímica**



En la IHQ las **enzimas** son las sustancias o moléculas más ampliamente empleadas para marcar los Ac, así se han desarrollado varios sistemas cuya finalidad es la **amplificación de la señal de la unión Ag-Ac** entre los que se encuentran:

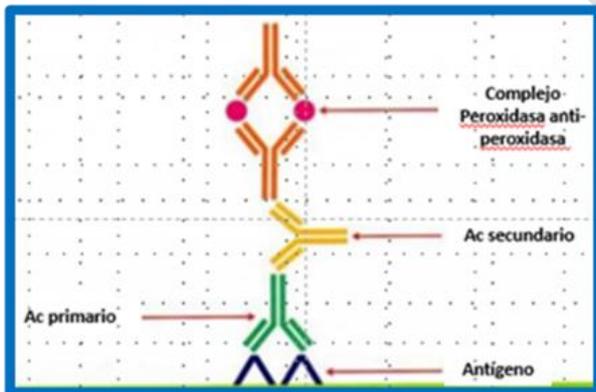
- **Complejo Peroxidasa anti-Peroxidasa (Figura 6a)**
- **Complejo ABC (Streptoavidina/Avidina-Biotina Peroxidasa) (Figura 6b)**

La **peroxidasa** es la enzima más empleada y se obtiene del rábano picante, presenta una gran estabilidad y facilidad para su conjugación con IgG; otra enzima también empleada es la **fosfatasa alcalina**.

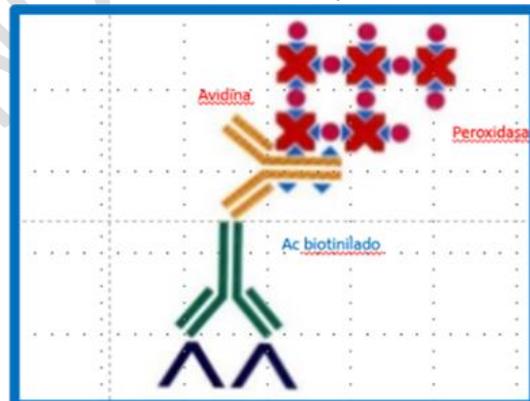
En cuanto al **complejo ABC (avidin-Biotin Complex)**, la **avidina (A)** es una glicoproteína producida en el oviducto de aves, reptiles y anfibios y se encuentra presente en la clara de los huevos, y la **Biotina (B)** es una vitamina del complejo B. La avidina presenta una elevada afinidad por la biotina presentando 4 sitios de unión para la biotina, lo que da lugar a una gran amplificación de la interacción Ag-Ac.

**Figura 6. Sistemas de amplificación de la IHQ**

**Fig. 6a. Complejo Peroxidasa anti-peroxidasa (1970 Sterberg)**



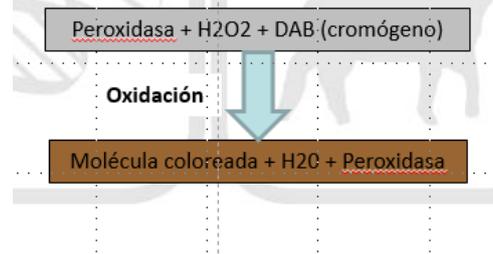
**Fig. 6b. Complejo ABC (Strept/avidina-Biotina peroxidasa) 1974 Heitzman, Richardson)**



La **Visualización de la unión Antígeno-Anticuerpo (Ag-Ac)** se lleva a cabo mediante la observación al microscopio y dependerá de la sustancia o molécula empleada para marcar el a Ac:

- **Fluorocromos:** [Texas Red, Isotiocianato de Fluoresceína (FITC)]. Mediante la emisión de fluorescencia del fluorocromo al ser expuesto a radiaciones de una determinada longitud de onda (Microscopio de fluorescencia).
- **Enzimas:** (peroxidasa, fosfatasa alcalina, glucosa oxidasa...) se emplean sustancias coloreadas o **cromógenos** que mediante **una reacción química**, generalmente de oxidación, entre la enzima y el cromógeno, **se producen un precipitado coloreado visible al microscopio óptico**. Entre los cromógenos más utilizados se encuentra la DAB o diaminobencidina (Figura 7).

**Figura 7. Mecanismo de acción del cromógeno DAB**

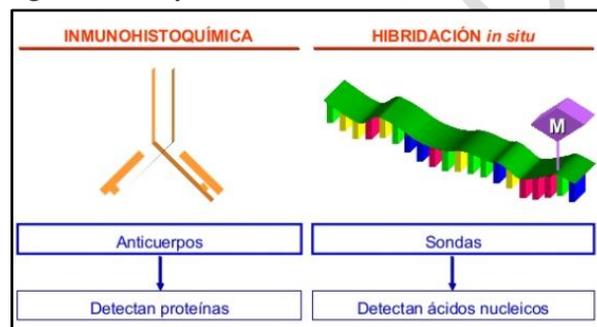


## 2.4. TÉCNICAS DE HIBRIDACIÓN *IN SITU*

### 2.4.1. Fundamento

El término hibridación *in situ*, hace referencia a la **capacidad de los ácidos nucleicos de hibridar entre sí**, el mecanismo es similar a las técnicas de IHQ, pero en este caso se emplea para la localización y la detección de secuencias de **ADN y de ARN específicas dentro de las células o tejidos** (Figura 8).

**Figura 8. Comparativa entre IHQ e Hibridación *in situ***



Para ello se emplean **Sondas (secuencia de aproximadamente 20 a 40 nucleótidos)**, complementaria a la secuencia del ARN /ADN que queremos detectar.

Al igual que en las técnicas de IHQ, las sondas se marcan con diferentes moléculas como fluorocromos, enzimas e isótopos radiactivos para poder ser visualizadas al microscopio.

Las enzimas son las moléculas marcadoras más empleadas como por ejemplo: Digoxigenina, peroxidasa, fosfatasa alcalina, así como fluorocromos.

## 2.5 LECTINAS

### 2.5.1. Fundamento

El término Lectina procede latín: *legere*, que significa "seleccionar", se obtienen de plantas leguminosas, y su nombre hace referencia a la planta de la que proceden, aunque también las hay de origen animal (Galectinas, Selectinas, Anexias).

Son proteínas que tienen la capacidad de unir azúcares con una elevada especificidad y presentan capacidad fitohemaglutinante (aglutinar eritrocitos). Se emplean para estudiar la distribución tisular de distintos tipos de azúcares.

### 2.5.2. Tipos de Lectinas

Las Lectinas presentan diferentes actividades, entre las que se puede destacar.

- Tipificación de grupos sanguíneos - Aglutinación membranas de eritrocitos.
- Marcadores tumorales: Galectinas.
- Actividad antitumoral: “*Ricina*” (RCA) *inhibe crecimiento de carcinomas en ratones.*
- Actividad antiviral: “*Phytolacca americana*”, *Hierba carmín, inhibe traducción de RNA viral.*
- Actividad antibacteriana: “*Papa*” *inmoviliza cepas de Pseudomonas solanacearum.*
- Actividad antifúngica: “*Urticaria dioica*”, *Ortiga, inhibe crecimiento de Trichoderma amatum.*
- Actividad insecticida: “*Canavalia ensiformes*”, *Concavalina A, sobre el pulgón de la alfalfa.*

### 3. APLICACIONES EN LABORATORIOS DE SANIDAD Y GENÉTICA ANIMAL

Las técnicas histológicas son una herramienta fundamental en los laboratorios de sanidad animal y vegetal, ya que permiten:

- **La identificación de las lesiones patognomónicas de cada enfermedad**, mediante el empleo de la técnica de Hematoxilina&eosina como por ejemplo:
  - La pérdida neuronal gliosis y vacuolización en encefalopatías espongiiformes transmisibles (EETs).
  - Inclusiones intraneuronales en las enfermedades de los crustáceos.
- **Identificación de Bacterias**
  - *Staphylococcus aureus*, *Costridium perfringes* mediante la tinción de Gram
  - *Mycobacterium tuberculosis* mediante la tinción de Ziehl Neelsen
- **Identificación y localización a nivel tisular de los agentes causales** de las enfermedades mediante el empleo de anticuerpos monoclonales o policlonales específicos de cada una como por ejemplo las EETs donde se emplea un anticuerpo frente a la proteína priónica.

- **Identificación de cromosomas** o regiones de cromosomas de secuencia conocida (enfermedades genéticas, mapeo de genes) mediante Hibridación *in situ*.

MATERIAL NO OFICIAL

## **BIBLIOGRAFÍA**

Técnicas en Histología y Biología Celular. Luis Montuenga, José Esteban, Alfonso Calvo. Elsevier Masson (2014).

Atlas de Inmunohistoquímica. Caracterización de células, tejidos y órganos normales. Martín-Lacave, Inés, García-Caballero, Tomas. Ediciones Díaz de Santos (2012).

Atlas de Histología Vegetal y Animal. Manuel Megías Pacheco, Pilar Molist García y Manuel Ángel Pombal Diego. Dpto. de Biología Funcional y Ciencias de la Salud. Facultad de Biología Universidad de Vigo. <https://mmegias.webs.uvigo.es/6-tecnicas/1-introduccion.php>

Manual de Técnicas en Histología y Anatomía Patológica. Fernando Torres Seco Editorial: ARIEL (2002).

MATERIAL NO OFICIAL

**MATERIAL PARA LA PREPARACIÓN DEL TEMA 29**

**ANATOMÍA PATOLÓGICA APLICADA EN EL CONTROL DE LA SANIDAD ANIMAL. CONCEPTO Y UTILIDAD. NECROPSIAS.**

*Este material no tiene carácter oficial, por lo que en ningún caso vinculará al Tribunal Calificador. Constituye, únicamente, un instrumento complementario que servirá de apoyo al opositor para enfocar cada uno de los epígrafes, pero nunca de forma exclusiva ni excluyente. El Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación no se hace responsable del contenido del mismo.*

*Los materiales no serán objeto de actualización constante.*

## **ÍNDICE**

### **1. ANATOMÍA PATOLÓGICA APLICADA EN EL CONTROL DE LA SANIDAD ANIMAL**

#### 1.1. INTRODUCCIÓN

#### 1.2. RESEÑAS HISTÓRICAS DE LA ANATOMÍA PATOLÓGICA

### **2. CONCEPTO Y UTILIDAD**

#### 2.1. CONCEPTO

##### 2.1.1. Anatomía Patológica General

##### 2.1.2. Anatomía Patológica Especial o Sistémica

##### 2.1.3. Anatomía Patológica Clínica

##### 2.1.4. Anatomía Patológica Experimental

##### 2.1.5. Anatomía Patológica Comparada

#### 2.2. UTILIDAD (Aplicaciones)

##### 2.2.1. Ámbito de Aplicación

##### 2.2.2. Herramientas de Trabajo

##### 2.2.3. Aplicaciones en Sanidad Animal

### **3. NECROPSIAS**

#### 3.1. DEFINICIÓN Y OBJETIVO

#### 3.2. ETAPAS DE LA NECROPSIA

##### 3.2.1. Eutanasia

##### 3.2.2. Examen Externo

##### 3.2.3. Disección (apertura y extracción de órganos)

##### 3.2.4. Examen Interno

##### 3.2.5. Exámenes especiales o complementarios. Toma de muestras

##### 3.2.6. Eliminación del cadáver

##### 3.2.7. Informe de necropsia

## 1. ANATOMÍA PATOLÓGICA APLICADA EN EL CONTROL DE LA SANIDAD ANIMAL

### 1.1. INTRODUCCIÓN

La palabra **Patología** tiene su origen en las palabras griegas “**pathos**” (sufrimiento o daño) y “**logos**” (estudio), lo que significa el estudio del daño. **Se puede definir como la rama de la medicina que se encarga del estudio de las causas, desarrollo y consecuencias de las enfermedades a nivel histológico (a nivel celular y de tejidos).**

**La Anatomía Patológica** es un área de la Patología que **estudia las bases morfológicas de la enfermedad.** El origen de la anatomía patológica es tan antiguo como la medicina, ya que se basa en la observación directa del órgano enfermo. Con el tiempo se han ido incorporando diferentes métodos como la observación microscópica de técnicas histológicas, histoquímicas, inmunohistoquímicas; la microscopía electrónica, y más recientemente, de las técnicas moleculares.

### 1.2. RESEÑAS HISTÓRICAS DE LA ANATOMÍA PATOLÓGICA

**Hipócrates**, a quién se conoce como **el padre de la medicina**, ya descubrió la importancia de la anatomía patológica con lo que él denominaba “la alteración de los humores” los cuales eran la sangre, la linfa, la bilis negra y la bilis amarilla.

Durante este **periodo y en épocas anteriores, se realizaban comprobaciones anatomopatológicas en animales, iniciadas antes que, en medicina**, ya que salvo en la época de Ptolomeo en Alejandría, estaba prohibido la apertura de cadáveres.

A partir del **Renacimiento** comienzan a realizarse **las primeras autopsias**; es así como surge una corriente nueva de autores que pasan a creer solo aquello que era posible mirar. Lo que los aleja de forma definitiva, de los dogmas que habían sido la única opción hasta ese momento. **Antonio Benivieni, considerado el padre de la Anatomía Patológica** empezó a realizar exámenes post mortem de personas fallecidas.

Benivieni, se inclinó más en la parte de la disección lo que dio resultados que se consideraron muy superficiales. Posteriormente, el médico belga **Vesalio** se encargó de estudiar las enfermedades en relación a lo que eran **aspectos de tipo morfológico**, y así es como se deja de lado el dogmatismo que reinaba en esa época.

Tras ello, apareció la **Anatomía Organicista**, que veía **relación entre la morfología corporal, las alteraciones y los síntomas que acompañan a la enfermedad.**

De ahí en adelante, los autores que surgieron se dieron cuenta de la importancia que contenía la realización de la **Anatomía Patológica Autópsica** con la finalidad de realizar los estudios de la medicina.

Es así como el italiano **Morgani**, entendió, que la observación, junto con el estudio de las alteraciones de tipo morfológicas, se convertían en la base fundamental para obtener el entendimiento de las enfermedades.

**A finales del siglo XVIII**, el anatomista y fisiólogo de origen francés **Bichat**, pasa a introducir el término de tejidos, **como una unidad morfológica del organismo**. Así es como va dando origen al concepto del mismo. Se dedicó a tratar de conseguir unidades simples que se encargaran de realizar la conformación de los órganos. Es de aquí en adelante que lo relacionado a la patología pasa a desarrollarse en la denominada **época tisular** y la **Patología se convierte en Histopatología**.

**En el siglo XIX**, con la aparición del **microscopio óptico** y con la **teoría celular (Schleiden y Schwann)**, **empieza entonces la anatomía patológica a nivel celular**, y junto con las aportaciones de **Virchow** con su tratado de **Patología Celular** supusieron una revolución en el campo de la **Patología Morfológica, llegando hasta la actualidad**.

Es así como la Anatomía Patológica, ha venido experimentado un gran desarrollo a través del tiempo debido a los avances que han surgido en la medicina, la veterinaria, la biología y la tecnología. Igualmente es de hacer notar que la Anatomía Patológica está en constante evolución.

## **2. CONCEPTO Y UTILIDAD**

### **2.1. CONCEPTO**

La **Anatomía Patológica**, es la rama de la Patología que estudia **las lesiones de los órganos, tejidos y células animales, desde el punto de vista macroscópico, microscópico y ultraestructural**; orienta su estudio hacia el conocimiento de las alteraciones estructurales, físicas, químicas e inmunológicas e histológicamente revelables, del substrato celular, tisular y de los órganos, relacionándolas con las causas que las producen y los trastornos funcionales que originan. La Anatomía Patológica se puede dividir en (Figura 1):

#### **2.1.1. Anatomía Patológica General**

**Estudia la lesión** propiamente dicha, las lesiones y mecanismos de reacción del organismo **independientemente del órgano** en el que se asienten relacionándola con el proceso que la ha producido.

Estudia **principios comunes a grupos de enfermedades**, que permiten elaborar una doctrina de validez universal. La alteración ocurrida lleva consigo un cambio en el substrato morfológico; este cambio puede caer en cualquiera de los constituyentes de los tejidos.

#### **2.1.2. Anatomía Patológica Especial o Sistémica**

También llamada de **Órganos o de Sistemas**, contempla el **estudio**, de manera sistemática, **de las lesiones**, teniendo en cuenta las modificaciones de estas alteraciones y las reacciones **según el órgano en el que radican**, relacionándolas con el cuadro clínico y con la causa de la enfermedad.

Tiene como objetivo primordial el **establecer patrones lesionales característicos** que permitan el diagnóstico y comprensión de los **diferentes procesos patológicos** que afectan a los animales de interés veterinario. Estudia las **bases fisiopatológicas y morfológicas de cada enfermedad en particular.**

### **2.1.3. Anatomía Patológica Clínica**

Se encarga del **diagnóstico a través de los análisis propios del laboratorio clínico**, e incluye Hematología analítica, Inmunología diagnóstica, Microbiología diagnóstica, Bioquímica o Química clínica, Citogenética y Genética Molecular.

Se encuentra directamente dirigida a la **verificación del estado de salud y a la solución de casos clínicos** de las diferentes especies animales de compañía, de producción, de laboratorio, fauna silvestre y aquellas empleadas en competencias deportivas.

### **2.1.4. Anatomía Patológica Experimental**

Además de **estudiar la lesión en sí**, analiza también cómo se ha constituido, **la cronología de las alteraciones y la evolución de las mismas.**

Esta disciplina busca primordialmente las causas y los mecanismos de la enfermedad, basándose en la experimentación a la vez que constituye uno de los planes fundamentales de la medicina moderna.

Para constituir una Patología es preciso provocar las enfermedades en los animales de experimentación y realizar los estudios pertinentes en diversos periodos de estas enfermedades, de esta manera **se podrá investigar "in vivo"** tanto las modificaciones de las propiedades fisiológicas de los tejidos como las alteraciones de los elementos y de los medios. Después, cuando el animal a investigar sea eutanasiado, habrá que realizar inmediatamente la **necropsia y realizar el estudio microscópico para llegar al diagnóstico anatomopatológico.**

### **2.1.5. Anatomía Patológica Comparada**

La **anatomía comparada es** la disciplina encargada del estudio **de las semejanzas y diferencias en la anatomía de los organismos.** La anatomía comparada forma parte de la **morfología descriptiva y es fundamental para la filogenia.**

El estudio de la histología normal de una determinada estructura en distintas especies animales puede ser de suma importancia para comprender mejor la estructura correspondiente en los individuos y por consiguiente sus alteraciones patológicas.

**Figura 1. Divisiones de la Anatomía Patológica**



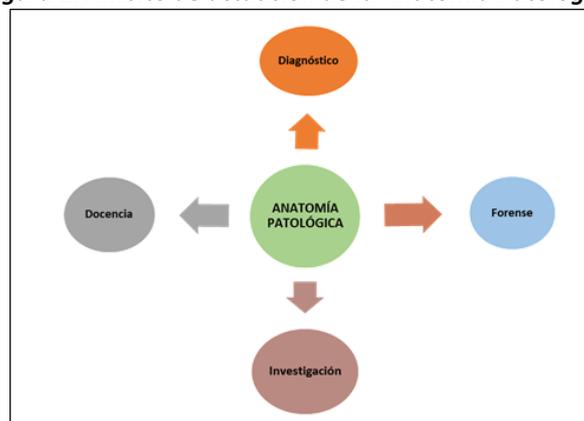
## 2.2. UTILIDAD

### 2.2.1. Ámbito de Aplicación

El objetivo principal de la anatomía patológica es interpretar los síntomas que pueden presentarse en un individuo a causa de una enfermedad o alteración. Se evalúa el daño o lesión que se tenga en un tejido o directamente en los órganos.

El ámbito de aplicación y las aplicaciones de la Anatomía Patológica abarca principalmente tres áreas (Figura 2):

**Figura 2. Ámbito de actuación de la Anatomía Patológica.**

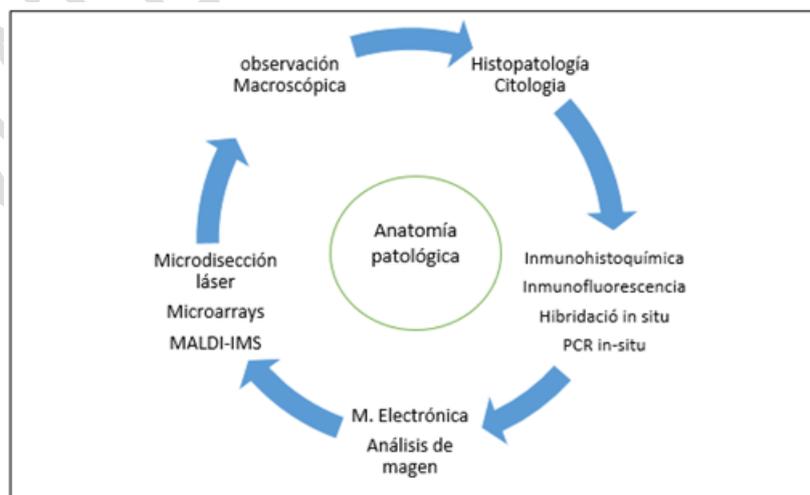


- **El diagnóstico anatomopatológico**, tanto en el **ámbito hospitalario como en los controles oficiales en el campo de la sanidad animal** realizando el diagnóstico rutinario de enfermedades infecciosas, parasitarias, nutricionales, etc. que se originan en los animales de compañía y de producción, bovino, porcino, pequeños rumiantes, aves y en la acuicultura.
- **La Docencia**, donde desempeña un papel fundamental en la formación de los pre y postgraduados, así como en la formación continuada.
- **La Investigación básica y clínica**, participando activamente en la **descripción patológica** de los fenómenos que se producen en el desarrollo de nuevas vacunas, así como en tratamientos farmacológicos, tanto de forma experimental como en explotaciones ganaderas, identificando los posibles efectos adversos de las mismas, así como apoyo en modelos experimentales de cáncer en su descripción histopatológica, mediante estudios inmunohistoquímicos y con la aplicación de nuevas herramientas.
- **Actividad Forense**, como parte de la Patología Veterinaria, ejerce su actividad en el **ámbito legal y judicial**; en casos de maltrato animal, robo de ganado, intoxicaciones, y delitos contra la fauna silvestre, desastres naturales que requieren una correcta y específica descripción del proceso, así como la verificación del bienestar animal o la realización de peritajes a instancias gubernamentales relacionadas con la protección animal y del medio ambiente.

### 2.2.2. Herramientas de Trabajo

La Anatomía Patológica cuenta con las siguientes herramientas para llevar a cabo sus objetivos (Figura 3):

**Figura 3. Anatomía patológica. Herramientas de trabajo**



### a. Observación Macroscópica

Consiste en el **examen de los tejidos dañados o enfermos**. Puede ser realizado **de forma directa** o con ayuda de una lente de magnificación o estereomicroscopio, especialmente cuando se examinan organismos parásitos.

Esto es importante para piezas grandes de tejidos u órganos porque la enfermedad puede ser identificada visualmente, y es más rápido.

También en este paso es en donde el patólogo selecciona áreas de este fragmento grande que serán procesados para pruebas posteriores de histopatología.

### b. Histopatología

Consiste en el examen **del tejido extraído por medio de una biopsia o una cirugía** que tras ser fijado en formol e incluido en parafina se realizan **cortes histológicos que son sometidos a técnicas histológicas de tinción para ser observados al microscopio óptico y proveer un diagnóstico específico basado en morfología**.

### c. Citología

Estudio que se realiza para **analizar una célula o un grupo de células** obtenidas **mediante**:

- Punción con aguja fina (PAF: sin aspiración): para tejidos frágiles como los ganglios linfáticos o muestras muy vascularizadas.
- Punción-aspiración con aguja fina (PAAF): generalmente para masas duras.
- Raspados: para piel, conjuntiva ocular.
- Hisopos: para oídos, superficie vaginal.
- Frotis, improntas: de lesiones externas o de muestras obtenidas en cirugías o necropsias.

Una vez obtenida la muestra, debe realizarse su extensión sobre un portaobjeto para obtener **una muestra en monocapa** y preservar la integridad de las células. Posteriormente se teñirán para su observación al microscopio óptico como para la histopatología.

### d. Inmunohistoquímica / Inmunofluorescencia

Es un procedimiento histopatológico basado en la **reacción antígeno-anticuerpo** que mediante la **utilización de anticuerpos** mono y/o policlonales y posteriormente revelados enzimáticamente o con fluorocromos, **permiten identificar marcadores antigénicos (proteínas) en los tejidos** embebidos en parafina para ser observados al microscopio óptico. Es muy útil para la detección de agentes infecciosos o caracterización de enfermedades y procesos tumorales.

#### e. Microscopía electrónica

El empleo de la microscopía electrónica es una herramienta de utilidad para el estudio y **caracterización a nivel ultraestructural de los patógenos** (bacterias, virus, parásitos...) causantes de las enfermedades.

#### f. Nuevas Tecnologías

##### - Análisis de imagen

Los microscopios están dejando lugar a enormes escáneres de alta resolución donde se obtienen imágenes digitales de los tejidos y las células lo que supone:

- Facilitar la tarea del patólogo, ya sea **segmentando y cuantificando el tejido tumoral**, como localizando y calculando el **número o la densidad de células** que hay en la muestra de tejido.
- El acceso a grandes **depósitos digitales** de portaobjetos de tejido de una enorme cantidad de imágenes con gran **valor en la docencia y en la investigación**.

##### - Microdissección por láser

El empleo de la microdissección con láser de captura en tejidos fijados en formol e incluidos en parafina, es una metodología reciente que **permite seleccionar diferentes poblaciones celulares específicas** libres de contacto y contaminación **preservando integridad del ADN, ARN y las proteínas** para su posterior estudio por genómica o proteómica.

##### - Microarrays de tejidos

Los microarrays o micromatrices de tejido son plataformas de alto rendimiento que permiten **el análisis de decenas a cientos de muestras de tejidos de forma simultánea**.

Se consigue ahorrar tiempo y materiales, el análisis es llevado a cabo en condiciones idénticas y estandarizadas sobre múltiples muestras, reduciendo la variabilidad de los experimentos.

Estas plataformas se construyen mediante la **obtención de biopsias cilíndricas a partir de decenas a cientos de bloques de parafina donantes**, las cuales son reincorporadas en un único bloque de parafina receptor.

Una sección obtenida a partir de esta matriz contiene pequeñas muestras de tejido representativas de los diferentes casos, sobre la cual se pueden aplicar las mismas técnicas que se usarían sobre una sección de tejido convencional en un portaobjetos, como por ejemplo la inmunohistoquímica.

### g. Técnicas de patología molecular

#### - Hibridación *in-situ*

Moléculas específicas de **ADN y ARN** pueden ser identificadas en secciones de tejidos utilizando esta técnica. Presenta la gran ventaja de permitir **correlacionar la detección de la presencia de ácidos nucleicos de los agentes patógenos con los hallazgos histopatológicos.**

#### - PCR *in-situ*

Consiste en **realizar la prueba de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) directamente sobre cortes de tejidos o extensiones citológicas** de forma que, posteriormente, se pueden detectar los productos de la PCR amplificados en el tejido donde se localiza el ADN (o ARN) original en la muestra, en lugar de utilizar un gel o una membrana.

#### - MALDI-IMS

La imagen de espectrometría de masas MALDI (MALDI-IMS) (*Imaging Mass Spectrometry*), es una **técnica de ionización** que utiliza una matriz de absorción de energía láser para crear iones a partir de moléculas grandes con una fragmentación mínima. Se emplea como una técnica de imagen de espectrometría de masas en la que la muestra, **una sección delgada de tejido, se mueve en dos dimensiones mientras se registra su espectro de masas.**

Se ha constituido como una poderosa herramienta para el **análisis molecular de secciones de tejido (preparaciones histológicas), proporcionando información sobre la distribución espacial y abundancia relativa de distintos componentes en esas secciones, permitiendo ahondar en la caracterización anatomopatológica.**

### 2.2.3. Aplicaciones en Sanidad Animal

La principal aplicación es el **diagnóstico anatomopatológico** de las enfermedades, neoplasias etc., mediante el reconocimiento de las lesiones tisulares características de cada una de ellas junto con la identificación de dianas o marcadores (Figura 4).

#### Figura 4. Aplicaciones de la Anatomía Patológica en Sanidad Animal

Viñetas:

(1) Observación Macroscópica. Peste porcina clásica. Bazo con múltiples infartos. Fuente: <http://apps.sanidadanimal.info/cursos/enfermedades-infecciosas-porcinas/1/1-ppc.htm>

(2) Histopatología: Scrapie. Vacuolización en el cerebro.

Fuente: <http://veteninf.50webs.com/bse/priones/priones2.htm>

(3) Inmunohistoquímica. Bazo de un cerdo con Circovirus porcino tipo 2. Fuente: Dr. Edward G. Clark, Prairie Diagnostic Services, Canadá.

(4) Microscopía electrónica. Célula infectada por el virus de la PPA: Fuente:

<https://www.3tres3.com/articulos/%C2%BFpara-cuando-la-vacuna-de-ppa-40170/>

(5) Microarrays de tejidos. Micromatriz de tejidos construida a partir de muestras de piel canina normal. Fuente: *Analecta Vet* 2017; 37 (1): 59 – 64.

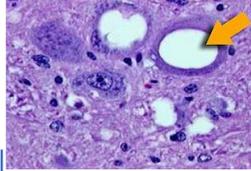
(6) Enfermedad de la mancha blanca. (P. Vannamei). Epitelio estomacal, hibridación *in situ* con sondas específicas para el virus. Fuente: *Rev. Ciencias Veterinarias*, Vol. 28, N° 2, [51-69], 2010.

### Observación Macroscópica(1)



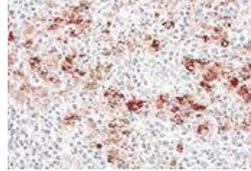
- **Observación de Parásitos.**
- **endoparásitos equinos:** (*Parascaris equorum*...)
- **Lesiones macroscópicas** (específicas/ inespecíficas)
- esplenomegalia, petequias, hemorragias, edemas, necrosis...

### Histopatología Citología (2)



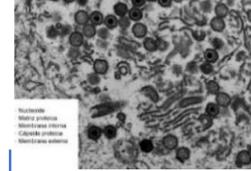
- Identificación de **parásitos, ácaros**
- **Bacterias:** Enfermedades de las abejas [*Paenibacillus Larvae* (Loque americana)]
- análisis de **sedimento urinario**
- **Descripción de estirpes celulares de neoplasias** (Sarcoma, Fibrosarcoma...)
- **Lesiones anatomopatológicas patognomónicas**
- EETs: pérdida neuronal, vacuolización, astrogliosis.
- PPA: Hipertrofia, hiperplasia y necrosis celular. Infiltración y deplección linfocitaria.

### IHQ / IIFI (3)



- **Reacción Ag-Ac. Identificación de marcadores antigénicos proteínas**
- **EETs:** Detección de la proteína priónica PrP<sup>Sc</sup>
- **Bacterias:** Listeriosis en bovino
- **Virus: Síndrome respiratorio y reproductivo (vPRRS):** identificación viral en distintas poblaciones de macrófagos

### M. Electrónica (4)



- fibrillas de *scrapie* (**Prión**)
- **inclusiones virales** (enfermedades de crustáceos...)
- **Agentes infecciosos** (Papovavirus, Adenovirus, Iridovirus, Poxvirus, Calicivirus, Birnavirus, Reovirus, Togavirus, Coronavirus, Ortomixovirus, Herpesvirus...)
- **Hongos** (*Histoplasma capsulatum*, *Candida* spp, *Trichophyton* spp...)
- **Hongos** (*Histoplasma capsulatum*, *Candida* spp, *Trichophyton* spp...)

### Nuevas Tecnologías (5)



- **Análisis de Imagen:**
  - Cuantificación de poblaciones celulares neoplásicas
  - Depósito digital de secciones de tejidos
- **Microdissección por láser:** Captura de poblaciones celulares de tumores para estudio genómico
- **Microarrays de tejidos:**
  - Análisis simultáneo de tejidos
  - Estandarización de los análisis y técnicas

### Patología Molecular (6)



- **Hibridación *in-situ*:**
  - Circovirus porcino tipo 2 (PCV2)
  - *Streptococcus agalactiae* en Tilapia (*Oreochromis* sp.)
- **Crustáceos** (Enfermedad de la mancha blanca, cabeza amarilla y Síndrome de taura)
- **PCR *in-situ*:** detección de secuencias de ADN en células
- **MALDI-IMS:**
  - Marcadores proteicos de enfermedad
  - Perfil proteico en lesiones proliferativas
  - Cambios proteicos prematuros como biomarcadores de neoplasias

### 3. NECROPSIAS

#### 3.1 DEFINICIÓN Y OBJETIVO

La palabra necropsia, proviene del **griego «νεκρός» (nekros) cadáver y «οψία (opsia) que quiere decir vista.** Se define como un **examen postmortem del cuerpo de un animal para determinar la causa de la enfermedad o de la muerte.**

La necropsia sigue siendo, hoy en día, el pilar fundamental de las enseñanzas médicas a todos los niveles, puesto que la necropsia es:

- El **reconocimiento y diagnóstico** de los distintos tipos de lesiones y **su asociación** con los **procesos patológicos.**
- La única demostración positiva de la **naturaleza, evolución de las enfermedades y de las causas inmediatas de la muerte.**

El Examen postmortem **evalúa** además de las **lesiones encontradas, la anamnesis, la reseña** del caso y los **resultados** que se obtienen de los **exámenes complementarios** que sean pertinentes.

**La anamnesis** constituye la recolección más completa y posible de datos, obtenido por parte del dueño y/o responsable de la de los animales, antes y durante la exploración del paciente, tanto si éstas se encuentran vivas como muertas.

**La reseña** también forma parte del protocolo de necropsia y abarca un conjunto de datos que identifican al paciente: nombre del propietario, especie, raza, línea sexo, edad, categoría, procedencia, etc.

La necropsia implica la disección reglada del animal y la realización de un examen macroscópico detallado de todos los sistemas orgánicos. **Se trata de la fuente principal de la Anatomía Patológica y sus fines son:**

- Facilitar información sobre enfermedades y determinar la causa de la muerte. **Valor diagnóstico.**
- Comprobar la eficacia del tratamiento. **Valor terapéutico.**
- Ser control para zoonosis. **Valor sanitario.**
- Servir como un medio de enseñanza. **Valor docente.**
- Resolución de problemas jurídicos/legales. **Valor Forense.**

#### 3.2. ETAPAS DE LA NECROPSIA

La necropsia debe **practicarse lo antes posible después de la muerte o sacrificio de los animales,** ya que la destrucción de los tejidos se acentúa con el paso de las horas, teniendo en cuenta que factores como la temperatura elevada aumentan los fenómenos de autólisis y putrefacción. Si la necropsia no puede hacerse inmediatamente, se deberá refrigerar el

cadáver, pero no se congelará, porque los cristales de hielo formados destruyen las estructuras tisulares.

Una vez se presenta la muerte del animal, se desencadenan alteraciones fisicoquímicas y morfológicas en los tejidos y células; estos cambios se conocen en general como **cambios postmortem**. Entre ellos algunos ocurren de manera temprana como:

- La rigidez cadavérica (**rigor mortis**), que consiste en una reacción contráctil de masas musculares antagónicas que se produce por la utilización energética aún existente en las células.
- La disminución de la temperatura (**algor mortis**).
- La palidez cadavérica (**palor mortis**), debida a un aporte insuficiente de sangre.
- La **autolisis** (autodegradación por enzimas de los tejidos).

Otros son un poco más tardíos, como la imbibición biliar y de hemoglobina, las rupturas, los desplazamientos viscerales post mortem y la **putrefacción** (descomposición por bacterias).

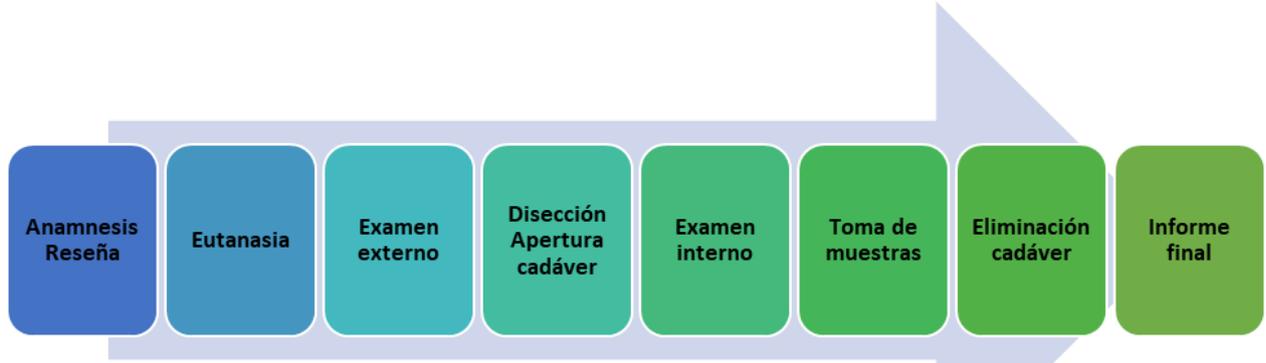
Todos los animales que son sometidos a una necropsia deben considerarse una fuente de infección para el resto de los animales y para el hombre. Por tal motivo **se deben tomar las medidas de bioseguridad** necesarias que eviten la diseminación de cualquier agente infectocontagioso fuera del área donde se realizará.

Así mismo, se deben emplear Equipos de Protección Individual (**EPIs**) como mono, calzado, guantes y gafa de protección y mascarillas autofiltrantes, etc. que protejan a los trabajadores de los riesgos biológicos y mecánicos asociados a esta actividad.

El instrumental utilizado debe limpiarse adecuadamente tanto antes como después de la necropsia, para evitar contaminaciones indeseables.

**La necropsia debe ser llevada a cabo siguiendo protocolos establecidos para que sea ordenada, sistemática y completa**, para así poder extraer la mayor cantidad de información posible del animal que permita determinar la causa de la muerte o la participación de una patología concreta. Las principales fases de una necropsia son (Figura 5):

**Figura 5. Etapas de una necropsia.**



### 3.2.1. Eutanasia

La eutanasia es el **acto de inducir la muerte sin dolor con la menor “angustia” para el animal que va a ser sacrificado**. En ocasiones hay que practicar la eutanasia de los animales antes de hacer una necropsia, tanto con fines diagnósticos como de investigación.

Se realizará mediante un método humanitario adaptado a cada especie. No existe un método ideal de eutanasia, las circunstancias son las que en cada caso van a determinar cuál es el más adecuado. En general, debe ser fiable, rápido, seguro, simple y económico, evitando la aparición de artefactos que enmascaren las posibles lesiones.

**El aturdimiento o insensibilización** es un procedimiento que provoca un estado inmediato de inconsciencia que se prolonga hasta la muerte. Mientras que el **sacrificio** es la muerte por sangrado. El aturdimiento ha de efectuarse antes del sacrificio, para provocar un estado de inconsciencia que evite sufrimientos inútiles.

Los métodos de eutanasia pueden ser de dos tipos, **físicos y químicos**:

- **Los métodos físicos** a su vez pueden ser **mecánicos y eléctricos**, aunque son utilizados en campañas de saneamiento y mataderos, pueden ser empleados en la sala de necropsias o en el campo. Pertenecen a ellos la pistola de clavija perforadora, la percusión y la dislocación cervical. Como método físico eléctrico se utiliza la electronarcosis.
- **Los métodos químicos**, son compuestos administrados **mediante inyección o por inhalación**. Su empleo es el que se recomienda para la eutanasia.

Para la administración de las sustancias inyectables, es preferible la vía intravenosa por su fácil aplicación y efecto más rápido y menos doloroso. Es recomendable la vía intracardiaca en animales comatosos y en estado de shock, en los que es difícil encontrar la vena. Si el animal es salvaje o agresivo, excitable o no se puede sujetar, se debe aplicar previamente un tranquilizante, que será diferente según la especie.

### 3.2.2. Examen externo

La inspección externa el animal se realizará previa a la apertura de cavidades, para ello, se debe colocar al animal sobre la mesa de necropsia en **posición decúbito lateral** derecho, valorándose su estado general (adelgazamiento, emaciación o caquexia), estado nutricional y la conformación anatómica. En el caso de rumiantes, se realizará en de cubito lateral izquierdo por lo voluminoso del rumen. En las aves es conveniente realizar un lavado previo del plumaje para evitar que las plumas interfieran en el campo visual.

Se evaluará la piel, pelaje, lesiones cutáneas, mucosas visibles, aberturas corporales posibles alopecias o erosiones, cambios de color, grosor y posible presencia de ectoparásitos, etc.

### 3.2.3. Disección (apertura del cadáver y extracción de órganos)

A continuación, se colocará al animal **en decúbito dorsal o supino activo** para realizar una incisión en la línea media ventral desde la sínfisis mandibular hasta el pubis.

Se comenzará a **separar la piel en caso toda su extensión**, desgarrando con una fuerte tracción con la finalidad de dejar al descubierto toda el área. Se debe realizar la inspección completa del tejido subcutáneo, los músculos o aparato locomotor. Posteriormente se procederá a la:

- **Apertura, examen y extracción de los órganos la cavidad abdominal** para evaluar el **aparato digestivo** incluyendo el hígado, bazo, rumen, retículo, omaso, abomaso e intestinos, en el caso de las aves hígado, bazo, buche, molleja, proventrículo, intestino y ciego.
- **Apertura, examen y extracción de los órganos de la cavidad pélvica.** Evaluar el **aparato genito-urinario**; el cual incluye: riñones, aparato reproductor y vejiga urinaria.
- **Apertura, examen y extracción de los órganos de la cavidad del cuello y el área torácica.** Incluye: lengua, faringe, esófago, tráquea, laringe, pulmones y corazón.
- **Apertura, examen y extracción de órganos de cavidad craneal y raquídea.** La apertura de la cavidad craneal se realiza con la ayuda de una sierra. Debido a la ubicación del encéfalo las líneas de apertura de esta cavidad varían según la especie de que se trate. Se analizará el contenido del **canal medular** y de **la médula ósea** el color, la consistencia y tras realizar cortes transversales nos fijaremos en la relación sustancia blanca, gris y simetría.

### 3.2.4. Examen Interno

Se debe evaluar la **presencia de alteraciones o anomalías** en lo que se refiere a: tamaño, grosor de membranas, transparencia, coloración, deformidades, edema, hematomas, petequias, hemorragias, congestión, necrosis etc., o cualquier lesión extraña.

**La descripción ha de ser objetiva, lo más precisa posible** y utilizando términos que se ajusten a lo observado. Se debería describir el **tamaño** del órgano, **peso, color, consistencia, olor y**

**superficie de corte.** Al describir una lesión es importante reflejar su localización anatómica exacta, y su **distribución** (focal, difusa, simétrica, bilateral...).

### 3.2.5. Exámenes adicionales o complementarios. Toma de muestras

A partir de los resultados obtenidos de la necropsia y de la anamnesis, y si las lesiones no son suficientemente específicas se considerará oportuno realizar análisis adicionales o complementarios para confirmar el diagnóstico; para lo cual deberá llevarse a cabo la toma de muestras como:

- **Muestras de sangre y suero;** se recomienda ser efectuadas antes de la eutanasia o inmediatamente después de la muerte del animal en tubos de vacío (tipo vacutainer®) con o sin anticoagulantes (EDTA, Heparina), dependiendo de las pruebas inmunológicas que se pretenda realizar. En caso de que se deba recolectar de un animal muerto, se recomienda extraerla del corazón o de la cavidad torácica, con el fin de evitar posibles contaminaciones.
- También pueden colectar **muestras de orina** mediante sonda urogenital que se conservarán refrigeradas.
- Además de esto, **se pueden recoger muestras de tejidos para estudios toxicológicos** con una muestra mínima de 50 g (por lo general hígado, riñón, así como contenido gastrointestinal).
- Es muy importante el envío de muestras para laboratorios oficiales en caso de sospechar una enfermedad infectocontagiosa, zoonótica o de declaración obligatoria.
- Para el **diagnóstico histopatológico**, las muestras recolectadas **de tejidos y órganos se** deben introducir en formaldehído al 4% y aproximadamente 10 veces el volumen de la muestra.
- En caso de realizar un **estudio microbiológico**, serán recogidas **secciones de tejido u órganos**. Las muestras recolectadas deben refrigerarse (4°C) desde su recolección hasta el envío al laboratorio. El material se puede introducir en bolsas estériles con cierre hermético o placas de Petri. En caso de **observar larvas de parásitos, se pueden conservar en alcohol al 7%**
- Se pueden enviar **heces, pelos, plumas**, entre otros, los cuales deberán enviarse en frascos limpios, bien cerrados, identificados y refrigerados. Pueden enviarse los parásitos completos conservándolos en alcohol al 70% o formol al 5%.

### 3.2.6. Eliminación de cadáver

Finalizada la necropsia, y para evitar posibles propagaciones o contaminaciones de la enfermedad, el cadáver del animal y los tejidos sobrantes, deben ser eliminados mediante su **incineración**.

Como norma general, los materiales desechables, como guantes, delantales y mascarillas etc., deberán eliminarse como residuos de riesgo biológico. El instrumental quirúrgico utilizado deberá lavarse con agua y jabón y posteriormente desinfectarse. El material corto punzante se depositará en contenedores específicos para objetos punzantes debidamente identificados.

### **3.2.7. Informe de necropsia**

De cada necropsia se realizará un informe, que consta de introducción, anamnesis, descripción de hallazgos macroscópicos y microscópicos, exámenes complementarios, diagnóstico y en su caso recomendaciones destinadas al propietario. Deberá llevar la fecha y firma del responsable del mismo.

Ha de tenerse en cuenta, que el diagnóstico que se hace tras la realización de la necropsia, a partir de las alteraciones macroscópicas, **es siempre presuntivo** ya que los hallazgos y las lesiones pueden no ser suficientemente específicas y requiere su confirmación mediante el diagnóstico histopatológico y los resultados de las pruebas complementarias pertinentes.

**Al final, si es posible, se debe indicar el diagnóstico definitivo y hacer una discusión del caso, coordinando el informe clínico con el diagnóstico anatomopatológico y los resultados de las pruebas especiales o complementarias.**

## **BIBLIOGRAFÍA**

**A. Méndez. L. Carrasco et al. (1997). Evolución histórica de la Anatomía Patológica.** Dpto. de Anatomía y Anatomía Patológica Comparadas. Facultad de Veterinaria de Córdoba. Anales de la Real Academia de Ciencias Veterinarias de Andalucía Oriental, ISSN 1130-2534, págs. 67-82.

Thomson, R. G. (1986). **Anatomía patológica General Veterinaria.** Editorial: Acribia.

A. Gázquez y MA. Sierra. (2012). **Anatomía Patológica Sistémica Veterinaria.** Editorial: librería Técnica Figueroa-2.

L. Núñez Ochoa y J. Bouda. (2007). **Patología Clínica Veterinaria.** Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia.

G. Cantón y E. Odriozola. (2019). **Técnica de necropsia de rumiantes. Recolección de muestras para laboratorios de diagnóstico veterinario.** INTA Ediciones.

BR Moreno Cardenti, G. Flores Ortiz, MP Sandoval Guzmán. (2006). **Manual de Técnicas de Necropsia Patología General.** Departamento de Ciencias de salud Animal. Universidad Nacional Autónoma de México.

A. Morales Briceño, A. Lamprea Garrido, A. García Hermoso, A. Méndez Sánchez. (2017). **La necropsia en campo: un servicio agregado en la medicina veterinaria rural.** Rev. Med. Vet.

**MATERIAL PARA LA PREPARACIÓN DEL TEMA 30**

**ELECTROFORESIS: CONCEPTO, TIPOS Y APLICACIONES EN  
LABORATORIOS DE SANIDAD ANIMAL Y GENÉTICA ANIMAL.**

*Este material no tiene carácter oficial, por lo que en ningún caso vinculará al Tribunal Calificador. Constituye, únicamente, un instrumento complementario que servirá de apoyo al opositor para enfocar cada uno de los epígrafes, pero nunca de forma exclusiva ni excluyente. El Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación no se hace responsable del contenido del mismo.*

*Los materiales no serán objeto de actualización constante.*

## **ÍNDICE**

### **1. FUNDAMENTOS**

### **2. ELEMENTOS DE LA ELECTROFORESIS**

2.1. CUBETA

2.2. FUENTE DE ALIMENTACIÓN

2.3. SOPORTE

2.4. MUESTRA

2.5. TAMPÓN

### **3. ETAPAS DE LA ELECTROFORESIS**

3.1. SIEMBRA

3.2. CORRIDA

3.3. REVELADO

### **4. TIPOS DE ELECTROFORESIS:**

4.1. ELECTROFORESIS EN GEL DE AGAROSA

4.2. ISOELECTROENFOQUE.

4.3. ELECTROFORESIS BIDIMENSIONAL

4.4. ELECTROFORESIS DE CAMPO PULSANTE

### **5. APLICACIONES EN LABORATORIOS DE SANIDAD Y GENÉTICA ANIMAL**

5.1. DETERMINACIÓN DE LA MASA MOLECULAR.

5.2. DETERMINACIÓN DEL PUNTO ISOELÉCTRICO.

5.3. ISOENZIMAS.

5.4. MAPAS DE RESTRICCIÓN

5.5. SECUENCIACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS.

5.6. APLICACIONES EN LOS LABORATORIOS DE SANIDAD Y GENÉTICA ANIMAL

## 1. FUNDAMENTOS

La electroforesis es una técnica de separación de partículas. Se basa en el movimiento de partículas cargadas a través de una solución, bajo la influencia de un campo eléctrico.

Todo campo eléctrico posee:

- Un electrodo negativo o cátodo hacia donde migran las partículas cargadas positivamente.
- Un electrodo positivo o ánodo hacia donde migran las partículas cargadas negativamente.

Las partículas con carga neutra permanecerán estacionarias, no migrarán. Por lo tanto, es un campo eléctrico creado por los dos electrodos el que posibilita que haya electroforesis.

La migración en la electroforesis va a depender de diferentes parámetros:

- La diferencia de potencial o V: se mide en voltios y generalmente se aplica una diferencia de potencial de bajo voltaje, entre 10 y 500 voltios. Pero, según los casos se puede aplicar una diferencia de potencial de alto voltaje, entre 500-1000 voltios. Hay que tener en cuenta que a mayor voltaje mayor velocidad de migración.

- Intensidad o I: se mide en amperios y cuantifica el flujo de carga eléctrica. Está relacionado con la diferencia de potencial a través de la LEY de OHM:  $V = I \times R$ .

Para una diferencia de potencial dada, viene determinado su valor, entre 5 y 50 mA, multiplicado por la resistencia del soporte. Este valor da cuenta de la distancia recorrida por la muestra.

- Resistencia o R: se mide en ohmios. Ésta va a depender de la naturaleza del soporte, de sus dimensiones (anchura, longitud y sección) así como de la concentración del tampón de electroforesis. A mayor resistencia del soporte menor será la movilidad electroforética.

- Temperatura: El paso de la corriente eléctrica produce calor debido al efecto Joule. El efecto será mayor cuanto mayor sea la diferencia de potencial y la resistencia del sistema. La temperatura ha de ser controlada estrictamente por que puede desnaturalizar la muestra, afectar al soporte y afectar al equipo electroforético.

- 

## 2. ELEMENTOS DE LA ELECTROFORESIS

### 2.1. CUBETA

La cubeta suele ser de metacrilato y con capacidad suficiente para añadir el tampón y el soporte donde van a correr las muestras. También ha de disponer de dos lugares donde se ha de conectar el ánodo y el cátodo. Hay diferentes tamaños y disposiciones según se realice una electroforesis horizontal o vertical.

## 2.2. FUENTE DE ALIMENTACIÓN

Va a proporcionar el voltaje y el amperaje suficiente para crear el campo eléctrico. Ambos parámetros son regulables. Suelen tener también la posibilidad de regular el tiempo que está funcionando.

## 2.3. SOPORTE DE LA ELECTROFORESIS

Se precisa para que la situación de la muestra en el campo eléctrico sea estable. Es decir, para que contrarreste el **efecto de difusión** (la muestra no va de un polo a otro sino también hacia los dos lados) y de las posibles **corrientes de convección** (debido al calentamiento, por los diferentes gradientes de temperatura).

Se suelen usar RETICULADOS MOLECULARES que forman un entramado tridimensional que impide o reduce dicha difusión y permite la entrada de agua en sus poros.

Las características de un soporte ideal son:

- Debe ser químicamente inerte.
- No debe tener grupos ionizados.
- No debe interferir en el sistema de revelado.
- Debe ser consistente y homogéneo.
- Estable y barato.

El soporte influye en la electroforesis debido a 3 fenómenos:

- Adsorción: retención inespecífica de las moléculas de la muestra en el soporte que afecta negativamente al resultado ensanchando las bandas.
- Electroendósmosis: se produce mayormente en los no restrictivos. Aparecen cargas negativas debido a los grupos carboxilo o sulfato que afectan a la electroforesis.
- Tamizado molecular: Debido al tamaño del poro pasarán mejor o peor.

Hay diferentes tipos de soportes:

### 1. Según su composición

- **Papel:** sencillo, pero con elevada adsorción debido a los grupos hidroxilo de la celulosa. En desuso.
- **Acetato de celulosa:** los grupos –OH están acetilados, lo que reduce la adsorción; baja tinción de fondo; es posible transparentarla o disolverla para detectar y recuperar, respectivamente, los componentes separados.
- **Almidón:** pasta de almidón cuyos granos se han disgregado en un tampón caliente (se hinchan). Actualmente se utiliza poco, ha sido sustituido por la poliacrilamida.
- **Agarosa:** polisacárido, producto purificado de algas (composición similar al agar-agar). Se disuelve en caliente (50-60°C) y al enfriar solidifica formando un gel, de alta porosidad.

- **Poliacrilamida:** el gel es el resultado de la polimerización química de una mezcla de acrilamida y bisacrilamida. Regulando la concentración y proporción de ambas se consiguen distintas porosidades, siempre menores que la de los geles de agarosa.
- **Agarosa+poliacrilamida:** se consigue una porosidad intermedia.
- **Poliacrilamida con SDS:** el dodecilsulfato sódico (*Sodium Dodecyl Sulphate*; sinónimo: laurilsulfato sódico) es un detergente aniónico que se une a las proteínas, desnaturalizándolas en una conformación extendida recubierta de moléculas de SDS. Como consecuencia, el tamaño de la molécula de proteína es directamente proporcional a su longitud en aminoácidos y su carga queda enmascarada por la mayor carga del SDS que la recubre, que es también proporcional a la longitud. Por lo tanto, la movilidad electroforética de la proteína depende **exclusivamente** de su masa molecular

## 2. Según su modo de disposición

- **Horizontal**

En papel, para aminoácidos u otras moléculas pequeñas; en soportes similares (especialmente, acetato de celulosa), para proteínas.

En gel de almidón o de agarosa, para proteínas y especialmente para ácidos nucleicos. Casi siempre el tampón cubre el gel (para evitar que se seque debido al calentamiento sufrido al pasar la corriente), denominándose por ello “electroforesis submarina”.

El soporte se impregna por capilaridad de disolución tampón, que disuelve la muestra y mantiene el contacto eléctrico.

Se aplica la muestra depositándola (con pipeta o un aplicador específico) como una gota sobre el soporte (papel, acetato de celulosa) o dentro de un “pocillo” creado en el gel.

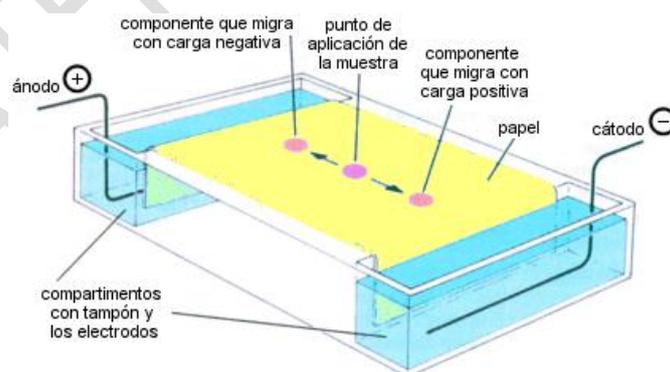


Imagen 1: Soporte horizontal (Fuente: Electroforesis de proteínas y ácidos nucleicos. Biomodel)

- **Vertical**

Se usa casi exclusivamente con gel de poliacrilamida (más resistente físicamente, no se desliza), para proteínas o para ácidos nucleicos de pequeño tamaño.

El gel puede rellenar tubos de vidrio (este formato ya apenas se usa) o estar contenido entre 2 placas rectangulares.

Contacto eléctrico y disolvente gracias al tampón que embebe el gel y llena las cubetas o compartimentos del ánodo y cátodo.

La muestra se deposita con micropipeta llenando un “pocillo” creado al polimerizar el gel.

En cuanto a la composición del gel hay dos variantes: electroforesis continua (un solo tipo de gel) y electroforesis discontinua (2 tramos de gel de composición ligeramente diferente).

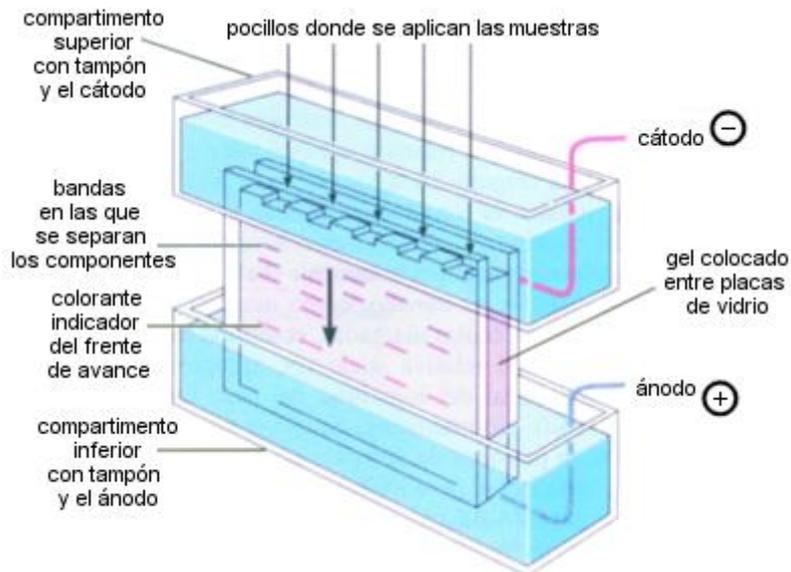


Imagen 2: Soporte vertical (Fuente: Electroforesis de proteínas y ácidos nucleicos. Biomodel)

### 3. Según su oposición al paso de las partículas

- **Tipo1: Soportes no restrictivos.**

En este tipo de soportes el tamaño del poro no se opone al paso de las moléculas. Este tipo de soporte suele ser de AGAR y pueden ser:

- AGAROPLECTINA: que posee grupos cargados (carbonilo y sulfato) Producen efecto electroendosmótico.
- AGAROSA: que es la más usada para separar ácidos nucleicos. Hay muchos tipos de agarosa que se diferencian por su punto de fusión (entre 35 y 95º), su resistencia física y su grado de electroendosmosis.

El tamaño del poro va a depender de la concentración de agarosa empleada en la disolución. Y así, a mayor concentración de agarosa menor tamaño del poro.

- **Tipo2: Soportes restrictivos.**

A este tipo de soporte pertenecen los geles de poliacrilamida, en el que el tamaño del poro opone resistencia al paso de las moléculas.

Este tipo de geles evita la convención, minimiza la difusión, participa en proceso de separación ya que la separación electroforética va a depender de la densidad de carga de las moléculas y de su tamaño.

#### **2.4. MUESTRA**

Esta técnica es muy utilizada para separar fragmentos de ácidos nucleicos, así como de proteínas.

La movilidad de la muestra será mayor cuanto mayor sea la carga de la misma. Sin embargo, cuanto mayor sea el tamaño de la muestra menor será la movilidad debido a que la fricción con el medio es mayor. Las moléculas globulares se moverán también mejor puesto que presentan menor superficie. Las moléculas con igual carga y tamaño con diferente disposición o forma se moverán a diferente velocidad

#### **2.5. TAMPÓN**

Es el líquido sobre el que descansa el gel y que baña todos los elementos de la electroforesis.

Durante la electroforesis se produce la electrolisis del agua que hace que se liberen protones en el ánodo (se acidifica) y grupos hidroxilo en el cátodo (se basifica). El tampón ayuda a mantener el pH del medio, así como la conductividad. El tampón debe ser preparado adecuadamente con el fin de que se equilibre solo el medio y no interfiera en el proceso. Generalmente se usan tampones con fuerza iónica moderada de 0,05-0,1 M.

### **3. ETAPAS DE LA ELECTROFORESIS**

Consta de tres fases:

#### **3.1. SIEMBRA.**

La muestra se dispone inicialmente en una pequeña zona del soporte. Si el soporte es de agarosa se ha de preparar con anterioridad. Para ello se utiliza agua destilada y desionizada y agarosa en polvo. La concentración de agarosa dependerá del tamaño de las partículas que queramos separar.

Se diluye la agarosa en el agua y se lleva a ebullición. Se deja enfriar y se puede añadir el agente para el revelado. Se deposita en un molde y se colocan los peines para hacer los soportes para las muestras. El gel de agarosa va a la nevera a 4°C hasta que solidifique.

Antes de introducirlo en la cubeta de electroforesis el gel es retirado de su molde y se retiran, igualmente, los peines que han definido los pocillos para las muestras.

La cubeta se llena con el tampón y se cargan las muestras que irán con una sustancia teñida como el azul de bromofenol para hacer más fácil la colocación en los pocillos del gel. Si el soporte es de poliacrilamida

### 3.2. CORRIDA

Una vez que tenemos las muestras en el gel se conectan los polos de la fuente de alimentación y se pone en funcionamiento regulando el voltaje/amperaje y el tiempo.

### 3.3. REVELADO

Se utilizan diversas sustancias. Se pueden emplear sustancias coloreadas o fluorescentes que se unan a las proteínas o los ácidos nucleicos. En el primer caso suelen ser colorantes orgánicos que interactúan con las proteínas de forma poco selectiva, principalmente electrostática. El azul brillante de Coomassie, el negro amido o el rojo Ponceau son tres ejemplos comunes.

Para los ácidos nucleicos se usa el azul de metileno o, más frecuentemente, compuestos fluorescentes e intercalantes, como el bromuro de etidio. Un compuesto intercalante es aquél que se introduce entre los pares de bases apilados del DNA. En la actualidad está en desuso por ser un compuesto cancerígeno. Para el revelado de ADN se utiliza Sybr Safe o Sybr Green. El Sybr Safe es un colorante de cianina utilizado como tinte de ácido nucleico en biología molecular y se une al ADN. El complejo resultante de ADN colorante absorbe la luz azul y emite luz verde.

Otras técnicas de tinción son:

- Ensayo enzimático: si entre las moléculas separadas hay una enzima, se puede detectar añadiendo sus sustratos (naturales o sintéticos) y sus cofactores, y detectando la aparición del producto, generalmente coloreado.
- Autorradiografía: tanto proteínas como ácidos nucleicos pueden marcarse isotópicamente previamente a la electroforesis, en cuyo caso la detección se hace mediante autorradiografía del gel.
- Inmunoensayo (*Western*): En caso de disponer de ellos, los anticuerpos permiten la detección selectiva del componente de interés (proteína o grupo marcador unido químicamente a la proteína o al ácido nucleico antes de la electroforesis). La permeabilidad de los geles para el acceso del anticuerpo es limitada, por lo que se hace una transferencia de las moléculas separadas en el gel hacia una membrana de nitrocelulosa o de nailon, la cual se somete luego a la disolución que contiene el anticuerpo. El wester-blot es utilizada como método de confirmación de encefalopatías espongiiformes transmisibles.
- Detección de ácidos nucleicos con sondas (*Southern y Northern*): Las moléculas con una secuencia determinada de nucleótidos se pueden detectar mediante hibridación con sondas específicas, pequeñas moléculas de ácido nucleico monocatenario (oligonucleótidos) con la secuencia complementaria a la buscada y marcadas con un isótopo radiactivo, un grupo fluorescente, etc. Para llevar a cabo con éxito la hibridación se requiere también la transferencia desde el gel a una membrana de nitrocelulosa o nailon.

## 4. TIPOS DE ELECTROFORESIS

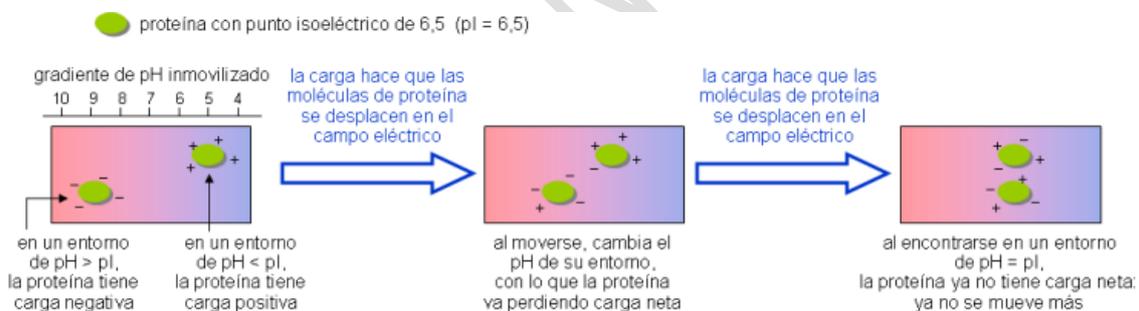
### 4.1. ELECTROFORESIS EN GEL

La **electroforesis en gel** es un grupo de técnicas empleadas para separar moléculas basándose en propiedades como el tamaño, la forma o el punto isoeléctrico. La electroforesis en gel es la más comúnmente usada en los laboratorios y tiene muchas utilidades.

Su esquema de funcionamiento y disposición se ha usado en este tema como ejemplo para definir los elementos de la electroforesis, así como sus etapas.

### 4.2. ISOELECTROENFOQUE

También se llama enfoque isoeléctrico o IEF, de *isoelectrofocusing*. Se trata de una variante de electroforesis en la que el gel (poliacrilamida) posee un gradiente de pH fijado en su estructura. Esto se consigue incluyendo en su preparación moléculas ionizables con valores de pK diferentes. Como consecuencia, al avanzar los componentes de la muestra a lo largo del gel se encuentran en entornos de pH diferente, y eventualmente alcanzan una región en la cual el pH local es igual al punto isoeléctrico de la molécula muestra y, en consecuencia, ésta detiene su avance. Se alcanza, pues, un equilibrio y se consigue la separación de los componentes de la muestra de acuerdo con su punto isoeléctrico, que además se puede medir, pues se conoce la geometría del gradiente de pH fijado al gel.

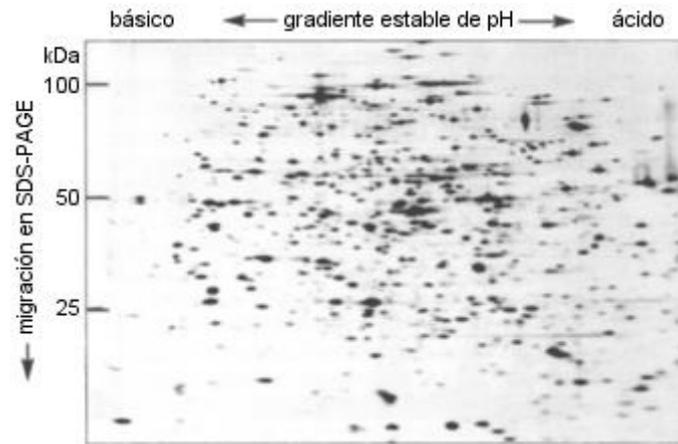


### 4.3. ELECTROFORESIS BIDIMENSIONAL

Tras realizar una primera separación su resultado se somete a otra de diferente mecanismo en dirección perpendicular. Generalmente la primera es un isoelectroenfoco en un gel cilíndrico estrecho que luego se coloca como muestra para una SDS-PAGE. SDS-PAGE es el acrónimo en inglés de *sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis* (electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico). Es una técnica ampliamente utilizada en bioquímica, genética, biología molecular y ciencia forense para separar las proteínas de acuerdo a su movilidad electroforética (en función de la longitud de la cadena polipeptídica, masa molecular, modificaciones postraduccionales y otros factores). Gracias al SDS las proteínas se desnaturalizan, perdiendo su conformación tridimensional. De este modo se obtiene un fraccionamiento que obedece a: la diferencia de peso; la longitud de

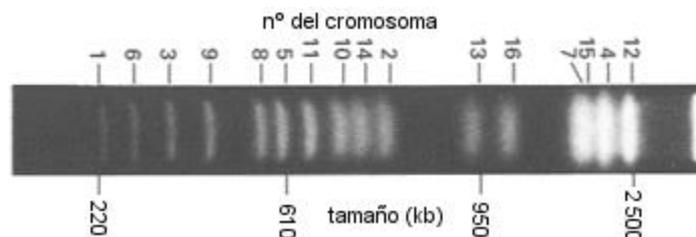
la cadena (tamaño); y la forma de la proteína. Es el método de electroforesis empleado con mayor profusión para analizar proteínas.

Se obtienen así mapas complejos de bandas, muy característicos de cada muestra, cuya utilidad principal es la comparación con el obtenido de otra muestra similar pero conocida.



#### 4.4. ELECTROFORESIS DE CAMPO PULSANTE

Las moléculas o fragmentos de ADN de longitud superior a 20-40 kb no se pueden resolver (separar) empleando la electroforesis convencional en gel de agarosa. Esto se debe, en primer lugar, a la dificultad de manejo de los gels preparados con las bajas concentraciones de agarosa que requerirían (inferior al 0,4%). Además, las moléculas de ADN, que adoptan una conformación más o menos globular, poseen un tamaño excesivamente grande para atravesar los poros del gel y no se separan en función de su tamaño. Para solventar este problema se ha ideado una modificación de la técnica, conocida como **electroforesis de campo pulsante** (o pulsado, *pulsed-field gel electrophoresis* PFGE). Se emplean gels de agarosa al 1%, pero se altera periódicamente la orientación del campo eléctrico aplicado, activando alternativamente dos pares de electrodos. El frecuente cambio de dirección del campo eléctrico consigue que las moléculas se desplieguen y avancen a través de los poros en conformación extendida. A mayor tamaño, se reorientan con más dificultad, por lo que avanzan más despacio.



Así se consigue separar fragmentos de ADN de hasta varias megabases, lo que supone un avance significativo, pero aún no sirve para estudiar los cromosomas humanos enteros (de 50 a 250 Mb cada uno). Sí se han podido analizar así los cromosomas de levadura (figura arriba).

Las muestras han de contener el ADN sin fragmentar, por lo que se requiere una preparación especial (al purificar el ADN por los métodos habituales se fragmenta por debajo de 100 kb). Para obtener preparaciones con los cromosomas intactos se mezclan las células con agarosa caliente (37°C) y se vierte en pequeños moldes de unos milímetros, de forma que al solidificarse la agarosa (4°C) forma bloques (“insertos”) que incluyen las células intactas. En éstos se realiza la lisis celular y la digestión de las proteínas (p.ej., con EDTA, SDS y proteinasa K, que difunden a través de los poros del gel) sin que se alteren las grandes moléculas de ADN. Tras una diálisis para eliminar los restos de la digestión, se consigue un bloque de agarosa con el DNA intacto en su interior, y se deposita el bloque entero en un pocillo del gel de electroforesis.

## **5. APLICACIONES**

### **5.1. DETERMINACIÓN DE LA MASA MOLECULAR**

Se puede obtener una estimación de la masa molecular (en kDa) de proteínas empleando SDS-PAGE, y de fragmentos de ADN (en pb) empleando electroforesis en agarosa. En ambos casos, en uno de los pocillos del gel se carga una mezcla de moléculas patrón de tamaño conocido, con el fin de poder trazar la curva de calibrado. Para las proteínas, la validez del dato obtenido depende de que la desnaturalización con SDS haya sido completa y de que se hayan separado las subunidades gracias a la reducción con mercaptoetanol; además, la presencia de oligosacáridos en las glicoproteínas altera la movilidad, que ya no proporciona valores de masa molecular fiables.

La electroforesis en gel de agarosa es utilizada en la detección de agentes causales de ciertas enfermedades. Por ejemplo, para la Toxoplasmosis en conejos y liebre existe un procedimiento donde se utilizará este tipo de geles que permiten la separación de moléculas de ADN amplificadas en PCR junto con un patrón de pares de bases que indicará el tamaño (en pares de bases) del fragmento de ADN. De esta manera, se puede diagnosticar cualquier enfermedad cuya secuencia de su ácido nucleico sea conocido. Es la base principal en el diagnóstico de enfermedades en Sanidad animal en la actualidad, aunque se esté sustituyendo por la PCR en tiempo real en donde no se requiere este tipo de electroforesis.

### **5.2. DETERMINACIÓN DEL PUNTO ISOELÉCTRICO**

Mediante isoelectroenfoque se obtiene una medida del punto isoeléctrico de las proteínas (pH<sub>i</sub> o pI).

Para la identificación de especies se utilizan métodos de electroforesis y isoelectroenfoque, así como variantes de estos procedimientos, especialmente donde las especies individuales de carne o pescado son de interés.

Desde hace años la identificación de especies para alimentos ha cobrado mayor importancia, esto se debe a la desconfianza que tiene el consumidor en el origen, composición y procesamiento de los alimentos.

Para identificar las proteínas miofibrilares: miosina, actina,  $\alpha$ -actinina, tropomiosina y troponina, la SDS-PAGE es una buena opción, utilizado para diferenciar entre distintas especies de pescados de valor nutritivo y económico muy diferente, como en los distintos tipos de atún, merluzas o incluso entre diferentes especies.

### 5.3. ISOENZIMAS

Las variantes de una enzima, con pequeñas diferencias en su estructura y en su actividad enzimática, se analizan rutinariamente mediante electroforesis o, en especial, mediante isoelectroenfoque. De hecho, los nombres de las isoenzimas derivan a veces de su movilidad electroforética. Se puede aplicar análogamente a las *isoformas* de proteínas no enzimáticas.

### 5.4. MAPAS DE RESTRICCIÓN

Una de las formas de estudiar la secuencia de los ácidos nucleicos, en especial el DNA, consiste en tratarlo con distintas enzimas de restricción, analizar mediante electroforesis en gel de agarosa los fragmentos resultantes e intentar reconstruir la secuencia de la molécula original formando su *mapa de restricción*, uno de los tipos de mapa físico.

Este método que permite obtener, mediante la utilización de enzimas de restricción unas secuencias de ADN determinadas, un patrón de bandas. Los patrones de bandas de diferentes muestras son comparados con patrones de referencia y se obtiene un porcentaje de similitud a una determinada cepa. Es método es utilizado para conocer el origen de cualquier enfermedad durante las investigaciones epidemiológicas, en las toxiinfecciones alimentarias o en la determinación de aquellas bacterias con resistencias antimicrobianas.

Así mismo se han utilizado, por ejemplo, en la detección del uso fraudulento de carnes de caballo en preparados comerciales que no lo incluyen en el etiquetado.

### 5.5. SECUENCIACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS

La obtención de la secuencia completa, nucleótido a nucleótido, también depende del análisis electroforético de fragmentos de DNA, tanto en el método químico de Maxam y Gilbert como en el método enzimático de Sanger. Se utilizan en este caso geles de poliacrilamida, debido al tamaño pequeño de los fragmentos, pudiéndose resolver fragmentos que se diferencian en un solo nucleótido y se denomina electroforesis capilar.

Hay muchas utilidades para este tipo de electroforesis, entre ellas la detección de mutaciones anómalas en el Scrapie o la identificación de especies en una muestra fraudulenta.

Asi mismo mediante el empleo de marcadores moleculares basados en microsatélites y posterior separación por electroforesis capilar podemos determinar la filiación de un determinado animal con un alto valor económico. Igualmente, la electroforesis es utilizada como parte de la determinación de la variabilidad genética de una población con el fin de

mantener aquellos recursos zoogenéticos de gran interés productivo o cultural para el mantenimiento o recuperación de una especie

## **5.6. APLICACIONES EN LABORATORIOS DE SANIDAD Y GENÉTICA ANIMAL**

Las aplicaciones de la electroforesis más frecuentes en los laboratorios de Sanidad y genética animal son:

### **5.6.1. Identificación de los agentes causales de una enfermedad.**

La electroforesis en gel de agarosa es utilizada para la separación de moléculas de ADN amplificadas en la **reacción en cadena de la polimerasa o PCR** junto con un patrón de pares de bases que nos indicará cuantos pares de bases tiene nuestra muestra amplificada de ADN. De esta manera, podemos diagnosticar cualquier enfermedad cuya secuencia de su ácido nucleico sea conocido. Es la base principal en el diagnóstico de enfermedades en Sanidad animal en la actualidad, aunque se esté sustituyendo por la PCR en tiempo real en donde no se requiere de la electroforesis del ácido nucleico amplificado ya que su identificación se produce en el mismo momento que se amplifica por medición de la fluorescencia emitida.

El **western-blot** que es una inmunoelectroforesis es utilizada como método de confirmación de encefalopatías espongiformes transmisibles donde las muestras

### **5.6.2. Tipificación de distintas especies bacterianas mediante RFLP con enzimas de restricción.**

Es un método que permite obtener, mediante la utilización de enzimas de restricción que corta una secuencia de ADN determinada, un patrón de bandas por electroforesis de campo pulsado. Los patrones de bandas de diferentes muestras son comparados entre si y con patrones de referencia y se da un porcentaje de similitud a una determinada cepa. Este método es utilizado para conocer el origen de cualquier enfermedad durante las investigaciones epidemiológicas, en las toxiinfecciones alimentarias o en la determinación de aquellas bacterias con resistencias antimicrobianas. En actualidad, esta técnica está siendo sustituida por métodos moleculares de secuenciación masiva.

### **5.6.3. En la Identificación de especies.**

Para la identificación de especies se utilizan métodos de electroforesis y isoelectroenfoque, así como variantes de estos procedimientos, especialmente donde las especies individuales de carne o pescado son de interés. Desde hace años la identificación de especies para alimentos ha cobrado mayor importancia, esto se debe a la desconfianza que tiene el consumidor en el origen, composición y procesamiento de los alimentos.

Los análisis de identificación de especies tienen como objetivo el autenticar al alimento, característica importante para consumidores con requerimientos especiales, tal es el caso de personas con ciertas creencias religiosas, quienes desean estar seguros que sus alimentos están libres de partes animales restringidas para su consumo. También es importante para los

que padecen alergia a la carne de algún tipo de animal, o incluso si se sospecha que el producto es ilegal, pues el origen de la carne puede ser de alguna especie protegida o en peligro de extinción, finalmente, también puede servir para identificar fraudes en alimentos, certificando que el producto realmente está elaborado con la carne que se declara.

Para identificar las proteínas miofibrilares: miosina, actina,  $\alpha$ -actinina, tropomiosina y troponina, la SDS-PAGE es una buena opción, utilizado para diferenciar entre distintas especies de pescados de valor nutritivo y económico muy diferente, como en los distintos tipos de atún, merluzas o incluso entre diferentes especies.

#### **5.6.4. En el estudio de variabilidad genética y control de paternidad.**

Mediante el empleo de marcadores moleculares basados en microsatélites y posterior separación por electroforesis capilar podemos determinar la filiación de un determinado animal con un alto valor económico. Igualmente, la electroforesis es utilizada como parte de la determinación de la variabilidad genética de una población con el fin de mantener aquellos recursos zoogenéticos de gran interés productivo o cultural para el mantenimiento o recuperación de una especie.

#### **5.6.5. Genotipado de especies resistentes a determinadas enfermedades.**

Como ocurre en la determinación de aquellas razas de ovejas resistentes a la enfermedad de Scrapie dentro del grupo de enfermedades denominadas encefalopatías transmisibles. Mediante la prueba de PCR se detectan aquellas razas de ovino que presentan la secuencia en el codón del gen de la proteína priónica más resistente a padecer Scrapie que es posteriormente evidenciada mediante electroforesis capilar.

**BIBLIOGRAFIA**

Técnicas de electroforesis

<https://docplayer.es/165310300-Tecnicas-de-electroforesis.html>

Electroforesis de proteínas y de ácidos nucleicos

<http://biomodel.uah.es/tecnicas/elfo/inicio.htm>

MATERIAL NO OFICIAL

**MATERIAL PARA LA PREPARACIÓN DEL TEMA 31**

**REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR): CONCEPTO, TIPOS Y APLICACIONES EN LOS LABORATORIOS DE SANIDAD Y GENÉTICA ANIMAL.**

*Este material no tiene carácter oficial, por lo que en ningún caso vinculará al Tribunal Calificador. Constituye, únicamente, un instrumento complementario que servirá de apoyo al opositor para enfocar cada uno de los epígrafes, pero nunca de forma exclusiva ni excluyente. El Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación no se hace responsable del contenido del mismo.*

*Los materiales no serán objeto de actualización constante.*

## **ÍNDICE**

### **1. INTRODUCCIÓN**

### **2. FUNDAMENTO**

### **3. COMPONENTES DE LA PCR**

### **4. OTROS ASPECTOS A TENER EN CUENTA**

### **5. ETAPAS DE LA PCR.**

5.1. INICIO

5.2. CICLOS DE PCR

5.3. ELONGACIÓN FINAL

5.4. CONSERVACIÓN

### **6. TIPOS DE PCR.**

6.1. PCR CONVENCIONAL

6.2. PCR ANIDADA

6.3. PCR MÚLTIPLE

6.4. PCR IN SITU

6.5. RT-PCR

6.6. PCR DIGITAL

6.7. ASO-PCR y ARMS-PCR

6.8. PCR TIEMPO REAL.

6.9. PCR TIEMPO REAL CUANTITATIVA

### **7. APLICACIONES EN LOS LABORATORIOS DE GENÉTICA Y SANIDAD ANIMAL**

## 1. INTRODUCCIÓN

La gran complejidad de los procesos biológicos en los seres vivos ha sido por años la razón por la que los investigadores han centrado su atención en descifrar los mecanismos que se esconden detrás de esos procesos. Desde las primeras observaciones de Gregorio Mendel hasta la actualidad, se tiene la noción de que parte de la explicación de los diferentes fenómenos biológicos se encuentra escondida en lo más recóndito del genoma celular y que una de las claves para entender dichos fenómenos es el estudio de los genes. Uno de los descubrimientos más importantes de la historia que marcó el inicio de una nueva era en el estudio y conocimiento de los ácidos nucleicos fue el de Watson y Crick, al descifrar la estructura del ADN (ácido desoxirribonucleico). Desde entonces, varios grupos han mostrado un gran interés por desarrollar métodos sensibles y reproducibles que les permitan estandarizar protocolos experimentales para estudiar los ácidos nucleicos. Es así como han ido apareciendo diferentes tecnologías cuyos protocolos están dirigidos al estudio del ADN; probablemente, la más importante sea la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, Polymerase Chain Reaction, por sus siglas en inglés), desarrollada en 1983 por **Kary Mullis** y que revolucionó la biología molecular y la forma en cómo se estudiaban los ácidos nucleicos en ese momento.

## 2. FUNDAMENTO

La reacción en cadena de la polimerasa es una reacción enzimática *in vitro* que amplifica millones de veces una secuencia específica de ADN durante varios ciclos repetidos en los que la secuencia blanco es copiada fielmente. Para ello, la reacción aprovecha la actividad de la **enzima ADN polimerasa** que tiene la capacidad de sintetizar naturalmente el ADN en las células. En la reacción, si usamos como sustrato ADN genómico, entonces típicamente hablamos de una PCR, pero si usamos ADN complementario (ADNc) proveniente del ARNm (ácido ribonucleico mensajero) se le conoce como RT-PCR (Reverse Transcription-PCR, por sus siglas en inglés). Esta conversión se logra mediante una reacción conocida como transcripción reversa y controlada por la **enzima transcriptasa reversa**, capaz de convertir el ARNm en una molécula de ADNc. Este método fue copiado de los retro virus que usan una transcriptasa reversa para convertir su genoma de ARN en ADN y duplicarse en millones de partículas virales.

Inicialmente la técnica era lenta, ya que las polimerasas se desnaturalizaban al realizar los cambios de temperatura y era necesario agregar nuevas polimerasas en cada ciclo. Puesto que las temperaturas del ciclo (95 °C en las fases de desnaturalización del ADN) suponen la inmediata desnaturalización de toda proteína, se emplean ADN polimerasas termoestables, extraídas de microorganismos adaptados a vivir a esas temperaturas (por ejemplo, de *Thermus aquaticus* se obtiene la **polimerasa Taq** y de *Pyrococcus furiosus* la **polimerasa Pfu**).

Generalmente se emplean mezclas de polimerasas muy procesivas (como la Taq) con otras capaces de hacer corrección de errores (como la Pfu).

La PCR normalmente se realiza con un volumen de reacción de 15-100  $\mu\text{L}$ , en pequeños tubos de 0.2-0.5 mL que se colocan en el termociclador.

### 3. COMPONENTES DE LA PCR

Los elementos importantes en la reacción son el templado o molde (ADN o ADNc), la enzima, los oligonucleótidos o primers, los desoxirribonucleótidos trifosfatados (dNTPs: adenina, timina, citosina y guanina), el ión magnesio ( $\text{Mg}^{+}$ ), una solución amortiguadora o buffer y  $\text{H}_2\text{O}$ . Todos estos elementos interactúan en tres etapas principales de las que se compone la PCR: desnaturalización, hibridación y extensión.

Los equipos en donde se realiza la reacción son llamados **termocicladores**, los cuales están diseñados para establecer un sistema homogéneo en donde las condiciones de temperatura y tiempo necesarios no se modifiquen en cada uno de los ciclos. A continuación se explicarán cada uno de los puntos mencionados.

El elemento principal en la PCR es el **ADN**, cuya naturaleza química ofrece ventajas para su manipulación. Para entrar en contexto, es importante recordar que la molécula de ADN está formada por tres componentes: un azúcar (desoxirribosa), un grupo fosfato y una base nitrogenada (adenina, timina, guanina o citosina) que es complementaria con la base de otra cadena, de tal forma, que el ADN se estructura en una doble hélice. La complementariedad entre las bases está dada por puentes de hidrógeno e interacciones hidrofóbicas, generando estabilidad a la doble hélice, la carga eléctrica del ADN es negativa y está dada por los grupos fosfatos. En la PCR, el templado o molde son las cadenas de ADN que se separan y funcionan como molde para que la enzima sintetice las nuevas cadenas que llevan la secuencia blanco de interés.

Por su parte, la **ADN polimerasa** se encarga de la catálisis de la reacción, sintetizando las nuevas cadenas de ADN que llevan la secuencia blanco. La enzima más usada con frecuencia se llama Taq ADN polimerasa, que proviene de una bacteria termófila llamada *Thermus aquaticus*, la cual vive en condiciones de temperatura muy altas y por eso su ADN polimerasa es capaz de soportar ese tipo de temperaturas. El rasgo que distingue a esta enzima bacteriana de otras ADN polimerasas de otros organismos es su capacidad para mantener su funcionalidad a temperaturas altas, por lo que se le considera una enzima termoestable. También hay otras enzimas que se utilizan como la Vent, obtenida de la bacteria *Thermococcus litoralis*. Normalmente, casi todas las enzimas que se venden comercialmente son eficientes y generalmente cuando fallan lo hacen por una manipulación incorrecta del usuario. Para que la enzima funcione con alta especificidad y la reacción transcurra exitosamente, también se necesita de los elementos ya mencionados como primers, dNTPs,  $\text{Mg}^{+}$ , buffer y  $\text{H}_2\text{O}$ .

Los **primers** son secuencias de oligonucleótidos que flanquean y delimitan la secuencia blanco que se desea amplificar y son complementarios a ésta. Generalmente su tamaño oscila entre 15-25 pares de bases y la cantidad de G-C no debe ser más del 55% de la secuencia. Si no se respetan estas reglas, existe la posibilidad de la formación de dímeros de primers, es decir, de

productos inespecíficos. Esto repercutiría en el rendimiento de la reacción, así como en la especificidad del producto esperado. Son dos secuencias diferentes de primers las que se utilizan en la PCR, una denominada «**forward**» o sentido y otra «**reward**» o antisentido; ambas deben estar diseñadas para que hibriden con el molde y las cadenas de ADN puedan ser extendidas por la Taq polimerasa en **dirección 5'-3'** (como sucede endógenamente). Con la finalidad de garantizar la formación de un complejo estable entre el molde y los primers, hoy en día existen programas informáticos para diseñar primers con alta especificidad, por lo que se evita la formación de productos inesperados.

Por su parte, los **dNTP's** son los ladrillos o bases nitrogenadas con los que la Taq polimerasa construye las nuevas cadenas de ADN. Son factores importantes que contribuyen a la especificidad de la reacción, por ello es importante que su concentración sea la adecuada ya que de lo contrario pueden afectar la función de la Taq polimerasa. Normalmente, se utilizan a una concentración que oscila entre 0.2 a 1.0 mM.

El **buffer** es la solución amortiguadora que se usa en la reacción y generalmente está compuesta de Tris-HCL (pH = 8) cuya concentración final de trabajo debe ser 1X. También se usan otros buffers de composición distinta que son fácilmente comprados en el mercado.

El **magnesio** es un cofactor enzimático que influye en la especificidad de la reacción, por eso se debe encontrar a una concentración adecuada para que no afecte al rendimiento de la Taq polimerasa; regularmente su concentración oscila entre 0.5 y 2.5 mM. En ocasiones ya viene incluido en el buffer, pero en otras se le tiene que agregar.

El **agua** es el disolvente en la reacción y se usa en su forma destilada libre de nucleasas, enzimas que degradan a los ácidos nucleicos.

La reacción se realiza en tubos o plazas de reacción con pocillos, en general 200 microlitros (en algunos casos, en tubos de 500 microlitros), dentro de los cuales se introduce la mezcla de PCR, que lleva todos los componentes necesarios para que se lleve a cabo la reacción.

#### 4. OTROS ASPECTOS A TENER EN CUENTA

Previamente a la realización de la reacción de PCR, es necesario obtener el ácido nucleico diana a partir de la muestra que se pretende analizar: es la etapa de extracción de los ácidos nucleicos.

La **extracción y purificación** de los ácidos nucleicos constituye la primera etapa de la mayoría de los estudios de biología molecular. Los métodos de extracción permiten obtener ácidos nucleicos purificados para después realizar análisis específicos como es la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). La calidad y la pureza de los ácidos nucleicos es uno de los elementos más importantes en este tipo de análisis. Si se desea obtener ácidos nucleicos muy purificados, que no contengan contaminantes inhibidores, es preciso aplicar métodos de extracción adecuados.

Conlleva dos fases:

1. Extracción.
2. Purificación

El ácido nucleico diana puede ser:

- ADN o ARN genómico que será el ácido nucleico mayoritario en la muestra.
- ADN o ARN de un agente patógeno que estará en la muestra menos representado proporcionalmente que el ADN genómico, por lo que en estos casos será aún más importante un buen rendimiento de la extracción o, si es posible y necesario, eliminar el ADN que no interesa.

Muchas veces hay que realizar un **tratamiento previo** de las muestras para facilitar la solubilización posterior, enriquecer la muestra y/o eliminar inhibidores:

- Sangres, tejidos y frotis: en algunos protocolos, se eliminan los hematíes por lisis con tampón hipotónico y posterior lavado con tampón isotónico para eliminar el grupo hemo que es inhibidor de la PCR.
- Células mononucleares de sangre periférica: centrifugación en gradiente de densidad para concentrarlas y separarlas de los hematíes.
- Virus: concentración por ultra centrifugación.
- Tejido en fresco: disgregación mecánica.
- Tejido fijado e incluido en parafina: eliminar parafina por extracción con un disolvente orgánico.

Actualmente se utilizan **kits de extracción comerciales** que proporcionan extractos de ácidos nucleicos en cantidad alta y muy purificados que hacen, en la mayoría de los casos innecesarias estas etapas de concentración y eliminación previa de inhibidores.

Según los requerimientos del análisis y el tipo de muestra hay diversos sistemas de **extracción**:

- **Extracción directa**: por calor, para muestras no complejas y ricas en ácido nucleico como en un cultivo bacteriano. La separación es mediante centrifugación quedándose los ácidos nucleicos en el sobrenadante
- **Extracción con tratamiento enzimático**: utilizando proteasas o lisozima (sin son micobacterias o bacterias gram +)

Después la **separación** se puede realizar mediante diferentes métodos como por ejemplo:

- **Extracción orgánica:** por separación con **disolventes orgánicos**. Tras la digestión enzimática se añade a la muestra tampón de extracción (TE) y mezcla de disolventes orgánicos y alcoholes (cloroformo, fenol, alcohol isoamílico) que separa los ácidos nucleicos, que quedan en la fase acuosa. En la fase orgánica polar se encuentra el resto de materiales (proteínas y otros restos). Después se añade alcohol isopropílico y/o etanol para precipitar y concentrar los ácidos nucleicos.

Los pasos fundamentales son:

- a) **Digestión:** lisis celular y lisis nuclear. Para ello se suele utilizar detergente SDS que rompe las membranas y solubiliza lípidos, molécula quelante EDTA que retira cationes para desestabilizar la membrana celular e inhibir la DNAsas, Sales NaCl que recubre el ADN protegiéndolo de la degradación, Tris-HCl que mantiene estable el pH, y proteasa que degrada proteínas y enzimas.
- b) **Fenolización y eliminación de proteínas:** el fenol que desnaturaliza las proteínas, el cloroformo, que elimina los lípidos y estabiliza la interfase y el alcohol isoamílico que aumenta la separación de fases. Después de la fenolización nos encontramos con la fase acuosa que contiene al ADN y ARN, la interfase que contiene proteínas desnaturalizadas y la fase orgánica que contiene proteínas, lípidos...
- c) **Purificación:** se lleva a cabo por precipitación con etanol absoluto frío y sales.

Los inconvenientes de este protocolo es que es largo, utiliza compuestos tóxicos y requiere mucha manipulación. Es por ello que ha caído en desuso.

- **Extracción inorgánica:** como por ejemplo la adsorción a filtros/membranas de sílica. Una vez realizada la digestión enzimática, se precipitan los ácidos nucleicos con alcohol isopropílico o etílico y se centrifugan en columnas con filtros de sílica, quedando los ácidos nucleicos adheridos al filtro. Se realizan sucesivos lavados haciendo tampones de lavado a través del filtro. Después se eluyen con agua o tampón de elución. Existen kits comerciales de diferente formato.
- **Extracción magnética:** Una vez realizada la digestión enzimática, los ácidos nucleicos se unen a unas bolitas metálicas recubiertas de sílica. Estas bolitas magnéticas son atraídas por unos émbolos magnéticos y, unidas a ellos, van pasando por sucesivos tampones de lavado, que van eliminando sustancias o inhibidoras de la PCR. Finalmente, se eluyen (se "sueltan" de las bolitas) con agua o tampón de elución. Existen kits comerciales de diferente formato.

En estos tipos de protocolos siempre se pueden incluir pasos específicos para que quede más limpio el ácido nucleico diana, como por ejemplo, DNAsas para eliminar el ADN genómico si se quiere amplificar ARN.

Existen también en el mercado sistemas de extracción para ADN que consisten en unas membranas con reactivos específicos, que realizan la lisis celular, la extracción y conservación de los ácidos nucleicos con sólo añadir la muestra sobre la membrana y realizar unos lavados.

Otro aspecto importante a tener en cuenta dado la gran sensibilidad de la PCR, son las **contaminaciones**. Son muy frecuentes si no se emplean las precauciones necesarias. El origen de la contaminación puede ser debida al ácido nucleico del control positivo o por productos amplificados de PCRs anteriores o de otras muestras de análisis. Se produce por una incorrecta manipulación o a través de aerosoles que pueden contaminar incluso los reactivos. Para disminuir el riesgo de contaminación se pueden adoptar medidas como la separación de áreas de trabajo de manera que la extracción, preparación de reacciones de PCR y posteriores análisis del producto amplificado se lleven en ubicaciones con separación física. Además, es esencial unos buenos hábitos de trabajo y BPL, limpieza de superficies y materiales con productos que eliminan ácidos nucleicos, tratamiento con UV de las superficies, etc.

Por otro lado, se deben tener en cuenta las **medidas de bioseguridad**. Si la PCR se utiliza para diagnóstico de microorganismos patógenos, hay que proteger tanto a los trabajadores, si es que los agentes infecciosos pueden afectar a humanos (Ver RD 664/97), como al medio ambiente de la difusión de agentes infecciosos que pudieran afectar a los animales, por lo que habría que aplicar medidas de bioseguridad según el tipo de agente infeccioso y la evaluación de riesgos realizada para cada caso.

## 5. ETAPAS DE LA PCR

Las reacciones de PCR consisten en un ciclo básico por el que se copia el ADN molde y se basa en el mecanismo de la replicación in vivo del ADN en el que el ADN bicatenario se desenrolla y pasa a ADN monocatenario, se duplica y se vuelve a enrollar. El ciclo básico consiste en tres etapas principales: desnaturalización, hibridación y extensión. Previo a ellas, podemos además describir una primera etapa de “inicio” o preparación.

### 5.1. INICIO

Consiste en llevar la reacción hasta una temperatura de 94-96 °C (ó 98 °C si se está usando una polimerasa termoestable extrema), que se mantiene durante 1-9 minutos, (aunque depende de la polimerasa). Este paso sólo es necesario para ADN polimerasas que requieran activación por calor.

### 5.2. CICLOS DE LA PCR

En su forma más básica, cada ciclo consta de tres pasos (Ver figura 1 y ANEXO 1):

**Desnaturalización:** En la primera etapa, la reacción es llevada a una temperatura de 94-96°C y se mantiene entre 30 segundos y un minuto. A estas temperaturas el ADN se desnaturaliza (se separan las dos hebras que lo constituyen).

La temperatura a la cual se decide llevar a cabo esta etapa va a depender de la proporción de G+C que tenga la hebra, así como también de su longitud. Debido a que G se une a C mediante tres puentes de hidrógeno (A se une a U o T mediante dos puentes de hidrógeno) se requiere

más energía para romper tres enlaces que para romper dos, lo que se traduce en una mayor temperatura. Además, depende de la velocidad en la que el termociclador aumenta la temperatura, esto varía de acuerdo al modelo del equipo. Al final de esta etapa tendremos las cadenas separadas que servirán como molde para el siguiente paso.

**Hibridación, Alineamiento (annealing) o unión del cebador.** En esta etapa, los primers se alinean al extremo 3' del molde previamente separado e hibridan con su secuencia complementaria. Para que se forme el complejo molde-primers, es importante que la temperatura de hibridación o temperatura melting ( $T_m$ ) sea la óptima; ésta generalmente oscila entre 50-60 °C. Si el diseño de los primers es el correcto y la temperatura es la adecuada, la estabilidad y especificidad del complejo será eficiente.

**Extensión o elongación de la cadena:** Actúa la ADN polimerasa, tomando el ADN molde para sintetizar la cadena complementaria y partiendo del cebador como soporte inicial necesario para la síntesis de nuevo ADN. La polimerasa sintetiza una nueva hebra de ADN complementaria a la hebra molde añadiendo los dNTP complementarios en dirección 5' → 3', uniendo el grupo 5'-fosfato de los dNTP con el grupo 3'-hidroxilo del final de la hebra de ADN creciente (la cual se extiende).

La temperatura para este paso depende del ADN polimerasa que usemos (comúnmente 72 °C). El tiempo de extensión depende tanto de la ADN polimerasa usada como de la longitud del fragmento de ADN que se va a amplificar.

Al final del ciclo, se habrán formado los amplicones con un tamaño dictado por el número total de pares de bases (pb) que deberá ser conocido por el investigador.

### **5.3. ELONGACIÓN FINAL**

Etapa única que se lleva a cabo a una temperatura de 70-74 °C durante 5-15 minutos tras el último ciclo de PCR. Con ella se asegura que cualquier ADN de cadena simple restante sea totalmente amplificado.

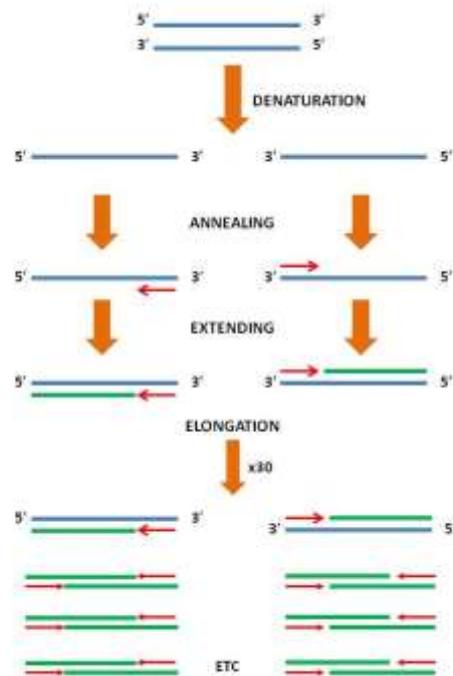


Figura 1. Esquema fases de PCR.

Podemos considerar que por cada ciclo que se completa se duplica la cantidad de fragmento a amplificar. Es decir, que **al final del proceso se obtiene aproximadamente una cantidad de fragmento igual al producto de la cantidad inicial de ADN molde por  $2^n$ , siendo n el número de ciclos**. Como dato para apreciar la cantidad de copias que se generan, en el ciclo 20 se han multiplicado por más de un millón la cantidad inicial de ADN molde. Esto permitirá su visualización. En general, las reacciones de PCR constan entre 35 y 45 ciclos.

La **especificidad** de la PCR depende, fundamentalmente, de los primers. Además, la temperatura empleada en la fase de hibridación y la cantidad de iones divalentes que se incorporan a la reacción influyen en la especificidad. Por una parte, cuanto mayor sea la temperatura utilizada en la fase de hibridación, más específica es la reacción. Esto se debe a que a mayor temperatura más dificultada se ve la unión entre el cebador y la cadena molde. En condiciones de temperatura de hibridación elevadas, el cebador sólo se unirá a la cadena molde si son complementarios en todos sus nucleótidos. Por otra parte, en un determinado rango, incrementos en la concentración de  $MgCl_2$  hacen disminuir la especificidad de la reacción. Los iones facilitan la unión del cebador a la cadena molde y permiten la incorporación de los nucleótidos a la cadena creciente.

## 5.4. CONSERVACIÓN

Este es un paso que se lleva a cabo a 4-15 °C durante un tiempo indefinido para conservar la reacción a corto plazo. Los productos generados aumentan su concentración de manera exponencial porque cada nueva copia sirve de molde en los siguientes ciclos.

Durante todos los ciclos de amplificación, las reacciones de extensión de los primers finalizan a diferentes distancias de los primers, originando productos de amplificación de diferentes longitudes. No obstante, después del segundo ciclo de amplificación, los "productos cortos" empiezan a acumularse y rápidamente se convierte en el producto predominante.

## 6.1. TIPOS DE PCR

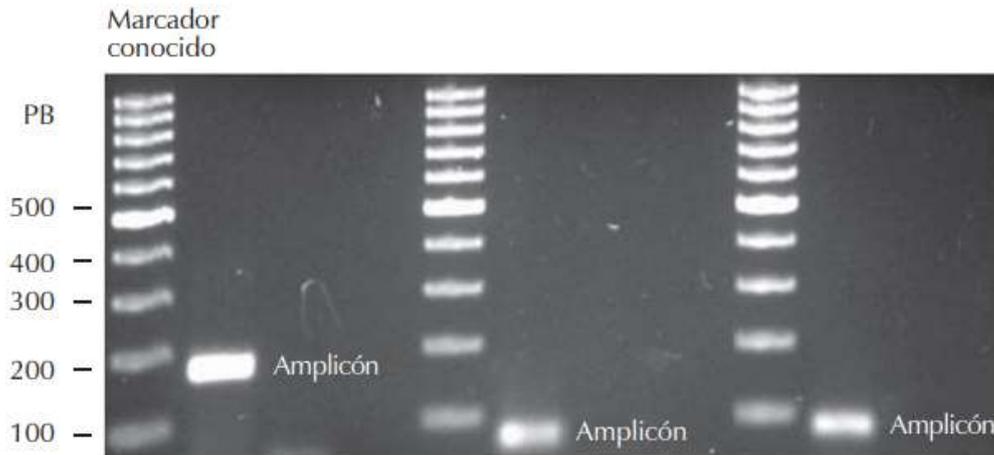
Existen distintas variantes del esquema básico de PCR presentado hasta el momento.

### 6.1. PCR CONVENCIONAL

En la PCR simple (o PCR convencional) se utiliza un par de cebadores oligonucleotídicos para amplificar una pequeña parte del genoma del agente infeccioso. La sensibilidad analítica es relativamente alta, con un mínimo de entre 100 y 1.000 copias del genoma detectable. La especificidad analítica también es bastante alta. Tanto la sensibilidad como la especificidad pueden mejorarse mediante la aplicación de PCR anidada (véase más adelante).

La detección y lectura de resultados en la PCR convencional, en general, se realiza por **electroforesis en geles de agarosa**. Para visualizar los productos (amplicones) se tiñen con Syber Green y se observan en el transiluminador, equipo que emite luz en la longitud de onda adecuada para su visualización. Las imágenes se suelen registrar en un PC con un programa gestor de imágenes.

Cuando los amplicones son corridos en el gel, éstos deben ser cargados junto con un marcador molecular que contenga un número determinado de segmentos de ADN conocidos, lo que facilita la identificación de los amplicones y si su tamaño corresponde con el esperado. El tamaño está dado por el número de pares de bases del amplicón. El marcador de peso molecular es fácilmente adquirido en el mercado. Finalmente, la visualización de los amplicones se lleva a cabo tomando una foto digital al gel de agarosa expuesto a luz UV (Figura 2); adicionalmente un procesador de imágenes se encarga de analizar las bandas observadas.



**Figura 2.** Gel de agarosa. Los productos de la PCR o amplicones están representados mediante bandas de un tamaño específico y se comparan con un marcador de peso molecular conocido para determinar la especificidad de la reacción.

En las **técnicas de secuenciación** de ácidos nucleicos, se usa la PCR convencional para amplificar la región de interés. Una vez amplificada, se realiza una purificación de este producto amplificado para eliminar restos de la reacción de PCR. Sobre este producto, se realiza la reacción de secuenciación.

La técnica de PCR, al multiplicar millones de veces los ácidos nucleicos diana, tiene un gran riesgo de contaminación, que si la hubiera, daría lugar a falsos positivos. Para verificar que esto no ocurre, se ponen **controles**, estos son:

- Controles de extracción positivos (CE+): Como control/es de extracción positivo/s se utilizan suspensiones víricas, bacterianas, de hongos, de parásitos o de muestras positivas del microorganismo o parásito a detectar-identificar y cuantificar.
- Controles de extracción negativos (CE-): Como controles de extracción negativos se utiliza por ejemplo PBS estéril.
- Controles de maceración negativos (CM-): En el caso de las muestras sólidas, se pondrá/n control/es negativos de maceración (CM-) para verificar la ausencia de contaminación en el proceso de maceración de las muestras.
- Control de amplificación positivo (CA+): Como control de amplificación positivo se utiliza un extracto de ácidos nucleicos.
- Control de amplificación negativo (CA-): Como control de amplificación negativo se utiliza agua para PCR
- Control dopado (C<sub>dop</sub>): Como control de los posibles inhibidores de la PCR que pudieran dar un resultado falso negativo, se puede utilizar un control dopado C<sub>dop</sub> o un control interno de PCR (C<sub>int</sub>). El control dopado se preparará dopando, al menos, una muestra por

microorganismo o parásito y matriz. La muestra a dopar se escogerá al azar de entre el grupo de muestras a analizar.

- Control interno de PCR (Cint): La otra opción para detectar posibles inhibiciones de la PCR es la utilización de control interno de PCR. Para ello, en cada reacción de PCR se realizará la detección de un ácido nucleico diferente al del genoma diana. Puede utilizarse un control endógeno o un control exógeno.

## **6.2 PCR ANIDADA O NESTED**

En los ensayos de la PCR anidada se utilizan dos ciclos de amplificación con **cuatro cebadores**, denominados cebadores externos e internos. Es una técnica muy sensible en la que el producto de una amplificación es utilizado como molde para realizar una **segunda amplificación** con cebadores que se ubican dentro de la primera secuencia amplificada, por lo que este tipo de PCR es muy específico.

En esta modalidad, se amplifica un fragmento y a continuación se usa este amplicón como molde para una segunda reacción empleando cebadores que hibriden con una secuencia interna del primer fragmento. De esta forma se aumentan la sensibilidad y la especificidad de la reacción, ya que se pueden usar condiciones menos específicas en la primera amplificación y más específicas en la segunda.

En general, si se comparan las pruebas de PCR anidada con las pruebas de PCR simple, las primeras proporcionan una sensibilidad y especificidad analíticas superiores. La sensibilidad analítica típica es <10 copias de genoma del agente infeccioso, y la especificidad analítica también aumenta porque, en la PCR anidada, cuatro oligonucleótidos tienen que unirse específicamente a las dianas seleccionadas para producir una reacción positiva.

## **6.3. PCR MULTIPLEX**

Es una PCR en la cual **se amplifica más de una secuencia en una misma reacción**. Emplea dos o más pares de iniciadores en un único tubo de reacción con el fin de amplificar simultáneamente múltiples segmentos de ADN. Consiste en combinar en una única reacción todos los pares de iniciadores de los sistemas que queremos amplificar simultáneamente, junto con el resto de los reactivos de la reacción en cantidades suficientes. La ventaja de esta PCR es que se obtiene la información de varios loci en una sola reacción, utilizando menor cantidad de molde para el análisis y menor cantidad de reactivos. Este tipo de PCR es frecuentemente usado en diagnóstico médico. En la PCR múltiple se pueden detectar y diferenciar de forma simultánea varios agentes infecciosos en un único recipiente de reacción individual.

#### 6.4. PCR IN SITU

Es una PCR realizada sobre preparaciones fijas sobre un portaobjetos, consiste en una reacción de PCR en **secciones histológicas o células**, donde los productos generados pueden visualizarse en el sitio de amplificación. Se realiza para ello una primera amplificación del ADN blanco y luego detección mediante hibridación in situ<sup>1</sup> convencional con sondas de ADN/ARN. De esta manera puede detectarse cantidades pequeñísimas del material genético

#### 6.5. RT-PCR

Donde el molde inicial es ARN y se requiere de una enzima denominada transcriptasa inversa, para realizar la conversión del ARN a un tipo de ADN llamado ADNc (ADN complementario). Es especialmente útil cuando solo se dispone de pequeñas cantidades de ARN. De esta forma, el desarrollo inicial de una RT-PCR sería:

1º retrotranscripción a partir de ARN.

2º amplificación del ADNc

#### 6.6. PCR DIGITAL

La PCR digital (dPCR) es un nuevo enfoque para la detección y cuantificación de ácidos nucleicos que ofrece un método alternativo a la PCR cuantitativa en tiempo real (qPCR) para la cuantificación absoluta, ya que cuenta directamente el número de moléculas diana en lugar de depender de patrones de referencia o controles endógenos.

La dPCR mide la fracción de réplicas negativas para determinar copias absolutas, mientras que la qPCR mide la amplificación a tiempo real.

Tanto en la dPCR como qPCR existe cuantificación, la dPCR se refiere a la fracción de reacciones de PCR negativas que se ajusta a un algoritmo estadístico de Poisson; mientras que qPCR la cuantificación se realiza analizando la cantidad del producto de PCR (datos recopilados durante la fase de crecimiento exponencial (log) de la PCR) la cual es directamente proporcional a la cantidad de ácido nucleico molde.

La PCR digital funciona de la siguiente manera:

Se parte de una muestra que contiene ADN o ADNc y se distribuye en una placa en la que se realizarán reacciones de PCR individuales en paralelo.

Cada uno de los pocillos está cargado con una mezcla de muestra, mezcla maestra y reactivos de ensayo TaqMan® con sondas marcadas con moléculas fluorescentes para detectar la señal posteriormente; y se analiza individualmente para detectar la presencia (positivo) o ausencia (negativo) de una señal de criterio de valoración. Algunos de los pocillos contendrán la

---

<sup>1</sup> Hibridación de sondas de oligonucleótidos específicos del producto amplificado, y que están marcadas ya sea radiactivamente o por biotinilación.

molécula/secuencia objetivo, lo cual proporcionará reacciones positivas, y otros pocillos no la contendrán, lo cual dará reacciones negativas.

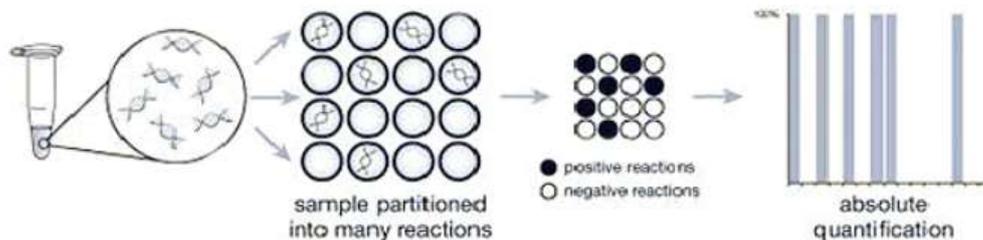
Se emplea un chip nanofluídico que proporciona un mecanismo cómodo y sencillo para ejecutar miles de reacciones de PCR en paralelo.

Cuando no hay ninguna secuencia de destino presente, no se acumula ninguna señal. Tras el análisis de PCR, la fracción de reacciones negativas se usa para generar un recuento absoluto del número de moléculas de la muestra, sin necesidad de estándares ni controles endógenos.

Para representar los pocillos que pueden haber recibido más de una molécula de la secuencia objetivo, se aplica un factor de corrección mediante el modelo de Poisson.

#### Ventajas de la PCR digital

- No es necesario depender de referencias o estándares.
- Capacidad para aumentar la precisión mediante más repeticiones de PCR.
- Alta tolerancia a los inhibidores.
- Capacidad para analizar mezclas complejas.
- Detección lineal de pequeños cambios de plegado



**Figura 3.** La PCR digital utiliza la relación de reacciones de PCR positivas (negro) a negativas (blanco) para contar el número de moléculas objetivo.

#### 6.7. ASO-PCR y ARMS-PCR

Son dos técnicas basadas en la PCR que permiten detectar mutaciones puntuales en el ADN o SNPs.

La ASO-PCR (PCR Alelo Específica) Se basa en la hibridación de productos de PCR a sondas de oligonucleótidos específicos de alelos. Se puede aplicar de manera directa cuando los productos de PCR se inmovilizan en una membrana y se hibridan a las sondas marcadas, o de manera indirecta cuando lo que se inmoviliza son las sondas.

La ARMS-PCR (sistema PCR refractario a la amplificación por mutaciones) se basa en que la amplificación por PCR es ineficiente o no ocurre cuando no existe complementariedad entre el nucleótido terminal 3' de un primer y el molde. La amplificación del alelo normal, y no del

mutante, se consigue empleando un primer que es complementario al alelo normal pero cuyo residuo 3' no es complementario del alelo mutante.

Análogamente, sólo se amplificará el alelo mutante si el residuo 3' del primer es complementario para el alelo mutante y no para el normal

## 6.8. PCR TIEMPO REAL

El principio de la técnica se basa en la PCR punto final, sólo que la forma en cómo se detectan y analizan los productos de la amplificación es diferente. El término en tiempo real se refiere a que la detección de los productos amplificados sucede en cada ciclo de la reacción. Representa una gran ventaja ya que el producto de amplificación es monitoreado conforme transcurre la reacción sin que haya la necesidad de que sea manipulado en un gel de agarosa para conocer si la reacción fue exitosa como sucede en la PCR punto final.

En las técnicas de PCR en tiempo real, el desarrollo de la reacción se puede monitorizar al mismo tiempo que se lleva a cabo. La presencia del ADN o ARN de interés (ADN o ARN diana), copiado a ADNc por la reacción de RT, en su caso, y amplificado por la reacción de PCR, se pone en evidencia por la fluorescencia emitida por un **fluorocromo**.

### *¿Cuáles son los métodos para detectar los productos amplificados?*

El monitoreo de los productos amplificados conforme transcurre la reacción es un paso importante en la PCR en tiempo real y ello se lleva a cabo mediante unas moléculas que actúan como "reporteros fluorescentes". En general, estos sistemas pueden ser clasificados en dos métodos diferentes: específicos y no específicos.

Los **métodos no específicos** se basan en el uso de **moléculas intercalantes** que tienen afinidad por el ADN de doble cadena y que al ser oxidados generan una señal fluorescente. La fluorescencia emitida es capturada en la etapa de extensión de cada ciclo y es proporcional al número de copias de ADN de doble cadena obtenidas en cada ciclo de la PCR. El más utilizado es el colorante SYBR Green. Es una molécula cargada positivamente que, mientras esté en solución sin unirse al ADN de doble cadena, prácticamente no emite fluorescencia; sin embargo, cuando se une al surco menor del ADN incrementa hasta 1,000 veces su fluorescencia. Aunque el SBYR Green es uno de más utilizados debido a su bajo costo, la principal desventaja es que puede unirse a cualquier molécula de ADN de doble cadena, incluyendo dímeros de primers, por lo que detectan la acumulación tanto de productos de PCR específicos como inespecíficos.

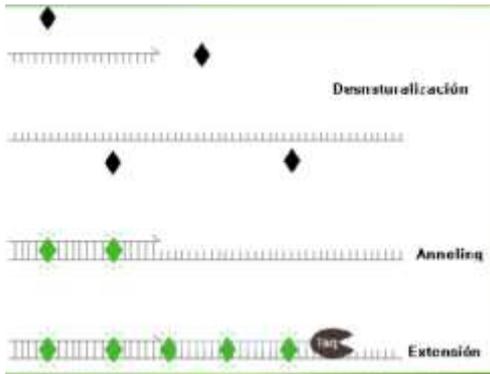


Figura 4a

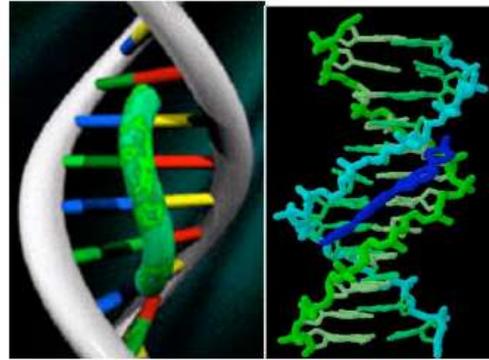


Figura 4b.

**Figura 4a.** Esquema de unión al ADN del colorante. Con los sucesivos ciclos se va acumulando el producto de reacción en el cual se intercala el colorante (SYBR Green).

**Figura 4b.** Representación de la interacción de SYBR Green con el ADN de doble cadena.

Ventajas:

1. Se puede utilizar para controlar la amplificación de cualquier secuencia de ADN bicatenario.
2. No se necesita ninguna sonda, lo que reduce los costes de ejecución y configuración de los ensayos.

Desventajas:

1. La principal desventaja de la composición química del colorante SYBR Green es que puede generar señales de falsos positivos, es decir, puesto que el colorante SYBR Green se une a cualquier ADN bicatenario, también se une a secuencias de ADN bicatenario inespecíficas.

Los **métodos específicos**, parten de principios distintos a diferencia de los no específicos y tienen en común la señal de fluorescencia emitida para detectar los productos amplificados. Estos métodos siguen el principio conocido como «transferencia de energía de resonancia fluorescente» (FRET, por sus siglas en inglés) para generar la señal; este método consiste en transferir energía desde un **donador** o reportero fluorescente a un **aceptor** o «quencher». Para ello, existen dos métodos específicos, éstos son: pruebas basadas en **hidrólisis** y por **hibridación**.

Los primeros se basan en sondas fluorescentes de oligonucleótidos etiquetados con un reportero fluorescente y un «quencher», ambos se encuentran en estrecha unión mientras la sonda no hibride a su secuencia blanco. Cuando hibrida, ocurren cambios conformacionales en el reportero y el quencher, lo cual permite que la actividad exonucleasa 5'-3' de la Taq polimerasa rompa esta unión, logrando que la fluorescencia emitida por el reportero sea liberada y capturada por el equipo. Estos métodos son muy seguros, ya que mientras no haya unión de la sonda a su blanco, no habrá amplificación y tampoco señal de fluorescencia; es

por eso que la especificidad es muy alta. Un ejemplo de estos sistemas son las sondas comerciales conocidas como **sondas de hidrólisis o Taqman**, aunque existen otras en el mercado.

Las sondas Taqman son cadenas cortas de ácidos nucleicos complementarias, como los primers, al ácido nucleico diana y marcados con un fluorocromo donador en el extremo 5' que emite fluorescencia al ser excitado y un aceptor en el extremo 3' que absorbe la fluorescencia liberada por el donador. Para que el aceptor absorba la fluorescencia del donador, debe estar próximo a él. Durante la amplificación del ADN diana, la polimerasa hidroliza el extremo libre 5' de la sonda, produciendo la liberación del fluorocromo donador por lo que, al estar alejado del aceptor, éste no absorbe la fluorescencia emitida y entonces la capta el termociclador.

En las PCRs en tiempo real con sondas Taqman, si en la muestra hay presencia de ácido nucleico diana (muestra positiva), al irse amplificando el fragmento específico de este ácido nucleico, va produciéndose un incremento de la fluorescencia a lo largo de los ciclos de PCR.

Durante los primeros ciclos, el incremento de fluorescencia es bajo y no es detectado por el termociclador. Si la muestra es negativa, no se produce un aumento notable de la fluorescencia.

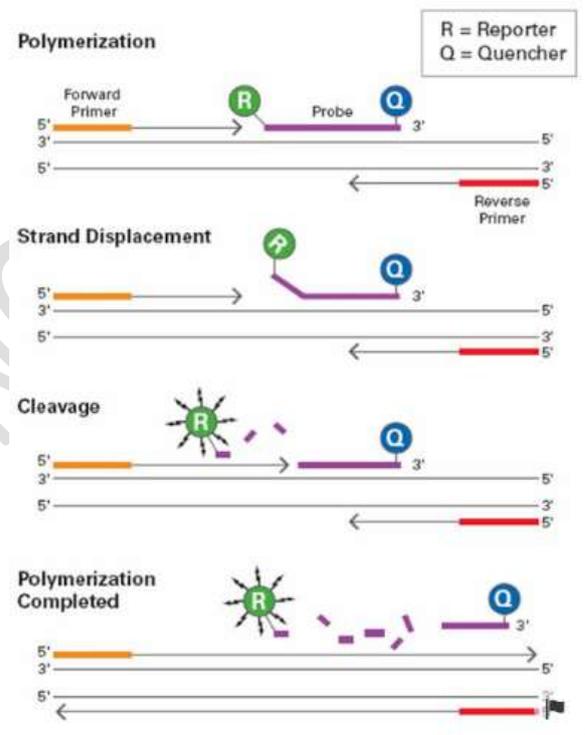


Figura 5. Sonda de Hidrólisis

**Sondas molecular Beacons.** Estas sondas son parecidas a las de hidrólisis. Tienen una molécula donadora en el extremo 5' y una aceptora en el 3' pero presentan una estructura secundaria en forma de asa, en la que reside la secuencia específica con el ADN diana. Los extremos permanecen plegados cuando la sonda no está hibridada, lo que conlleva que el donador y el aceptor estén muy cerca. Por ello la fluorescencia emitida por el donador es absorbida por el aceptor, y no es captada por el equipo, pero al hibridar con el ADN diana, la sonda se abre, alejándose donador y aceptor, pudiendo ser detectada la fluorescencia emitida por el primero.

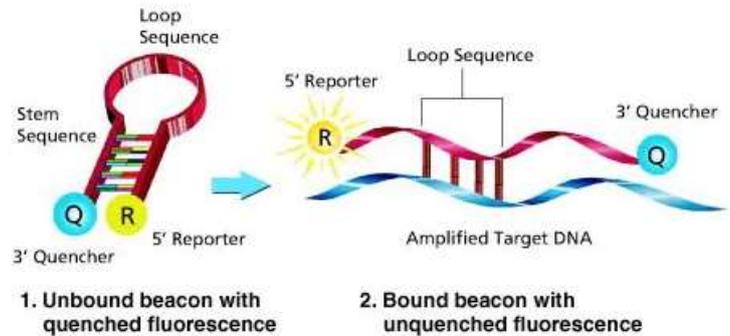


Figura 6. Sonda molecular beacons

**Sondas Scorpions.** Consiste en una sonda unida al extremo 5' del cebador a través de un motivo no amplificable. Lleva un grupo donador en el extremo 5' y uno aceptor en el 3' que mantiene una estructura en horquilla por tener secuencias complementarias en ambos extremos que evita emisión de fluorescencia. A medida que el primer elonga durante la PCR, la sonda hibrida con su secuencia complementaria en la cadena recién formada y la horquilla se abre, produciéndose una señal de fluorescencia que aumenta en relación directa con el aumento de las copias del amplicón específico.

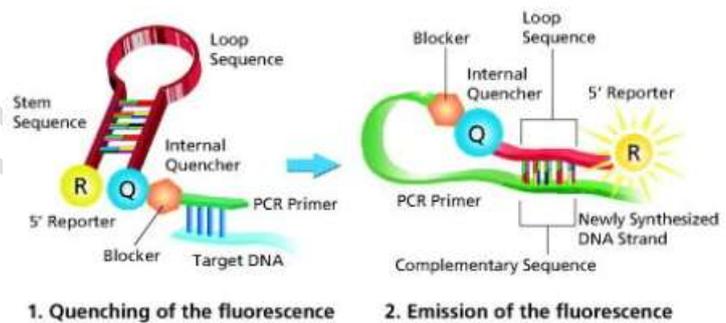


Figura 7. Sonda Scorpions

**Sondas FRET** o de hibridación. Son dos sondas que se unen a secuencias adyacentes del ADN diana, una lleva un donador en el extremo 3' y otra un aceptor en el 5'. Cuando hibridan están muy próximos. Al ser excitado, el donador transfiere su energía al aceptor que a su vez emite fluorescencia que detecta el equipo.

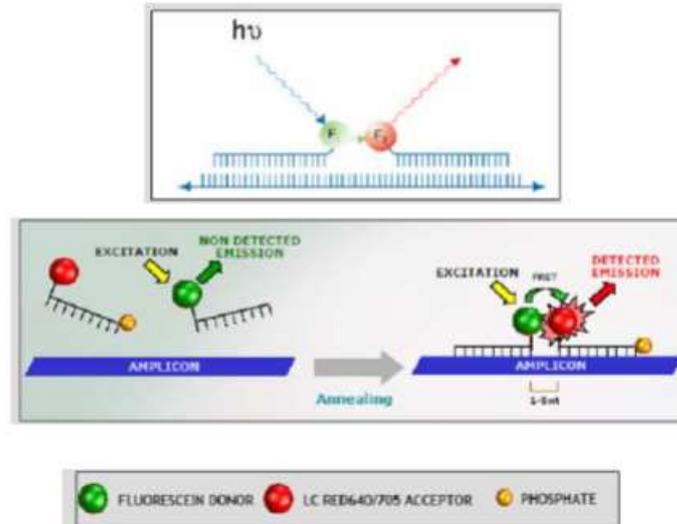


Figura 8. Sonda FRET

Ventajas:

1. Es necesaria una hibridación específica entre la sonda y el objetivo para generar la señal fluorescente.
2. Las sondas se pueden marcar con diferentes colorantes indicadores distinguibles, lo que permite la amplificación de dos secuencias diferentes en un solo tubo de reacción.
3. Se elimina el procesamiento posterior a la PCR, lo que reduce los costes de material y mano de obra del ensayo.

Desventajas:

1. La principal desventaja de la composición química TaqMan es que es necesaria la síntesis de sondas diferentes para secuencias diferentes.

### **¿Cómo se captura la señal de fluorescencia?,**

Cualquiera de los métodos que se utilicen para detectar los productos amplificados en cada ciclo de la reacción necesita de la tecnología incluida en los termocicladores de PCR en tiempo real para:

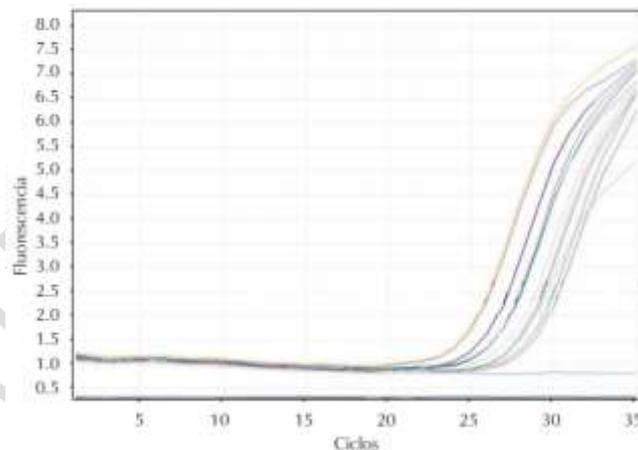
- a) excitar al reportero,
- b) capturar la señal de emisión
- c) realizar el análisis cuantitativo.

En el mercado existen diferentes tipos de termocicladores para esta finalidad, cuyas diferencias principales son la fuente de energía que utilizan para la excitación. En general son tres las fuentes: las lámparas de luz, diodos de emisión de luz (LED, por sus siglas en inglés) y

láseres. Cualquiera que sea la fuente, primero el reportero es excitado y su señal de emisión colectada a través de un filtro que permite el paso de la longitud de onda correspondiente que llega hasta un fotodetector que captura la información proveniente de la muestra para su análisis en el software del equipo. Otros rasgos característicos son las velocidades para incrementar o disminuir las temperaturas en cada etapa de la reacción, el número de muestras que puede soportar, los consumibles para la reacción y los kits que se utilizan para la amplificación; en algunos casos sólo se usan reactivos del proveedor del termociclador, es decir, son sistemas cerrados y en otros casos, se pueden utilizar reactivos de diferentes proveedores, es decir, son sistemas abiertos.

### **¿Cómo se analizan los resultados?,**

Como se ha comentado anteriormente, la PCR en tiempo real se basa en el uso de termocicladores que miden la fluorescencia dentro del tubo de reacción, y esta aumenta proporcionalmente a la cantidad de producto amplificado. Los termocicladores están provistos de un PC con un software que generalmente son fáciles de usar. Este software genera una serie de gráficas en donde se muestran todos los datos necesarios para conocer si la reacción fue exitosa. Una de estas **gráficas** es la **de amplificación** (Figura 9) que muestra el curso y el progreso de la reacción, otra gráfica es la **curva de disociación o curva melting** (Figura 11) que muestra información sobre la especificidad de la reacción.



**Figura 9.** Curva de amplificación 1. En el eje Y se muestra la cantidad de fluorescencia y en el eje X los ciclos de la reacción. La amplificación se detecta en cada ciclo de la reacción, midiendo el incremento de la fluorescencia que es proporcional al aumento de ADN.

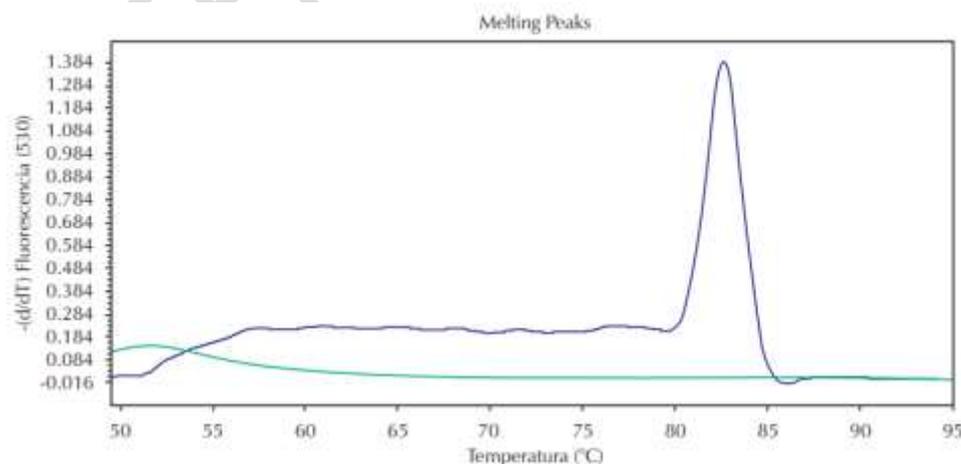
Determinando la intensidad de fluorescencia en cada ciclo de amplificación, se obtiene una curva sigmoideal que representa la aparición del amplicón a lo largo de la PCR. Es lo que se denomina **PCR EN TIEMPO REAL CUALITATIVA**.

En la curva de amplificación son característicos los siguientes puntos (figura 10):

- **Línea base:** La señal de fluorescencia en las muestras negativas y en los primeros ciclos de amplificación de una muestra positiva constituye la **línea base**.
- **Umbral de Fluorescencia:** Ligeramente por encima de esta línea base se fija el umbral de fluorescencia también llamado **threshold**.
- **Ciclo umbral (Ct-cycle threshold):** El punto donde la fluorescencia pasa de niveles no significativos a detectables y éste sería el valor umbral de intensidad de fluorescencia a partir del cual una muestra se considera positiva. **Cuanto mayor es la cantidad de ácido nucleico diana presente en la muestra, menor es el valor de Ct.**



- **Figura 10.** Curva de amplificación 2. Se observa la línea base, el umbral de fluorescencia y el Ct



**Figura 11.** Melting peaks. Se puede observar un único pico de amplificación que corresponde a la curva de disociación o curva melting que indica la especificidad de la reacción, es decir, que los amplicones que se formaron son del tamaño esperado. La línea de abajo corresponde al control negativo, el cual no amplificó.

## 6.9. PCR EN TIEMPO REAL CUANTITATIVA

La PCR en tiempo real se puede utilizar de manera cuantitativa. Existen dos tipos principales de PCR cuantitativa en tiempo real: ensayos de **cuantificación relativa** y ensayos de **cuantificación absoluta**.

En los ensayos de **cuantificación relativa** la cantidad de ácido nucleico diana en una muestra se compara con el de otra muestra (por ejemplo, la expresión de un gen de interés en muestras de tejidos que han sufrido distintos tratamientos). Los resultados se expresan en número de veces que ha aumentado o disminuido la expresión de ese gen con un tratamiento con respecto al otro. Se utiliza un gen normalizador para controlar la variabilidad experimental. Se aplica cuando se desean evaluar los cambios en la expresión de genes en distintos estados fisiológicos. Estos cambios se basan en los niveles del ARNm del gen blanco comparados con un gen de referencia (gen housekeeping) que no cambia su expresión a pesar de que los estados fisiológicos se modifiquen por diversas causas. Los datos son expresados como relativos al gen de referencia y generalmente son referidos como el número de veces en el que aumentaron o disminuyeron los niveles de ARNm o en su caso, si no hubo cambios.

En los ensayos de **cuantificación absoluta** se realizan diluciones seriadas de las muestras con cantidad o concentración conocida de organismo o de ácido nucleico diana (patrones). Se realiza la PCR con cada uno de ellos y, con los Ct obtenidos, se genera una recta patrón que relaciona la señal de PCR (Ct) con la cantidad o concentración de organismo o de ácido nucleico diana.

Con esa recta patrón se puede inferir la cantidad o concentración de organismo o de ácido nucleico diana que contiene una muestra problema, a partir del Ct obtenido al analizar la muestra. En este procedimiento, cuando hablamos de PCR cuantitativa en tiempo real (Q-PCRtr: Q-rPCR ó Q-rRT-PCR) hablamos de ensayos de cuantificación absoluta.

Ecuación de la recta patrón:

$$Y = m \cdot X + Y_0,$$

siendo **Y** el valor de **Ct**,

**m** la pendiente de la recta,

**X** el logaritmo decimal de la concentración o de la cantidad de ácido nucleico diana (C) e

**Y<sub>0</sub>** la intersección de la recta con el eje y.

La ecuación de la recta patrón se obtiene por el método de mínimos cuadrados.

De esta recta patrón se puede obtener información sobre el funcionamiento de la reacción y varios parámetros:

- El coeficiente de correlación ( $R^2$ , coeficiente de determinación) refleja la linealidad de la curva. Idealmente sería 1; generalmente, se puede obtener un máximo de 0,999.
- La intersección con el eje y ( $Y_0$ ).
- Pendiente (m): refleja la eficiencia o rendimiento de la reacción. Para obtener resultados precisos y reproducibles, las reacciones deben tener una eficiencia del 100 % o cercana. Una reacción tiene un 100 % de eficiencia cuando existe una duplicación perfecta del ácido nucleico diana en cada ciclo; esto correspondería a una pendiente de -3,32.

En general, son aceptables rangos de eficiencia de entre el 90 y el 110 %, lo que corresponde a pendientes de entre -3,6 y -3,1

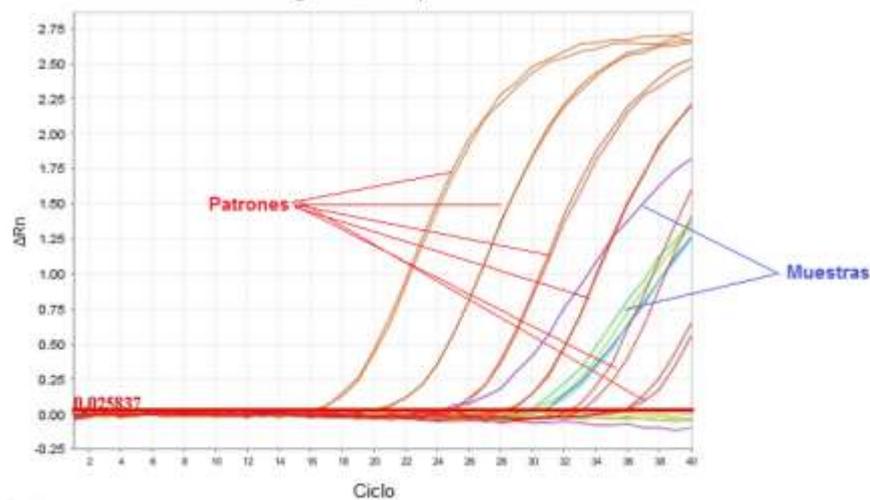


Figura 12. Curva de amplificación

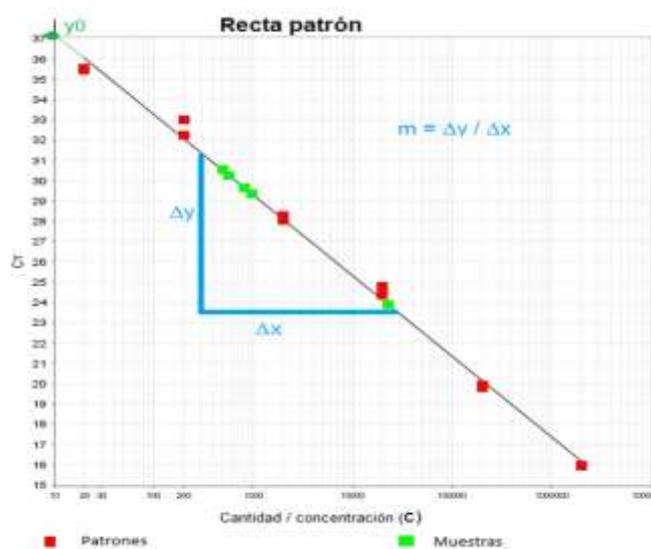


Figura 13. Recta de Calibrado

Generalmente se utiliza para conocer el número exacto de copias amplificadas del blanco o la concentración precisa de ácidos nucleicos en una muestra. En la práctica, este tipo de cuantificación se usa para medir la carga viral o bacteriana en diferentes tejidos.

## 7. APLICACIONES EN LOS LABORATORIOS DE GENÉTICA Y SANIDAD ANIMAL

El análisis por PCR puede realizarse a partir de una amplia variedad de muestras clínicas como tejidos frescos y fijados en parafina, secreciones corporales, líquido cefalorraquídeo, sangre total, plasma, leucocitos, material fecal, exudados de garganta, vaginales o anales, etc.

Se pueden **detectar** diversos microorganismos como virus y bacterias a nivel **cualitativo** (presencia o ausencia) y **cuantitativo** (carga viral o bacteriana). La velocidad de estas pruebas y el apoyo que dan al diagnóstico oportuno y certero le otorgan un valor agregado. La PCR es una técnica rápida que en 5-6 horas desde el inicio del proceso de extracción en PCR convencional y 2-2.5 h en PCR en tiempo real se pueden obtener los resultados.

Además presenta grandes ventajas frente a otras técnicas de diagnóstico como su gran sensibilidad y especificidad. Según el diseño de primers y sondas, las PCR se pueden utilizar para la detección de grupos relativamente amplios de microorganismos (spp o género) o para caracterizar grupos más pequeños (subtipos y serotipos).

Cabe reseñar que además permite detectar patógenos directamente de la muestra, sin necesidad de aislarlos, por lo que resuelve la dificultad que plantea el diagnóstico de enfermedades por algunos patógenos que son muy difíciles de aislar como por ejemplo los virus lagomorfos de la Enfermedad hemorrágica del conejo.

Es una técnica que se utiliza como confirmatoria de otras técnicas de diagnóstico, Ej confirmación del sobrenadante de los cultivos celulares en la técnica de aislamiento viral. En algunas enfermedades, permite la detección de patógenos en fases muy tempranas de la enfermedad, antes de que se pueda detectar por otras técnicas (como aquellas que requieren la presencia de anticuerpos, Ej; virus de la Fiebre Aftosa). Además, debido a su gran sensibilidad, es muy útil en la detección de virus latentes como el virus de la Enfermedad de Aujeszky en cerdos.

La PCR es una técnica muy utilizada en Sanidad Animal, en **control oficial de enfermedades** infecciosas y de declaración obligatoria, como por ejemplo en el control de la influenza aviar, en la vigilancia activa, cuando una explotación da resultados positivos a las técnicas serológicas, se toman muestras de hisopos para analizar por PCR. Si el resultado es positivo, se determina el subtipo por PCR específicas de subtipo y, si es una muestra positiva H5 o H7, se determina su patogenicidad por secuenciación de ácidos nucleicos. También se utiliza para analizar las muestras de vigilancia pasiva.

Dentro del ámbito de la **agroalimentación**, se puede utilizar para detectar la presencia de microorganismos patógenos en muestras de alimentos o piensos (*Salmonella*, *E. Coli*, *Clostridium*...). Detectar componentes no deseados en alimentos, como por ejemplo carne de especies no declaradas en la composición del alimento, como ocurrió con la detección en

Europa de carne de caballo no declarada en hamburguesas. Cabe reseñar que existen kits comerciales de PCR en tiempo real para su detección.

Asimismo, puede ser muy útil en la **identificación de especies** en productos sospechosos de fraude detectando componentes no deseados en alimentos y piensos. Por ejemplo en especies pesqueras como el atún y otras que, cuando ya están fileteados, no se puede distinguir si es la especie que se dice en el etiquetado. Para ello se utiliza PCR y secuenciación y, con las secuencias obtenidas, se construye un árbol filogenético para comparar la secuencia obtenida con la de distintas especies y subespecies.

También, puede ser empleada para la **identificación de genes** interesantes en la **producción animal** (producción de carne, de leche...) y/o **filiación de animales** (test de identificación genética).

Además, es la técnica de referencia para la identificación y cuantificación de **Organismos Modificados Genéticamente** (OMG) en alimentos y piensos. Aquellos alimentos o piensos que posean un valor superior al 0,9% de un evento debe ser especificado en su etiquetado. La PCR en tiempo real es método de elección para su determinación y cuantificación.

MATERIAL NO ORIGINAL

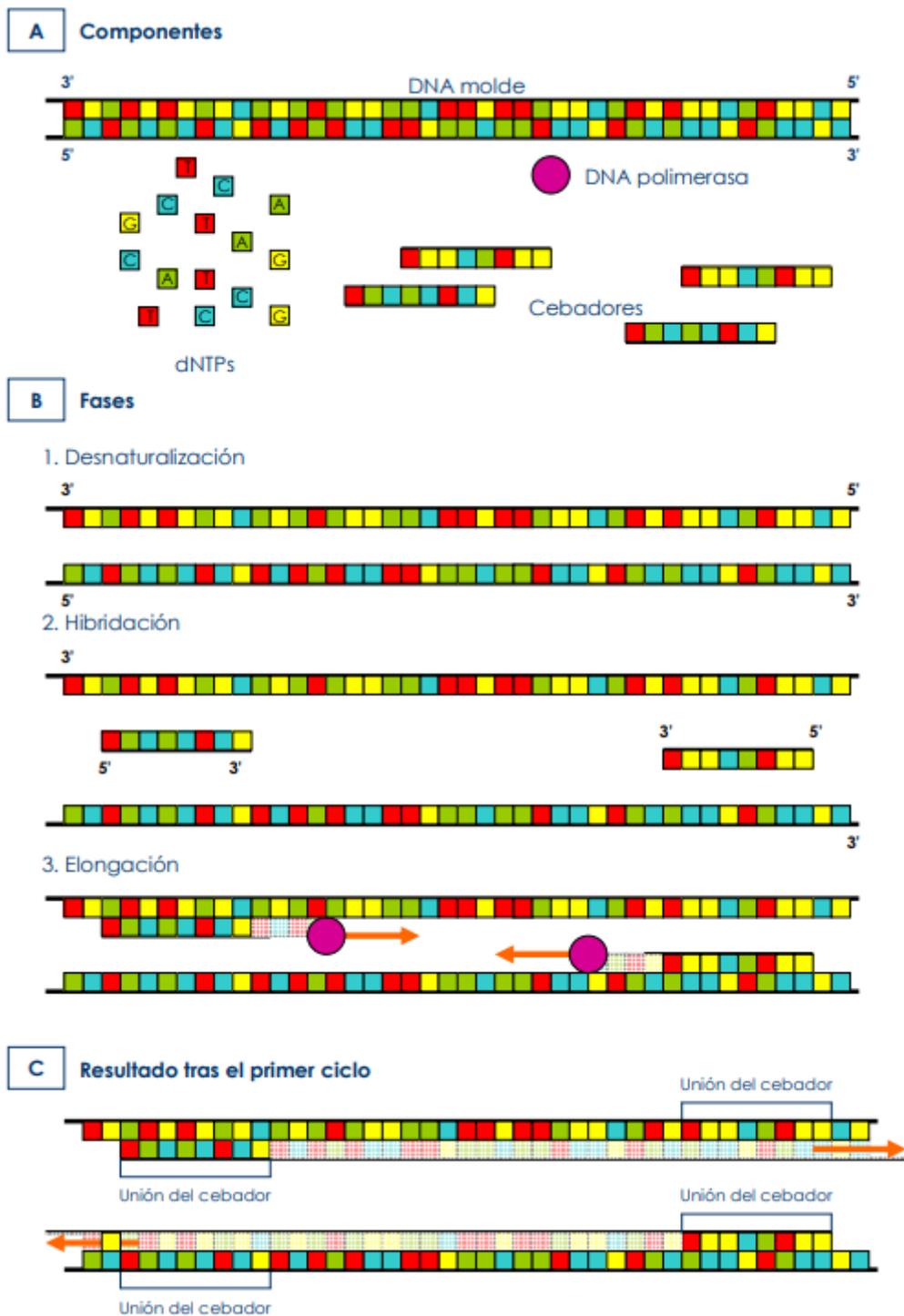
## ANEXO 1

Representación esquemática de:

A. Componentes básicos para llevar a cabo una PCR.

B. Fases de la PCR.

C. Resultado obtenido tras el primer ciclo de amplificación (la cadena recién formada se representa de color más claro).



**BIBLIOGRAFIA:**

Temario de preparación de oposiciones para Técnicos 2015 (CSIT).

Aspectos básicos de la PCR en tiempo real. Thermo Fisher Scientific  
<https://www.thermofisher.com/es/es/home/life-science/pcr/real-time-pcr/real-time-pcr-learning-center/real-time-pcr-basics/essentials-real-time-pcr.html>.

PCR en tiempo real. Penélope Aguilera, Martha Ruiz Tachiquín, Martha Graciela Rocha Munive, Benjamín Pineda Olvera y María Elena Chánez Cárdenas  
<http://www2.inecc.gob.mx/publicaciones2/libros/710/pcrtiempo.pdf>

Guía de PCR en tiempo real. Michelle C. Chirinos-Arias

Fundamentos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y de la PCR en tiempo real  
Tamay de Dios L, Ibarra C, Velasquillo C

OIE. capítulo 1.1.3 Validación y control de calidad de los métodos de reacción en cadena de la polimerasa utilizados para el diagnóstico de enfermedades infecciosas

Reacción en cadena de la polimerasa (Polymerase Chain Reaction, PCR), Universidad Politécnica de Valencia.

**MATERIAL PARA LA PREPARACIÓN DEL TEMA 32**

**SECUENCIACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS: CONCEPTO, TIPOS Y APLICACIONES EN LABORATORIOS DE SANIDAD Y GENÉTICA ANIMAL**

*Este material no tiene carácter oficial, por lo que en ningún caso vinculará al Tribunal Calificador. Constituye, únicamente, un instrumento complementario que servirá de apoyo al opositor para enfocar cada uno de los epígrafes, pero nunca de forma exclusiva ni excluyente. El Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación no se hace responsable del contenido del mismo.*

*Los materiales no serán objeto de actualización constante.*

## **ÍNDICE**

### **1. CONCEPTO DE SECUENCIACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS**

### **2. TIPOS DE SECUENCIACIÓN**

2.1. SECUENCIACIÓN QUÍMICA

2.2. SECUENCIACIÓN ENZIMÁTICA (SECUENCIACIÓN DE SANGER)

2.3. SECUENCIACIÓN DE NUEVA GENERACIÓN (NGS)

2.3.1. Generación de bibliotecas

2.3.2. Secuenciación

2.3.3. Procesamiento e interpretación de los resultados

### **3. APLICACIONES DE LAS TÉCNICAS DE SECUENCIACIÓN**

3.1. APLICACIONES EN LABORATORIOS DE SANIDAD ANIMAL

3.2. APLICACIONES EN LABORATORIOS DE GENÉTICA ANIMAL

MATERIAL NO OFICIAL

## 1. CONCEPTO DE SECUENCIACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS

La **secuenciación genómica** implica, según la OIE, “*determinar el orden en el que se encuentran las bases de ácidos nucleicos en un gen*”, aunque las técnicas de secuenciación se pueden dirigir también a regiones no codificantes.

Se puede adoptar, por tanto, un concepto más amplio, definiendo la secuenciación como la **determinación del orden en que aparecen las bases orgánicas nitrogenadas a lo largo del genoma (u otros componentes de ácido nucleico) de los organismos, o en regiones concretas de los mismos.**

De esta definición se infiere que las técnicas de secuenciación **no se limitan al estudio del ADN**, sino que es posible estudiar mediante las mismas **también la secuencia de bases nitrogenadas en el ARN**, ya sea genómico (como en el caso de algunos virus) o no. La secuenciación se puede realizar, por tanto, sobre el **genoma** de los organismos (incluyendo sus regiones codificantes y no codificantes), su **transcriptoma** (el conjunto de moléculas de ARN generadas tras la transcripción), y otros elementos genéticos como **los plásmidos**.

Los datos de las **secuencias** obtenidas juegan un papel con creciente importancia tanto en sanidad como en genética animal. Estos datos, en cualquier caso, deben ser **tratados, analizados e interpretados** para poder ofrecer información valiosa.

Los métodos para la secuenciación de ácidos nucleicos han sufrido grandes avances en los últimos años, permitiendo cada vez una secuenciación de regiones más amplias, en menos tiempo, con menor esfuerzo y requiriendo una menor inversión económica.

## 2. TIPOS DE SECUENCIACIÓN

### 2.1. SECUENCIACIÓN QUÍMICA

Los comienzos de la secuenciación tuvieron lugar en la década de los 70, proponiéndose en primer lugar **métodos químicos**, similares a los empleados para la secuenciación de proteínas. Estos primeros métodos de secuenciación se basaban en la **escisión de grandes moléculas en pequeños fragmentos**.

El método propuesto en 1977 por **Maxam y Gilbert** se basa en **emplear diferentes reacciones químicas para romper las moléculas de ADN**, siendo estas reacciones **específicas para las distintas bases**.

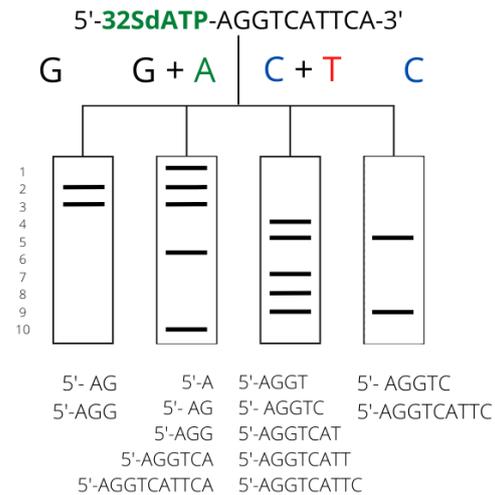
En primer lugar, el fragmento de ADN que se desea secuenciar se **marca** en sus extremos con **moléculas radiactivas**. Una vez marcado el fragmento, se generan **cuatro alícuotas**, cada una de las cuales se someterá a una determinada reacción química, que por sus características provocará la escisión en una región determinada según las bases orgánicas nitrogenadas presentes:

- Reacción a nivel de las **guaninas (G)** mediante la **metilación** con **dimetil sulfato**.

- Reacción a nivel de las **adeninas (A)** (con separaciones también en **G**) mediante la **depurinación con ácido fórmico**.
- Reacción a nivel de las **timidinas (T)** (con separaciones en **C**) mediante la **hidrólisis con hidracina**.
- Reacción a nivel de las **citiosinas (C)** mediante el tratamiento con **hidracina y cloruro sódico** (que inhibe la reacción de la timina).

Tras las reacciones químicas, se realizará un tratamiento con **piperidina**, que dará lugar a la escisión de la molécula de ADN al nivel de la base modificada. Así, se generará un fragmento de ADN cuya **longitud dependerá de la posición de la base** concreta en su secuencia con respecto al extremo marcado radiactivamente. Los fragmentos generados diferirán en su tamaño en **una única base**.

Los fragmentos generados pueden separarse y analizarse mediante su carga y electroforesis en un **gel de poliacrilamida**, pudiendo leerse en base al patrón de bandas radiactivas obtenidas en cada una de las cuatro alícuotas, como puede observarse en el ejemplo de la ilustración 1.



1. Ejemplo de secuenciación química. Fuente:  
elaboración propia

En este ejemplo se puede observar el patrón de bandas generado para cada una de las alícuotas tratadas químicamente en la secuenciación de un fragmento de 10 nucleótidos.

Se trata de una técnica laboriosa tanto para su desarrollo como para su interpretación, por lo que en la actualidad, con otros métodos disponibles, ha caído en desuso.

## 2.2. SECUENCIACIÓN ENZIMÁTICA (SECUENCIACIÓN DE SANGER)

La fragmentación del ADN empleando **enzimas de restricción** supuso un hito fundamental en el avance de las técnicas de secuenciación. Estas enzimas reconocen secuencias específicas del ADN, en general de entre 4 y 6 nucleótidos de largo, y supusieron un método general para fragmentar moléculas largas de ADN, permitiendo la posterior separación de los fragmentos en geles de agarosa. Esta fragmentación enzimática ha permitido el estudio de las secuencias de forma más sencilla, y hoy en día siguen empleándose para el desarrollo de algunas técnicas (como la técnica del análisis de *AFLP*).

Sin embargo, la técnica más extendida para la secuenciación enzimática no se basa en el uso de enzimas de restricción, sino en el uso de **la enzima ADN polimerasa**. Esta técnica de secuenciación enzimática fue propuesta por **Sanger**, también en la década de 1970. Su fundamento es, como en los casos mencionados anteriormente, la generación de fragmentos de diferente tamaño, de tal manera que puede determinarse cuál es la base presente en cada

una de las posiciones. En este caso, sin embargo, los fragmentos no se generarán a través de la escisión de moléculas más grandes, sino de la **síntesis de nuevas moléculas**.

Para ello, se parte de una molécula de ADN que debe ser simple, por lo que se debe realizar un paso previo para provocar la separación de las cadenas que conforman la doble hélice de ADN.

Para la síntesis, se empleará un **cebador complementario** a la cadena molde. Tras su hibridación, se puede dar la extensión de la cadena en formación mediante la acción de la ADN polimerasa I, que irá incorporando (en sentido 3'→5') los nucleótidos correspondientes por complementariedad con la cadena molde.

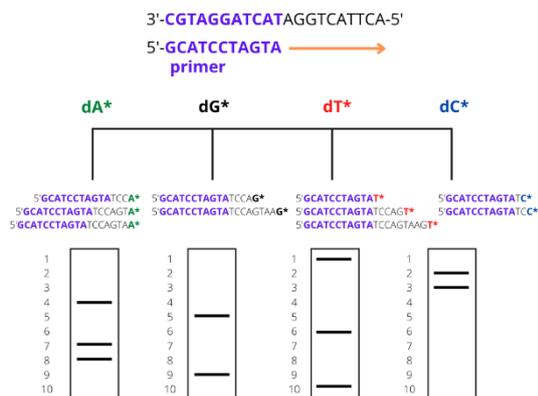
Para poder diferenciar qué dNTP se incorpora en cada posición, este método propone el uso de **didesoxinucleótidos (ddNTPs)**. Estos se diferencian de los desoxinucleótidos que conforman el ADN (dNTPs) en que no presentan un grupo OH libre en su extremo 3', por lo que, después de incorporarse a la cadena, la polimerasa no es capaz de unir un nuevo nucleótido a estos, **deteniéndose la elongación**.

Así, se dividirá la muestra en cuatro alícuotas, a cada una de las cuales se añadirán ddNTPs que presenten una base nitrogenada en concreto (A, G, C o T). Al llevarse a cabo la polimerización del ADN a secuenciar en presencia de una mezcla de dNTPs y ddNTPs, tendrá lugar la **incorporación de los ddNTPs en las posiciones** en las que su **complementario aparezca en la cadena molde**.

El resultado será, por tanto, la obtención por separado de cuatro mezclas de fragmentos de longitud variable, en cuya última posición se presentará el nucleótido correspondiente.

Estos ddNTPs se añadirán **marcados con fluorescencia**, de tal forma que los fragmentos generados en cada una de las cuatro alícuotas puedan analizarse mediante técnicas de **electroforesis en gel de poliacrilamida**, de forma similar a lo descrito para la secuenciación química, o bien mediante **electroforesis capilar**.

Cabe mencionar que es fundamental considerar la **potencial actividad exonucleasa** de las polimerasas. Mediante su actividad exonucleasa 3' → 5', las polimerasas podrán degradar aquellos nucleótidos mal apareados inmediatamente tras su adición a la cadena en el extremo 3', mientras que mediante la actividad exonucleasa 5' → 3' las polimerasas pueden escindir las cadenas de nucleótidos en su extremo 5'. Ambas actividades resultan **contraproducentes** para el objetivo de la secuenciación, ya que podrían evitar la adición de didesoxinucleótidos,



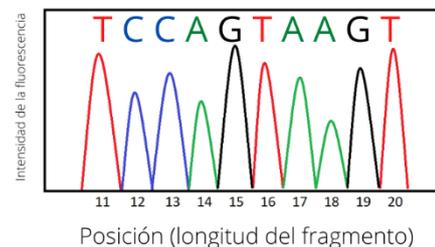
2. Ejemplo de secuenciación de Sanger. Fuente: elaboración propia

o bien acortar la longitud total de la cadena. Por ello, las polimerasas empleadas deben presentar **escasa o nula actividad exonucleasa** en ambos sentidos.

Se trata, como en el caso de la secuenciación química, de una técnica laboriosa, por lo que en la actualidad han surgido variantes de la misma que permiten simplificar la técnica y abaratar los costes asociados, fundamentalmente basadas en técnicas de **ciclado térmico**. Estas se llevan a cabo de forma idéntica a la PCR pero empleando **un único cebador** y los ddNTPs, de tal manera que se da la misma reacción que en la técnica clásica, pero amplificando a su vez el número de fragmentos generados al llevarse a cabo sucesivos ciclos. Sus principales ventajas frente a la técnica clásica son que permite realizar la secuenciación directamente a partir de ADN bicatenario (ya que mediante la modulación de la temperatura se incluye, como en la PCR, una primera fase de desnaturalización) y partiendo de una cantidad pequeña de ADN molde, eliminando la necesidad de clonarlo previamente.

Así, surge el concepto de secuenciación **automática**. Para llevar a cabo este tipo de técnica, se emplean marcadores fluorescentes **diferentes para marcar cada uno de los cuatro ddNTPs**, y la posterior electroforesis se realiza en un equipo de **electroforesis capilar**. Así, las cuatro reacciones pueden realizarse en el mismo tubo. Además, el uso de electroforesis capilar (frente a la electroforesis en gel) permite acelerar el proceso.

Tras las fases de ciclado térmico, los fragmentos amplificados se cargan en el secuenciador. En él, estos son sometidos a una excitación que da lugar a que los marcadores empleados emitan fluorescencia, cada uno de ellos en una longitud de onda característica. La información generada se transforma mediante una fase de procesamiento informático en una imagen consistente en un conjunto de picos de diferentes colores. La posición de estos picos determinará la **longitud del fragmento** detectado, mientras que el color en el que estos sean visualizados vendrá determinado por el **nucleótido incorporado en la última posición** de la cadena sintetizada, y que por tanto será el complementario del nucleótido presente en dicha posición en la cadena molde.



3. Ejemplo de secuenciación automática.  
Fuente: elaboración propia

Esta técnica permite leer fragmentos **más largos** y además permite cargar en el secuenciador una mayor cantidad de muestras simultáneamente, lo cual aumenta significativamente la rapidez de la prueba, y permite reducir además su coste.

### 2.3. SECUENCIACIÓN DE NUEVA GENERACIÓN

Con el desarrollo de la considerada "**primera generación**" de las técnicas de secuenciación, surgieron nuevas necesidades, fundamentalmente relacionadas con **la longitud de los fragmentos a secuenciar** (buscándose desarrollar técnicas que permitieran la secuenciación de amplias regiones genómicas), pero también con el **número de muestras** a tratar simultáneamente. Además, resulta importante mencionar que estas técnicas de primera

generación son costosas, tanto para su puesta en marcha como para su posterior realización rutinaria.

En este contexto se dio el desarrollo de las conocidas como **técnicas de secuenciación de nueva generación** (o NGS, del inglés “Next Generation Sequencing”), también denominadas técnicas de **secuenciación profunda, de alto rendimiento o secuenciación masiva paralela**, permitiendo dejar atrás algunas de las limitaciones de las técnicas clásicas. Estas técnicas han evolucionado rápidamente en los últimos años, así como sus aplicaciones en ciencia básica y aplicada.

Las plataformas desarrolladas permiten secuenciar **millones de fragmentos de ADN** de forma paralela, reduciendo además el coste significativamente. Además, presentan el potencial de **realizar múltiples análisis en un único ensayo**, no limitándose al estudio de variaciones genéticas (como las inserciones, deleciones o las mutaciones de tipo SNP), sino que permiten también el **análisis del genoma completo** para realizar análisis **filogenéticos** o análisis de asociación para determinar regiones genómicas de interés.

En la actualidad, existen múltiples plataformas para la secuenciación masiva, las cuales difieren significativamente en las reacciones empleadas para la secuenciación. Sin embargo, el **esquema de trabajo** es similar para todos los casos.

Siguiendo este esquema, se parte de una muestra de ácidos nucleicos, a partir de la cual se generarán **bibliotecas** (también denominadas “librerías”, por la traducción literal del inglés), consistentes en conjuntos de fragmentos del ADN molde sobre los cuales se llevarán a cabo las reacciones de secuenciación propiamente dichas. A estos fragmentos se añadirán, en sus extremos, secuencias que actuarán como **adaptadores**.

Estas bibliotecas servirán como molde de la secuenciación, para lo cual puede ser necesaria su **amplificación previa** (según el tipo de secuenciación a llevar a cabo), tras lo cual se inmovilizarán en un soporte o superficie sólida. En caso de haberse amplificado previamente, los fragmentos se deberán inmovilizar de forma agrupada (formando “*clusters*” de moléculas idénticas).

Sobre estas moléculas que servirán como molde se realizarán las **reacciones de secuenciación**, obteniendo datos crudos que deberán ser procesados informáticamente para su interpretación. Así, en el caso de la NGS, el **análisis computacional** es una parte esencial del esquema de trabajo.

### 2.3.1. Generación de bibliotecas

El primer paso para llevar a cabo la secuenciación masiva es **la generación de bibliotecas**. Esta generación diferirá según la técnica de secuenciación a emplear y de si se llevará a cabo una secuenciación de tipo “*paired-end*” (en la cual los fragmentos se leen dos veces, una en cada sentido) o “*single-end*” (en la que cada fragmento se lee únicamente en un sentido).

En caso de no requerirse un número inicial alto de moléculas, los fragmentos generados serán **fijados directamente sobre el molde**, sin necesidad de llevar a cabo una amplificación previa.

Esta fijación se puede realizar empleando **sondas complementarias al ADN molde** o bien **complementarias a los adaptadores universales**, que se habrán unido previamente a los extremos de los fragmentos generados. También es posible, en caso de emplearse técnicas de secuenciación por síntesis, la fijación de las **polimerasas** al soporte.

Como ya se ha mencionado, en algunos casos la técnica de secuenciación a emplear requiere partir de un número inicial de moléculas alto, para lo cual se llevarán a cabo reacciones de **reacción en cadena de la polimerasa** sobre los fragmentos que conforman la biblioteca.

En caso de que la técnica a emplear para la secuenciación requiera un **elevado número de copias** del ADN molde para poder generar una señal suficiente para ser detectada por los métodos empleados, se deberá realizar previamente la **amplificación de los fragmentos generados**, para lo cual se utilizan técnicas de PCR con ciertas modificaciones (según la plataforma que se desee utilizar). Los dos tipos de PCR más empleados para este fin son la PCR de emulsión y la PCR en puente, que además permiten directamente la fijación de las moléculas generadas a la superficie conformando “*clusters*”.

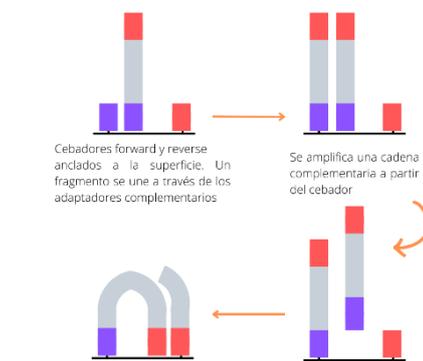
- **PCR de emulsión.** Los fragmentos de ADN, unidos a las secuencias adaptadoras, se incluyen en una emulsión oleo-acuosa compuesta por microesferas recubiertas de moléculas de ADN complementarias a los adaptadores. Así, los fragmentos hibridarán por complementariedad a su superficie. En las microesferas se dan las condiciones para que en cada una hibride únicamente un fragmento de ADN, sobre el cual se llevan a cabo múltiples ciclos de PCR empleando dichas moléculas complementarias a los adaptadores como cebadores. De esta forma, se generan múltiples copias clonales de cada uno de los fragmentos en las diferentes microesferas.

Tras la amplificación, estas microesferas se podrán inmovilizar en un gel de poliacrilamida, sobre una superficie de vidrio o en pocillos individuales de una placa.

- **PCR en puente.** En este caso, los cebadores (tanto *forward* como *reverse*) se unen previamente a la superficie sólida mediante enlaces covalentes. La proporción de cebadores con respecto al área de dicha superficie definirá la densidad de los *clusters*.

Al añadir los fragmentos de ADN unidos a adaptadores, estos hibridarán con los cebadores de la superficie, iniciándose la reacción de PCR. Las hebras generadas se unirán por sus extremos libres a otros cebadores fijados en la superficie, sirviendo a su vez como molde para la síntesis de nuevas hebras, siendo esto lo que le confiere su nombre característico (PCR “en puente”).

Tras varios ciclos de amplificación, se consiguen muchas localizaciones aisladas con copias idénticas de un único fragmento. Esta metodología es la empleada por la **Tecnología Illumina**, por lo que normalmente aparece asociada a esta plataforma.



4. PCR en puente. Fuente: elaboración propia

Antes de abordar la secuenciación, es fundamental tener en cuenta el valor de **profundidad de cobertura (*coverage*) a emplear**. Este valor determina el **número de veces que cada una de las posiciones del genoma se encontrará presente en los *reads* (o lecturas) producidos**. Hace referencia, por tanto, al número de fragmentos generados en la preparación de bibliotecas que comprenderán una determinada posición del genoma. Este valor es uno de los factores determinantes para evaluar la fiabilidad de los resultados: esta aumentará a valores más altos de cobertura.

### 2.3.2. Secuenciación

En el marco de las técnicas de NGS, existen **múltiples métodos de secuenciación** que son utilizados por las diferentes plataformas disponibles.

Se debe tener en cuenta que se trata de técnicas cuyo desarrollo se encuentra en plena etapa expansiva, por lo que abordar todas las técnicas disponibles resulta muy complicado. En este tema, por tanto, se presentarán únicamente algunas de las técnicas más empleadas en la actualidad.

#### 2.3.2.1. Secuenciación por hibridación

Se trata de técnicas basadas en la **unión de hebras de ácidos nucleicos** a otras con sus secuencias complementarias, y se considera dentro de las técnicas denominadas de **“segunda generación”**.

Para explotar este tipo de técnicas, se suelen emplear **chips o microarrays** consistentes en superficies sólidas a las cuales se fijan grandes cantidades de **oligonucleótidos** de secuencia conocida. Estos oligonucleótidos pueden presentar variantes, de tal manera que los fragmentos de la muestra se unirán únicamente a aquellas posiciones en las que el oligonucleótido fijado a la superficie sea **completamente complementario**. Es, por tanto, una técnica sensible que permite la detección de mutaciones, incluidas las mutaciones en una única posición (SNPs).

Son útiles, por ejemplo, para analizar el perfil de mutaciones que presenta un individuo.

En cualquier caso, han sido en gran parte desplazadas por otras técnicas, e incluso hay autores que no las consideran una categoría dentro de las técnicas de Nueva Generación.

#### 2.3.2.2. Secuenciación por síntesis

Se trata de técnicas ampliamente empleadas en la actualidad, también incluidas en la denominada **“segunda generación”**. Se basan en métodos de **síntesis de moléculas de ácido nucleico**, como la **secuenciación de Sanger y la PCR**.

Generalmente, emplean un soporte sólido en el cual las reacciones tienen lugar en microcanales, pocillos o en la superficie (como en el caso de la Tecnología Illumina). Las

moléculas de ADN molde, tras la amplificación, se someten a reacciones de síntesis de ADN en las que se incluyen nucleótidos marcados, tras lo cual se puede realizar una **lectura** de las reacciones ocurridas.

Estas técnicas difieren de la aproximación original de la secuenciación de Sanger en varios puntos. En primer lugar, generalmente no utilizan didesoxinucleótidos como terminadores, aunque en algunos casos sí que se emplean terminadores reversibles con una función similar a la de los ddNTPs en la secuenciación de Sanger. Además, se generan **lecturas** mucho **más cortas**, generalmente de hasta unas 500 bases, y presentan **tasas de error relativamente más altas**, por lo que su fiabilidad se basa en altos valores de **cobertura, realizando la lectura de millones a billones de fragmentos cortos**.

Algunas de las técnicas que emplean la síntesis como método para la secuenciación incluyen:

- Terminación reversible cíclica
- Pirosecuenciación
- Ion Torrent (secuenciación por semiconducción)

#### 2.3.2.2.1. Terminación reversible cíclica

Las técnicas de terminación reversible cíclica emplean **terminadores reversibles**, en este caso **nucleótidos modificados** unidos a una **molécula fluorescente**. La unión de esta molécula fluorescente juega una doble función: por un lado, permite la detección del nucleótido añadido, y por otro lado impide continuar la síntesis de la cadena hasta que es eliminada.

Así, tienen lugar ciclos de síntesis de ADN en los cuales se añaden **nucleótidos modificados protegidos con grupos fluorescentes**, se **lavan los nucleótidos no añadidos**, se **lee la señal fluorescente** y por último se **retira el grupo protector fluorescente** para permitir que continúe la síntesis de la cadena.

Así, se limita la posibilidad de lecturas erróneas (ya que se eliminan los grupos fluorescentes empleados en ciclos previos) y permite detectar mejor secuencias homopolímeras.

Este tipo de tecnología es la empleada por las plataformas Illumina (en la cual cada uno de los nucleótidos se marca **con un grupo fluorescente que emite fluorescencia en un color diferente**) y Helicos BioSciences.

La plataforma Helicos BioSciences emplea nucleótidos marcados con un único color, denominados *Virtual Terminator nucleotides (VTn)*. Estos además no tienen bloqueado el extremo 3', por lo que permiten una mayor eficiencia para continuar la síntesis tras las lecturas. Sin embargo, genera lecturas muy cortas, por lo que se dificulta el posterior ensamblaje para poder interpretar secuencias largas.

#### 2.3.2.2. Pirosecuenciación

Se trata de un método basado en la **bioluminiscencia**, que mide la generación de luz visible en una reacción enzimática. Esta reacción se produce sobre moléculas inorgánicas que son liberadas durante la síntesis de la cadena, denominadas pirofosfatos.

Para llevarla a cabo, se añaden secuencialmente los diferentes nucleótidos a una solución que contiene el ADN molde, la polimerasa y las enzimas necesarias para llevar a cabo las reacciones de luminiscencia (sulfurilasas y luciferasas).

Así, cuando se añade el **dNTP correcto** (complementario en esa posición a la cadena molde), este se añade a la cadena en síntesis, **liberándose un pirofosfato**. Dicho **pirofosfato liberado** sufrirá una reacción por parte de dichas enzimas, generando **luz de intensidad variable** en función del número de nucleótidos incorporados en las diferentes cadenas que se encuentren en síntesis simultáneamente.

La luz generada es detectada y **cuantificada**, generándose un gráfico de picos denominado **pirograma**. En este pirograma cada uno de los picos se corresponde con los dNTPs presentes en cada posición de la cadena.

Así, este tipo de secuenciación permite obtener **lecturas** más largas que otras (hasta 600-800 bases), facilitando el posterior ensamblado del genoma.

Esta tecnología es la empleada por la plataforma Roche (antes 454 Life Sciences). Esta dejó de comercializarse en 2013, aunque tras ello algunos de los reactivos continuaron estando disponibles para su adquisición a través de diferentes distribuidores.

#### 2.3.2.3. Ion torrent o secuenciación por semiconducción

La tecnología Ion Torrent supone un caso particular de la secuenciación por síntesis, ya que convierte directamente la secuencia de nucleótidos en información digitalizada mediante el uso de un chip semiconductor, por lo que en ocasiones es considerada por los autores como una categoría aparte.

Esta tecnología se basa en que, durante la síntesis del ADN, cuando se incorpora el nucleótido correcto en la cadena, para su unión se libera **un ion hidrógeno**. Esto hace cambiar el pH de la solución, lo cual puede ser **registrado como un cambio de voltaje empleando un sensor iónico** (similar a un pHímetro). En caso de no incorporarse nucleótidos a la cadena, no se producirá esta liberación y por tanto el pH y el voltaje de la solución se mantendrán inalterados.

Estas reacciones tienen lugar en millones de micropocillos que recubren un chip constituido por millones de pixels, que permiten convertir esta información química en información de secuencias. Para la preparación del molde, generalmente se emplea la PCR en emulsión, obteniendo millones de fragmentos unidos a pequeñas microesferas que se introducirán en los micropocillos del chip.

Al añadir los dNTPs secuencialmente, los cambios en el voltaje se registrarán únicamente cuando se incorpore el nucleótido correcto. Si dos nucleótidos adyacentes presentan la misma base, se añadirán dos nucleótidos a la cadena en el mismo ciclo, lo cual se registrará como un pico del **doble de voltaje** que en el caso de haberse añadido un único nucleótido. Por esta misma razón, en caso de realizarse sobre cadenas largas de homopolímeros del mismo nucleótido puede ser difícil discernir su longitud.

### 2.3.2.3. Secuenciación por ligación

Este tipo de tecnología se basa en la acción de la ADN **ligasa**, una enzima que **une los extremos de las moléculas de ADN**, en lugar de la ADN polimerasa. Es la **sensibilidad** de esta enzima a los desajustes en el apareamiento de bases lo que ha permitido el desarrollo de estas técnicas, consideradas también de “**segunda generación**”.

Como en otros casos, se parte de una biblioteca de fragmentos amplificados por PCR (generalmente, se emplea la PCR de emulsión) y **unidos a adaptadores de secuencia conocida**.

A los fragmentos que servirán como molde se añaden **sondas basadas en oligonucleótidos (de ocho o nueve bases de largo) marcados con marcadores fluorescentes**. Estos oligonucleótidos hibridarán con la secuencia de ADN molde, de tal manera que la ADN ligasa llevará a cabo la unión de ambas moléculas únicamente si las bases de ambas son complementarias. Al emitirse fluorescencia por parte de la molécula, se puede inferir la **identidad del nucleótido** en una posición concreta en la molécula de ADN molde.

Además, es posible construir los marcadores de tal manera que se puedan escindir por su extremo 5' tras la lectura de la fluorescencia, generando un extremo libre que permita un **segundo ciclo de ligación**. Este ciclo se puede repetir en varias ocasiones, permitiendo así obtener secuencias más largas.

Este tipo de tecnología es la empleada en la plataforma SOLiD.

### 2.3.2.4. Secuenciación en tiempo real

La secuenciación en **tiempo real** ha sido incorporada en la plataforma SMRT (por sus siglas en inglés, de Single Molecule Real Time) de Pacific Biosciences. Esta tecnología permite la secuenciación de fragmentos muy largos del genoma, de hasta 30-50 kb, y es la primera de las consideradas de “**tercera generación**”.

Para ello, se incorporan moléculas individuales de ADN polimerasas modificadas mediante ingeniería, junto con las moléculas del ADN a secuenciar, al fondo de un pocillo de cámaras denominadas **zero-mode waveguide (ZMW)**. Estas son pequeñas cámaras (de 10 a 30nm de diámetro por pocillo) que por su pequeño tamaño evitan que la luz visible de un láser las atraviese completamente. Cuando los nucleótidos marcados con fluoróforos se añaden a estos pocillos, estos penetran en el detector, y **si no son incorporados a la cadena en síntesis**, difunden y atraviesan por completo los mismos, saliendo de ellos en microsegundos. Por el

contrario, si los nucleótidos son añadidos a la cadena, esta operación tarda milisegundos en producirse, por lo que se da una **mayor intensidad de señal** en el pocillo.

Así, por el diseño de estas placas, solamente se produce la lectura en aquellos pocillos en los que la ADN polimerasa incorpora nucleótidos a la cadena en síntesis.

Este tipo de secuenciación presenta una alta tasa de error, que sin embargo puede ser subsanada mediante la repetición de lecturas. Además, permite realizar lecturas muy largas, de hasta 10kb, facilitando el ensamblaje posterior.

### 2.3.2.5. Secuenciación basada en nanoporos

La secuenciación mediante **nanoporos** se suele incluir dentro de las técnicas consideradas de “**tercera generación**” (aunque según algunos autores, forma parte de una “**cuarta generación**”), y consiste en **hacer pasar largas moléculas de ADN a través de poros de pequeño diámetro**, pudiendo **medir y registrar los cambios de conductancia eléctrica** que tienen lugar tras el paso de cada uno de los diferentes nucleótidos mediante el uso de un detector incorporado en la plataforma.

A pesar de que las técnicas basadas en los cambios de conductancia eléctrica son las más ampliamente desarrolladas, también existe la posibilidad de realizar la secuenciación mediante nanoporos con **lectores ópticos**, anclando moléculas fluorescentes a los nucleótidos y leyendo la fluorescencia emitida a medida que la cadena atraviesa el nanoporo.

En teoría, estas técnicas podrían emplearse para la secuenciación de más de 1000kb de ADN a través de un único poro, pudiendo procesar varios Gb de secuencias de una forma sencilla y a un coste relativamente bajo.

Se pueden diferenciar diversos tipos de tecnologías empleadas para la secuenciación mediante nanoporos:

- Técnicas basadas en el uso de **membranas biológicas**. En este tipo de técnicas se emplean proteínas transmembrana embebidas en membranas lipídicas para la producción de los poros. Algunas de las proteínas más empleadas con este propósito son la **alfa hemolisina** y la **porina A de *Mycobacterium smegmatis* (MspA)**.
- Técnicas basadas en **sensores en estado sólido**.

### 2.3.2.6. Técnicas complementarias para la secuenciación

A pesar del continuo desarrollo de los métodos de secuenciación, el uso de métodos complementarios presenta una gran utilidad para completar o **confirmar el orden** de las bases en el genoma.

Algunos de los métodos más populares utilizados a este propósito incluyen:

- **Mapeo óptico.** Se trata probablemente del método más empleado, basado en el **marcaje de nucleótidos a lo largo de moléculas largas de ADN**, empleando para ello sus **secuencias complementarias**. Esta técnica permite la localización de algunas de las secuencias obtenidas en mapas genómicos.
- Secuenciación mediante **microscopio electrónico**. Para poder visualizar las moléculas de ADN en microscopía electrónica, estas deben marcarse con átomos pesados ya que los átomos normalmente presentes en su estructura no son visibles. Para ello, se debe desnaturalizar previamente el ADN, realizar el marcaje y extenderlo en soportes para microscopio electrónico, preferiblemente cuadrículados. Además, se deben emplear métodos que permitan mantener el ADN desnaturalizado y linear durante la realización de la prueba.

### 2.3.3. Procesamiento e interpretación de los resultados

El procesamiento **informático** de los resultados de secuenciación es un paso **imprescindible**, tan importante como el resto del desarrollo de la técnica.

Por ello, es fundamental que los laboratorios cuenten con personal especializado en bioinformática y que el **análisis bioinformático** se lleve a cabo de forma transparente y trazable. Así, en todos los registros de las pruebas de secuenciación deben constar los programas informáticos empleados, sus versiones y las bases de datos o secuencias de referencia empleadas.

En primer lugar, es fundamental establecer el **rendimiento analítico** de las pruebas, para lo cual se deben tener en cuenta diversos parámetros cuyos valores aceptables serán determinados a través de la validación del método:

- Profundidad de la **cobertura o coverage**, como ya se ha mencionado anteriormente.
- **Uniformidad de la cobertura.** Define la variación en la profundidad de cobertura entre las diferentes regiones analizadas.
- **Sesgo por el contenido en GC.** La cantidad de nucleótidos G respecto a los nucleótidos C puede afectar a la eficiencia de las reacciones de secuenciación y afectar a la uniformidad de la cobertura, por lo que se recomienda determinar el sesgo GC en las regiones analizadas.
- **Puntuaciones basales de la calidad.** Son resultados obtenidos por las plataformas de secuenciación que indican el cociente señal-ruido. Durante la validación debe establecerse un **umbral aceptable** que posteriormente se incorporará a los filtros bioinformáticos, permitiendo eliminar los datos de mala calidad.
- **Intensidad de la señal y longitud de lectura.**
- **Calidad del mapeo.** Es una medición de la **incertidumbre** asociada al **mapeo** de las lecturas en una posición genómica.

- **Valores de los controles internos.**

Una vez determinados los parámetros de calidad, se debe llevar a cabo el procesamiento de los resultados para poder obtener **datos interpretables**.

Este **procesamiento bioinformático variará** en función de las técnicas empleadas y del **propósito del análisis**, por lo que es fundamental que los laboratorios dispongan de procedimientos claramente definidos para llevar a cabo las técnicas de secuenciación en las circunstancias previstas.

En todos los casos, el primer paso será la **determinación de la calidad de las secuencias obtenidas** y su **preprocesado**, eliminando aquellas lecturas que no cumplan con los requisitos mínimos de calidad establecidos.

Los pasos consecutivos en el análisis dependerán de la plataforma utilizada (y por tanto del tipo de datos de partida) y de **la finalidad del análisis**.

### **3. APLICACIONES DE LA SECUENCIACIÓN**

Como resulta evidente, la secuenciación presenta un **amplio abanico de posibilidades** para el diagnóstico y la investigación, tanto en el área de genética animal como en el de sanidad animal.

Además, cabe esperar que con el continuo desarrollo de las técnicas también **crezcan significativamente sus aplicaciones**, extendiéndose a áreas en las que todavía no se trata del método de elección, al permitir mejorar la eficiencia, la capacidad de análisis, y disminuir drásticamente el coste con respecto a otros métodos.

#### **3.1. APLICACIONES EN LABORATORIOS DE SANIDAD ANIMAL**

En el área de Sanidad Animal, la secuenciación ha jugado un papel fundamental en los últimos años, permitiendo avanzar a pasos agigantados en la **caracterización de agentes patógenos** y la realización de **estudios epidemiológicos y filogenéticos**.

Aunque en la actualidad los laboratorios todavía se encuentran inmersos en un proceso de adaptación a **las nuevas tecnologías cada vez más disponibles**, la secuenciación es una prueba que se realiza de forma prácticamente rutinaria en muchos ámbitos desde hace años, fundamentalmente empleando el método de Sanger y la secuenciación automática.

Los análisis de secuencias llevados a cabo en el área de **sanidad animal** pueden realizarse con gran variedad de finalidades, tanto para la **detección de agentes infecciosos como, fundamentalmente, para su caracterización**. Así, estas técnicas pueden emplearse para el diagnóstico primario o como pruebas confirmativas en el diagnóstico, aunque se debe tener en cuenta que se trata de técnicas que requieren una gran inversión y esfuerzo para su puesta a punto, por lo que de momento no han desplazado a otros tipos de técnicas (como la PCR) para este propósito.

Sin embargo, la secuenciación sí que proporciona datos muy valiosos para diversos fines complementarios a las labores de diagnóstico:

- **Caracterizar microorganismos**, permitiendo determinar la presencia de determinadas proteínas de interés, por ejemplo para el diseño de vacunas o de métodos de análisis serológicos.
- **Detectar, identificar y caracterizar microorganismos previamente no identificados.** Por ejemplo, para poner a punto una técnica de PCR para la detección de un microorganismo causante de una enfermedad emergente es imprescindible disponer de datos sobre su secuencia para poder diseñar los cebadores.
- **Desarrollar pruebas de diagnóstico simples**, y aplicables a múltiples grupos de microorganismos diferentes.
- **Detectar simultáneamente y con rapidez múltiples agentes patógenos** en coinfecciones o enfermedades de etiología multifactorial.
- Aumentar la capacidad de estudio de la **dinámica evolutiva de los agentes patógenos** a todos los niveles.
- Conocer mejor la **epidemiología de las enfermedades infecciosas** y la **filogenia de los agentes.**
- Mejorar la **trazabilidad** de los brotes de las enfermedades infecciosas.
- **Caracterizar** de forma más detallada **poblaciones** de agentes patógenos.
- **Mejorar el conocimiento** de la relación entre el **genotipo y fenotipo** de los agentes patógenos.
- En el caso particular de los **agentes bacterianos**, resulta fundamental su uso para el **estudio de las resistencias** a los antibacterianos, **su distribución en las poblaciones y su evolución.**

### 3.2. APLICACIONES EN LABORATORIOS DE GENÉTICA ANIMAL

En el campo de la **genética animal**, se debe tener en cuenta que se tratará con **genomas de una longitud mucho mayor que los genomas de los agentes patógenos.** Por ello, este tipo de tecnologías, sobre todo las que implican la secuenciación del genoma completo, serán menos accesibles que para el área de sanidad animal.

En cualquier caso, las aplicaciones de la secuenciación son **múltiples y variadas**, a pesar de que en muchos casos su implantación aún no ha sido consolidada, por lo que se siguen empleando otro tipo de técnicas. Algunas de estas aplicaciones pueden incluir:

- **Genotipado de los animales** con respecto a genes de interés, por ejemplo el gen *Prnp*, que determina la susceptibilidad al Scrapie. Para este propósito, en la actualidad se emplea una técnica que podría considerarse una modalidad de los

métodos de secuenciación, denominada de “**primer extension**”. Esta consiste en emplear cebadores que lleguen justamente hasta la región previa a la posición en que se encuentra la mutación de interés, y posteriormente añadir **nucleótidos terminadores marcados**. De esta manera, se sintetizará una cadena a la cual únicamente se añadirá el nucleótido correspondiente a la posición de interés, que posteriormente podrá ser detectado.

- **Estudio de regiones genómicas de interés**, por ejemplo para la detección de genes **causantes de enfermedades** o **determinantes de caracteres productivos de interés**.
- Estudios de **genética de poblaciones**, fundamentales para las **estrategias de conservación de especies y/o de razas**.
- **Identificación de la especie animal** en muestras de origen desconocido, como son algunas muestras de animales silvestres. También puede ayudar a la determinación de **especies de interés ganadero**, por ejemplo para evitar el fraude en la comercialización de productos pesqueros.
- **Identificación de animales de interés a nivel individual**.
- Realización de **análisis de asociación del genoma completo** para determinar regiones genómicas de interés presentes en individuos con un fenotipo característico.

## **BIBLIOGRAFÍA**

Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE). Manual de las Pruebas Diagnósticas y de las Vacunas para los Animales Terrestres. Capítulo 1.1.7. (Normas aplicables a la secuenciación de alto rendimiento, la bioinformática y la genómica computacional). [Internet] Disponible en: <https://oie.int/es>

Slatko, B. E., Gardner, A. F., & Ausubel, F. M. (2018). Overview of Next-Generation Sequencing Technologies. *Current protocols in molecular biology*, 122(1), e59. <https://doi.org/10.1002/cpmb.59>

Terry Brown. Genomas. Editorial Médica Panamericana.

Instituto de Investigaciones Biomédicas “Alberto Sols” (Centro Superior de Investigaciones Científicas, Universidad Autónoma de Madrid). Métodos clásicos de secuenciación. [Internet]

Isabel Gobernado Ferrando. Secuenciación de exoma complete en trastorno bipolar autosómico dominante: afectación del gen PERIOD3 – ritmo circadiano (Capítulo 3: Secuenciación masiva paralela: revisión de las técnicas actuales). Tesis Doctoral. Facultad de Medicina, Universidad de Alcalá.

**MATERIAL PARA LA PREPARACIÓN DEL TEMA 33**

**MÉTODOS MOLECULARES PARA EL ANÁLISIS DE GENOMAS: CONCEPTO, TIPOS Y APLICACIONES EN LABORATORIOS DE SANIDAD Y GENÉTICA ANIMAL**

*Este material no tiene carácter oficial, por lo que en ningún caso vinculará al Tribunal Calificador. Constituye, únicamente, un instrumento complementario que servirá de apoyo al opositor para enfocar cada uno de los epígrafes, pero nunca de forma exclusiva ni excluyente. El Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación no se hace responsable del contenido del mismo.*

*Los materiales no serán objeto de actualización constante.*

## ÍNDICE

### 1. CONCEPTO DE GENÓMICA

### 2. TIPOS DE ANÁLISIS GENÓMICOS

#### 2.1. GENÓMICA ESTRUCTURAL

##### 2.1.1. Mapas físicos del genoma

###### 2.1.1.1. Mapas citogenéticos

###### 2.1.1.2. Mapas de "contigs"

##### 2.1.2. Mapas genéticos

##### 2.1.3. Secuencia genómica

###### 2.1.3.1. Shotgun Sequencing

###### 2.1.3.2. Secuenciación clon a clon

#### 2.2. GENÓMICA FUNCIONAL

#### 2.3. GENÓMICA COMPARATIVA

### 3. APLICACIONES DE LAS TÉCNICAS DE ANÁLISIS DE GENOMAS

MATERIAL NO OFICIAL

## 1. CONCEPTO DE GENÓMICA

En las últimas décadas ha tenido lugar un cambio de paradigma en lo que respecta al análisis del material genético: mientras que anteriormente el interés se había centrado en el estudio de un único gen o un número relativamente pequeño de estos, se ha progresado hacia la investigación del material genético de los organismos **al completo**.

La **genómica** es la ciencia dedicada al **estudio de los genomas**. Resulta, por tanto, fundamental aclarar el **concepto de genoma**, que puede definirse como **el conjunto completo de material genético en un organismo**. Es importante puntualizar que, aunque muchos autores hagan referencia al “conjunto completo de ADN”, esta definición excluye aquellos organismos cuya información genética no se almacena en forma de ADN, sino de ARN, como ciertos virus.

En los **virus**, el genoma se encuentra **en el interior de la cápside nuclear**, mientras que en los **organismos vivos** está presente en **todas las células nucleadas del organismo**.

En el caso de los organismos eucariotas, el genoma comprende el ADN **nuclear**, que se encuentra estructurado en  **cromosomas**, así como el genoma presente en orgánulos celulares como **las mitocondrias**. En organismos procariotas, el término hace referencia a los ácidos nucleicos del **nucleoide**, excluyendo otros elementos como los plásmidos.

Además, se debe tener en cuenta que en los **organismos o en las células diploides** estarán presentes **dos copias** del genoma, existiendo pares de cromosomas homólogos. Por el contrario, los organismos (o células) **haploides** presentarán una única copia del genoma.

El estudio de los genomas surgió inicialmente ligado a la **determinación de secuencias** de ácidos nucleicos, pero **se ha expandido** de forma notable hacia otros niveles, incluyendo otro tipo de estudios estructurales, así como estudios sobre **la funcionalidad de los ácidos nucleicos**. Por ello, en la actualidad se suele hablar de tres ramas principales de la genómica:

- Genómica estructural
- Genómica funcional
- Genómica comparativa

Además, no pueden olvidarse otras disciplinas directamente relacionadas con la genómica, ya que consisten en el estudio de otras moléculas producto del procesamiento de los ácidos nucleicos. Estas incluyen, fundamentalmente, la **transcriptómica**, que se puede definir como el estudio de los productos de la **transcripción del genoma**, la **proteómica**, dedicada a estudiar el conjunto de **proteínas** sintetizadas por los organismos, y la **metabolómica**, cuyo objeto serán otros compuestos sintetizados mediante la acción de las proteínas, como los azúcares o los lípidos.

En cuanto al **desarrollo** de la genómica, su principal motor han sido los **Proyectos Genoma**, fundamentalmente el **Proyecto Genoma Humano**, que dio comienzo en la década de 1980. Uno de sus objetivos principales era la creación de mapas genéticos y físicos de alta resolución de cada uno de los cromosomas humanos, permitiendo así mejorar en gran medida la

capacidad de localizar e identificar genes responsables de caracteres de interés como las enfermedades hereditarias.

Los **esfuerzos** llevados a cabo para la compleción de estos proyectos, **unidos a la evolución exponencial** de las técnicas de secuenciación masiva, ha permitido obtener gran cantidad de información en el campo de la **genómica**.

En cualquier caso, la descripción de la secuencia de ADN genómico de un organismo no es sino el **primer paso** para la comprensión de los mecanismos que relacionan el simple **orden de los nucleótidos a lo largo de las moléculas de ácidos nucleicos** con la síntesis del **resto de moléculas presentes en los organismos, su funcionamiento y sus interrelaciones**.

## 2. TIPOS DE ANÁLISIS GENÓMICOS

El avance en ciertas áreas, como la química de los ácidos nucleicos o la biología computacional, ha permitido desarrollar **técnicas para el estudio de los genomas** que generan información de forma rápida y fiable sobre caracteres genéticos de interés. Estas técnicas son **muy diversas**, ya que deben abordar el estudio de los genomas desde diferentes puntos de vista.

### 2.1. GENÓMICA ESTRUCTURAL

La **genómica estructural** se dedica al estudio del **contenido o la naturaleza física del genoma**, incluyendo su secuencia y su distribución a lo largo de los cromosomas.

Generalmente, los resultados se definen en términos de **secuencias** o bien de **posición de los genes** a lo largo del genoma.

Además, comprender la posición que los genes (u otros elementos genéticos) ocupan en el genoma permite también entender la forma en que estos **se heredan** y las **relaciones entre ellos**. Para poder entender esto, es fundamental tener en mente los conceptos de **ligamiento y recombinación genética**.

El **ligamiento** se define, según el National Institutes of Health de Estados Unidos como la **"asociación de genes u otras secuencias que se encuentran en posiciones cercanas del ADN, en el mismo cromosoma"**. De esta forma, cuanto más cerca están dos elementos genéticos, mayor es la probabilidad de que se hereden juntos.

La **recombinación genética**, por el contrario, es un fenómeno por el cual se forman nuevos ácidos nucleicos a partir de una combinación de dos secuencias. Este fenómeno puede afectar al estudio del ligamiento, ya que puede hacer que **dos genes ligados se hereden de forma separada**.

Los **principales métodos de análisis** englobados dentro del término de **genómica estructural** son los dirigidos a la obtención y el estudio de:

- Mapas físicos del genoma

- Mapas genéticos
- Secuencias genómicas

Existen múltiples técnicas para el mapeo de los cromosomas, que además serán diferentes en función del tipo de mapas que se desee construir. Algunas de estas técnicas incluyen el **uso de enzimas de restricción para localizar en el genoma los sitios de restricción**, el **mapeo de sitios de secuencia específica** (“*sequence tagged sites*”), o la **secuenciación de ADN**.

Para la **detección de las secuencias** en la región en que se encuentran en el genoma, una de las técnicas más frecuentemente empleadas es la **hibridación in situ**. Para llevarla a cabo, se emplean sondas de ADN de secuencia conocida y complementaria a la que se desea marcar. Estas sondas se marcan con isótopos radiactivos o fluorescencia, de tal manera que hibridarán con las secuencias complementarias en el ADN de estudio y permitirán su **observación directa con el microscopio óptico o de fluorescencia** sobre un extendido cromosómico.

Una de sus variantes más empleadas es la técnica **FISH**, de **hibridación in situ fluorescente**. Se trata de una técnica sensible, que permite localizar una secuencia con una gran precisión, y resulta útil para detectar diversas anomalías cariotípicas. Se pueden emplear múltiples fluorocromos que emiten a diferentes longitudes de onda, como la fluoresceína, la rodamina y el Texas Red.

En cualquier caso, pueden emplearse además otro tipo de técnicas:

- **Electroforesis**. Se trata de una técnica estándar que permite la separación de moléculas en función de su tamaño y su carga eléctrica. Se emplea frecuentemente para la realización de algunos tipos de análisis genómicos, como el estudio del ADN recombinante.
- **Técnicas de transferencia e hibridación a membranas**. En primer lugar, las moléculas a estudiar se separan mediante una electroforesis en gel, tras lo cual se transfieren a una membrana de nitrocelulosa mediante la acción capilar. Tras la transferencia, se emplean **sondas de hibridación** marcadas radiactiva o químicamente para la detección de los fragmentos complementarios presentes. Según el tipo de molécula a analizar, se pueden diferenciar:
  - **Southern Blot**, empleado para el análisis de ADN
  - **Northern Blot**, para el análisis de ARN
  - **Western Blot**, para el análisis de proteínas. Las sondas empleadas pueden ser anticuerpos específicos para detectar las proteínas de interés
- **Footprinting del ADN**. Se emplea para determinar las secuencias de ADN que actúan como sitios de fijación para algunas proteínas, así como las proteínas que se unen a estos sitios de fijación, y las interacciones entre ambos elementos.

- Uso de animales de experimentación **transgénicos**, siendo una de sus variantes más empleadas el uso de **ratones “knock-out”**, a los cuales se les ha desactivado un determinado gen interés.
- **PCR y secuenciación** genómica.

### 2.1.1. Mapas físicos del genoma

Los mapas físicos se basan en el **análisis directo** del ADN, y permiten establecer **distancias** entre regiones genéticas.

Los tipos de mapas físicos más importantes incluyen los **mapas citogenéticos o de bandedo** (aunque algunos autores los consideran una categoría aparte, diferente a los mapas físicos) y los **mapas de regiones adyacentes, o de “contigs”**.

#### 2.1.1.1. Mapas citogenéticos

Los primeros **mapas físicos** disponibles para el estudio de los genomas fueron los **mapas citogenéticos**, que permitieron la observación directa mediante microscopía del patrón de bandas presente en cada uno de los cromosomas estudiados. También se denomina **bandedo cromosómico**.

Este tipo de mapas físicos son útiles para el estudio de **alteraciones cromosómicas** como las **deleciones y translocaciones**, siendo fundamentales para el estudio de ciertas condiciones causadas por este tipo de alteraciones. Hoy en día, la elaboración y estudio de mapas citogenéticos es empleado como elemento diagnóstico para detectar un gran número de patologías, siendo también útil para realizar **estudios evolutivos** y determinar el grado en el que las especies están relacionadas entre sí.

Las **técnicas más empleadas** para el estudio citogenético son aquellas basadas en la **generación de células híbridas** en las que estudiar los diferentes cromosomas.

- **Híbridos de células somáticas.** Se realiza en primer lugar la fusión *in vitro* de células somáticas provenientes de diferentes especies. En estas células híbridas existe una tendencia a **perder los cromosomas que pertenecen a uno de los conjuntos parentales**, predominando el otro conjunto. Así, resulta posible obtener un panel de células híbridas que hayan perdido un número variable de cromosomas correspondiente a uno de los conjuntos, pudiendo expresarse **los cromosomas de forma individual en algunas de estas células**. Por ejemplo, en el caso de los híbridos ratón/humano, las células tienden a perder los cromosomas humanos, por lo que en un número variable de estas células se presentará cada uno de los cromosomas humanos de forma individual junto con el conjunto completo de cromosomas de ratón.

Estos cromosomas pueden ser detectados mediante técnicas como la **hibridación in situ**, pudiendo asignar la presencia de **un gen o región genética a un determinado cromosoma**.

- **Híbridos de radiación.** Esta técnica fue descrita por Goss y Harris en la década de los 70. Los paneles de células híbridas se construyen a partir de células de la especie en estudio **irradiadas letalmente para causar la fragmentación de sus cromosomas**, que se fusionarán con líneas celulares **deficientes para un marcador de selección**. Estos marcadores deben ser **moléculas esenciales para la supervivencia de las células bajo ciertas condiciones**, de tal manera que aquellas que no incorporen los fragmentos genéticos correspondientes de las células irradiadas no serán capaces de sobrevivir. Los marcadores más frecuentemente empleados incluyen la timidina quinasa o la hipoxantina fosforibosil transferasa. En teoría, los loci que se encuentran próximos tendrán más posibilidades de retenerse **en el mismo fragmento cromosómico después de la irradiación**.

El estudio de la presencia de marcadores permite **definir la localización de los mismos**, de tal forma que los marcadores que aparezcan en las mismas células se considerarán en posiciones próximas.

#### 2.1.1.2. Otros tipos de mapas físicos: mapas de “contigs”

Además de los mapas citogenéticos, otros tipos de mapas físicos también resultan de interés para el estudio de los genomas. El tipo más importante es el **mapa de regiones contiguas (“contigs”)**.

Para generar este tipo de mapas, se generan bibliotecas de fragmentos de ADN mediante una **digestión enzimática por restricción**. Los fragmentos correspondientes a regiones adyacentes contendrán una zona **de secuencia superpuesta**, es decir, que estará presente en ambos fragmentos.

Estos fragmentos se insertarán en **vectores de clonación, como los YACs** (cromosomas artificiales de levadura) o los **BACs** (cromosomas artificiales bacterianos).

Estos clones posteriormente se analizan para **determinar cuáles contienen regiones de secuencias superpuestas**. Así, los clones **que presentan estas secuencias superpuestas** se considerará que contienen **zonas adyacentes o contiguas del genoma**, constituyendo un **contig**.

Este tipo de estudios suponen una herramienta indispensable para **el ensamblado de secuencias genómicas completas**.

#### 2.1.2. Mapas genéticos

Los **mapas genéticos o mapas de ligamiento se basan en la localización relativa de marcadores específicos en los cromosomas**.

Así, teniendo en cuenta el concepto de **ligamiento**, se entiende que los marcadores que se encuentren en el **mismo cromosoma** estarán **conectados físicamente** y por tanto deben segregarse juntos durante el proceso de meiosis.

La distancia entre dos marcadores, expresada en **centiMorgans** (una unidad que permite definir la recombinación), se define en función de su **tendencia a sufrir recombinaciones**. Así, no refleja una distancia física real entre los mismos sino la probabilidad de que estos se separen durante la meiosis, permitiendo una aproximación teórica a dicha distancia física. En cualquier caso, debe tenerse en cuenta de que la tasa de recombinación en un cromosoma no es uniforme, sino que pueden darse **interferencias** en caso de que otro fenómeno de recombinación esté teniendo lugar en el mismo cromosoma simultáneamente. Por ello, existe una **discrepancia relativamente alta** entre la distancia **genética y física** de dos elementos genéticos.

Para la construcción de este tipo de mapas, se cruzan individuos **heterocigotos** para uno o varios loci y se estudian **los fenómenos de recombinación ocurridos**.

En caso de que la frecuencia de recombinación entre dos loci sea del **50% o superior**, se considerará que **los loci están localizados en posiciones muy separadas del mismo cromosoma**, o bien en **cromosomas diferentes**.

Con frecuencias de recombinación **inferiores al 50%**, puede considerarse que los loci se localizan en el mismo cromosoma en posiciones físicas próximas, es decir, que pertenecen al **mismo grupo de ligamiento**. La frecuencia de recombinación será proporcional a la distancia física entre los loci.

Este tipo de mapas presenta ciertas limitaciones, principalmente su baja resolución y su discrepancia con los mapas físicos. En cualquier caso, han sido fundamentales para el desarrollo de la genómica estructural, la construcción de mapas físicos y el ensamblado de secuencias genómicas completas.

### 2.1.3. Secuenciación genómica

La secuenciación de ácidos nucleicos es objeto exclusivo de uno de los temas (tema 32), pero la secuenciación de **genomas completos** para la realización de estudios de genómica estructural presenta ciertas particularidades que se deben reseñar.

Para este tipo de estudios, fundamentalmente se emplean dos **métodos de secuenciación**:

- Métodos de **Shotgun Sequencing** (“secuenciación de escopeta”) y de **Hierarchical Shotgun Sequencing** (“secuenciación jerárquica de escopeta”)
- Método de **secuenciación clone-by-clone** (“secuenciación clon a clon”)

### 2.1.3.1. Shotgun sequencing

La conocida como **Shotgun Sequencing** es la metodología más eficiente para la secuenciación de fragmentos largos de ácidos nucleicos.

Permite la secuenciación del genoma completo, cromosoma a cromosoma, para lo cual en primer lugar se debe fragmentar el ADN en fragmentos de diversos tamaños, de los cuales se generarán múltiples copias para construir una biblioteca de fragmentos que serán posteriormente secuenciados de forma individual. Estas copias pueden generarse mediante **clonación**.

Mientras que en el método de **Hierarchical Shotgun Sequencing** la fragmentación del genoma y la secuenciación tienen lugar en dos pasos consecutivos, y los fragmentos generados son por norma general fragmentos más largos, el método de **Shotgun Sequencing** tiene lugar en un único paso, generándose fragmentos de menor tamaño que serán secuenciados aleatoriamente.

Para realizar el ensamblado posterior de la secuencia, los programas informáticos analizan tramos de secuencias idénticas en las diferentes lecturas, pudiendo identificar así zonas de **solapamiento** entre los reads, de forma similar a lo descrito para la generación de mapas de *contigs*.

### 2.1.3.2. Secuenciación clon a clon

La diferencia principal entre la secuenciación Shotgun y la secuenciación clon a clon es que, para este segundo método, **se realiza el mapeo de los cromosomas previamente a la fragmentación del ADN**, mientras que en la secuenciación Shotgun este paso no tiene lugar, por lo que la escisión del ADN tiene lugar en regiones aleatorias.

En la secuenciación clon a clon, tras el mapeo el ADN se escinde generando fragmentos de unas 150 kilobases que posteriormente se clonarán. Tras el clonado, los fragmentos generados y clonados se vuelven a romper, dando lugar a fragmentos de unas 500 bases de largo. Estos fragmentos más pequeños se insertan de nuevo en **vectores con una secuencia de ADN conocida** a partir de la cual comienza la secuenciación del ADN problema.

Como en el caso de la secuenciación Shotgun, los programas informáticos identificarán las secuencias solapantes del ADN para realizar el ensamblado de la secuencia al completo. Además, al disponer de datos de mapeo de los cromosomas, esta secuencia se puede ensamblar teniendo en cuenta qué fragmentos se encuentran en cada uno de ellos.

En cuanto a los **vectores** que se pueden emplear para la clonación y secuenciación del ADN, pueden mencionarse:

- **Plásmidos**. Se trata de fragmentos de ADN circulares que se presentan de forma natural en las bacterias y que contienen orígenes de replicación, por lo que son capaces de replicarse de forma independiente con respecto al cromosoma bacteriano. Para la inserción de ADN en ellos suelen emplearse enzimas de restricción.

- **Bacteriófagos.** Son virus que presentan una elevada eficacia para la transmisión del ADN a bacterias, en cuyo genoma además se presenta una alta proporción de regiones no esenciales que pueden ser sustituidas por el ADN que se desea clonar.
- **Cósmidos.** Son fragmentos de ADN pequeños, similares a los plásmidos, pero que presentan ciertos sitios genéticos (sitios “cos”) de los bacteriófagos. Pueden alojar grandes fragmentos de ADN de interés para su clonación.
- **Cromosomas artificiales,** como YACs (cromosomas artificiales de levadura) y BACs (cromosomas artificiales de bacterias). Pueden emplearse para la inserción y clonación de secuencias grandes, de hasta 1Mb en el primer caso, y hasta 500Kb en el segundo.

## 2.2. GENÓMICA FUNCIONAL

La genómica funcional se dedica, como su propio nombre indica, al estudio de la **función de los genes**, clasificándolos. Esta disciplina permite **profundizar en la organización genética** de los organismos y cómo esta afecta a su fisiología, por lo que es un paso fundamental para el análisis de la información genómica.

Como resulta lógico, este tipo de análisis resulta más complicado que el estudio de la estructura de los genomas, ya que la expresión de las funciones de los genes puede verse afectada por múltiples factores, tanto intrínsecos como extrínsecos al genoma.

Tradicionalmente, la función de los genes se ha estudiado mediante la **observación y análisis del fenotipo resultante en los individuos**, pero existen múltiples caracteres cuya expresión es multifactorial, para los cuales no existe una manifestación fenotípica clara que pueda ser analizada.

A partir de la **secuencia de nucleótidos de un gen** se puede **predecir la secuencia de aminoácidos** de la proteína que codificará. Esto puede permitir sintetizar o simular informáticamente la proteína para el estudio de sus propiedades, pero se trata de un enfoque costoso en términos tanto económicos como de esfuerzo.

Un enfoque mucho más extendido es la realización de **estudios de homología** con otros **genes ya descritos**, partiendo de la premisa de que es probable que genes de secuencia similar se traduzcan en proteínas similares que pueden presentar funciones, así mismo, relacionadas. Estos estudios pueden realizarse mediante la **búsqueda en bases de datos, como GenBank**.

Además de al ADN, el estudio **genómico funcional** puede dirigirse a otras moléculas, como el ARN o las proteínas. Así, la genómica funcional es una disciplina **ligada de forma directa** a otras como la **transcriptómica, la proteómica y la metabolómica**, ya que estos productos genéticos resultan tan importantes para dilucidar la función de los genes como los propios elementos genéticos.

En la actualidad existen múltiples técnicas para realizar análisis de genómica funcional, que deben permitir el estudio de moléculas tanto de ADN como de ARN (para la realización de

estudios de expresión) y, en menor medida, proteínas y otras moléculas. Entre estas técnicas se pueden mencionar:

- Técnicas de **Differential Display** o expresión diferencial. Permiten la comparación de los perfiles de expresión entre dos o más células eucariotas. Para ello, pueden emplearse técnicas como la **secuenciación, la PCR o los microarrays**.
- **Uso de microarrays o chips de ADN** (o de ARN). Permiten estudiar la presencia o la expresión de miles de genes o alelos de forma simultánea. Consisten en soportes de vidrio que presentan unidas a la superficie miles de sondas de secuencias complementarias a regiones conocidas del genoma, de tal manera que los fragmentos (por ejemplo, los genes o los transcritos) presentes en la muestra **hibridarán con estas sondas**, pudiendo ser detectados.
- **Análisis en serie de la expresión génica (SAGE)**. Permite detectar y cuantificar la expresión de genes en una muestra, pudiendo crear perfiles de expresión para determinados tejidos o individuos. Mediante la comparación de estos perfiles se puede inferir qué genes están relacionados con la aparición de determinadas condiciones. Consiste en el aislamiento y clonado de fragmentos de información genética que están presentes en la población celular o tejido de interés y que serán posteriormente secuenciados. La frecuencia de aparición de un determinado elemento en las lecturas refleja su frecuencia de aparición en los fragmentos clonados, y por ende la **abundancia** con que el transcrito está presente en la muestra. Permite, por tanto, la realización de análisis a nivel **tanto cualitativo como cuantitativo**.
- Secuenciación masiva del **ARN o RNA-Seq**. Permite secuenciar el transcriptoma al completo, de forma similar a la secuenciación del genoma.
- Para el análisis **proteómico y metabolómico** se emplean técnicas que permitan el estudio de este tipo de moléculas, siendo fundamentales los métodos de **espectrometría de masas**. Estos permiten determinar la presencia de una determinada molécula en la muestra de tal manera que pueda ser estudiada de forma similar a lo descrito para los ácidos nucleicos.
- Para el análisis de proteínas también se pueden emplear métodos como el **Western Blot** o la **electroforesis en gel**.

### 2.3. GENÓMICA COMPARATIVA

La **genómica comparativa** consiste en el **estudio de los genomas** mediante su **comparación** con genomas de otro u otros organismos, analizando sus semejanzas y diferencias. La información obtenida resulta de gran utilidad para comprender mejor la estructura y función de diversos elementos genéticos.

La simple comparación de caracteres genómicos generales, como pueden ser el **tamaño del genoma**, el **número de genes presentes** y el **número de cromosomas** en que se organiza resulta un **punto de inicio** para este análisis genómico comparativo.

Una comparación de mayor resolución entre genomas de diversas especies (por ejemplo, mediante el uso de secuenciación) permite identificar **regiones altamente conservadas**, que se definen como aquellas que presentan una alta analogía entre especies más o menos alejadas filogenéticamente. Estas regiones altamente conservadas contendrán, con mayor probabilidad, **genes importantes para ciertas funciones vitales**. Por el contrario, aquellas regiones que se presenten menos conservadas entre los diferentes organismos es más probable que contengan genes que no resulten indispensables para realizar funciones vitales.

Así, se pueden definir ciertos términos que se emplearán en los estudios de genómica comparativa y servirán para analizar las relaciones entre genes de diferentes especies:

- La **sintenia genética** se define como una situación en la cual los genes aparecen estructurados **en bloques similares** en **diferentes especies u organismos**.
- Los genes **homólogos** son los que presentan un **ancestro común**. Pueden ser:
  - Genes **ortólogos**. Son aquellos que **comparten** un último ancestro común, y cuyas diferencias se deben a la especiación. Son, por tanto, los mismos genes presentados en diferentes especies.
  - Genes **parálogos**. Son genes cuyo último ancestro en común **es diferente**, es decir, que no presentan relación de **ortología**.

Para llevar a cabo estos estudios, la genómica comparativa emplea un amplio rango de métodos, pudiendo realizarse técnicas para el análisis a muy diferentes niveles:

- La **utilización de bases de datos de secuencias nucleotídicas y aminoacídicas** resulta fundamental para poder realizar la comparación entre las moléculas de interés y otras que han sido previamente caracterizadas.
- Para obtener información sobre las regiones genómicas que se desea comparar pueden emplearse **técnicas de cartografía genética**, como la hibridación in situ fluorescente (FISH), u otras técnicas de genómica estructural como la **secuenciación**. Una técnica empleada para el estudio comparativo entre genomas de diferentes especies es el **pintado cromosómico comparativo**, que utiliza sondas marcadas con fluorescencia de una **especie**, haciendo que hibriden sobre los cromosomas de **otra especie**.
- La realización de métodos experimentales, como la **inducción de mutagénesis** en animales de experimentación, puede ayudar a obtener información de diversos aspectos sobre caracteres genéticos. A partir de estos organismos modelo se pueden comparar ciertas funciones básicas para estudiar el desarrollo de enfermedades hereditarias, o bien analizar la interacción entre diferentes genes.

### 3. APLICACIONES DE LOS ANÁLISIS GENÓMICOS

Los análisis **genómicos** han permitido avanzar notablemente en el conocimiento de la estructura, función y evolución del material genético de los organismos.

La **genómica estructural** ha permitido conocer de forma más extensa la **organización de los elementos genómicos** y su **secuencia**, por lo que algunas de las aplicaciones a las que ha contribuido en los laboratorios de sanidad y genética animal podrían incluir:

- Desarrollo de **técnicas de diagnóstico moleculares**. Para el diseño de estas técnicas (como la PCR) es fundamental conocer la **secuencia** de las regiones a las que se dirigirán, su **grado de conservación** para poder dirigir los cebadores a las zonas más conservadas, y su **especificidad** (si se trata de genes que presentan la misma secuencia en diferentes organismos o no).
- Conocimiento en profundidad sobre la **caracterización de agentes patógenos**.
- Identificación de genes que codifican para **proteínas de interés**, que a su vez puede servir para realizar la **síntesis artificial** de dichas proteínas, que podrán emplearse como productos farmacéuticos o reactivos para determinadas técnicas diagnósticas.
- Descripción de la **estructura cromosómica** en las diferentes especies. Gracias al conocimiento sobre el número de cromosomas y la distribución de genes en los mismos, se pueden desarrollar técnicas diagnósticas basadas en el cariotipado, para la **identificación de enfermedades debidas a alteraciones estructurales** o para la **identificación de especies**, entre otras aplicaciones.

La **genómica funcional** permite analizar la forma en que los genes determinan la expresión de proteínas y, en consecuencia, las funciones vitales de los organismos. Sus aplicaciones relacionadas a la actividad de los laboratorios de sanidad y genética animal podrían incluir:

- Caracterización de los **transcriptomas**, por ejemplo para estudiar los patrones de **expresión genética asociados a diferentes procesos, como las infecciones** por diferentes agentes, o determinadas enfermedades de origen genético.
- Identificación de la función de los genes de los agentes patógenos, pudiendo estudiar por ejemplo si intervienen en la **interacción con células hospedadoras** o en la **activación de la respuesta inmune**.
- Determinación de genes **implicados en caracteres de producción u otros** que puedan resultar de interés, por ejemplo en **programas de conservación de razas**.

Por último, las **aplicaciones de la genética comparativa** son notables en el campo de la Medicina Veterinaria, y en consiguiente también resultan de gran interés para los laboratorios. Algunas de ellas son:

- Mapeo de **genes** o regiones genéticas **altamente conservadas** que puedan estar relacionadas con caracteres de producción u otros caracteres de interés.

- Realización de análisis **filogenéticos** entre patógenos, pudiendo determinar la proximidad o distancia de las diferentes especies o grupos de los mismos.

MATERIAL NO OFICIAL

## **BIBLIOGRAFÍA**

Virginia Espina and Lance A. Liotta (eds.), Luca Del Giacco and Cristina Cattaneo (2012). Molecular Profiling: Methods and Protocols. Chapter 6: Introduction to Genomics. Methods in Molecular Biology, vol. 823. [https://doi.org/10.1007/978-1-60327-216-2\\_6](https://doi.org/10.1007/978-1-60327-216-2_6)

Genómica. Facultad de Biología, Universidad Tecnológica de Pereira (Colombia). [Internet]

MATERIAL NO OFICIAL

**MATERIAL PARA LA PREPARACIÓN DEL TEMA 34**

**PLAN NACIONAL DE CONTROL OFICIAL DE LA CADENA ALIMENTARIA. MARCO LEGAL. LABORATORIOS NACIONALES DE REFERENCIA Y LABORATORIOS DE REFERENCIA DE LA UNIÓN EUROPEA. DESIGNACIÓN, REQUISITOS Y FUNCIONES.**

*Este material no tiene carácter oficial, por lo que en ningún caso vinculará al Tribunal Calificador. Constituye, únicamente, un instrumento complementario que servirá de apoyo al opositor para enfocar cada uno de los epígrafes, pero nunca de forma exclusiva ni excluyente. El Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación no se hace responsable del contenido del mismo.*

*Los materiales no serán objeto de actualización constante.*

## **ÍNDICE**

### **1. INTRODUCCIÓN**

### **2. PLAN NACIONAL DE CONTROL OFICIAL DE LA CADENA ALIMENTARIA**

#### **2.1. ASPECTOS GENERALES**

2.1.1. Objeto

2.1.2. Estructura

2.1.3. Resultados

#### **2.2. MARCO LEGAL**

2.2.1. Plan Nacional de Control Oficial de la Cadena Alimentaria 2021-2025

### **3. LABORATORIOS OFICIALES Y LABORATORIOS NACIONALES DE REFERENCIA**

#### **3.1. DESIGNACIÓN Y REQUISITOS**

#### **3.2. FUNCIONES**

#### **3.3. LABORATORIOS DEL MAPA**

3.3.1. Laboratorios de sanidad de la producción agraria

3.3.2. Laboratorios agroalimentarios

### **4. LABORATORIOS DE REFERENCIA DE LA UNIÓN EUROPEA**

#### **4.1. DESIGNACIÓN Y REQUISITOS**

#### **4.2. FUNCIONES**

## 1. INTRODUCCIÓN

Las condiciones sanitarias de la cabaña ganadera han constituido siempre una preocupación de las Administraciones públicas por diversos motivos. El primero, para maximizar la rentabilidad de las explotaciones y conseguir una mejor calidad de vida en el entorno rural. Asimismo, por motivos de salud pública, para evitar el desarrollo de enfermedades animales que puedan ser transmisibles a las personas. Además, la sanidad animal juega un papel de primer orden en la apertura y mantenimiento de los flujos comerciales con terceros países que permiten que nuestro sector agroalimentario tenga una clara vocación exportadora colaborando a equilibrar la balanza comercial negativa.

Por ello, la aparición de enfermedades animales implica importantes restricciones e, incluso, el cierre de nuestras fronteras para los productos de origen animal y, por tanto, repercute directamente sobre el sector agroalimentario. Sirva de ejemplo mencionar la relevancia para el comercio español de los derivados del porcino y el impacto que para ellos tendría una hipotética aparición la temida Peste Porcina Africana, como así ha ocurrido con otros países comunitarios.

Por consiguiente, las Administraciones Públicas (AA.PP.) están obligadas a diseñar e implantar políticas de sanidad animal dirigidas a instaurar sistemas de vigilancia epidemiológica y programas de control, lucha y erradicación frente a las principales enfermedades animales con el objetivo de controlar sus consecuencias económicas, comerciales y sanitarias.

Para llevar a cabo esta labor, se ha creado el **Plan Nacional de Control Oficial de la Cadena Alimentaria** que persigue unificar en un único documento todos aquellos controles a los que han de someterse los alimentos para garantizar altos niveles de seguridad alimentaria desde la producción primaria hasta su venta al consumidor final.

Respecto a la producción primaria, una pieza clave para el control de la sanidad animal se sostiene sobre la Red de Laboratorios Oficiales, imprescindible para el correcto funcionamiento de la Red de alerta sanitaria. De esta forma los laboratorios que integran esta red constituyen un elemento de primer orden a través del apoyo analítico a las tareas de control desarrolladas por los servicios veterinarios oficiales para el diagnóstico de las principales enfermedades animales que afectan a la cabaña ganadera.

La normativa de referencia tanto para el Plan Nacional de Control Oficial de la Cadena Alimentaria como para los laboratorios oficiales de análisis recae sobre el **Reglamento 625/2017** del Parlamento Europeo y del Consejo, de 15 de marzo de 2017, *relativo a los controles y otras actividades oficiales realizados para garantizar la aplicación de la legislación sobre alimentos y piensos, y de las normas sobre salud y bienestar de los animales, sanidad vegetal y productos fitosanitarios*.

Esta norma ofrece un marco único, simple y armonizado para la organización de los controles oficiales a lo largo de toda la cadena agroalimentaria, aumentando la transparencia sobre las actividades de control oficial gracias a la digitalización, la asistencia y la cooperación interadministrativa.

## 2. PLAN NACIONAL DE CONTROL OFICIAL DE LA CADENA ALIMENTARIA

### 2.1. ASPECTOS GENERALES

El **Plan Nacional de Control Oficial de la Cadena Alimentaria (PNCOCA)** es el documento que describe los sistemas de control oficial que tienen lugar a lo largo de toda la cadena alimentaria en España, es decir, desde la producción primaria hasta los puntos de venta al consumidor final. El Plan es completo e integral y describe las actuaciones de control oficial de las distintas Administraciones Públicas españolas en el ámbito de sus competencias.

Las competencias en el control oficial de la cadena alimentaria en nuestro país recaen, a nivel central, en los Ministerios de Agricultura, Pesca y Alimentación; el Ministerio de Sanidad; el Ministerio de Consumo y el Ministerio de Industria, Comercio y Turismo, que ostentan un papel principalmente coordinador. No obstante, con la excepción de los controles en frontera, las competencias en la planificación y ejecución de los controles oficiales recaen principalmente en las comunidades autónomas.

#### 2.1.1. Objeto

El Plan Nacional de Control Oficial de la Cadena Alimentaria tiene por objeto unificar todos aquellos controles a los que se someten los alimentos desde su producción en la granja hasta su puesta a disposición del consumidor final. Se trata, por tanto, de un documento único que persigue garantizar la **transparencia informativa**, así como reunir los requisitos necesarios en materia de controles en ámbitos que abarcan la higiene de piensos, la sanidad animal y vegetal, la seguridad y calidad alimentaria y la salud pública.

La finalidad es proporcionar un marco sólido, estable y flexible para la realización de los controles oficiales sobre animales, alimentos y piensos donde las administraciones públicas, operadores económicos y consumidores encuentren un referente para las obligaciones derivadas del cumplimiento de la normativa aplicable.

#### 2.1.2. Estructura

El contenido del PNCOCA incluye:

- Los objetivos estratégicos del plan y sus prioridades de control para la asignación de recursos.
- La categorización del riesgo de las actividades de control para cumplir los objetivos fijados.
- La designación de las autoridades competentes y sus tareas a nivel central, regional y local, así como los recursos disponibles.
- Los sistemas de control a realizar en cada uno de los sectores implicados en la producción de piensos y alimentos y la coordinación entre los diferentes servicios de las autoridades competentes responsables.
- Si procede, la delegación de tareas en organismos de control.
- Los métodos para garantizar el cumplimiento de los criterios operativos.

- La formación del personal responsable de realizar los controles oficiales.
- Los procedimientos documentales en los que se van a basar los controles oficiales.
- La organización de planes de emergencias relacionadas con enfermedades animales o alertas alimentarias relacionadas con la contaminación de piensos y otros riesgos para la salud humana.
- La organización de la cooperación y la asistencia mutua.

### **2.1.3. Resultados**

Los resultados del PNCOCA se recogen anualmente en un informe en el que, de manera preestablecida, se incluye toda la información relevante que permite asegurar el cumplimiento de todos los controles oficiales que se han efectuado a lo largo de la cadena alimentaria.

De esta forma, el actual modelo de **informe anual** empleado es el recogido en el **Reglamento de ejecución (UE) 2019/723 de la Comisión, de 2 de mayo de 2019**, por el que se establecen disposiciones de aplicación del Reglamento (UE) 2017/625 del Parlamento Europeo y del Consejo en lo que respecta al modelo de formulario normalizado que debe utilizarse en los informes anuales presentados por los Estados Miembros (EE.MM).

Este informe, a su vez, se divide en tres grandes bloques:

- Producción primaria y calidad alimentaria, del que es responsable el Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación.
- Establecimientos alimentarios y alimentos, del que es responsable el Ministerio de Consumo.
- Mercancías de uso o consumo humano procedentes de terceros países, del que es responsable el Ministerio de Sanidad.

## **2.2. MARCO LEGAL**

La existencia de un Plan Nacional de control multianual es obligatoria en todos los Estados Miembros de la Unión Europea, de acuerdo con el **artículo 109 del Reglamento (UE) 2017/625**, donde se establece que las autoridades competentes de las distintas administraciones que conforman los EE.MM. desarrollarán las actividades de control en base a un **Plan Nacional de Control de la Cadena Alimentaria plurianual integrado**.

### **2.2.1. Plan Nacional de Control Oficial de la Cadena Alimentaria 2021-2025**

El PNCOCA es un plan quinquenal que en la actualidad abarca el periodo comprendido entre 2021 y 2025. Consta de una parte general en la que se describen los principios orientadores en los que se ha basado la redacción del plan, la organización territorial y la distribución de competencias entre las distintas administraciones, y establece 4 objetivos de alto nivel:

- **OBJETIVO 1.** Reducir los riesgos para la salud de las personas, los animales o las plantas a través del cumplimiento por los operadores implicados en la producción

primaria, de la normativa aplicable en seguridad alimentaria, sanidad animal y vegetal y bienestar animal.

- **OBJETIVO 2.** Reducir los riesgos para la salud de las personas, presentes en los alimentos, asegurando el bienestar de los animales destinados al sacrificio para el consumo humano, mediante la organización de controles oficiales en establecimientos alimentarios, y verificar el cumplimiento por parte de los operadores de la normativa aplicable en seguridad alimentaria, nutrición y bienestar animal.
- **OBJETIVO 3.** Garantizar la consecución de un elevado nivel de calidad alimentaria, incluidas la Calidad Diferenciada y la Producción Ecológica, de los productos agroalimentarios e intensificar la lucha contra el fraude alimentario, a lo largo de toda la cadena alimentaria, para conseguir la sostenibilidad del sistema agroalimentario, aumentar la confianza de los consumidores, garantizar su derecho a la información y a la protección de sus intereses económicos frente a prácticas comerciales desleales.
- **OBJETIVO 4.** Reducir los riesgos para la salud de las personas y sus intereses, para la salud de los animales o las plantas a través del cumplimiento por los operadores de la normativa aplicable en seguridad alimentaria, sanidad animal, sanidad vegetal, bienestar animal, calidad comercial, producción ecológica, garantizando la consecución de un alto nivel de calidad alimentaria intensificando además la lucha contra las prácticas fraudulentas o engañosas en los animales, plantas y alimentos introducidos o importados a través de las fronteras españolas. Además, se contempla ofrecer garantía sanitaria y fitosanitaria de los vegetales, productos vegetales y animales, objeto de exportación.

Algunos de los programas de control oficial competencia del MAPA son:

- ✓ PNCO de la liberación voluntaria de organismos modificados genéticamente (OMG) para la producción de alimentos y piensos
- ✓ PNCO de higiene de la producción primaria ganadera
- ✓ PNCO de alimentación animal
- ✓ PNCO de Importaciones de animales, productos de origen animal no aptos para consumo humano, productos destinados a la alimentación animal y de importaciones de vegetales, productos de origen vegetal y otros objetos.
- ✓ PNCO para verificar el cumplimiento de la normativa en materia de sanidad animal de los animales y productos de la acuicultura
- ✓ PNCO de los establecimientos autorizados de productos reproductivos de las especies bovina, equina, ovina, caprina y porcina.
- ✓ PNCO de subproductos de origen animal no destinados a consumo humano en establecimientos y transporte de SANDACH
- ✓ PNCO del bienestar animal en explotaciones ganaderas y en el transporte de animales

### 3. LABORATORIOS OFICIALES Y LABORATORIOS NACIONALES DE REFERENCIA

En cuanto a los laboratorios de análisis, el concepto de **laboratorios oficiales** hace referencia a aquellos que están reconocidos por las autoridades competentes para emitir resultados de carácter oficial y son, por tanto, los responsables de llevar a cabo los análisis enmarcados dentro de los programas oficiales de vigilancia, control y erradicación de las enfermedades animales y vegetales, así como del cumplimiento de la normativa en materia de higiene y seguridad alimentaria. En definitiva, son aquellos laboratorios responsables de desarrollar los análisis pertinentes de cualquier actividad de control oficial.

Estos laboratorios pueden ser de titularidad pública o privada, pero han de contar, en todo caso, con el reconocimiento de las Autoridades Competentes de las CC.AA. para la realización de pruebas analíticas, cuyos resultados tendrán carácter y validez oficial.

En España, la organización de estos laboratorios se estructura en dos niveles, extensibles a tres. En la cúspide se sitúan los **Laboratorios Nacionales de Referencia (LNR)**, responsables en última instancia, de confirmar la presencia de un agente peligroso concreto. En segundo lugar, los **Laboratorio Regionales de Referencia**, responsables bien de ejecutar o bien de centralizar los análisis de cribado realizados por las CC.AA. y, en los casos que resulten positivos o dudosos, remitírselos a los LNR. El tercer nivel se compone por los **laboratorios provinciales** que podrán darse en aquellas comunidades con más de una provincia que así lo decidan.

#### 3.1. DESIGNACIÓN Y REQUISITOS

La **designación de un laboratorio oficial** corre a cargo de las autoridades competentes de un Estado Miembro o de un país tercero si forma parte de un Acuerdo sobre el Espacio Económico Europeo. Esta designación se hará por escrito e incluirá una descripción detallada de las tareas que el laboratorio lleva a cabo como laboratorio oficial, las condiciones en que lleva a cabo esas tareas y las disposiciones necesarias para garantizar una coordinación eficiente entre el laboratorio y las autoridades competentes en la ejecución de los análisis de control oficial.

En este sentido, las autoridades competentes solo podrán designar como laboratorio oficial un laboratorio que:

- disponga de la experiencia, el equipamiento y la infraestructura necesarios para la realización de análisis, ensayos o diagnósticos de las muestras;
  - cuente con personal suficiente con la cualificación, formación y experiencia adecuadas;
  - garantice que las tareas que tiene encomendadas se realizan de manera imparcial y sin conflictos de intereses;
  - pueda entregar en tiempo oportuno los resultados del análisis, ensayo o diagnóstico efectuado con las muestras tomadas durante los controles y otras actividades oficiales;
- y

- funcione de acuerdo con la **norma EN ISO/IEC 17025** y esté acreditado de acuerdo con dicha norma por un organismo nacional de acreditación que funcione de conformidad con el Reglamento (CE) 765/2008.

Cabe reseñar que el Reglamento establece en su artículo 40 las excepciones a la condición de acreditación obligatoria para determinados laboratorios oficiales como es el caso de los laboratorios cuya única actividad consiste en la detección de triquinas en carne.

Por otro lado, en el artículo 42 se establecen las excepciones temporales a la condición de acreditación obligatoria de los laboratorios oficiales, por las que las autoridades competentes podrán designar temporalmente un laboratorio oficial existente como laboratorio oficial de acuerdo a los requisitos que se han mencionado anteriormente. Esta designación temporal está sujeta a las siguientes condiciones:

- a) que el laboratorio oficial esté ya acreditado de acuerdo con la norma EN ISO/IEC 17025 para el uso de un método que sea similar al que no está incluido en el alcance de su acreditación;
- b) que el laboratorio oficial disponga de un sistema de garantía de la calidad para garantizar resultados sólidos y fiables al utilizar un método que no está incluido en el alcance de la acreditación vigente;
- c) que los análisis, ensayos o diagnósticos se efectúen bajo la supervisión de las autoridades competentes o del laboratorio nacional de referencia para ese método (ello puede llevarse a cabo mediante la participación de ensayos de intercomparación organizados por el LNR).

La acreditación deberá incluir los métodos de análisis, ensayo o diagnóstico y podrá comprender uno o más métodos o grupos de métodos de análisis.

En relación a los **métodos**, se establece en el artículo 34 que los métodos de muestreo, así como los de análisis, ensayo y diagnóstico de laboratorio, utilizados durante los controles oficiales y otras actividades oficiales cumplirán la normativa de la Unión por la que se establecen dichos métodos o los criterios de funcionamiento de dichos métodos.

De no existir, los laboratorios oficiales utilizarán uno de los siguientes métodos, en función de su idoneidad para sus necesidades específicas de análisis, ensayo y diagnóstico:

- a) los métodos disponibles que se ajusten a las normas o los protocolos pertinentes internacionalmente reconocidos, incluidos los aceptados por el Comité Europeo de Normalización (CEN), o los métodos pertinentes desarrollados o recomendados por los laboratorios de referencia de la Unión Europea y validados conforme a protocolos científicos aceptados a escala internacional;
- b) de no existir las normas o protocolos pertinentes mencionados en la letra a), los métodos que cumplan las normas pertinentes establecidas a escala nacional o, de no existir dichas normas, los métodos pertinentes desarrollados o recomendados por los laboratorios de referencia nacionales y validados conforme a protocolos científicos aceptados a escala internacional, o los métodos pertinentes desarrollados y validados con estudios de validación

de métodos realizados por el laboratorio o entre varios laboratorios conforme a protocolos científicos aceptados a escala internacional.

Siempre que sea posible, los métodos utilizados para los análisis de laboratorio se caracterizarán por los criterios pertinentes establecidos en el anexo III del Reglamento, tales como precisión, exactitud, repetibilidad, reproducibilidad, etc.

La designación de **los Laboratorios Nacionales de Referencia (LNR)** se lleva a cabo por parte de los Estados miembros quienes podrán designar uno o varios laboratorios nacionales de referencia por cada laboratorio de referencia de la Unión Europea designado. No obstante, los Estados miembros podrán designar también un laboratorio nacional de referencia cuando no exista el correspondiente laboratorio de referencia de la Unión Europea y así lo estimen oportuno.

Los LNR deberán ser imparciales y no tendrán conflicto de intereses, en especial, en lo relacionado con el ejercicio de sus tareas como laboratorios de referencia nacionales. Los LNR deberán contar con personal debidamente cualificado y formado y con conocimiento suficiente de las normas y prácticas internacionales y estarán al tanto en los últimos avances científicos. También deberán contar con personal de apoyo, o capacidad para contratarlo, cuando la situación de una enfermedad así lo requiera. Asimismo, estarán equipados o tendrán acceso al equipamiento necesario para realizar sus tareas en situaciones de emergencia, y cuando proceda, estarán equipados para cumplir las correspondientes normas de bioseguridad.

En lo referente a la condición de acreditación, para los LNR es **obligatorio** la acreditación en base a la **Norma UNE-EN ISO/IEC 17025** sin establecerse excepciones.

Esta acreditación deberá incluir los métodos de análisis, ensayo o diagnóstico y podrá comprender uno o más métodos o grupos de métodos de análisis. Además, deberán cumplir los requisitos que se establecen en el artículo 37 respecto a los métodos de ensayo descrito anteriormente.

Por otro lado, los laboratorios que desempeñen tareas relacionadas con el control oficial deben trabajar siguiendo estándares de **Buenas Prácticas de Laboratorio** conformes con el **Real Decreto 2043/1994**, *en el que se establecen los principios de las BPL así como la mecánica de su inspección y verificación por las Administraciones Públicas.*

Las buenas prácticas de laboratorio exigen que el laboratorio disponga de los siguientes elementos:

- Programa de Garantía de Calidad.
- Instalaciones, con condiciones adecuadas en cuanto a dimensiones, construcción, diseño y ubicación para satisfacer las exigencias de los estudios realizados.

- Aparatos, materiales, reactivos junto con registros de funcionamiento, mantenimiento, comprobación, calibración y validación, materiales y los reactivos químicos etiquetados correctamente y se almacenados a las temperaturas adecuadas, etc.
- Procedimientos adecuados para el manejo y el control de los distintos sistemas experimentales requeridos para los estudios realizados en la instalación como, por ejemplo, los sistemas químicos y físicos, celulares y microbianos.
- Procedimientos Normalizados de Trabajo (PNT), escritos para todos los aspectos importantes de las actividades que realiza.
- Informes sobre los resultados del estudio, determinando si los informes finales se elaboran en conformidad con los principios BPL
- Archivo y conservación de los registros

### 3.2. FUNCIONES

En cuanto a las funciones, los **laboratorios oficiales** deberán informar a las autoridades competentes que los hayan designado, sobre los resultados de un análisis efectuado con las muestras tomadas durante controles oficiales y cuando indiquen un riesgo para la salud humana, la salud animal o la sanidad vegetal o para el medio ambiente.

Asimismo, a petición del laboratorio de referencia de la Unión Europea o del laboratorio nacional de referencia, los laboratorios oficiales participarán en **ensayos interlaboratoriales** o en **ensayos de aptitud** organizados para los análisis, ensayos o diagnósticos que realicen en su calidad de laboratorios oficiales.

Igualmente, pondrán a disposición del público los nombres de los métodos utilizados para los análisis en el contexto de los controles oficiales y, además, indicarán junto con los resultados el método utilizado para cada análisis.

Por su parte, los **laboratorios nacionales de referencia**, en su ámbito de competencia:

- colaborarán con los laboratorios de referencia de la Unión Europea, y participarán en los cursos de formación y en los ensayos interlaboratoriales de comparación que organicen estos laboratorios;
- coordinarán las actividades de los laboratorios oficiales designados a fin de armonizar y mejorar los métodos de análisis, ensayo o diagnóstico de laboratorio y su utilización;
- cuando proceda, organizarán ensayos interlaboratoriales comparados o ensayos de aptitud entre los laboratorios oficiales, garantizarán un seguimiento apropiado de dichos ensayos e informarán a las autoridades competentes de los resultados de dichos controles y seguimiento;

- velarán por que se difunda a las autoridades competentes y a los laboratorios oficiales la información que aporte el laboratorio de referencia de la Unión Europea, en especial en los referente al desarrollo de técnicas analíticas e información científica;
- proporcionarán asistencia científica y técnica a las autoridades competentes para la aplicación del PNCOCA;
- validarán los reactivos y lotes de reactivos, establecerán y mantendrán actualizadas listas de sustancias y reactivos de referencia disponibles y de fabricantes y proveedores de dichas sustancias y reactivos;
- impartirán cursos de formación para el personal de los laboratorios oficiales designados
- asistirán activamente al Estado miembro que los haya designado en el diagnóstico de los brotes de enfermedades de origen alimentario, zoonosis o enfermedades de los animales, o de plagas de vegetales, y en caso de partidas no conformes, mediante la realización de diagnósticos de confirmación y estudios de caracterización y epizooticos o taxonómicos con cepas patógenas aisladas o muestras de plagas.

### 3.3. LABORATORIOS DEL MAPA

En el ámbito de las funciones del **Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación (MAPA)**, existen dos vertientes de laboratorios que dan servicio y apoyo analítico al cumplimiento del PNCOCA. Se trata, por una parte, de los *laboratorios de sanidad de la producción agraria*, compuestos, a su vez, por los laboratorios de análisis de sanidad animal y sanidad vegetal. Por otra parte, también dependientes del MAPA se encuentran los *laboratorios agroalimentarios*.

#### 3.3.1. Laboratorios de sanidad de la producción agraria

Los laboratorios de sanidad animal y sanidad vegetal del MAPA desde 2021 pertenecen a la **División de Laboratorios de Sanidad de la Producción Agraria**. Esta División nace como una entidad independiente, dentro de la Dirección General de Sanidad de la Producción Agraria. Esta División se compone por dos laboratorios de diagnóstico de sanidad animal y uno de sanidad vegetal:

- **Laboratorio Central de Veterinaria de Algete (LCV)**
- **Laboratorio Central de Sanidad Animal de Santa Fe (LCSA)**
- **Laboratorio Nacional de Sanidad Vegetal de Lugo (LNSV)**

Los campos principales de actividad del LCV y del LCSA son:

- ✓ Dar servicio a la Dirección General de Sanidad de la Producción Agraria en todas aquellas labores como laboratorio que se requieran y que entren dentro de las competencias establecidas.
- ✓ Funciones de apoyo a las Comunidades Autónomas en el diagnóstico de enfermedades infecciosas.
- ✓ Realización de los análisis requeridos para el comercio internacional de animales y productos biológicos. Exportación e importación.
- ✓ Funciones de referencia nacionales e internacionales.

Algunos ejemplos de estas referencias son:

LCSA, LNR para brucelosis y sus agentes causales, tuberculosis por "Mycobacterium bovis" u otros agentes, carbunco y sus agentes causales, estafilococos coagulasa positivos, fiebre Q y sus agentes causales, rabia, leishmaniasis y sus agentes causales, equinococosis y sus agentes causales, triquinosis y sus agentes causales, criptosporidiosis y sus agentes causales, cisticercosis y sus agentes causales, toxoplasmosis y sus agentes causales, anisakiasis y sus agentes causales, y otras parasitosis en productos para la alimentación animal y en animales vivos, salvo los sospechosos de rabia, (ORDEN APA/1808/2007, de 13 de junio, por la que se modifica el anexo V del Real Decreto 1940/2004, de 27 de septiembre, sobre la vigilancia de las zoonosis y los agentes zoonóticos).

LCV, LNR para Campilobacteriosis, listeriosis, salmonelosis, 'Escherichia coli' verotoxigénica, Leptospirosis, psitacosis, vibriosis, Yersiniosis, tularemia, borreliosis, botulismo... y sus agentes causales, Calicivirus, virus de la hepatitis A, virus de la gripe, virus transmitidos por artrópodos, y otras zoonosis y agentes zoonóticos, víricos o bacterianos en productos para la alimentación animal y en animales vivos, distintos de los indicados en el capítulo I, apartado b), de la ORDEN APA/1808/2007, de 13 de junio.

LCV, LNR para las enfermedades incluidas en el Anexo II del Real Decreto 804/2011, de 10 de junio, por el que se regula la ordenación zootécnica, sanitaria y de bienestar animal de las explotaciones equinas y se establece el plan sanitario equino: Arteritis Viral Equina y Metritis Equina Contagiosa (sujetas a programa de control sanitario); Peste Equina Africana, Anemia Infecciosa Equina, Muermo, Durina, Rinoneumonitis equina, Piroplasmosis equina, Gripe Equina, Encefalomielitis equina, Fiebre del Nilo Occidental (sujetas a plan de vigilancia epizootiológica)

LCV, LNR para diversas enfermedades de peces según el Real Decreto 1614/2008, de 3 de octubre, relativo a los requisitos zosanitarios de los animales y de los productos de la acuicultura, así como a la prevención y el control de determinadas enfermedades de los animales acuáticos. Aneo IV \_Lista de enfermedades: Necrosis hematopoyética epizoótica, Septicemia hemorrágica vírica, Necrosis hematopoyética infecciosa, Enfermedad causada por el virus herpes koi y la Anemia infecciosa del salmón (AIS): infección por genotipo HPR con delección del género Isavirus

Además, entre las actividades como Centro de Referencia se incluyen la contrastación de reactivos de diagnóstico, desarrollo y valoración de técnicas, identificación y/o conservación de los agentes patógenos, transferencia y validación de métodos de diagnóstico, mantenimiento de relaciones con la comunidad científica internacional, organización de ensayos de intercomparación, actividades de formación, coordinación con laboratorios oficiales de las diferentes CC.AA., etc.

En el ámbito de la sanidad animal, liderados por el LCV y LCSA, y en combinación con los laboratorios oficiales en esta materia de las CC.AA., se crea **la Red de Laboratorios de Sanidad Animal (RESALAB)** con la finalidad de consultar toda la información relativa a la carta de servicios de los laboratorios miembros de la red por medio de una base de datos centralizada. Esta red pone a disposición de los laboratorios una serie de herramientas destinadas a facilitar la colaboración e intercambio de información entre sus miembros y la participación en ensayos colaborativos.

### **3.3.2. Laboratorios agroalimentarios**

Por su parte, la **Subdirección General de Control y de Laboratorios Alimentarios** de la Dirección General de la Industria Alimentaria, tiene encomendadas, entre otras funciones, el desarrollo de las competencias en materia de control de la calidad de los alimentos, los piensos y otros medios de producción, en coordinación con las Comunidades Autónomas y colaborar con ellas en materia de análisis alimentarios y realizar análisis arbitrales cuando proceda; participar en el estudio y elaboración de metodología analítica y en la propuesta de métodos oficiales de análisis.

Dependientes de esta Subdirección General figuran el **Laboratorio Arbitral Agroalimentario de Madrid (LAA)** y el **Laboratorio Agroalimentario de Santander (LAS)**, designados como Laboratorios Nacionales de Referencia para diferentes áreas del ámbito agroalimentario y medios de la producción agraria.

Para dar cumplimiento a las obligaciones del Reglamento (UE) 2017/625, se ha creado la **Red de Laboratorios Agroalimentarios (LAGRORED)**, integrada por los laboratorios que han sido designados por las autoridades competentes de las Comunidades Autónomas para realizar el control oficial de productos agroalimentarios y medios de la producción agraria, y por los laboratorios agroalimentarios del MAPA. Con la creación de esta Red, se pretende lograr una coordinación más eficaz del control analítico oficial, así como facilitar la coordinación de las actuaciones en materia de análisis de productos agroalimentarios y medios de la producción agraria. Actualmente en la Red de Laboratorios Agroalimentarios figura un total de 46 laboratorios, de los cuales 44 han sido designados por las Comunidades Autónomas como laboratorios que pueden realizar el análisis de las muestras tomadas en los controles oficiales.

## **4. LABORATORIOS DE REFERENCIA DE LA UNIÓN EUROPEA**

En relación con los laboratorios de referencia de la Unión Europea, es importante recordar que la Unión Europea, como entidad supranacional, permite la existencia de un mercado único basado en la libre circulación de mercancías, personas, capitales y servicios, abriendo un

campo de posibilidades para el comercio agroalimentario con la puesta a disposición de casi 450 millones de consumidores. El éxito de este mercado único se asienta en la existencia de normas comunes en materia de higiene y seguridad de piensos y alimentos, así como en materia de sanidad animal y vegetal y bienestar de los animales, equiparando las exigencias legales entre EE.MM. y ofreciendo un marco legal sólido y fiable para la salud pública.

En este sentido, la creación de laboratorios de referencia de la Unión Europea en estos ámbitos contribuye con el cumplimiento de la normativa aplicable y ofrece un referente para los análisis derivados de los controles oficiales. Concretamente, la decisión por la que se establecen Laboratorios de Referencia de la Unión Europea depende de la calidad, uniformidad y fiabilidad de los métodos de análisis, ensayo o diagnóstico empleados por los laboratorios oficiales designados y de los resultados de los análisis, ensayos y diagnósticos efectuados por dichos laboratorios oficiales.

#### 4.1. DESIGNACIÓN Y REQUISITOS

La **designación** de los **laboratorios de referencia de la Unión Europea (EU-RL)** recae sobre la Comisión, a través de actos de ejecución. Las designaciones deberán ir precedidas de un proceso público de selección y tener una duración limitada y por un periodo mínimo de cinco años o revisarse periódicamente.

Por su parte, los laboratorios de referencia de la Unión Europea funcionarán de acuerdo con la **norma EN ISO/IEC 17025** y serán acreditados de acuerdo con dicha norma por un organismo nacional de acreditación que actúe de conformidad con el reglamento (CE) Nº 765/2008<sup>1</sup>. El alcance de dicha acreditación incluirá todos los métodos de análisis, ensayo o diagnóstico de laboratorio y podrá comprender uno o más métodos de análisis. Asimismo, se podrá definir de manera flexible, de modo que el alcance de la acreditación pueda incluir las versiones modificadas de los métodos utilizados por el laboratorio de referencia de la Unión Europea cuando se le concedió la acreditación o bien nuevos métodos además de aquellos, sobre la base de las propias validaciones del laboratorio sin una evaluación específica antes del uso de dichos métodos modificados o nuevos por parte del organismo nacional de acreditación del Estado miembro en que esté localizado.

Adicionalmente, los EURL serán imparciales, no tendrán conflicto de intereses, y en particular no se hallarán en una situación que, directa o indirectamente, pueda afectar a la imparcialidad de su conducta profesional en lo que respecta al ejercicio de sus tareas como laboratorios de referencia de la Unión Europea. Estos laboratorios deberán, además:

- Contar con personal cualificado y adecuadamente formado en técnicas de ensayo y diagnóstico aplicadas en su ámbito de competencia y con personal de apoyo según proceda o podrán contratarlo;

---

<sup>1</sup> Reglamento (CE) no 765/2008 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 9 de julio de 2008, por el que se establecen los requisitos de acreditación y vigilancia del mercado relativos a la comercialización de los productos y por el que se deroga el Reglamento (CEE) no 339/93

- Poseerán o tendrán acceso a la infraestructura, el equipamiento y los productos necesarios para realizar las tareas que se les asignen;
- Garantizarán que su personal y cualquier otro personal contratado tenga un buen conocimiento de las normas y prácticas internacionales y que en su trabajo se tenga en cuenta los últimos avances en materia de investigación a escala nacional, de la Unión e internacional;
- Estarán equipados o tendrán acceso al equipo necesario para realizar sus tareas en situaciones de emergencia, y, cuando proceda, estarán equipados para cumplir las normas de bioseguridad pertinentes.

#### **4.2. FUNCIONES**

Respecto a sus **funciones**, los laboratorios de referencia de la Unión Europea contribuirán a la **mejora y armonización de los métodos de análisis, ensayo o diagnóstico que deban utilizar los laboratorios oficiales** designados y de los datos de análisis, ensayo y diagnóstico generados por dichos métodos.

Así, los EURL serán responsables de las siguientes tareas en la medida en que estén incluidas en los programas de trabajo anuales o plurianuales de los laboratorios de referencia que se hayan establecido de conformidad con los objetivos y prioridades de los correspondientes programas de trabajo adoptados por la Comisión de acuerdo con el Reglamento (UE) n. o 652/2014 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 15 de mayo de 2014, por el que se establecen disposiciones para la gestión de los gastos relativos a la cadena alimentaria, la salud animal y el bienestar de los animales, y relativos a la fitosanidad y a los materiales de reproducción vegetal. Estas responsabilidades incluyen:

- proporcionar a los laboratorios nacionales de referencia la descripción y orientación de los métodos de análisis, ensayo o diagnóstico de laboratorio, incluidos los métodos de referencia;
- proporcionar materiales de referencia a los laboratorios nacionales de referencia;
- coordinar la aplicación, por parte de los laboratorios nacionales de referencia y, en caso necesario, por parte de otros laboratorios oficiales, de los métodos mencionados y, en particular, organizando periódicamente ensayos interlaboratoriales comparativos o ensayos de aptitud periódicos y velando por el seguimiento adecuado de dichos ensayos de conformidad con los protocolos aceptados internacionalmente de que se disponga, e informar a la Comisión y a los Estados miembros de los resultados y del seguimiento de los ensayos de aptitud;
- coordinar las disposiciones prácticas necesarias para aplicar nuevos métodos de análisis, ensayo o diagnóstico de laboratorio, e informar a los laboratorios nacionales de referencia de los avances en este campo;

- impartir cursos de formación para el personal de los laboratorios nacionales de referencia y, en caso necesario, de otros laboratorios oficiales, así como para expertos de terceros países;
- proporcionar asistencia científica y técnica a la Comisión en el ámbito de su misión;
- informar a los laboratorios nacionales de referencia sobre las actividades pertinentes de investigación realizadas a escala nacional, de la Unión e internacional;
- colaborar con los laboratorios situados en terceros países y con la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA), la Agencia Europea de Medicamentos (EMA) y el Centro Europeo para la Prevención y el Control de las Enfermedades (ECDC);
- contribuir activamente al diagnóstico de los brotes en los Estados miembros de enfermedades de origen alimentario, zoonosis o enfermedades de los animales, o plagas de vegetales, mediante la realización de estudios de diagnóstico de confirmación, de caracterización y epizooticos o taxonómicos con cepas de patógenos aislados o ejemplares de plagas;
- coordinar o realizar ensayos para comprobar la calidad de los reactivos y lotes de reactivos utilizados para el diagnóstico de las enfermedades de origen alimentario, zoonosis o enfermedades de los animales y de las plagas de los vegetales;
- cuando sea pertinente en su ámbito de competencia, establecer y mantener:
  - **colecciones** de referencia de plagas de los vegetales y/o **cepas de referencia de agentes patógenos**,
  - colecciones de referencia de materiales destinados a entrar en contacto con los alimentos, utilizados para calibrar los equipos analíticos y aportar muestras de ellos a los laboratorios nacionales de referencia,
  - **listas actualizadas de sustancias y reactivos de referencia** disponibles y de fabricantes y proveedores de dichas sustancias y reactivos, y
- cuando sea pertinente en su ámbito de competencia, cooperar entre sí y con la Comisión, según corresponda, para desarrollar métodos de análisis, ensayo o diagnóstico que cumplan normas exigentes. Por lo que respecta a la letra k), inciso i), el laboratorio de referencia de la Unión Europea podrá establecer y mantener dichas colecciones de referencia y cepas de referencia mediante contratación externa de otros laboratorios oficiales y organizaciones científicas.

Los laboratorios de referencia de la Unión Europea publicarán la lista de los laboratorios nacionales de referencia designados por los Estados miembros para cada enfermedad animal, vegetal o alimentaria.

Cabe reseñar la designación como EURL del LCV para la Peste Equina Africana y para la Fiebre Catarral Bovina (Lengua Azul), según el REGLAMENTO (UE) 2018/415 de la Comisión de 16 de marzo de 2018 por el que se aprueban responsabilidades y tareas adicionales para

el laboratorio de referencia de la Unión Europea para la peste equina y por el que se modifica el anexo II de la Directiva 92/35/CEE del Consejo, el anexo II de la Directiva 2000/75/CE del Consejo y el anexo VII del Reglamento (CE) n.o 882/2004 del Parlamento Europeo y del Consejo.

Además, el LCV es Laboratorio de referencia de la OIE para la Peste Equina Africana.

MATERIAL NO OFICIAL

## **BIBLIOGRAFÍA**

Página web del Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. Plan Nacional de Control Oficial de la Cadena Alimentaria.

<https://www.mapa.gob.es/es/ministerio/planes-estrategias/plan-nacional-de-control-de-la-cadena-alimentaria/>

Reglamento 625/2017 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 15 de marzo de 2017, relativo a los controles y otras actividades oficiales realizados para garantizar la aplicación de la legislación sobre alimentos y piensos, y de las normas sobre salud y bienestar de los animales, sanidad vegetal y productos fitosanitarios.

Página web del Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. Laboratorios de sanidad y genética animal.

<https://www.mapa.gob.es/es/ganaderia/temas/laboratorios/>

Página web del Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. Laboratorios agroalimentarios.

<https://www.mapa.gob.es/es/alimentacion/temas/laboratorios-agroalimentarios/>

MATERIAL NO OFICIAL

**MATERIAL PARA LA PREPARACIÓN DEL TEMA 35**

**LEYES DE SANIDAD ANIMAL DE LA UNIÓN EUROPEA Y ESPAÑOLA.  
ORGANIZACIÓN Y AUTORIDADES COMPETENTES EN LA SANIDAD  
ANIMAL EN ESPAÑA.**

*Este material no tiene carácter oficial, por lo que en ningún caso vinculará al Tribunal Calificador. Constituye, únicamente, un instrumento complementario que servirá de apoyo al opositor para enfocar cada uno de los epígrafes, pero nunca de forma exclusiva ni excluyente. El Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación no se hace responsable del contenido del mismo.*

*Los materiales no serán objeto de actualización constante.*

## **ÍNDICE**

### **1. LEGISLACIÓN SOBRE SANIDAD ANIMAL DE LA UNIÓN EUROPEA**

#### 1.1. REGLAMENTO UE 2016/429 (“LEGISLACIÓN SOBRE SANIDAD ANIMAL)

##### 1.1.1. Principales disposiciones

##### 1.1.2. Actos complementarios

#### 1.2. OTROS ACTOS LEGISLATIVOS EN MATERIA DE SANIDAD ANIMAL

### **2. LEGISLACIÓN ESPAÑOLA**

#### 2.1. LEY 8/2003 DE SANIDAD ANIMAL

##### 2.1.1. Principales disposiciones

#### 2.2. OTROS ACTOS LEGISLATIVOS EN MATERIA DE SANIDAD ANIMAL

### **3. PROGRAMAS SANITARIOS**

### **4. ORGANIZACIÓN DE LA SANIDAD ANIMAL EN ESPAÑA. AUTORIDADES COMPETENTES**

## 1. LEGISLACIÓN EUROPEA SOBRE SANIDAD ANIMAL

Desde su adhesión a la Comunidad Económica Europea en 1986, parte de las competencias de España como Estado miembro se **ceden a la ahora denominada Unión Europea**, adquiriendo asimismo la obligación de acatar la legislación de la UE, que pasa a formar parte del derecho nacional.

En este contexto, y teniendo en cuenta las importantes repercusiones de la sanidad animal en el comercio tanto comunitario como exterior, la legislación europea sobre esta materia cobra una gran importancia como marco en el que se regularán aspectos tan importantes como las condiciones para los programas de vigilancia y el control de las enfermedades, o las normas para los desplazamientos de animales y sus productos entre países tanto dentro como fuera de la Unión.

### 1.1. REGLAMENTO (UE) 2016/429 (“LEGISLACIÓN SOBRE SANIDAD ANIMAL”)

La nueva legislación europea sobre Sanidad Animal, que entró en vigor en 2016 y cuya aplicación comenzó el 21 de abril de 2021, comprende el **Reglamento (UE) 2016/429** y los actos que lo complementan.

Este paquete legislativo surge tras la **experiencia adquirida** a partir de la implementación y evaluación de las estrategias llevadas a cabo en la misma área desde la década de los 90 tras la aparición de **brotes de enfermedades** que dieron lugar a importantes pérdidas tanto económicas como sociales. En 2006 se llevó a cabo la evaluación de la Estrategia en Sanidad Animal 1995-2004, a partir de la cual se decidió centrar las políticas subsecuentes en la **prevención**, bajo el lema “mejor prevenir que curar”. Así, la **estrategia 2007-2013** se fundamentó en cuatro pilares básicos:

- Definición clara de **prioridades y priorización de la intervención de la UE**.
- Un **marco legislativo modernizado**.
- Foco en la **prevención y el control** de las enfermedades y preparación ante las emergencias.
- Mayor importancia de la **ciencia, innovación e investigación**.

Teniendo en cuenta estos antecedentes, la nueva legislación surge para **simplificar el marco normativo**, actualizarlo a la situación sanitaria actual e **integrar todas las fases de la cadena alimentaria**, adoptando de esta manera una estrategia “Farm to Fork”, “de la granja a la mesa”.

El **Reglamento (UE) 2016/429 del Parlamento Europeo y del Consejo** relativo a las enfermedades transmisibles de los animales y por el que se modifican o derogan algunos actos en materia de sanidad animal (“Legislación sobre sanidad animal”, o en inglés “Animal Health Law”) se puede considerar el **elemento central** de la nueva legislación europea en materia de

sanidad animal, de tal manera que en él se establecen las disposiciones generales a aplicar, aunque es complementado en algunos puntos por **otros actos legislativos**.

Este reglamento se estructura en **nueve partes**:

- Parte I, de disposiciones generales.
- Parte II, de notificación de enfermedades y envío de informes, vigilancia, programas de erradicación y estatus libre de enfermedad.
- Parte III, de concienciación, preparación y control ante la enfermedad.
- Parte IV, de inscripción registral, autorización, trazabilidad y desplazamientos.
- Parte V, de entrada en la Unión y exportación.
- Parte VI, de desplazamientos sin fines comerciales de animales de compañía a un Estado miembro, desde otro Estado miembro o desde un tercer país o territorio. No entrará en aplicación hasta el año 2026.
- Parte VII, de medidas de emergencia.
- Partes VIII y IX, de disposiciones comunes y de disposiciones transitorias y finales, respectivamente.

### 1.1.1. Principales Disposiciones del Reglamento 2016/429

#### a) Parte I

En la parte I de este Reglamento, se establecen en primer lugar los **objetivos** y el **ámbito de aplicación** del mismo.

Así, los principales objetivos de esta legislación son **garantizar**:

- **Una mejora de la sanidad animal** en apoyo a la sostenibilidad.
- La **eficacia** del funcionamiento del mercado interior.
- La **reducción de los efectos adversos** en la sanidad animal, la salud pública y el medio ambiente de determinadas enfermedades y las medidas adoptadas para su prevención y control.

Las normas establecidas tendrán en cuenta:

- La **relación** entre la sanidad animal y la salud pública, el medio ambiente, la inocuidad de los alimentos y los piensos, el bienestar animal, las resistencias antimicrobianas y la seguridad alimentaria.
- Las **consecuencias** económicas, sociales, culturales y medioambientales de la **aplicación de medidas** de prevención y control de enfermedades.
- Las **normas internacionales** aplicables.

En cuanto a su **ámbito subjetivo**, esta legislación será de aplicación a:

- Animales **en cautividad y silvestres**
- **Productos reproductivos**
- **Productos** de origen animal

- **Subproductos** y derivados
- Instalaciones, medios de transporte, equipos, y demás **material** que puede intervenir en la propagación de enfermedades transmisibles.

Además, se establecen los principios sobre la **categorización de enfermedades**, incluyendo los criterios de inclusión en la lista y el procedimiento a seguir para la inclusión y exclusión de enfermedades de la misma, así como las medidas generales a seguir para las enfermedades listadas según su categoría.

A este efecto, divide las enfermedades en cinco categorías, nombradas de la A a la E:

- A: Enfermedades de **erradicación inmediata**.
- B: Enfermedades para las cuales es obligatorio implementar programas de erradicación.
- C: Enfermedades para las cuales los EEMM pueden **decidir voluntariamente si diseñar e implementar programas de erradicación**.
- D: Enfermedades para las cuales se debe realizar un **control en los desplazamientos**.
- E: Enfermedades sobre las cuales se debe llevar a cabo **vigilancia**.

Además, se enumeran **los criterios para definir las enfermedades emergentes** y el **protocolo de actuación** ante las mismas.

Por último, en esta primera parte también se establece la **definición de responsabilidades**, que pone un mayor peso en los operadores, lo cual supone una de las principales diferencias con las estrategias previas.

## **b) Parte II**

En la parte II, se establecen en primer lugar las disposiciones relativas a la **notificación y elaboración de informes** sobre la aparición de enfermedades de la lista. Esta **notificación** se podrá hacer, bien entre EEMM por los operadores y otras personas legales o físicas, o bien de forma inmediata a la Comisión y a los demás EEMM cuando esta notificación sea necesaria para garantizar que se aplican a tiempo las medidas oportunas para la gestión del riesgo (fundamentalmente, para enfermedades de Categoría A o enfermedades de otras categorías consideradas emergentes). En el resto de los casos, las enfermedades serán objeto de **elaboración de informes** que se remitirán de forma periódica a la Comisión.

En esta parte también se establecen medidas relativas a los **programas de vigilancia y control**, incluyendo la obligación de vigilancia por diferentes actores y disposiciones relativas a la metodología, frecuencia e intensidad de la vigilancia.

Por último, en cuanto a los **programas de erradicación obligatoria y voluntaria**, se regula la forma de proceder en caso de obligación de implementación de este tipo programas y en caso de querer implementarlos de forma voluntaria, las **medidas mínimas de las que deben constar estos programas**, y el procedimiento para la **declaración del estatus libre de enfermedad y su conservación**.

## **c) Parte III**

En la parte III, se establecen **disposiciones sobre planes de contingencia, simulacros** y la normativa sobre **bancos de vacunas, antígenos y reactivos**.

Además, se definen las **medidas de control** para enfermedades de las categorías A, B y C, que deben incluir la **toma de medidas preliminares ante una sospecha**, el desarrollo de una **investigación epidemiológica**, la **confirmación** de la presencia del agente infeccioso y por último el establecimiento de **medidas de control** tras la confirmación.

#### **d) Partes IV y V**

Las partes IV y V regulan aspectos relacionados con el registro y autorización de los establecimientos, así como el desplazamiento de animales y sus productos dentro de la Unión, su entrada en la Unión y su exportación a terceros países.

Como novedad con respecto a la legislación previa, se establece la **obligatoriedad de registro de todos los establecimientos**, independientemente de que los animales que se mantengan en los mismos vayan a estar destinados a la exportación o no. Además, los requerimientos con respecto a los **desplazamientos** se aplican de forma general, incluyéndose también los desplazamientos entre los EEMM.

En cuanto a la entrada en la Unión, se establece que las condiciones de entrada deben ser **al menos tan estrictas como para los movimientos** entre Estados Miembros dentro de la Unión. Se definen las **responsabilidades** en materia de entrada en la Unión, y se especifica la posibilidad de complementar las disposiciones con actos complementarios. Sobre la **exportación**, se contempla la posibilidad de hacer **derogaciones** por requerimiento de las autoridades competentes del destino siempre y cuando estén legalmente establecidas, así como la posibilidad de firmar **acuerdos bilaterales** con terceros países.

#### **e) Parte VII**

En ella se regulan las **medidas de emergencia**, para lo cual se fijan normas en función del **país en el que se detecte la alarma**, haciendo distinción entre si se detecta en animales, productos, medios de transporte u otros materiales **que provengan de dentro de la Unión Europea**, o si estos tienen su origen **en terceros países**. Las medidas a tomar se dividen entre las medidas ejercidas por parte de la **Comisión Europea**, por parte del **país en el que se ha detectado** la emergencia y por **otros Estados Miembros**.

##### **1.1.2. Actos Complementarios al Reglamento 2016/429**

Para complementar el Reglamento 2016/429, la Comisión puede elaborar y aprobar **Reglamentos Delegados** o **Reglamentos de Ejecución**.

Los Reglamentos Delegados se elaboran por la Comisión según lo dispuesto sobre la delegación en el artículo 290 del Tratado de Funcionamiento de la Unión Europea (TFUE). Su función principal es **corregir o complementar** aspectos **no esenciales** del Reglamento base. Para su aprobación, se deberá realizar una **consulta previa al grupo experto en Sanidad Animal**. Este tipo de actos deberán ser **aprobados** posteriormente por el Consejo y el Parlamento como órganos legislativos de la Unión Europea.

Los Reglamentos de Ejecución se elaboran de acuerdo con lo dispuesto en el artículo 291 del TFUE y el Reglamento (UE) 182/2011 del Parlamento Europeo y del Consejo, por el que se establecen las normas y los principios generales relativos a las modalidades de control por parte de los Estados Miembros del ejercicio de las competencias de ejecución por la comisión.

Estos reglamentos se elaborarán con el objetivo de **asegurar la aplicación uniforme de las disposiciones del Reglamento 2016/429**. Deben ser sometidos a **examen por el Comité** (en el caso de sanidad animal, el Comité competente es el denominado **PAFF**, “*Plants, Animals, Food and Feed*”, “*Vegetales, Animales, Alimentos y Piensos*”), y se aprobarán por **mayoría cualificada** que comprenda el 55% de los países y el 65% de la población. En cualquier caso, existe la posibilidad de publicar este tipo de actos **sin consulta previa** en caso de **emergencias**.

## 1.2. OTROS ACTOS LEGISLATIVOS RELEVANTES EN MATERIA DE SANIDAD ANIMAL

Además del Reglamento 2016/429 y los Reglamentos Delegados y de Ejecución que lo complementan, es fundamental tener en cuenta otros actos legislativos que regulan algunos aspectos relevantes en el área de la sanidad animal, entre los cuales cabe destacar los siguientes:

- Reglamento (CE) 999/2001 por el que se establecen disposiciones para la prevención, el control y la erradicación de determinadas **encefalopatías espongiformes transmisibles**. Estas patologías quedan excluidas del ámbito de aplicación del nuevo paquete legislativo, por lo que es fundamental considerar la legislación específica al respecto.
- Reglamento (CE) 1069/2009 por el que se establecen las normas sanitarias aplicables a los **subproductos animales** y los productos derivados no destinados al consumo humano (reglamento “SANDACH”). A pesar de que los subproductos sí constan de forma expresa en la definición del ámbito subjetivo del Reglamento 2016/429, se establece que las disposiciones de este reglamento tendrán efecto “*sin perjuicio de lo dispuesto en el Reglamento 1069/2009*”.
- Reglamento (UE) 2017/625, relativo a los **controles oficiales** y otras actividades oficiales. Presenta una **estrecha relación con la nueva legislación sobre sanidad animal** y tenerlo en consideración es fundamental para la implementación de la misma en relación con diversos aspectos, incluidos los programas de vigilancia, control y erradicación.

## 2. LEGISLACIÓN ESPAÑOLA

### 2.1. LEY 8/2003 DE SANIDAD ANIMAL

Esta ley entra en vigor en 2003, tras más de 50 años durante los cuales la sanidad animal tenía su base en la Ley de Epizootias de 1952, la cual supuso un hito en la mejora de las condiciones en esta materia. En cualquier caso, resulta obvio que, en el contexto de cambios socioeconómicos sufridos durante más de cinco décadas en España, resultaba necesario

realizar una actualización de la legislación, permitiendo su adaptación al nuevo contexto en el que debe ser implementada.

La Ley 8/2003, de 24 de abril, de Sanidad Animal, busca **mejorar la sanidad animal** mediante un sistema basado en la **prevención**, eficaz para impedir la aparición y desarrollo de las enfermedades.

Su objeto es, según se establece en la propia ley, por un lado, el **establecimiento de las normas básicas y de coordinación** en materia de sanidad animal, y por otro lado la **regulación de la sanidad exterior** en lo relativo a la sanidad animal.

Esta ley se estructura en **siete títulos**:

- Título I, de **disposiciones generales**. En él se establecen el objeto y fines de la ley, su ámbito de aplicación y las principales definiciones de interés al objeto de la misma. Además, se regulan el **principio de proporcionalidad** y la **obligación de comunicación**, y los preceptos en materia de **coordinación** de la sanidad animal.
- Título II, de **prevención, lucha, control y erradicación** de las enfermedades de los animales.
- Título III, de **organización sanitaria sectorial**.
- Título IV, de **productos zoonosarios y para la alimentación animal**.
- Título V, sobre **inspecciones, infracciones y sanciones**.
- Título VI, sobre **tasas**.
- Título VII, sobre **información, formación y sensibilización**.

## 2.1.2. PRINCIPALES DISPOSICIONES DE LA LEY DE SANIDAD ANIMAL

### a) Título I

En él, se definen los fines de la ley como:

- La **prevención, lucha, control y erradicación de las enfermedades** de los animales.
- La **mejora sanitaria** de los animales, de sus explotaciones, de sus productos y de la fauna de los ecosistemas naturales.
- La **prevención de la introducción** en el territorio nacional, y en el resto de la Unión Europea, de enfermedades de los animales.
- La **protección de la salud humana y animal** mediante la prevención, lucha, control y, en su caso, erradicación de las enfermedades zoonóticas.
- La **prevención de los riesgos para la salud humana** derivados del consumo de productos alimenticios de origen animal que puedan ser portadores de sustancias o aditivos nocivos o fraudulentos, así como de residuos perjudiciales.
- La **prevención de los riesgos para la sanidad animal** derivados de la utilización incorrecta de productos zoonosarios, de la administración de productos nocivos y del consumo de productos para la alimentación animal que contengan sustancias capaces de desencadenar la aparición de enfermedades en los animales.
- La **evaluación de los riesgos para la sanidad animal del territorio nacional**.
- Lograr un **nivel óptimo de protección de la sanidad animal** contra sus riesgos potenciales, teniendo en cuenta los factores económicos de la actividad pecuaria y,

entre ellos, el posible perjuicio por pérdida de producción o de ventas en caso de entrada, difusión o propagación de una enfermedad, los costos de control o erradicación y la relación coste-beneficio de otros posibles métodos para limitar los riesgos.

Esta ley resulta **de aplicación** al ámbito **definido en la misma**, que incluye:

- Todos los **animales**, las **explotaciones** y los **cultivos** de estos, así como sus **producciones específicas y derivadas**.
- Los **productos** zoonos, productos para la alimentación animal y demás medios de producción animal en lo concerniente a su elaboración o fabricación, almacenamiento o conservación, transporte, comercialización, aplicación o suministro y presencia residual, en su caso, en animales y en los productos de origen animal.
- Los **alojamientos** del ganado, los terrenos, pastizales, estanques y ecosistemas naturales, las explotaciones de acuicultura, las instalaciones y utillaje, materiales, medios de transporte y de sacrificio de animales, así como de conservación o almacenamiento de sus producciones.
- Las **actividades** de las personas físicas o jurídicas, de naturaleza pública o privada, en cuanto que tales actividades estén relacionadas con alguna de las finalidades de esta ley.

Además, se propone **el principio de proporcionalidad**, de tal manera que las medidas adoptadas por las Administraciones públicas deberán ser proporcionales al resultado que se pretenda entender.

En cuanto a **la comunicación**, se establece que toda persona, física o jurídica, pública o privada, estará obligada a comunicar a la autoridad competente, de forma inmediata y, en todo caso, en la forma y plazos establecidos, todos los focos de que tenga conocimiento de enfermedades de carácter epizootico, o que por su especial virulencia, extrema gravedad o rápida difusión impliquen un peligro potencial de contagio para la población animal, incluida la doméstica o silvestre, o un riesgo para la salud pública o para el medio ambiente.

## **b) Título II**

En este título se establecen, en el primer capítulo, disposiciones sobre la **prevención de las enfermedades** de los animales. En concreto, se mencionan:

- **Obligaciones de los particulares.** Los propietarios o responsables de los animales, así como otros agentes implicados (importadores, transportistas, profesionales que ejerzan actividades relacionadas...) deberán **vigilar a los animales y sus productos, facilitar la información** que les sea requerida por la autoridad competente, **aplicar las medidas sanitarias** impuestas, **tener debidamente identificados a sus animales**, comunicar a las Administraciones los **datos sanitarios exigidos**, proceder a la **eliminación** de cadáveres y otros productos de la forma establecida en la normativa, **no abandonar a los animales** bajo su responsabilidad o sus cadáveres, cumplir las obligaciones relativas a los **medicamentos veterinarios**, **asumir los costes** de todo tipo, **solicitar la documentación sanitaria exigible** para la importación, **mantener en**

**buen estado sus animales, comunicar** a la autoridad competente las enfermedades y **cumplir otras obligaciones cualesquiera** impuestas por la normativa aplicable.

- **Medidas cautelares.** Para prevenir la introducción o la difusión de enfermedades de los animales, podrán adoptarse medidas cautelares que incluyen **la prohibición del movimiento de animales, el sacrificio obligatorio de los mismos, la incautación de animales o sus productos** o la suspensión temporal de las autorizaciones, entre otras. El ministerio competente deberá informar a la Comisión Europea y a los demás Estados miembros o terceros países afectados.
- **Planes de gestión de emergencias sanitarias.** Con el fin de perfeccionar la capacidad de respuesta de todas las estructuras del Sistema de Alerta Sanitaria Veterinaria, se podrán desarrollar de forma controlada simulacros de emergencias sanitarias, tanto empíricas como en escenarios reales.
- La **introducción** de material infeccioso, cualquiera que sea su posterior destino, requerirá la autorización previa del Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. Las Administraciones públicas **se facilitarán entre sí la información que precisen** sobre la actividad que desarrollan.

En el segundo capítulo se desarrollan preceptos sobre **los intercambios con terceros países**. La importación o exportación de animales y/o sus productos debe realizarse a través de los puestos de inspección fronterizos o de los centros de inspección autorizados, en los cuales se hará una inspección. Será necesaria la correspondiente **autorización sanitaria**.

En el tercer capítulo se disponen medidas para la **lucha, control y erradicación de enfermedades** de los animales.

Como **obligaciones de los particulares**, se establecen la obligación de mantener los animales en **buen estado sanitario, aplicar las medidas sanitarias obligatorias, efectuar revisiones y modificaciones en las instalaciones** y mantener el **equilibrio de la fauna silvestre** en sus aspectos sanitarios.

Además, se establecen disposiciones específicas para las actuaciones sanitarias **en especies cinegéticas**.

Otros puntos mencionados incluyen:

- Actuaciones **inmediatas** en caso de sospecha. La autoridad competente se personará en el lugar del foco, emitiendo un diagnóstico preliminar y tomando muestras que se remitirán al laboratorio de diagnóstico. Se adoptarán **medidas de precaución** encaminadas a evitar la posible difusión del foco y a establecer la identificación de la enfermedad, incluyendo la inmovilización de los animales, su censado, la prohibición de entrada y salida de las instalaciones, sacrificio de los animales, o la vacunación de emergencia, entre otros. El sacrificio de los animales será **indemnizado** por la autoridad competente. Tras el sacrificio y la eliminación higiénica del material de riesgo, el propietario deberá someter las instalaciones a un proceso de limpieza, desinfección, desinsectación, desratización y obras de adecuación sanitaria, si fueran necesarias.
- **Confirmación y declaración oficial de la enfermedad.** La Comunidad Autónoma realizará la declaración obligatoria al Ministerio de Agricultura, ratificando o

rectificando las medidas preliminares tomadas. En caso de una enfermedad de declaración obligatoria, se informará a las autoridades sanitarias europeas, así como a las de terceros países y organismos internacionales. Si se tratara de una zoonosis de las que se encontraban incluidas en la antigua lista A del Código Zoosanitario Internacional de la OIE, se comunicará al Ministerio de Sanidad y Consumo. El Ministerio de Agricultura comunicará al Comité Nacional del sistema de Alerta Sanitaria Veterinaria el conjunto de medidas adoptadas para la erradicación del foco para su análisis y evaluación.

- Se establecen además preceptos sobre las medidas de **sacrificio obligatorio** y las indemnizaciones asociadas, el **saneamiento de los focos**, la **repoblación** de las explotaciones, la **extinción oficial de la enfermedad**, los **programas nacionales de prevención, control, lucha y erradicación de enfermedades** y las **situaciones de emergencia sanitaria**.

El capítulo IV recoge las normas sobre el **Comité Nacional del sistema de Alerta Sanitaria Veterinaria**, órgano de coordinación en materia de sanidad animal entre el Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación y las Comunidades Autónomas. De dicho comité formarán parte representantes de la AGE y de las Comunidades Autónomas y, en su caso, de las entidades locales. Sus funciones incluyen coordinar las actuaciones entre distintas administraciones, estudiar las medidas incluidas en los programas nacionales, seguir la evolución de la situación epidemiológica y proponer las medidas de considere pertinentes.

En el capítulo V se establecen las disposiciones relativas a los **laboratorios**, determinándose que sólo podrán realizar diagnósticos o análisis de enfermedades sujetas a programas nacionales los **laboratorios nacionales de referencia**, los **laboratorios de carácter público de las Comunidades Autónomas** (o los expresamente reconocidos o designados al efecto por éstas) y los **laboratorios oficiales** de la Administración General del Estado. Sus análisis serán los únicos con **carácter y validez oficial**.

Los **laboratorios nacionales de referencia tendrán las funciones de:**

- Coordinar las actuaciones necesarias con los laboratorios de las Administraciones públicas.
- Establecer colaboración con centros de investigación.
- Transferir a los laboratorios oficiales de las CCAA y de la AGE las nuevas técnicas que se desarrollen por los laboratorios de referencia de la Unión europea y de la OIE.
- Efectuar los análisis que les sean solicitados.
- Confirmar el diagnóstico de laboratorio en los casos de sospecha, o diagnosticados como sospechosos o positivos por los laboratorios oficiales de las CCAA, cuando se trate de enfermedades de declaración obligatoria.
- Homologar los métodos de diagnóstico.
- Organizar pruebas comparativas y ensayos colaborativos con los laboratorios oficiales de las CCAA.

Los **laboratorios centrales de sanidad animal** de la Administración General del Estado, sin perjuicio de las funciones de los laboratorios nacionales de referencia, tendrán la función de informar perceptivamente la homologación de nuevas técnicas de diagnóstico, mantener

ceparios de patógenos altamente infecciosos y tener a punto técnicas de diagnóstico para dichos agentes, transferir la tecnología científica a otros laboratorios y actuar como laboratorio nacional de referencia en caso de que no existiera uno designado. El resto de laboratorios oficiales de la AGE podrá realizar tareas de apoyo y colaboración.

### c) Título III

En él se hace referencia a la **ordenación sanitaria de las explotaciones de animales**, incluyendo normas sobre las condiciones sanitarias básicas, la eliminación de residuos, el mantenimiento de registros y libros de explotación y el sistema nacional de identificación animal, a la **regulación de agrupaciones de defensa sanitaria ganadera**, la **calificación sanitaria de las explotaciones**, la **ordenación sanitaria del mercado de los animales** y la elaboración de **mapas epizootiológicos**.

### d) Título IV

Se establecen disposiciones sobre:

- **Medicamentos veterinarios.** Para su autorización, tendrá carácter vinculante el informe emitido por el representante del Ministerio de Agricultura en el Comité de Evaluación de Medicamentos de Uso Veterinario. Los lotes de productos biológicos de enfermedades de declaración obligatoria deberán ser contrastados por el laboratorio nacional de referencia para la enfermedad de que se trate. El representante del Ministerio de Agricultura en el Comité de Seguridad de Medicamentos de Uso Veterinario suministrará al Comité Nacional del Sistema de Alerta Sanitaria Veterinaria toda la información que resulte necesaria.
- **Otros productos zoonosarios.** Ningún producto zoonosario distinto de los medicamentos veterinarios podrá ser puesto en el mercado sin la previa autorización expedida por el Ministerio de Agricultura. Los reactivos biológicos deberán ser contrastados. La autorización de un producto tendrá un periodo de validez de cinco años, al cabo de los cuales se procederá a su cancelación a menos que sea solicitada su renovación. El Ministerio de Agricultura podrá autorizar la comercialización de productos adecuados, para una utilización controlada y limitada por un periodo no superior a un año en los supuestos de aparición de una enfermedad exótica o por razones urgentes de sanidad animal. Las autorizaciones podrán ser modificadas, suspendidas o revocadas por el Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, a solicitud de su titular o de oficio, cuando razones de índole ganadero o sanitario así lo hagan necesario.
- **Productos para la alimentación animal.** No podrán ser puestos en el mercado sin una autorización previa. Los establecimientos que se dediquen a su elaboración, distribución, transporte o comercialización, serán objeto de una autorización previa al ejercicio de su actividad.

#### e) Título V

Se establece la obligación de **realizar inspecciones y controles** para comprobar el cumplimiento de la normativa. Los inspectores acreditados podrán adoptar, de forma motivada, medidas de carácter cautelar.

El personal funcionario en el ejercicio de las funciones inspectoras tendrá el **carácter de agente de la autoridad**, pudiendo acceder libremente a toda la instalación, realizar cualquier examen o prueba, tomar muestras de los animales, examinar la documentación de los animales e incautar animales o productos. El inspector levantará acta en la que constarán los datos relativos a la explotación inspeccionada, las medidas ordenadas y los hechos relevantes.

En cuanto a las **infracciones**, se clasifican en **leves, graves o muy graves**, atendiendo a los criterios de riesgo para la salud pública, la sanidad animal o el medio ambiente, el grado de intencionalidad, la gravedad del posible daño y las dificultades para la vigilancia y control.

Algunas **infracciones leves** incluyen la tenencia de menos del 10% de los animales con una identificación incompleta, la falta de comunicación de nacimientos, entradas o salidas de los animales de una explotación, la comunicación de una sospecha fuera del plazo establecido en la normativa vigente, o la falta de colaboración con la autoridad inspectora.

Como infracciones **graves**, se pueden mencionar el inicio de la actividad en una explotación sin contar con la autorización administrativa o sin la inscripción registral, la falta de comunicación de la muerte de animales de producción, la declaración de datos falsos sobre los animales, o el sacrificio de animales sospechosos o afectados por enfermedades infectocontagiosas o parasitarias sin contar con la correspondiente autorización.

Las infracciones **muy graves** incluyen la ocultación de enfermedades de declaración obligatoria, suministrar documentación falsa a los inspectores, la omisión de análisis de detección de enfermedades en animales con destino a consumo humano, el abandono de animales o de sus cadáveres, o la realización de análisis de enfermedades sometidas a programas nacionales de erradicación por laboratorios no reconocidos expresamente por la autoridad competente.

Las infracciones serán objeto de las **sanciones administrativas correspondientes**, previa instrucción del oportuno expediente.

#### f) Título VI

Regula la normativa en cuanto a las tasas, estableciéndose la **tasa por inspecciones y controles veterinarios** de animales vivos procedentes de países no comunitarios y la **tasa por autorización y registro de otros productos zoonutricionales**.

#### g) Título VII

Establece que las Administraciones competentes promoverán la formación de los ganaderos en materia de sanidad animal, incluyendo su estudio en todos los programas de formación desarrollados en el Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, así como la realización de

proyectos educativos y científicos; todo ello con la finalidad de fomentar el conocimiento de la sanidad animal y sus repercusiones en la salud de las personas y en el medio ambiente.

## **2.2. OTROS ACTOS LEGISLATIVOS RELEVANTES**

En materia de sanidad animal, es fundamental mencionar otros actos legislativos que deben aplicarse de forma conjunta con la Ley 8/2003, entre los cuales cabe destacar:

- **Real Decreto 526/2014**, por el que se establece la lista de las enfermedades de los animales de declaración obligatoria y se regula su notificación
- **Real Decreto 1440/2001**, por el que se establece el sistema de alerta sanitaria veterinaria.

## **3. PROGRAMAS SANITARIOS EN ESPAÑA**

El Reglamento 2016/429, así como Ley de Sanidad Animal, contemplan el diseño y desarrollo de **Programas Nacionales** de prevención, control, lucha y erradicación de las enfermedades de los animales.

Según lo dispuesto en la Ley de Sanidad Animal, estos programas irán dirigidos a las enfermedades determinadas por la Administración General del Estado, consultadas las Comunidades Autónomas y el Comité Nacional del Sistema de Alerta Sanitaria Veterinaria (cuyas funciones y composición se exponen en el siguiente epígrafe del tema). En cualquier caso, se deberán incluir todas las enfermedades dispuestas por el Reglamento 2016/429 según su clasificación.

A este respecto, sigue vigente el Real Decreto 2611/1996, por el que se regulan los programas nacionales de erradicación de las enfermedades de los animales.

Cabe destacar la mención al **diagnóstico de las enfermedades**, al respecto de lo cual dispone que **los laboratorios oficiales** serán los únicos que realizarán el diagnóstico laboratorial, mediante la utilización de técnicas analíticas oficialmente aprobadas, de las muestras destinadas al diagnóstico de las enfermedades.

También establece disposiciones sobre los **criterios de elaboración de los programas**, el **deber de información**, el **desarrollo de los programas** (en relación con la notificación, identificación, y vacunación), el **sacrificio de los animales y la indemnización correspondiente**, y disposiciones **específicas relativas a cada una de las enfermedades** objeto de este Real Decreto.

## **4. ORGANIZACIÓN DE LA SANIDAD ANIMAL EN ESPAÑA. AUTORIDADES COMPETENTES.**

Para comprender la organización de la sanidad animal, es fundamental tener claro el contexto legal en el que se enmarca. Así, la base legal de la sanidad animal en España comprenderá lo dispuesto en los diferentes actos que conforman el derecho estatal:

- Tras la adhesión de España a la Comunidad Económica Europea, se dio la cesión de competencias a favor de la ahora denominada Unión Europea en diversas materias, incluyendo la sanidad animal. Por ello, las instituciones europeas presentan **competencias legislativas en materia de sanidad animal**, pero también ejecutivas y sancionadoras en los casos previstos en la legislación. Se debe atender, como ya se ha mencionado, a lo dispuesto en la Legislación Europea sobre Sanidad Animal, fundamentada en el Reglamento 2016/429.
- En la Constitución Española, se establece que las **Comunidades Autónomas podrán asumir competencias en agricultura y ganadería** (según el artículo 148.1.7ª), mientras que el Estado tiene competencia exclusiva sobre las **bases y coordinación** de la planificación general de la actividad económica (según el artículo 149.1.13ª), lo cual no excluye la actividad económica de la producción primaria.
- En cuanto al marco legislativo estatal, se debe atender a lo dispuesto en la **Ley 8/2003, de Sanidad Animal**. Además, como ya se ha especificado en epígrafes anteriores del tema, existe normativa de menor rango constituida por Reales Decretos, y legislación autonómica que regula la ordenación de la sanidad animal en el territorio autonómico correspondiente.

A nivel de la Administración General del Estado, el Real Decreto 139/2020 establece la estructura orgánica básica de los departamentos ministeriales, desarrollando la estructura básica del Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación.

Así, dentro de la Secretaría General de Agricultura y Alimentación se enmarca la **Dirección General de Sanidad de la Producción Agraria**. Sus funciones quedan recogidas en el Real Decreto 430/2020, e incluyen **desarrollar las competencias del Departamento en materia de sanidad agraria y forestal** y desarrollar las líneas directrices de las **políticas** en esta materia, ejercer el **control fitosanitario y veterinario** en la importación y exportación, remover los obstáculos técnicos para las exportaciones a países terceros, coordinar y ejercer la dirección técnica **los laboratorios**, o el **registro de medicamentos veterinarios**, entre otras.

La **Subdirección General de Sanidad e Higiene Animal y Trazabilidad**, dependiente de la mencionada Dirección General, ejerce algunas de estas funciones.

También integrada en la Dirección General se encuentra la **División de Laboratorios de Sanidad de la Producción Agraria**, cuyas funciones incluyen **asegurar la correcta dotación** de personal cualificado, instalaciones y equipos adecuados en los laboratorios centrales de sanidad animal y vegetal integrados en la misma, **fomentar el trabajo en red** con laboratorios europeos e internacionales de referencia y con los laboratorios de las comunidades autónomas, y **adoptar las medidas adecuadas en materia de bioprotección, bioseguridad y biocontención**.

Dado que la competencia en materia de **agricultura y ganadería** corresponde a las Comunidades Autónomas, estas presentan la responsabilidad en dichas materias en sus respectivos territorios.

Para poder ejercerla, en cada Comunidad Autónoma existe una Consejería competente en materia de agricultura, que presentará una Dirección General y esta a su vez un **Servicio de Sanidad Animal**. En cada provincia, este Servicio de Sanidad Animal presentará una **Jefatura o Delegación Provincial**, de la cual dependerán las Unidades Veterinarias Locales de ámbito municipal o comarcal.

Además, es fundamental tener en cuenta que en España se publica de forma periódica por el Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación el **Plan Coordinado de Alerta Sanitaria Veterinaria**.

En este se establece la **cadena de mando** en caso de una alerta sanitaria veterinaria, la cual define las responsabilidades de los diferentes actores en la toma de decisiones en relación con la gestión de estas alertas. Esta cadena de mando está constituida por órganos que pertenecen a una de tres categorías:

- **Órganos decisorios:** Comité Nacional del Sistema de Alerta Sanitaria Veterinaria, el Centro Nacional de Emergencia y un Gabinete de Crisis.
- **Órganos asesores:** Grupos de expertos, unidades de seguimiento y Laboratorios Nacionales de Referencia.
- **Órganos ejecutivos:** Centros locales de crisis, y Servicio de Intervención Rápida (SIR).

El Comité Nacional del **Sistema de Alerta Sanitaria Veterinaria**, establecido mediante el Real Decreto 1140/2001, **coordina las actuaciones en materia de sanidad animal, siendo el órgano superior responsable de la vigilancia, lucha y erradicación de las enfermedades de los animales** en España. Está presidido por el Director General de Sanidad de la Producción Agraria, y como vocales intervienen el Subdirector General de Sanidad e Higiene Animal y Trazabilidad, representantes de todas las CCAA, Directores de los Laboratorios Nacionales de Referencia y, en caso de zoonosis, también un representante del Ministerio de Sanidad.

El Centro Nacional de Emergencia deberá constituirse en caso de detección en territorio español de **un brote de cualquiera de las enfermedades de la lista de la Unión europea**, y estará compuesto por el Subdirector General de Sanidad e Higiene Animal y Trazabilidad y los responsables en materia de Sanidad Animal de todas las Comunidades Autónomas. Sus responsabilidades incluirán la **notificación a la Comisión** de la aparición de sospecha o foco de la enfermedad, la **comunicación a la Comisión y otros Estados miembros** de cualquier información epidemiológica en relación con la enfermedad y del número de personas disponibles y cualificadas, y la **recepción de información del comportamiento de la enfermedad a escala mundial**. Además, será su responsabilidad la creación de grupos de expertos, la aprobación de los planes de emergencia, la dirección y coordinación de la estrategia de lucha, la formación y reciclaje del personal de los centros locales y el desarrollo de campañas de sensibilización y prevención.

Ante la aparición de enfermedades de la lista de declaración obligatoria, se constituirán además tantos **Gabinetes de Crisis** como Comunidades Autónomas haya afectadas. Estarán formados por representantes del MAPA y las CCAA afectadas. Su misión será **valorar la**

**situación**, asesorados por los órganos asesores, y **establecer la estrategia de lucha** a llevar a cabo en los Centros Locales, siempre bajo las órdenes del Centro Nacional de Emergencia.

En cuanto a los **Centros Locales**, el Jefe de Servicio de Sanidad Animal de la Comunidad Autónoma actuará como máxima autoridad sanitaria y será el responsable de la organización de sus actividades. Sus responsabilidades incluirán **desplazar personal y equipo** a los locales infectados, **organizar el sacrificio del ganado infectado**, organizar la ejecución de la **estrategia de vacunación**, aconsejar sobre las demarcaciones de zonas de protección y vigilancia, realizar la **toma de muestras oficiales** y su remisión al laboratorio, colaborar con las autoridades, supervisar las actuaciones y asegurar el cumplimiento de las normas de higiene, bienestar animal, bioseguridad y prevención de riesgos laborales.

El **Servicio de Intervención Rápida (SIR)** es un grupo compuesto por veterinarios especializados en la lucha y control de enfermedades, dependiente de la Dirección General de Sanidad de la Producción Agraria del MAPA, pero adscrito funcionalmente a las Comunidades Autónomas cuando se encuentra prestando servicio en éstas. Entre sus funciones se encuentran las de **intervenir directamente en el control de las enfermedades** de los animales en situaciones de emergencia y **colaborar** con las Administraciones públicas competentes.

En cuanto a los **órganos asesores**, los **grupos de expertos** están creados por el CNE y formados por personal de las CCAA, MAPA, Universidad y otros centros de investigación, cuyas funciones incluyen **proponer un modelo de encuesta epidemiológica**, aconsejar en materia de saneamiento, detección de portadores o protección frente a vectores, la **formación del personal** y la **colaboración** con las distintas administraciones.

En caso de aparición de la enfermedad se podrán crear **Unidades de Seguimiento**, que podrán incluir responsables del MAPA, las CCAA, la Administración Local, las Fuerzas de Seguridad y representantes del sector. Serán encargadas de hacer un **seguimiento puntual** de la situación de la enfermedad y valorar la situación real del sector y la evolución de la enfermedad. Actuarán como órganos asesores del Gabinete de Crisis, no teniendo poder decisorio.

Los **Laboratorios Nacionales de Referencia** actuarán como órganos asesores del CNE y los Gabinetes de Crisis.

Por último, resulta fundamental mencionar la estructura del **Sistema de Alerta Sanitaria Veterinaria**, regulado en el Real Decreto 1440/2001. El Comité Nacional del Sistema de Alerta Sanitaria Veterinaria coordina las actuaciones entre las distintas Administraciones, y el Servicio de Intervención Rápida interviene para atender situaciones de emergencia en caso de peligro grave de extensión de epizootias o zoonosis. El último componente de este sistema es una red informática que integra las bases de datos sanitarias, la **Red de Alerta Sanitaria Veterinaria (RASVE)**. Este sistema es fundamental para los objetivos del Sistema de Alerta Sanitaria Veterinaria, e integra toda la información sanitaria disponible, tanto a nivel nacional como internacional, permitiendo en tiempo real la conexión entre las aplicaciones informáticas existentes en materia de Sanidad y Producción Animal y de Seguridad Alimentaria. Así, facilita la toma de decisiones urgentes para la prevención, control y erradicación de las enfermedades animales.

## **BIBLIOGRAFÍA**

Reglamento (UE) 2016/429 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 9 de marzo de 2016, relativo a las enfermedades transmisibles de los animales y por el que se modifican o derogan algunos actos en materia de sanidad animal («Legislación sobre sanidad animal»)

Ley 8/2003, de 24 de abril, de sanidad animal.

Real Decreto 2611/1996, de 20 de diciembre, por el que se regulan los programas nacionales de erradicación de enfermedades de los animales.

Real Decreto 430/2020, de 3 de marzo, por el que se desarrolla la estructura orgánica básica del Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, y por el que se modifica el Real Decreto 139/2020, de 28 de enero, por el que se establece la estructura orgánica básica de los departamentos ministeriales.

Orden APA/219/2021, de 8 de marzo, por la que se crea la División de Laboratorios de Sanidad de la Producción Agraria.

Real Decreto 1440/2001, de 21 de diciembre, por el que se establece el sistema de alerta sanitaria veterinaria.

Plan Coordinado Estatal de Alerta Sanitaria Veterinaria. Dirección General de Sanidad de la Producción Agraria. Subdirección General de Sanidad e Higiene Animal y Trazabilidad. (Revisión febrero 2020)

**MATERIAL PARA LA PREPARACIÓN DEL TEMA 36**

**INSTITUCIONES INTERNACIONALES IMPLICADAS EN LA COORDINACIÓN Y/O CONTROL EN LA SANIDAD ANIMAL Y EN LA GESTIÓN DE LOS RESIDUOS MEDICAMENTOSOS VETERINARIOS. COLABORACIÓN TRIPARTITA OMS-FAO-OIE, EFSA, EMA.**

*Este material no tiene carácter oficial, por lo que en ningún caso vinculará al Tribunal Calificador. Constituye, únicamente, un instrumento complementario que servirá de apoyo al opositor para enfocar cada uno de los epígrafes, pero nunca de forma exclusiva ni excluyente. El Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación no se hace responsable del contenido del mismo.*

*Los materiales no serán objeto de actualización constante.*

## **ÍNDICE**

### **1. INTRODUCCIÓN**

### **2. INSTITUCIONES INTERNACIONALES RELACIONADAS CON LA SANIDAD ANIMAL**

#### 2.1. OMS

2.1.1. Objetivos y funciones

2.1.2. Estructura

#### 2.2. FAO

2.2.1. Origen

2.2.2. Funciones

2.2.3. Composición y estructura

2.2.4. Hitos

#### 2.3. OIE

2.3.1. Origen y misión

2.3.2. Estructura

2.3.3. Códigos y Manuales

2.3.4. Lista de Enfermedades de la OIE

#### 2.4. ISAG

### **3. OMS/FAO/OIE Y LA SANIDAD ANIMAL**

3.1. ESTRATEGIA ONE HEALTH

3.2. GESTIÓN DE RESIDUOS MEDICAMENTOSOS VETERINARIOS

3.3. COLABORACIÓN CON LA EFSA Y LA EMA

3.3.1. EFSA

3.3.2. EMA

## **1. INTRODUCCIÓN**

Hoy en día vivimos en un entorno globalizado en el que el mercado internacional de productos agroganaderos está experimentando un importante crecimiento, auspiciado por la creciente liberalización del comercio. A estos flujos comerciales en aumento hay que añadir el incremento de los viajes internacionales y los cambios demográficos humanos, promovidos por marcadas desigualdades entre el mundo más avanzado y los países menos desarrollados, que se ven acentuados por el aumento de la población mundial, el cambio climático y la rápida urbanización e industrialización de muchas regiones que van de la mano de la deforestación y desertificación.

El efecto de estos factores se multiplica si tenemos en cuenta las conexiones que existen en el trinomio hombre-animal-ambiente, que se caracterizan por la relación directa del hombre con los animales de compañía y, también, con los animales de abasto, ya sea directamente a nivel profesional o indirectamente a través de los alimentos. A su vez, los animales de abasto están estrechamente ligados con los animales tanto de compañía como silvestres y todos ellos se relacionan a través del medio, además de por otras vías como las aguas residuales.

Todas estas circunstancias no hacen más que aumentar el riesgo de aparición y difusión de enfermedades emergentes y reemergentes que afectan tanto a animales como a personas y dañan, a su vez, el medioambiente, poniendo en relieve que las relaciones entre la salud pública, sanidad animal, seguridad alimentaria y sanidad medioambiental deben ser abordadas de manera conjunta por una estrategia única.

Todos estos riesgos se magnifican a nivel internacional debido a la globalización y justifican la existencia de organismos supranacionales especializados dirigidos a promover la salud humana internacional, mejorar la nutrición y la alimentación a través de la agricultura o combatir y prevenir las enfermedades animales garantizando, así, la seguridad alimentaria.

## **2. INSTITUCIONES INTERNACIONALES RELACIONADAS CON LA SANIDAD ANIMAL**

En este contexto, hablar de sanidad animal en el plano internacional no puede limitarse únicamente a mencionar la Organización Mundial para la Sanidad Animal, OIE, sino que debe extenderse a las organizaciones que abordan la salud y nutrición humana, como es la Organización Mundial de la Salud (OMS) y la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO).

### **2.1. OMS**

En primer lugar, la Organización Mundial de la Salud (OMS) es el organismo de las Naciones Unidas especializado en gestionar las políticas de prevención, promoción, e intervención en salud a nivel mundial. Se creó el 7 de abril de 1948 y en la actualidad cuenta con 197 Estados Miembros.

#### **2.1.1. Objetivos y funciones**

La Constitución de la OMS define la salud como un estado de completo bienestar físico, mental y social, y no solamente la ausencia de afecciones o enfermedades. Tal y como

establece su Constitución, el **objetivo general de OMS** es que todos los pueblos puedan gozar del grado máximo de salud que se pueda alcanzar.

Para llevar a cabo este objetivo global, existen una serie de objetivos programáticos:

- Cooperación internacional en materia de salud entre las naciones.
- Implementar programas para el control y erradicación de las enfermedades.
- Impulsar la calidad de vida.

Asimismo, dentro de las funciones asignadas a la OMS, destacan:

- Promover la armonización y codificación: lleva a cabo la clasificación internacional de las enfermedades.
- Establecer medidas sanitarias para detener una epidemia y medidas sanitarias sobre viajes internacionales.
- Asistencia a los países menos avanzados (PMA) en materia de vacunaciones, erradicación de enfermedades, etc.
- Desarrollar programas sobre el SIDA/VIH.
- Garantizar el acceso a medicamentos de calidad, seguros y eficaces.

### 2.1.2. Estructura

La estructura funcional se organiza del siguiente modo:

Cuenta con una **Asamblea Mundial de la Salud** compuesta por representantes de los Estados Miembros de la OMS que se reúnen en Ginebra todos los años en mayo. La Asamblea Mundial de la Salud es el órgano decisorio supremo de la OMS. Los principales cometidos de este órgano son:

- aprobar el programa de la OMS para el siguiente bienio,
- determinar las políticas de la Organización,
- nombrar al Director General,
- supervisar las políticas financieras de la Organización y examinar y aprobar el proyecto de presupuesto por programas.

Además, cuenta con un **Consejo Ejecutivo** integrado por 32 miembros técnicamente cualificados en el campo de la salud. Sus miembros se eligen para un mandato de tres años. Las principales funciones del Consejo Ejecutivo consisten en dar efecto a las decisiones y políticas de la Asamblea de la Salud, en asesorarla y, de manera general, en facilitar su trabajo.

En la Sede central se encuentra una **secretaría permanente**, al frente de la cual se encuentra un **director general**, que es designado por la Asamblea de la Salud a propuesta del Consejo Ejecutivo. Actualmente, el Director General de la Organización es el Dr. **Tedros Adhanom Ghebreyesus**.

Además, cuenta con 6 **oficinas regionales** distribuidas por los 5 continentes: Copenhague (Europa), Brazzaville (África), Nueva Delhi (Asia Sudoriental), Manila (Pacífico occidental), El Cairo (Mediterráneo oriental) y Washington DC (América).

## 2.2. FAO

En segundo lugar, la FAO son las siglas inglesas de las Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (*Food and Agricultural Organization*).

La constitución de la FAO fue firmada el 16 de octubre de 1945, en la ciudad de Quebec (Canadá), por un grupo de 42 países, y en la actualidad es el mayor organismo especializado del sistema de las Naciones Unidas, y la principal organización dedicada a la agricultura, la silvicultura, la pesca y el desarrollo rural. Cuenta con 196 Estados Miembros y una Organización miembro, la Unión Europea.

### 2.2.1. Origen

La FAO fue fundada como consecuencia de una Conferencia convocada en 1943, por las Naciones Unidas para estudiar los problemas de la alimentación y la agricultura en Hot Springs (Virginia, Estados Unidos). Se consideraba entonces necesaria una organización que con una perspectiva global abordara los problemas de la agricultura y se preocupara directamente de la nutrición de los habitantes del planeta.

Los países firmantes del acta de constitución se comprometieron a:

- Elevar los niveles de nutrición y vida de los pueblos bajo su respectiva jurisdicción
- Mejorar los rendimientos de la producción y la eficacia de la distribución de los alimentos.
- Mejorar las condiciones de la población rural.
- Contribuir a la expansión de la economía rural y a liberar a la humanidad del hambre.

### 2.2.2. Funciones

Para cumplir estos objetivos, la FAO, en sus Estatutos, ha fijado las siguientes funciones que se pueden dividir en dos grandes grupos, normativos y divulgativo, y de carácter operativo:

#### Funciones normativas y divulgativas:

- Recopilar, analizar, y difundir informaciones relativas a la nutrición, alimentación y agricultura.
- Fomentar y recomendar acciones nacionales e internacionales tendentes a realizar investigaciones sobre alimentación y agricultura, mejora de la enseñanza agrícola, conservación de recursos, mejora de métodos de elaboración, comercialización y distribución de alimentos, y adopción de políticas internacionales que favorezcan los convenios relativos a productos agrícolas esenciales.

### Funciones operativas:

Por su parte, las funciones operativas hacen mención a proporcionar la asistencia técnica que soliciten los gobiernos así como a organizar misiones, en cooperación con los gobiernos, para cumplir las funciones derivadas de las recomendaciones de la FAO.

El **objetivo general de la FAO** es **fomentar la agricultura sostenible y el desarrollo rural**, ya que son estrategias que a largo plazo incrementan la producción de alimentos y la seguridad alimentaria a la vez que conservan y ordenan los recursos naturales. Para el próximo bienio, la FAO ha señalado como principales prioridades:

- ayudar a eliminar el hambre, la inseguridad alimentaria y la malnutrición;
- hacer que la agricultura, la actividad forestal y la pesca sean más productivas y sostenibles;
- reducir la pobreza rural;
- fomentar sistemas agrícolas y alimentarios integrados y eficientes;
- ayudar a los países a prepararse para las catástrofes naturales que ponen en riesgo los sistemas agrícolas y la producción de alimentos.

### **2.2.3. Composición y estructura**

Los representantes de los Estados miembros se reúnen en la **Conferencia bienal** de la FAO para analizar las normativas y marcos internacionales, así como para evaluar el trabajo realizado y aprobar el presupuesto para el próximo bienio. La Conferencia bienal es, por tanto, el órgano decisorio máximo de la FAO.

La Conferencia elige a los 49 miembros del **Consejo** que es el órgano ejecutivo, con mandatos rotatorios de tres años para la supervisión del programa general y el presupuesto. La Conferencia elige también al **Director General** para un mandato de cuatro años, renovable una vez. El actual Director General es **QU Dongyu**, que se encarga del control y la dirección de las actividades de la organización a través de distintos departamentos:

- Agricultura y Protección del Consumidor
- Desarrollo Económico y Social
- Pesca y Acuicultura
- Forestal
- Servicios Internos
- Cooperación Técnica y Gestión de Programas

Además de la oficina central con sede en Roma, la FAO dispone de una red descentralizada de oficinas presentes en más de 130 países del mundo. En 2014-15, la FAO desarrollo programas y proyectos por un valor total de 1 600 millones de dólares. Cerca del 10% está financiado por contribuciones ordinarias a través del Programa de Cooperación Técnica de la FAO (PCT). Mientras que el 90% restante se financia a través de contribuciones voluntarias, mediante el Programa de cooperación FAO/Gobiernos, establecidas en la Conferencia bienal de la FAO.

#### 2.2.4. Hitos

Finalmente, los hitos más importantes en la evolución de la FAO son los siguientes:

- En 1962 se puso en marcha el Codex Alimentarius para fijar normas alimentarias internacionales.
- En 1963 se crea el Programa Mundial de Alimentos, la mayor organización de ayuda alimentaria en el mundo
- En 1986 se puso en marcha AGROSTAT (hoy FAOSTAT) la fuente de información sobre agricultura más amplia del mundo.
- En la década de 1990 se instó la promoción del manejo integrado de plagas.
- En el año 2000, la celebración del Programa especial para la Seguridad Alimentaria.
- En el año 2009, la Cumbre Mundial sobre Seguridad Alimentaria.

#### 2.3. OIE

En tercer lugar, el intercambio de información sobre las enfermedades de los animales entre países fue una de las principales razones por las que se creó la Oficina Internacional de Epizootias. Su origen se remonta a 1920 cuando un brote en Bélgica de peste bovina a raíz del tránsito por el puerto de Amberes de cebús infectados procedentes de la India y destinados a Brasil, provocó que Francia, alarmada, convocara una conferencia Internacional en París para examinar la situación sanitaria y promover el intercambio de información entre países, así como estudiar las medidas sanitarias aplicables a las exportaciones.

##### 2.3.1. Origen y misión

La OIE es una organización intergubernamental creada por el Convenio Internacional del 25 de enero de 1924, firmado por 28 países. En 2018, la OIE contaba con 182 Países Miembros. Su **Sede** está en París.

El 28 de mayo 2022, La OIE estrena una nueva entidad corporativa y, además, promueve el uso de su nombre completo, "Organización Mundial de Sanidad Animal" con sus siglas "OMSA" (o sus siglas en Inglés, WOAAH).

Las **Misiones** más importantes de esta organización son:

- Garantizar la transparencia de la situación zoonositaria en el mundo. Cada País Miembro se compromete a declarar las enfermedades de los animales que detecta en su territorio.
- Recopilar, analizar y difundir la información científica veterinaria
- Asesorar y estimular la solidaridad internacional para el control de las enfermedades animales.

- Garantizar la seguridad sanitaria del comercio mundial mediante la elaboración de reglas sanitarias aplicables a los intercambios internacionales de animales y productos de origen animal.
- Mejorar el marco jurídico y los recursos de los SERVICIOS VETERINARIOS.
- Garantizar mejor la SEGURIDAD DE LOS ALIMENTOS DE ORIGEN ANIMAL y MEJORAR EL BIENESTAR ANIMAL usando bases científicas.

### 2.3.2. Estructura

La OIE desempeña su cometido bajo la autoridad y el control de una **Asamblea Mundial de delegados** compuesta de Delegados que designan los Gobiernos de los Países Miembros. La Asamblea, es el órgano supremo de la OIE, formado por todos los Delegados y se reúne por lo menos una vez al año. Las principales funciones de la Asamblea son:

- Adoptar normas internacionales en materia de sanidad animal, que faciliten el comercio internacional.
- Adoptar resoluciones sobre la lucha contra las principales enfermedades animales.
- Elegir los miembros de los órganos directivos de la OIE
- Nombrar al Director General de la OIE.
- Examinar y aprobar el programa de actividades y el informe financiero.

El **Director General** (Monique Eloit), nombrado por la Asamblea para un mandato de 5 años, dirige las actividades de la OIE en la Oficina Central (París). Esta Oficina aplica las resoluciones de la Asamblea, elaboradas con el apoyo de las siguientes Comisiones elegidas por los delegados:

- Consejo: Integrado por el Presidente, el Vicepresidente y el Presidente saliente de la Asamblea Mundial y por seis Delegados, elegidos para un mandato de tres años.
- Comisiones Regionales, creadas para estudiar los problemas específicos de los Servicios Veterinarios y organizar la cooperación a nivel regional.
- Comisiones Especializadas, utilizan la información científica actual para estudiar los problemas de epidemiología, prevención y control de las enfermedades de los animales, y así elaborar y revisar las normas internacionales de la OIE.

Dentro de las comisiones especializadas se incluye la Comisión de Normas Sanitarias para los Animales Terrestres, la Comisión Científica para las Enfermedades de los Animales; la Comisión de Normas Biológicas (“Comisión de Laboratorios”) y Comisión de Normas Sanitarias para los Animales Acuáticos.

La OIE también dispone de apoyo técnico a partir de Centros Colaboradores, Laboratorios de Referencia, Grupos ad hoc y Grupos de Trabajo.

Por último, los recursos financieros de la OIE provienen fundamentalmente de las contribuciones anuales ordinarias y de las contribuciones voluntarias de sus Países Miembros.

Los principales documentos normativos que elabora la OIE son los códigos sanitarios y los manuales de diagnóstico de enfermedades.

### 2.3.3. Códigos y Manuales

Los **códigos zoosanitarios** tienen como finalidad contribuir a la armonización internacional de los métodos de vigilancia y de control de las enfermedades animales de mayor relevancia. Por su parte, los manuales describen los métodos normalizados para los diagnósticos de laboratorio y para la producción y el control de productos biológicos de uso veterinario (principalmente las vacunas) en el mundo entero.

Por parte de la OIE se han elaborado dos tipos de Códigos Zoosanitarios:

- *Código Sanitario para los Animales Terrestres.*
- *Código Sanitario para los Animales Acuáticos*

El objetivo del **Código Sanitario para los Animales Terrestres** es velar por la seguridad sanitaria del comercio internacional de animales terrestres y productos de origen animal gracias a una definición detallada de las medidas sanitarias que las autoridades veterinarias del país importador y del país exportador deben aplicar para evitar la transmisión de agentes patógenos a los animales o a las personas y, al mismo tiempo, evitar la creación de barreras sanitarias injustificadas.

El código incluye:

- definiciones generales,
- notificación y datos epidemiológicos,
- zonificación y compartimentación,
- criterios de inscripción de enfermedades en la Lista de la OIE

De la misma forma, el objetivo del **Código Sanitario para los Animales Acuáticos** (denominado en adelante Código Acuático) es velar por la seguridad sanitaria del comercio internacional de animales acuáticos (peces, moluscos y crustáceos) y productos de animales acuáticos.

Por otra parte, la OIE dispone un Manual de Pruebas de Diagnóstico y Vacunas para los Animales Terrestres y otro Manual de Pruebas de Diagnóstico para los Animales Acuáticos, que describe los métodos normalizados para los diagnósticos de laboratorio y para la producción y el control de productos biológicos de uso veterinario (principalmente las vacunas) en el mundo.

## 2.4. ISAG

Por último, hacemos referencia a la Sociedad Internacional de Genética Animal (ISAG) que evolucionó de una serie de talleres anuales para comparar métodos de detección de antígenos de glóbulos rojos y variantes de proteínas a una sociedad centrada en la investigación básica y aplicada en los campos de la inmunogénica, la genética bioquímica y la genética molecular.

La ISAG apoya el intercambio eficiente de ideas, resultados y aplicaciones de investigación organizando conferencias y talleres, organizando pruebas de intercomparación para pruebas de ADN en animales, publicando en la revista *Animal Genetics*, el diario oficial de ISAG, y muchas otras actividades.

Sus objetivos principales son:

- fomentar el estudio de los caracteres genéticamente influenciados de los tejidos y fluidos animales, y
- facilitar el intercambio de ideas y materiales entre trabajadores de la investigación.

## 3. OMS/FAO/OIE Y LA SANIDAD ANIMAL

Una vez vistas los aspectos más importantes de las tres organizaciones por excelencia en materia de salud, cabe recordar que la historia de la humanidad ha estado siempre ligada a la de los animales; siendo, en primera instancia, una relación del tipo depredador-presa para pasar luego, con la llegada del Neolítico, a una relación más estrecha basada en la domesticación y la ganadería, de donde surgieron los animales de abasto y los de compañía.

Teniendo en cuenta que, además, la distancia filogenética entre animales, especialmente mamíferos, y el hombre no es muy lejana, no es de extrañar que aparecieran coincidencias espacio-temporales en el desarrollo de enfermedades conjuntas entre animales y hombre. Estas coincidencias fueron observadas por Rudolf Virchow quien, en el siglo XIX, acuñó el término de zoonosis para referirse a estas enfermedades compartidas entre los animales y el ser humano.

En este contexto, es importante considerar que aproximadamente el 70% de las enfermedades infecciosas humanas son de origen animal y que, incluso, aquellas enfermedades no zoonóticas pueden repercutir en la salud pública al provocar pérdidas en la producción de alimentos tanto cuantitativas como cualitativas. Por consiguiente, parece bastante clara la necesidad de establecer estrategias comunes que permitan abordar de manera conjunta la sanidad humana, animal y medioambiental con la misión de prevenir, controlar y vigilar las enfermedades infecciosas con potencial epidémico o pandémico.

### 3.1. ESTRATEGIA ONE HEALTH

En este sentido, el origen del concepto de **Una Sola Salud** se remonta a principios del siglo XXI, cuando en un simposio celebrado en el año 2004 en Nueva York y, tras los denominados Doce Principios de Manhattan, se puso en marcha la estrategia “Un Mundo, Una Salud”, cuyo

propósito era la creación de un método holístico capaz de prevenir las enfermedades animales y humanas manteniendo la integridad de los ecosistemas a instancias de cuatro organizaciones internacionales: la Organización Mundial de la Sanidad Animal (OIE), la Organización Mundial de la Salud (OMS), la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO) y el Fondo de las Naciones Unidas para la Infancia (UNICEF).

Esta estrategia surgió de la idea de entablar un planteamiento común para profundizar en el conocimiento del papel tanto de animales como del medioambiente en la transmisión de las enfermedades hacia el hombre y viceversa donde se integren por tanto, la salud animal, humana y medioambiental en una sola salud. El objetivo primordial de la estrategia es reducir el riesgo y minimizar el impacto global de las epidemias y pandemias provocadas por enfermedades infecciosas emergentes sobre la salud de las personas y animales y sobre el medio natural, a través de un mejor conocimiento de las mismas que permita desarrollar sistemas de prevención, vigilancia y control más efectivos y adecuados planes de emergencia apoyándose, para ello, en servicios de salud pública y sanidad animal fuertes y estables así como en estrategias de comunicación válidas.

La estrategia Un Mundo, una Salud asentó las bases para, años después, dar origen a la iniciativa de **Una Sola Salud**, u originariamente *One Health* que, promovida conjuntamente por **OMS, FAO y OIE**, busca promover, mejorar y defender la salud y el bienestar de todas las especies mediante la mejora de la cooperación y la colaboración entre médicos, veterinarios y otros profesionales de la salud y del medioambiente. Este pilar se debe conseguir por medio de la integración de la medicina humana y veterinaria y las ciencias ambientales de acuerdo con una serie de líneas de actuación, que incluyen:

- Esfuerzos educativos conjuntos entre facultades de medicina, veterinaria y ciencias ambientales.
- La publicación conjunta en revistas, conferencias u otros medios divulgativos.
- La atención clínica a través de la evaluación, tratamiento y prevención de la transmisión de enfermedades entre especies.
- La puesta en marcha de programas conjuntos de prevención, vigilancia y control de enfermedades.
- Esfuerzos encaminados a una mejor comprensión de la transmisión de enfermedades entre especies a través de la medicina comparativa y la investigación medioambiental.

Podría decirse, por tanto, que este planteamiento posibilita realizar una gestión del riesgo sanitario en el denominado interfaz hombre-animal que, a su vez, vehiculiza el desarrollo de herramientas de prevención, detección precoz y respuesta rápida. Para ello, tanto OIE como OMS han desarrollado marcos de referencia e instrumentos con el objetivo de ayudar a sus Estados Miembros a adquirir una capacidad de respuesta duradera y adecuada para garantizar la seguridad sanitaria de personas y animales.

Concretamente, la **OMS** emplea como instrumento el **Reglamento Sanitario Internacional** obligando a sus estados miembros a disponer de un conjunto mínimo de capacidades sanitarias básicas para aplicarle eficazmente y plasmarlo en un informe a modo de autoevaluación. Entre estas capacidades básicas se incluye la disposición de una legislación y financiación nacional suficiente, la coordinación y comunicación entre el Estado y la OMS, por medio de centros de enlace, la disposición de unos recursos humanos mínimos y de servicios de laboratorio adecuados, así como mecanismos de vigilancia, respuesta y comunicación ante posibles emergencias sanitarias.

Por su parte, la **OIE** también ha establecido un procedimiento de prestaciones de servicios veterinarios, denominado como **procedimiento PVS**, por el que fija un protocolo para determinar el grado de cumplimiento de los Códigos Sanitarios y Manuales Diagnósticos y de Vacunas publicados por este organismo junto con una serie de herramientas para que sus estados miembros conozcan la calidad de sus servicios veterinarios.

Estos preceptos básicos deben ser combinados con políticas clásicas de lucha contra enfermedades como la vigilancia epidemiológica y programas de control y erradicación de enfermedades junto con medidas de prevención y bioseguridad adaptadas al nivel económico y posibilidades de cada país. Además, la base para una buena coordinación y colaboración entre profesionales sanitarios en el ámbito internacional deberá asentarse sobre el compromiso de la **transparencia informativa sanitaria** gracias al desarrollo de redes de notificación y alerta de sanidad humana y animal, como la **WAHIS de la OIE** o la **INFOSAN de la FAO**. A estas redes de comunicación hay que añadir la red desarrollada conjuntamente por FAO, OMS y OIE conocida por sus siglas como **GLEWS**, del inglés, *Global Early Warning System*, para los riesgos sanitarios de alcance mundial.

### 3.2. GESTIÓN DE RESIDUOS MEDICAMENTOSOS VETERINARIOS

Otro punto clave que justifica la necesidad de establecer estrategias conjuntas en materia de *One Health* son los residuos de medicamentos veterinarios que son administrados a los animales de abasto y que, por tanto, pueden entrar en la cadena alimentaria con las consiguientes consecuencias sobre la salud humana y ambiental.

En este sentido, el uso indiscriminado de medicamentos veterinarios con otros fines distintos a los meramente terapéuticos condujo a la aparición de repercusiones sanitarias desconocidas hasta el momento. Estos efectos eran debidos a que la ingesta de los medicamentos veterinarios genera metabolitos secundarios que pueden persistir durante un tiempo en el organismo animal con efectos, similares o distintos, a los producidos por las sustancias primarias. La persistencia puede llegar a ser tan marcada que puede perdurar en los productos de origen animal, tales como carnes, y ser ingerida por el hombre, causando en él los correspondientes efectos perjudiciales. Entre estos efectos se incluyen tales como efectos estrogénicos u otros de carácter agudo como así se describió con la intoxicación por clenbuterol en los años 90. Además, los restos de sustancias antimicrobianas en los tejidos animales juegan un papel muy importante en la aparición y difusión de resistencias a lo largo de toda la cadena alimentaria.

Ante esta situación, durante los años 80 y 90 se hizo necesario desarrollar una normativa específica con la que se fijaron medidas restrictivas y prohibitivas respecto al uso de estas sustancias para prevenir la aparición de efectos perjudiciales para la sanidad animal y la salud pública. A partir de estas normas surgieron conceptos tan útiles en la vigilancia de residuos medicamentosos como los **Límites Máximos de Residuos**, que pueden estar presente en un producto de origen animal sin que supongan un riesgo para la salud humana, y los **Tiempos de Espera**, como aquel periodo de tiempo que debe transcurrir entre el consumo de un medicamento y el sacrificio y posterior destino a consumo de un animal y de sus productos para evitar cualquier efecto perjudicial.

En esta materia, la Unión Europea ha liderado siempre las políticas sobre residuos medicamentosos veterinarios prohibiendo, desde 2006, su uso con fines distintos a los terapéuticos y regulando, de manera contundente, la presencia de residuos en productos de origen animal. Así, la UE obliga a sus EE.MM. a desarrollar planes específicos de control desde 1986. En este sentido, el **Plan Nacional de Investigación de Residuos (PNIR)** tiene por objetivo establecer medidas de control y su organización para la detección de sustancias medicamentosas y a sus metabolitos que son administrados a los animales.

Esta investigación tendrá lugar en cualquier fase de la cadena alimentaria, incluyendo a los animales vivos, sus excrementos y líquidos biológicos; órganos y tejidos de animales y pienso, agua para beber y otros componentes empleados en la alimentación animal. Además, desde 1999, se ha ampliado el control a otras especies animales, incluyendo especies de caza mayor y menor, conejo y aves y otros productos animales más allá de la carne fresca (leche, huevos, productos de la acuicultura y miel).

La consecución y cumplimiento del PNIR está controlada, a nivel europeo, por la **Agencia Europea del Medicamento** que se completa con la información científica y asistencia técnica que aporta la **EFSA**. Estas entidades comunitarias colaboran, a su vez, con los organismos internacionales de referencia, principalmente OMS/OIE/FAO, para velar por la seguridad de los productos de origen animal que haga posible un elevado nivel de salud pública.

### 3.3. COLABORACIÓN CON LA EFSA Y LA EMA

En el ámbito comunitario, y en colaboración estrecha con la OMS/OIE/FAO existen dos entidades de referencia a nivel sanitario que, como no podía ser de otra manera, aúnan asuntos de la medicina humana, veterinaria y medioambiental.

#### 3.3.1. EFSA

Por una parte, la **Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria** (en inglés, *European Food Safety Agency*, **EFSA**) fue creada por el **Reglamento 178/2002**. Según este Reglamento, la Autoridad debe actuar como **órgano de referencia científico** independiente en la **evaluación del riesgo sanitario**, al que se le pueden solicitar dictámenes científicos sobre aspectos controvertidos para permitir a las instituciones comunitarias y a los Estados

miembros tomar con conocimiento de causa las decisiones, en la determinación del riesgo y la de gestión de crisis, necesarias para asegurar la seguridad alimentaria.

Los cometidos que se han fijado para la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria son los siguientes:

- **Proporcionará** a las instituciones comunitarias y a los Estados miembros los mejores **dictámenes científicos** posibles.
- Promoverá y coordinará el **desarrollo de metodologías uniformes de determinación del riesgo** en los ámbitos comprendidos en su cometido;
- Búsqueda, recopilación y análisis de datos científicos y técnicos sobre nutrición humana, salud y bienestar de los animales, fitosanitarios, piensos y organismos modificados genéticamente.
- Identificará y caracterizará los riesgos emergentes.
- Establecerá un **sistema de redes interconectadas** formadas por las Autoridades nacionales en seguridad alimentaria.
- Proporcionará asistencia científica y técnica, cuando así se lo solicite la Comisión
- Asegurará que el público y otras partes interesadas reciben una información rápida, fiable, objetiva y comprensible.

La autoridad está compuesta por los siguientes órganos: una Junta Directiva, un Director Ejecutivo y su equipo de colaboradores, un Foro Consultivo, un Comité científico y varias comisiones técnicas científicas compuestas por expertos científicos independientes, que serán responsables de proporcionar a la Autoridad sus dictámenes científicos.

### 3.3.2. EMA

Por su parte, la **Agencia Europea de Medicamentos (EMA)**, del inglés *European Medicine Agency*) es un organismo descentralizado de la Unión Europea que tiene su sede en Ámsterdam.

Su principal función es la protección y promoción de la salud pública y animal, mediante la evaluación y supervisión de los medicamentos de uso humano y veterinario.

La EMA es, por tanto, responsable de la evaluación científica de las solicitudes europeas de autorización de comercialización de medicamentos cuando se utiliza el procedimiento centralizado, en el cual las empresas presentan una única solicitud de autorización de comercialización para el conjunto de países de la UE.

Asimismo, la seguridad de los medicamentos también se controla por la EMA a través de la **red de farmacovigilancia europea**. En este sentido, la EMA adopta las medidas oportunas cuando los informes sobre efectos adversos indican cambios en el equilibrio beneficio/riesgo de un medicamento. Con respecto a los medicamentos veterinarios, la Agencia tiene la responsabilidad de establecer límites máximos para los residuos de medicamentos en los alimentos de origen animal y es, en consecuencia, la última

responsable de garantizar la seguridad de los productos alimenticios en cuanto a la presencia de residuos medicamentosos.

## **BIBLIOGRAFÍA**

Organización Mundial de las Naciones Unidas  
<https://www.who.int/es>

Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación  
<https://www.fao.org/home/es>

Organización Mundial de Sanidad Animal  
[Inicio - OMSA - Organisation Mondiale de la Santé Animale \(woah.org\)](https://www.woah.org)

International Society for Animal Genetics  
<https://www.isag.us/index.asp>

Organización Mundial de Sanidad Animal. Una sola Salud.  
<https://www.oie.int/es/que-hacemos/iniciativas-mundiales/una-sola-salud/>

Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria  
<https://www.efsa.europa.eu/es>

Agencia Europea del Medicamento  
<https://www.ema.europa.eu/en>

**MATERIAL PARA LA PREPARACIÓN DEL TEMA 37**

**PLATAFORMAS Y BASES DE DATOS ON LINE Y SU USO PARA LA GESTIÓN DE PROGRAMAS NACIONALES EN SANIDAD Y GENÉTICA ANIMAL (RASVE, ARIES, RASFF, ARCA). MARCO LEGAL.**

*Este material no tiene carácter oficial, por lo que en ningún caso vinculará al Tribunal Calificador. Constituye, únicamente, un instrumento complementario que servirá de apoyo al opositor para enfocar cada uno de los epígrafes, pero nunca de forma exclusiva ni excluyente. El Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación no se hace responsable del contenido del mismo.*

*Los materiales no serán objeto de actualización constante.*

## **ÍNDICE**

### **1. INTRODUCCIÓN**

### **2. PLATAFORMAS Y BASES DE DATOS ON-LINE**

2.1. ARCA

2.2. SITRAN

2.2.1. REGA

2.2.2. REMO

2.2.3. RIIA

2.3. RASVE

2.4. RASFF

2.5. ARIES, FILUS Y FILOVI

2.5.1. ARIES

2.5.2. FILUS Y FILOVI

2.6. OTRAS PLATAFORMAS

2.6.1. TRACES-RACES

2.6.2. LETRA Q

2.6.3. SILUM

2.6.4. SIRENTRA

### **3. MARCO LEGAL**

## 1. INTRODUCCIÓN

Los primeros sistemas de información ganadera dentro del Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, **MAPA**, consistían en aplicaciones aisladas, hechas a medida para resolver problemas concretos y ejecutándose en un único equipo.

Esta situación pervivió durante varios años, con excepciones, hasta que el sector ganadero y la necesidad del control de la información saltó a la luz pública repentinamente. Durante el período 1998-2002, el "**mal de las vacas locas**", puso en tela de juicio la carne de vacuno y la desconfianza llegó a alcanzar a la carne en general.

Por otro lado, **la crisis de las dioxinas en 1999** marcó un punto de inflexión en el control de productos de origen animal. Otros problemas como la Peste Porcina Clásica y Africana han provocado cuantiosas pérdidas a los sectores implicados y, además, han sensibilizado a los consumidores, que son cada vez más exigentes en temas relacionados con la alimentación.

El **aspecto positivo** de todas estas crisis contribuyó a una importante mejora de los sistemas de control y producción de alimentos, así como en el aseguramiento de la calidad. Se perfeccionó el sistema alimentario en toda la UE con el objetivo de proporcionar una información de calidad y con ello aumentar la confianza del consumidor.

Tanto la Administración como los distintos eslabones de la cadena alimentaria tuvieron que adaptar los mecanismos necesarios para evitar nuevos problemas o saber cómo actuar en caso de que se produzcan. De hecho, surgió un especial interés en el MAPA por poner en marcha **sistemas de trazabilidad** de los animales y productos de origen animal y, basados en éstos, sistemas de ayuda a una mejor toma de decisión en caso de alertas sanitarias o alimentarias.

**La trazabilidad** es un sistema de control que permite conocer el origen y la trayectoria de los productos o lotes de productos a lo largo de toda la cadena alimentaria. Además, ofrece la información necesaria, para que en el caso de que se produzca un problema con un alimento, sea posible tomar medidas inmediatamente. De esta manera se reducirán o eliminarán los posibles peligros.

No obstante, la trazabilidad es un requisito imprescindible pero no suficiente para garantizar la seguridad. Ha de completarse con **otros mecanismos** que permitan la rápida reacción ante situaciones de alarma, y sistemas que manejen de forma eficaz la ingente cantidad de información que permita delimitar las zonas afectadas y prever la posible evolución de la situación.

Un **primer paso** hacia el concepto de "Trazabilidad, del campo a la mesa" fue la creación del **Sistema Nacional de Identificación y Registro de los Bovinos**, SIMOGAN, que fue el principio de un nuevo concepto de sistema de intercambio de información entre Comunidades Autónomas (CCAA) y MAPA, basado en un sistema distribuido y heterogéneo de gestores de bases de datos, con una información consensuada y común.

Es el primer ejemplo de gran sistema informático que, aun estando definido a nivel del MAPA, requiere la interconexión con sistemas autonómicos para la obtención de los datos, forma de

trabajo que se ha repetido después. Por otra parte, ha sido el primer gran registro de explotaciones ganaderas explotado a nivel nacional, planteándose por primera vez la necesidad de la integración entre aplicaciones.

A principios de los 2000 comenzó pues lo que podríamos llamar la “**fase de explosión**” de los sistemas informáticos ganaderos. El interés por controlar la trazabilidad de los productos de origen animal se extendió de su objeto inicial, el ganado vacuno, a muchos otros productos, de distintos sectores (porcino, ovino, avicultura, ...), como los productos lácteos, carnes, etc.

Dentro del control de algunos de estos grupos de productos tiene importantísimo papel la iniciativa privada, debiendo hacerse un esfuerzo para facilitar la comunicación automática de datos entre los sistemas de las empresas y los de la administración, como en el proyecto **LETRA Q (Sistema de trazabilidad como soporte de la mejora integral de la calidad de la leche y del control del sector lácteo)** que se describirá con posterioridad.

Mención aparte merece la importancia que, en el control de la sanidad ganadera, tiene un procesamiento eficaz de la información. Se potenció la creación de una **Red de Vigilancia** apoyada en un sistema informático especializado.

Con todo ello, durante esos años aparecieron, o adquirieron entidad, una serie de sistemas informáticos que vienen a facilitar la gestión de la información necesaria para conseguir los objetivos descritos.

**A finales del año 2004**, comenzó a funcionar la aplicación REGA (Registro de Explotaciones Ganaderas multiespecie), que en un año sustituye a dos de los más importantes y veteranos sistemas de trazabilidad de la Dirección General de Ganadería, SIMOGAN y SIMOPORC. Tanto el REGA, como el RIIA (Registro de Identificación Individual de Animales) y el REMO (Registro General de Movimiento de Ganado) se integraron luego con posterioridad dentro del SITRAN o Sistema Integral de Trazabilidad Animal que surge siguiendo los mandatos de la Ley 8/2003 y a la gran proliferación de legislación sectorial.

Este momento era crítico por **varias razones**:

- Gran volumen de información manejada.
- Dispersión de los datos, en 17 sistemas o bases de datos distintos a finales de 2004.
- Muchos agentes involucrados en el mantenimiento de la información: Dirección General de Ganadería, administraciones locales, asociaciones de productores y usuarios, entes autónomos, Unión Europea, etc. y aumentando.
- La responsabilidad del mantenimiento de la información está difuminada entre varios departamentos, con fronteras poco claras.

Los riesgos que se podían correr eran claros:

- Redundancia de datos. El principal enemigo de una correcta administración de un sistema de información.
- Duplicación de funcionalidades entre sistemas.
- Difuminación de la responsabilidad en el mantenimiento de los datos, que lleva a la obsolescencia de los mismos.

- Ineficacia en la explotación de los datos.

Sin embargo, en el momento que se empezaron a vislumbrar estos riesgos, desde la Administración Pública se tomaron las siguientes medidas con el objetivo de evitarlos o minimizarlos:

- Visión global. Potenciación de la visión de los sistemas de la Dirección General de Ganadería, como un único gran sistema de distribución, con multitud de agentes implicados y conectado al resto de sistemas del MAPA.
- Definición de mecanismos de comunicación entre sistemas. En un entorno tecnológico heterogéneo, es muy importante definir el mecanismo de intercambio de datos entre sistemas. En el caso que nos ocupa, se ha considerado adecuada la utilización de Servicios Web, por ser una tecnología estándar, suficientemente probada, que garantiza la seguridad y que está ampliamente soportada por grandes empresas tecnológicas del sector.
- Coordinación de los futuros desarrollos, orientándolos en distintos aspectos:
  - Entorno tecnológico
  - Imagen corporativa
  - Arquitectura modular
  - Definición de funciones

El resultado de todas las medidas mencionadas anteriormente es la construcción de **un gran sistema integrado**. En él, el almacenamiento de datos está distribuido entre varios servidores y tecnologías. El acceso se hace a través de la intranet del MAPA, y es completamente transparente.

Con estas herramientas y tecnología se consigue:

- Tecnología cliente-servidor, para un tratamiento más ágil de la información o para conseguir interfaces amigables y eficaces.
- Y adecuación de los medios hardware a los objetivos descritos, mediante la utilización de dispositivos específicos como pantallas táctiles, mosaicos de paneles, utilización de dispositivos móviles como Tablet PC, Pocket, etc. que puedan permitir al gestor la explotación de los datos a distancia y siguiéndole en sus movimientos.

## 2. PLATAFORMAS Y BASES DE DATOS

### 2.1. ARCA (SISTEMA NACIONAL DE INFORMACIÓN DE RAZAS)

La evolución de las razas en nuestro país, la aplicación de las normas comunitarias, como el Reglamento 2016/1012<sup>1</sup>, de cría animal, y la importancia creciente de los recursos zoogenéticos, al ser fuente de productos de calidad y por contribuir al mantenimiento del medio ambiente y de las tradiciones, ha hecho preciso actualizar las líneas de actuación en el campo de la Zootecnia a través del Real Decreto 45/2019, de 8 de febrero, por el que se

---

<sup>1</sup> Reglamento (UE) 2016/1012 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 8 de junio de 2016, relativo a las condiciones zootécnicas y genealógicas para la cría, el comercio y la entrada en la Unión de animales reproductores de raza pura, porcinos reproductores híbridos y su material reproductivo, y por el que se modifican el Reglamento (UE) n.º 652/2014 y las Directivas 89/608/CEE y 90/425/CEE del Consejo y se derogan determinados actos en el ámbito de la cría animal («Reglamento sobre cría animal»)

establecen las normas zootécnicas aplicables a los animales reproductores de raza pura, porcinos reproductores híbridos y su material reproductivo, se actualiza el Programa nacional de conservación, mejora y fomento de las razas ganaderas y se modifican algunas normativas zootécnicas.

Como instrumento fundamental para la difusión de la información relativa a las razas incluidas en el catálogo Oficial de Razas de Ganado de España se mantiene **el Sistema Nacional de Información ARCA**, dónde se consultan todos aquellos aspectos relacionados con las diversas especies y razas ganaderas y su reglamentación. Es dependiente del Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, con la colaboración y participación de las comunidades autónomas y las asociaciones de criadores. Se constituye como una herramienta dinámica de gestión de la información zootécnica española, para las entidades y organizaciones implicadas.

El Catálogo Oficial de Razas de Ganado de España contiene la relación oficial y la clasificación de todas las razas ganaderas reconocidas y utilizadas en España por su interés económico, zootécnico, productivo, cultural, medioambiental o social, destinadas a ser objeto de un programa de cría.

El Catálogo Oficial de Razas de Ganado de España se encuentra recogido en el Anexo I del Real Decreto 45/2019 que recoge varias especies como la aviar, el bovino, el caprino, el equino asnal, el equino caballar, el ovino, el porcino y otras especies entre las que se encuentran algunas tan dispares como el camello o el conejo.

## **2.2. SITRAN O SISTEMA INTEGRAL DE TRAZABILIDAD ANIMAL**

Llamamos Sistema Integral de Trazabilidad Animal al conjunto de los sistemas informáticos que gestionan información ganadera dentro de la globalidad de sistemas del MAPA.

La capacidad de conocer el historial, ubicación o trayectoria de los animales de abasto vivos a lo largo de su cadena de producción, desde la granja hasta el matadero se ha convertido en los últimos años en un factor imprescindible para la puesta en práctica de políticas de sanidad animal y de seguridad alimentaria. Así viene recogido en la legislación comunitaria y nacional, tanto desde un punto de vista horizontal como desde un enfoque sectorial.

Cada uno de los sistemas que en su concepción y desarrollo se consideraron separadamente, se vería dentro de la globalidad como un módulo dentro de aquél, que interacciona con el resto de los módulos y con los usuarios correspondientes. Ocasionalmente, puede tener también intercambio de datos con sistemas externos, pudiendo ser éstos pertenecientes a la administración central, administraciones periféricas, empresas, Unión Europea, etc.

SITRAN se nutre íntegramente de los datos suministrados por las aplicaciones de las Comunidades y Ciudades Autónomas, que a su vez proceden de los datos suministrados por los propios ganaderos (al gestionar altas, bajas, emisión de documentos de identificación, declaraciones de censo, etc.) u obtenidos mediante el ejercicio de sus competencias (inspecciones, controles, emisión de documentos de movimiento, etc.).

Dentro del total de subsistemas o módulos que componen el sistema integrado se pueden destacar los siguientes:

### **2.2.1. REGA o Registro General de Explotaciones Ganaderas**

El registro de explotaciones multiespecie, es la evolución natural de los sistemas SIMOGAN (registro de explotaciones y movimientos de ganado vacuno) y SIMOPORC (registro de explotaciones y movimientos de ganado porcino). Su importancia radica en que es el sistema donde se recoge una de las informaciones básicas para el sector, como es el registro de explotaciones ganaderas, sobre el que se enlaza la mayoría de la información que se gestiona. Incluye los datos básicos de más de 900.000 explotaciones ubicadas en España, relativos a más de 150 especies diferentes de animales de producción.

### **2.2.2. REMO o Registro de Movimientos de las especies de interés ganadero**

Recoge información relativa a los movimientos de las diferentes especies (en el caso del ganado bovino, ovino, caprino y equino, de manera individual; en el resto de las especies, por lotes).

### **2.2.3. RIIA o Registro de Identificación Individual de Animales.**

En funcionamiento para las especies bovina, ovina, caprina y para équidos.

## **2.3. RASVE (Sistema de Alerta Sanitaria Veterinaria)**

En España, los esquemas de vigilancia epidemiológica de las enfermedades animales se producen a través de:

- El catálogo de Enfermedades de Declaración Obligatoria (EDOs), con el fin de establecer las medidas que impidan su difusión fuera del foco en que se han originado, restringiendo paralelamente sus potenciales repercusiones
- El Sistema de Alerta Sanitaria Veterinaria, que está integrado por:
  - el Comité Coordinador del Sistema,
  - el Servicio de Intervención Rápida (SIR),
  - una red informática (RASVE = Red de Alerta Sanitaria Veterinaria), que reúne toda la información sanitaria disponible (nacional e internacional), permitiendo la conexión entre las aplicaciones informáticas existentes en materia de Sanidad animal, Producción animal y Seguridad alimentaria.

Esta red informática permite la toma rápida de decisiones para la prevención, control y erradicación, de forma coordinada entre las distintas autoridades competentes en materia de sanidad animal. Se encuentra a disposición de los Ministerios de Agricultura y Sanidad y de las CCAA y a través del cual se informará a los entes y organismos internacionales frente a los cuales se encuentra obligada España. RASVE está conectada con las Redes de vigilancia de la

OIE (Organización Mundial de Sanidad Animal) así como con la Red de vigilancia de la UE (Sistema de Notificación de Enfermedades Animales).

La red RASVE incluye un servidor informático que integra toda la información en materia sanitaria proveniente de fuentes tanto nacionales como comunitarias e internacionales; posteriormente difunde esta información en forma de alertas a los centros de toma de decisiones y al público en general. De esta manera recoge la información de las redes de vigilancia epidemiológica de las CCAA y de las ADNS y las relaciona con el sistema comunitario de movimientos de animales y productos de origen animal (TRACES) y la base nacional de datos del Sistema Integral de Trazabilidad Animal (SITRAN). Permite una actuación rápida, eficaz y coordinada y, en definitiva, facilita la toma de decisiones urgentes para la prevención, control y erradicación de las enfermedades animales.

RASVE incluye dos módulos diferenciados:

- **Módulo de focos:** a través del mismo las CCAA notifican los focos en su territorio, estando conectado directamente con Sistema de Notificación de enfermedades de los animales (ADNS por sus siglas en inglés). De esta manera se agiliza la comunicación de información, tanto a las otras CCAA, como a la Comisión Europea, al resto de EEMM y a los sectores ganaderos. Este sistema también funciona en sentido inverso, recibiendo información de los focos producidos en el resto de EEMM y difundiéndola a nivel nacional. El módulo es de acceso público y permite consultar focos aplicando diferentes criterios de búsqueda.
- **Módulo de epidemio-vigilancia (de alertas):** permite identificar las partidas de animales que han salido o entrado de o desde una zona o explotación en la que se haya producido un foco, así como su localización. Facilita, además, la puesta en marcha de las actuaciones ante la aparición de un foco, ya que dispone de una herramienta geográfica que automáticamente nos permite determinar las zonas de vigilancia y protección, establecer pasillos sanitarios o identificar las explotaciones u otros establecimientos dentro de esas zonas. El módulo de alertas es privado, sólo al servicio de los SVO.

#### 2.4. RASFF o Sistema De Alerta Rápida para Alimentos y Piensos

A nivel de la UE se establece el sistema RASFF (Rapid Alert System Feed and Food), que proporciona a las autoridades de control de alimentos y piensos una herramienta para el intercambio de información sobre las medidas tomadas ante la detección de un riesgo en un pienso o en un alimento. La eficacia en el intercambio de información se consigue mediante la utilización de las aplicaciones informáticas i-RASFF y RASFF WINDOW, donde se publica la información en forma de notificaciones y a las que tienen acceso los puntos de contacto de la Comisión Europea, EFSA, países de la EFTA (Asociación Europea de Libre Comercio) y los puntos de contacto nacionales de los Estados Miembros.

El Reglamento de ejecución (UE) 2019/1715 de la Comisión, de 30 de septiembre de 2019, por el que se establecen las normas de funcionamiento del sistema de gestión de la información sobre los controles oficiales y sus componentes (“Reglamento SGICO”) establece las medidas

de ejecución del Sistema de Alerta Rápida para los Productos Alimenticios y los Alimentos para animales

## **2.5 ARIES, FILOVI Y FILUS.**

### **2.5.1 ARIES**

Es el Sistema de Información para la Identificación y Genotipado de Ganado Ovino.

El Reglamento (CE) 727/2007, de 26 de junio, establece los requisitos mínimos que deben cumplir los programas de cría de animales resistentes a las EETs, que los EE.MM pueden introducir en su población ovina, derogando además la Decisión 2003/100/CE. Estos programas se centrarán en rebaños de alto valor genético y tienen como objetivo aumentar la frecuencia del alelo ARR en el rebaño ovino, y reducir la prevalencia de los alelos ARQ conocidos por contribuir a la sensibilidad a las EET.

Uno de los requisitos para los rebaños participantes es que los animales cuyo genotipo se vaya a determinar se identificarán de manera segura. Por otro lado, se debe disponer de una base de datos que contendrá, como mínimo, información sobre la identidad, raza y número de cabezas de todos los rebaños que participan en el programa de cría y los resultados de cualquier prueba de genotipado realizada. Además, la puesta en marcha de los programas de cría se acompañará de un sistema que permita la identificación de animales y de muestras, el tratamiento de las mismas y la notificación de resultados, en el cual se minimice la posibilidad de error humano.

Por todo lo anterior el Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación diseñó, con la participación de las Comunidades Autónomas y las Asociaciones de Criadores de Ovino de Raza Pura, un **Programa Nacional de selección genética para Resistencia a Encefalopatías Espongiformes Transmisibles (EETs) en Ovino** cuyos objetivos principales se concretan en la obtención de animales resistentes a **EETs**, de modo que se minimicen las posibles repercusiones en la salud pública y se incremente el estatus sanitario de nuestra cabaña ovina.

Una de las acciones claves del Programa Nacional ha sido la puesta en marcha y mantenimiento de un **Sistema de Información para la Identificación y Genotipado de Ganado Ovino (ARIES)**. Dicho sistema pretende, no solo cumplir la legislación vigente, sino ofrecer a todos los usuarios del sistema, una herramienta que contribuya al desarrollo de los **Programas de Conservación y Mejora de cada raza**.

### **2.5.2. FILUS Y FILOVI**

El departamento de identificación genética y gestión de recursos zoogenéticos lleva a cabo los análisis de microsatélites de ADN necesarios para la identificación, control genealógico y la homologación de las técnicas de análisis para la identificación. La gestión de las solicitudes de análisis que se remiten al laboratorio desde las distintas Asociaciones de Criadores de Ganado Selecto tanto para el genotipado, control de identidad y control de filiación, se realiza a través del uso de las bases de datos FILUS y FILOVI. Siendo FILUS para Equino y FILOVI para ganado ovino.

## **2.6. OTRAS BASES DE DATOS**

**2.6.1. TRACES – RACES** (TRAdE Control and Expert System) es una herramienta de la Comisión Europea para registrar los movimientos de animales, productos de origen animal y no animal, piensos y plantas que transitan por países de la UE o que son importados desde fuera de la UE con el fin de velar por la seguridad de los alimentos y los consumidores. Las partidas en la mayoría de los casos se acompañan de certificados sanitarios o documentos comerciales y las autoridades competentes pueden expedir estos documentos online a través de TRACES.

TRACES es una herramienta multilingüe que notifica, certifica y supervisa el comercio. Su finalidad es facilitar el comercio, acelerar los procedimientos administrativos y mejorar la gestión de riesgos relacionados con amenazas sanitarias, además de combatir el fraude y mejorar la seguridad de la cadena alimentaria y la salud animal.

A raíz de la entrada en vigor del reglamento de controles oficiales, el Reglamento (UE) 2017/625, el 14 de diciembre de 2019, la Comisión ha desarrollado una nueva versión de TRACES, denominado TRACES-NT (TRACES New Technologies). Según dicho Reglamento, TRACES tiene que integrarse como parte del Sistema de Gestión de la Información para Controles Oficiales (IMSOC) con el objetivo de apoyar una gestión más eficiente de los controles oficiales.

### **2.6.2. LETRA Q**

Sistema de trazabilidad como soporte de la mejora integral de la calidad de la leche y del control del sector lácteo. En dicho proyecto se emplearán terminales portátiles en los que el personal de las industrias lácteas grabará datos de movimientos de leche cruda, para su posterior envío al sistema central. Se utilizarán tarjetas criptográficas CERES con firma digital para validar la entrada al sistema del usuario que introduzca la información.

### **2.6.3. SILUM**

Sistema de registro y control de las entidades de la alimentación animal, gestionado por las CC.AA. y el MAPA según las competencias de cada uno.

### **2.6.4. SIRENTRA**

Aplicación informática que permita mantener un Registro Nacional de transportistas de animales vivos y de sus vehículos, integrando todos los registros autonómicos actuales y que, aprovechando los recursos actualmente disponibles en tecnología informática y web, permita el acceso a la información de manera homogénea y su actualización por las CCAA como gestoras de los datos.

## **3. MARCO LEGAL**

- El Real Decreto 479/2004, de 26 de marzo, por el que se establece y regula el Registro general de explotaciones ganaderas.
- La Ley 8/2003, de 24 de abril, de Sanidad Animal establece (artículo 38.1) que todas las explotaciones de animales deben estar registradas en la comunidad autónoma en la que

se ubiquen, y que sus datos básicos han de ser incluidos en un registro nacional. El artículo 7.1 establece la obligación de los propietarios o responsables de los animales de comunicar a las administraciones públicas los datos relativos a las entradas y salidas de animales de sus explotaciones. Cuando el movimiento se realiza entre comunidades autónomas, la de origen debe comunicarlo a la de destino. La Ley establece la creación de un registro nacional de carácter informativo que incluirá los datos básicos de los movimientos de ganado dentro del territorio nacional.

- Además, está regulada la identificación individual de los animales de determinadas especies, así como la creación de registros que recogen sus datos básicos:
  - Real Decreto 1980/1998, de 18 de septiembre, por el que se establece un sistema de identificación y registro de los animales de la especie bovina
  - Real Decreto 685/2013, de 16 de septiembre, por el que se establece un sistema de identificación y registro de las especies ovina y caprina
  - Real Decreto 676/2016, de 16 de diciembre por el que se establece un sistema de identificación y registro de los animales de la especie equina.
- El Real Decreto 728/2007, de 13 de junio, establece y regula tanto REMO como RIIA.
- El sistema de alerta sanitaria veterinaria, Rasve, se creó mediante el Real Decreto 1440/2001, con el objetivo de prevenir la entrada de enfermedades infecciosas, evitar su difusión y erradicar las ya presentes.
- El Reglamento de ejecución (UE) 2019/1715 de la Comisión, de 30 de septiembre de 2019, por el que se establecen las normas de funcionamiento del sistema de gestión de la información sobre los controles oficiales y sus componentes (“Reglamento SGICO”) establece las medidas de ejecución del Sistema de Alerta Rápida para los Productos Alimenticios y los Alimentos para animales.
- El Reglamento (CE) 727/2007, de 26 de junio, establece los requisitos mínimos que deben cumplir los programas de cría de animales resistentes a las EETs, que los EE.MM pueden introducir en su población ovina, derogando además la Decisión 2003/100/CE. Para Aries junto con el **Real Decreto 21/2013**, de 18 de enero, por el que se establece el programa nacional de selección genética para la resistencia a las encefalopatías espongiformes en ovino.

## **BIBLIOGRAFIA**

EL SISTEMA INTEGRADO DE INFORMACIÓN GANADERA Luis Manuel de Villena Cabeza  
Subdirector General Adjunto Subdirección General de Informática y Comunicaciones.  
Secretaría General Técnica. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación.

Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. Trazabilidad Animal  
<https://www.mapa.gob.es/es/ganaderia/temas/trazabilidad-animal/>

Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. Sistema Nacional de Información de Razas.  
<https://www.mapa.gob.es/es/ganaderia/temas/zootecnia/razas-ganaderas>

Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. Red de Vigilancia Epidemiológica.  
[https://www.mapa.gob.es/es/ganaderia/temas/sanidad-animal-higiene-ganadera/sanidad-animal/alertas-sanitarias/redes\\_vigilancia.aspx](https://www.mapa.gob.es/es/ganaderia/temas/sanidad-animal-higiene-ganadera/sanidad-animal/alertas-sanitarias/redes_vigilancia.aspx).

**MATERIAL PARA LA PREPARACIÓN DEL TEMA 38**

**CONSERVACIÓN DE RECURSOS ZOOGENÉTICOS. PROGRAMA DE MEJORA GENÉTICA ANIMAL.MARCO LEGAL.**

*Este material no tiene carácter oficial, por lo que en ningún caso vinculará al Tribunal Calificador. Constituye, únicamente, un instrumento complementario que servirá de apoyo al opositor para enfocar cada uno de los epígrafes, pero nunca de forma exclusiva ni excluyente. El Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación no se hace responsable del contenido del mismo.*

*Los materiales no serán objeto de actualización constante.*

## **ÍNDICE**

### **1. INTRODUCCIÓN**

### **2. DEFINICIONES**

2.1. CATÁLOGO OFICIAL DE RAZAS DE GANADO DE ESPAÑA.

2.2. ASOCIACIÓN DE CRIADORES.

2.3. PROGRAMA DE CRÍA

2.4. BANCO DE GERMOPLASMA

2.5. CENTRO CUALIFICADO DE GENÉTICA

2.6. DIFUSIÓN DE LA MEJORA

2.7. CONTROL TÉCNICO DE UNA RAZA

2.8. CENTRO NACIONAL DE REFERENCIA

### **3. PROGRAMA DE MEJORA ANIMAL**

3.1. APAREAMIENTO ADECUADO Y PROGRAMA DE INSEMINACIÓN ARTIFICIAL

3.2. LA SELECCIÓN DE INDIVIDUOS CON DOTACIÓN GENÉTICA SUPERIOR

3.3. MÁXIMA DIFUSIÓN DE LA MEJORA GENÉTICA OBTENIDA

### **4. CATÁLOGO OFICIAL DE RAZAS DE GANADO DE ESPAÑA**

4.1. RAZAS AUTÓCTONAS

4.2. RAZAS INTEGRADAS

4.3. OTRAS RAZAS RECONOCIDAS EN ESPAÑA

### **5. MARCO LEGAL**

## **1. INTRODUCCIÓN**

La **cría de animales de razas puras** constituye un elemento fundamental de la ganadería por sus implicaciones económicas, sociales y medioambientales. En este sentido, las razas autóctonas ganaderas constituyen una fuente de ingresos para la población agraria, que se ve favorecida por el uso de animales de alto valor genético, que contribuyen a un incremento de rentabilidad y competitividad de su producción, mejorando su posicionamiento en el mercado.

Por otro lado, la búsqueda de competitividad o de productividad no debe convertirse en una amenaza para **las razas autóctonas** que no son altamente productivas pero que cuentan con características de resistencia y rusticidad que les confieren gran capacidad de adaptación a entornos ambientales, cambio climático y resistencia a enfermedades y a las demandas del consumidor orientadas a productos de calidad resultantes de sistemas de producción respetuosos con el medio ambiente y con el bienestar animal, precisando especial atención las razas amenazadas, que constituyen un relevante depósito de genes que pueden contribuir a los objetivos mencionados.

Estas razas no sólo contribuyen al desarrollo rural, a la fijación de la población en zonas rurales y a la preservación del patrimonio zoogenético nacional y de la biodiversidad, sino que además son esenciales para el desarrollo sostenible del sector ganadero, ya que las diversas condiciones climatológicas y orográficas en España han contribuido a convertir a nuestro país en uno de los países europeos con mayor diversidad biológica.

Sin embargo, la variedad y continuidad de muchas de las razas ganaderas a nivel mundial y nacional se ha visto amenazada en los últimos años por el abandono de su explotación, lo que ha conducido a la adopción de medidas y numerosos informes y acuerdos internacionales.

Por lo tanto, en los últimos años, gracias a la puesta en marcha de diversa normativa y al desarrollo del Plan de Acción por el que se han desarrollado las líneas de actuación del Programa nacional, se ha producido un gran avance en nuestro país para la modernización del sector de las razas puras y se han apoyado desde las Administraciones las actuaciones relativas a las asociaciones de criadores, los libros genealógicos, la admisión para cría y las pautas para control de rendimientos y evaluación del valor genético de diferentes especies, con vistas por un lado, a armonizar los intercambios intracomunitarios y la importación de animales de raza pura y su material reproductivo, y por otro lado, a garantizar el mantenimiento y mejora de nuestros recursos.

En dicha labor es esencial que dispongan y mantengan una **base de datos o sistema informatizado de gestión de datos** que permita el registro adecuado de genealogías y garanticen la capacidad de registrar, comunicar y utilizar datos en su programa de cría.

Deben a su vez certificar los aspectos raciales y garantizar el acceso a dicha base de datos al personal de las autoridades competentes responsables de los controles oficiales, permitiendo la evaluación de riesgo, el seguimiento de la raza, la comprobación de cumplimiento de obligaciones de las asociaciones y las actividades de control oficial y control técnico de la raza,

además de poder incorporar la información en el Sistema Nacional de Información de Razas (ARCA) y en la base de datos internacional DAD-IS.

En cuanto a **las competencias** para llevar a cabo estas actuaciones el Real Decreto 45/2019 , de 8 de febrero, por el que se establecen las normas zootécnicas aplicables a los animales reproductores de raza pura, porcinos reproductores híbridos y su material reproductivo, se actualiza el Programa nacional de conservación, mejora y fomento de las razas ganaderas, señala a:

**Las comunidades autónomas** serán las autoridades competentes para el reconocimiento de las asociaciones de criadores, para la aprobación de los programas de cría, la realización de controles oficiales de los operadores y otras actividades oficiales y la gestión de un Programa de Cría de acuerdo con el artículo 38 del Reglamento (UE) 2016/1012 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 8 de junio de 2016, en los casos en que tengan atribuidas dichas competencias en sus ámbitos territoriales, de acuerdo con el artículo 9 del presente real decreto.

Asimismo, las comunidades autónomas serán las autoridades competentes para el reconocimiento de bancos de germoplasma, Laboratorios de genética molecular animal, Centros de testaje y Centros cualificados de genética animal, así como para la aplicación y el desarrollo de todas las líneas englobadas en el Programa nacional de acuerdo al presente real decreto en sus respectivos ámbitos de competencia.

**El Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación** será la autoridad competente para el reconocimiento de las asociaciones, la aprobación de los programas de cría, la realización de controles oficiales de los operadores y otras actividades oficiales en su ámbito competencial y la gestión de un Programa de Cría de acuerdo al artículo 38 del Reglamento (UE) 2016/1012 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 8 de junio de 2016, en los casos en que tenga atribuidas dichas competencias de ámbito nacional, de acuerdo con el artículo 9 del presente real decreto.

Asimismo, tendrá competencias en materia de:

- a) Creación y mantenimiento de una lista de asociaciones conforme al artículo 7 del Reglamento (UE) 2016/1012 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 8 de junio de 2016.
- b) Reconocimiento del Banco Nacional de Germoplasma Animal, así como de Laboratorios de genética molecular animal y Centros cualificados de genética animal, cuando éstos sean dependientes de la Administración General del Estado y designación de Centros Nacionales de Referencia.
- c) Controles zootécnicos a la entrada en la Unión Europea.
- d) Coordinación e interlocución con la Comisión y el resto de los Estados miembros en el reconocimiento de asociaciones y autorización de programas de cría. Específicamente, realizará la interlocución con las asociaciones reconocidas en otros Estados miembros que lleven a cabo en el Reino de España un programa de cría y con la autoridad competente que reconoció a dichas entidades en otro Estado miembro para actuaciones reguladas en el

artículo 12 del Reglamento (UE) 2016/1012 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 8 de junio de 2016.

Asimismo, realizará la interlocución con las autoridades competentes de los Estados miembros a los que asociaciones reconocidas en el Reino de España pretendan extender su programa de cría.

e) Colaboración con la Comisión en los controles que realice de acuerdo al artículo 55 del Reglamento (UE) 2016/1012 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 8 de junio de 2016.

f) Prestación de asistencia a otros Estados miembros y a terceros países en caso de detección de incumplimientos.

g) Interlocutor para los Centros de referencia de la Unión Europea.

h) Interlocutor con Organismos Internacionales en materia de zootecnia.

i) Coordinación, registro, publicidad y desarrollo de las funciones que le corresponden a nivel nacional, para la aplicación homogénea del Programa nacional en todo el territorio nacional.

j) Creación y mantenimiento de la lista de autoridades competentes del control oficial y a efectos de notificaciones, de acuerdo al artículo 39 del Reglamento (UE) 2016/1012 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 8 de junio de 2016

## **2. DEFINICIONES.**

**2.1. Catálogo Oficial de Razas de Ganado de España:** aquél que contiene la relación oficial y la clasificación de todas las razas ganaderas reconocidas y utilizadas en España por su interés económico, productivo, cultural, medioambiental o social, destinadas a ser objeto de un programa de cría.

**2.2. Asociaciones de criadores:** sociedades de criadores de razas puras y sociedades de criadores de porcinos híbridos de acuerdo con lo establecido en el artículo 2 del Reglamento (UE) 2016/1012 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 8 de junio de 2016, y otras entidades que puedan ser reconocidas a nivel nacional para otras especies.

**2.3. Programa de Cría:** conjunto de actuaciones sistematizadas, entre las que se incluye el registro, selección, cría e intercambio de animales reproductores y de su material reproductivo, diseñadas y aplicadas para conservar y/o mejorar las características fenotípicas y/o genotípicas deseadas en la población reproductora objetivo. Su finalidad podrá ser la conservación, la mejora, la reconstrucción o la creación de una raza, o una combinación de dichas finalidades. Por tanto, deben contener las disposiciones que afectan tanto al libro genealógico como a las actividades dirigidas a la consecución de su finalidad

**2.4. Banco de germoplasma:** colección de material genético (esperma, ovocitos, embriones, células somáticas o ADN) reconocida oficialmente en el marco del programa de cría, cuya finalidad sea la conservación ex situ o el uso sostenible de las razas puras de ganado.

**2.5. Centro cualificado de genética:** cualquier entidad pública o privada reconocida oficialmente para llevar a cabo la evaluación genética de animales y/o los análisis de los parámetros genéticos previstos en un programa de cría, así como para el asesoramiento científico a las asociaciones de criadores, que cuenta con suficientes recursos materiales y personales, experiencia y formación técnica para el desarrollo de dichas funciones.

**2.6. Difusión de la mejora:** cualquier actividad desarrollada para la propagación en el resto de la población del progreso genético obtenido en los programas de cría.

**2.7. Control técnico de una raza:** otras actividades oficiales cuyos objetivos son la comprobación, por los medios que la autoridad competente determine, de la situación de la raza y colaboración en el seguimiento y efectividad del programa de cría y actuaciones que desarrollan las asociaciones para esa raza, así como la realización de otras actuaciones de soporte técnico a las autoridades competentes, además de contribuir, en caso de solicitarlo la autoridad competente, al control oficial. En el caso de las asociaciones reconocidas por el Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, el control técnico de la raza podrá llevarse a cabo, entre otros medios, a través de un inspector de la raza, funcionario designado a estos efectos, que desarrollará las funciones definidas en el artículo 30. Las comunidades autónomas podrán designar un Inspector de raza a estos efectos, para las asociaciones reconocidas en su ámbito competencial.

**2.8. Centros Nacionales de Referencia:** aquéllos con los medios adecuados y experiencia contrastada en materia de zootecnia, que puede designar el Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación para que actúen en el marco del Programa nacional de conservación, mejora y fomento de las razas ganaderas, colaborando en la armonización y propuesta de actuaciones zootécnicas para el desarrollo de cada sector en todo el territorio nacional y la realización de otros aspectos de interés relacionados con las razas y su material genético

### **3. PROGRAMA DE MEJORA GENÉTICA**

El Programa nacional de conservación, mejora y fomento de las razas ganaderas comprende, como mínimo, las siguientes actuaciones:

- Caracterización y clasificación de las razas para su inclusión en el Catálogo Oficial de Razas de Ganado de España, así como de sus diferentes variedades.
- Reconocimiento de asociaciones de criadores. Las asociaciones de criadores de animales de razas ganaderas son aquellas oficialmente reconocidas en el marco de la normativa vigente para la creación o la gestión de los libros genealógicos y el desarrollo de los programas de mejora.
- Aprobación de programas de cría llevados por las asociaciones de criadores. Los programas de cría recogen el conjunto de actuaciones sistematizadas, entre las que se incluye el registro, selección, cría e intercambio de animales reproductores y de su material reproductivo, diseñadas y aplicadas para conservar y/o mejorar las características fenotípicas y/o genotípicas deseadas en la población reproductora objetivo. Su finalidad podrá ser la

conservación, la mejora, la reconstrucción o la creación de una raza, o una combinación de dichas finalidades.

Por tanto, deben contener las disposiciones que afectan tanto al libro genealógico como a las actividades dirigidas a la consecución de su finalidad. Los programas de cría son desarrollados por las asociaciones de criadores oficialmente reconocidas por las autoridades competentes. El programa de cría es elemento fundamental para la organización de las actividades sobre una raza, de tal forma que permita que el ganadero cuente con la información necesaria para la correcta selección de los reproductores más idónea. Se desarrolla en tres puntos:

### **3.1. APAREAMIENTOS ADECUADO Y PROGRAMAS DE INSEMINACIÓN ARTIFICIAL.**

Se debe tener en cuenta que este apareamiento se puede producir a través de la endogamia o de la exogamia dependiendo del tipo de mejora que pretendamos y de nuestra urgencia en conseguirla

### **3.2. LA SELECCIÓN DE INDIVIDUOS CON DOTACIÓN GENÉTICA SUPERIOR A LA MEDIA DE LA POBLACIÓN,**

para un determinado carácter o producción. Esta detección se basa en los libros genealógicos, el control de rendimiento tanto del propio animal como de su descendencia, así como sobre la evaluación del valor genético del individuo.

### **3.3. MÁXIMA DIFUSIÓN DE LA MEJORA GENÉTICA OBTENIDA:**

Se realiza a través de:

a. Asesoramiento técnico a los ganaderos

b. Fomento de las publicaciones e investigaciones.

- Desarrollo de un sistema nacional de información y bases de datos para la gestión y divulgación de las razas. Es esencial que dispongan y mantengan una base de datos o sistema informatizado de gestión de datos que permita el registro adecuado de genealogías y garanticen la capacidad de registrar, comunicar y utilizar datos en su programa de cría.

Deben a su vez certificar los aspectos raciales y garantizar el acceso a dicha base de datos al personal de las autoridades competentes responsables de los controles oficiales, permitiendo la evaluación de riesgo, el seguimiento de la raza, la comprobación de cumplimiento de obligaciones de las asociaciones y las actividades de control oficial y control técnico de la raza, además de poder incorporar la información en el Sistema Nacional de Información de Razas (ARCA) y en la base de datos internacional DAD-IS.

Por otro lado, el fomento de la integración de datos de los programas de cría para la misma raza garantizará la coherencia en cuanto a las características esenciales de la raza y los objetivos principales del programa, evitando así la pérdida de eficiencia en progreso genético o la pérdida de variabilidad genética, por la posible fragmentación de las poblaciones, además de favorecer la comparación válida entre animales sometidos a controles de rendimiento

- Creación y registro de centros de reproducción, bancos de germoplasma, así como la creación y coordinación de la Red Española de Bancos de Germoplasma.
- Reconocimiento oficial de Laboratorios de genética molecular animal, Centros de testaje, Centros de genética cualificados y designación de Centros Nacionales de Referencia
- Aprobación y desarrollo de los programas de difusión de la mejora y la celebración de certámenes ganaderos.
- Establecimiento y designación de los órganos de análisis y coordinación de actividades zootécnicas.
- Medidas específicas para promocionar las razas autóctonas y sus productos, como el Real Decreto 505/2013, de 28 de junio, por el que se regula el uso del logotipo «raza autóctona» en los productos de origen animal.
- Impulso de medidas que estimulen la investigación, la innovación, el asesoramiento y la capacitación en cualquiera de las líneas del programa para favorecer el intercambio de experiencias y conocimientos a nivel nacional e internacional, en el marco de los planes de acción de la FAO o la Unión Europea.
- Fomento de las razas ganaderas del Catálogo Oficial de Razas de Ganado de España y líneas de ayudas al Programa nacional, de acuerdo a las regulaciones y disponibilidades presupuestarias de las autoridades competentes

#### **4. CATÁLOGO OFICIAL DE RAZAS DE GANADO DE ESPAÑA**

##### **4.1. RAZAS AUTÓCTONAS**

Todas aquellas razas originarias de España de protección especial y de carácter más local, que deben ser conservadas como patrimonio genético español para favorecer su expansión y evitar su abandono y extinción, al disponer en su mayoría de escasos censos poblacionales y estar sometidas a factores de riesgo, con diversos grados de amenaza. Dentro de éstas se encuentran:

**a) Especie bovina:** Albera, Alistana-Sanabresa, Asturiana de la Montaña, Asturiana de los Valles, Avileña-Negra Ibérica (incluida la variedad Bociblanca), Berrenda en Colorado, Berrenda en Negro, Betizu, Blanca Cacereña, Bruna dels Pirineus, Cachena, Caldelá, Canaria, Cárdena Andaluza, Frieiresa, Lidia, Limiá, Mallorquina, Marismeña, Menorquina, Monchina, Morucha (incluida la variedad Negra), Murciana-Levantina, Negra Andaluza, Pajuna, Pallaresa, Palmera, Parda de Montaña, Pasiega, Pirenaica, Retinta, Rubia Gallega, Sayaguesa, Serrana de Teruel, Serrana Negra, Terreña, Tudanca, Vianesa.

**b) Especie ovina:** Alcarreña, Ansotana, Aranesa, Canaria, Canaria de Pelo, Carranzana (incluidas las variedades cara rubia y cara negra), Cartera, Castellana (incluida la variedad negra), Colmenareña, Chamarita, Churra Lebrijana, Churra Tensina, Churra, Guirra, Latxa, Lojeña, Maellana, Manchega (incluida la variedad negra), Merina (incluidas las variedades Negra y Merina de los Montes Universales), Merina de Grazalema, Montesina, Navarra, Ojalada, Ojinegra de Teruel, Ovella Eivissenca, Ovella Galega, Ovella Mallorquina, Ovella

Menorquina, Ovella Roja Mallorquina, Palmera, Rasa Aragonesa Ripollesa,, Roya Bilbilitana, Rubia del Molar, Sasi Ardi, Segureña, Talaverana, Xalda, Xisqueta.

**c) Especie caprina:** Azpi Gorri, Bermeya, Blanca Andaluza o Serrana, Blanca Celtibérica, Blanca de Rasquera, Cabra de las Mesetas, Cabra Galega, Del Guadarrama, Florida, Eivissenca, Majorera, Malagueña, Mallorquina, Moncaína, Murciana-Granadina, Negra Serrana, Palmera, Payoya, Pirenaica, Retinta Tinerfeña, Verata.

**d) Especie porcina:** Chato Murciano, Euskal Txerria, Gochu Asturcelta, Ibérico (incluidas las variedades Entrepelado, Lampiño, Manchado de Jabugo, Torbiscal y Retinto), Negra Canaria, Porco Celta y Porc Negre Mallorquí.

**e) Especie equina caballar:** Asturcón, Burguete, Caballo de Las Retuertas, Caballo de Monte de País Vasco, Cabalo de Pura Raza Galega, Cavall Mallorquí, Cavall Menorquí, Cavall Pirinenc Català, Pura Raza Española (incluida la estirpe Cartujana), Hispano-Árabe, Hispano-Bretón, Jaca Navarra, Losina, Marismeña, Monchina, Pottoka

**f) Especie equina asnal:** Andaluza, Ase Balear, Asno de las Encartaciones, Catalana, Majorera, Zamorano-Leonés.

**g) Especie (s) aviar(es):** Andaluza Azul, Combatiente Español, Euskal Antzara, Euskal Oiloa, Galiña de Mos, Gallina Castellana Negra, Gallina Eivissenca, Gallina Empordanesa, Gallina Extremeña Azul, Gallina del Prat, Gallina del Sobrarbe, Gallina Pedresa, Indio de León, Mallorquina, Menorquina, Murciana, Pardo de León, Penedesenca, Pita Pinta, Utrerana, Valenciana de Chulilla, Oca Empordanesa.

**h) Otras especies:** Camello Canario, Conejo Antiguo Pardo Español, Conejo Gigante de España.

#### **4.2. RAZAS INTEGRADAS:**

Aquellas razas foráneas procedentes de la Unión Europea o de Países Terceros que tras un período de explotación en España están contrastadas, con genealogía y controles de rendimiento, y disponen de un censo suficiente para llevar a cabo un programa de cría, habiendo demostrado su adaptación al entorno medioambiental y a las condiciones y sistemas de producción españoles.

Dentro de éstas se encuentran:

**a) Especie bovina:** Blonda de Aquitania, Charolesa, Fleckvieh, Frisona, Limusina, Parda.

**b) Especie ovina:** Assaf, Berrichon du Cher, Charmoise, Fleischschaf, île de France, Lacaune, Landschaff, Merino Precoz.

**c) Especie porcina:** Duroc, Landrace, Large White y Pietrain

**d) Especie equina caballar:** Árabe, Angloárabe, Pura Sangre Inglés, Trotador Español.

### **4.3. OTRAS RAZAS RECONOCIDAS EN ESPAÑA**

Aquellas razas que han sido caracterizadas y desarrolladas en España con distintas influencias genéticas, que tienen un objetivo funcional o productivo definido en un programa de cría, con censo suficiente para desarrollarlo y que no cumplen los requisitos para incorporarse al resto de las categorías. Dentro de éstas encontramos:

- a) **Especie ovina:** Salz.
- b) **Especie equina caballar:** Caballo de Deporte Español (C.D.E.)

### **5. MARCO LEGAL**

- Instrumento de Ratificación de 16 de noviembre de 1993 del **Convenio sobre Diversidad Biológica**, que reconoce los derechos soberanos de los Estados sobre sus recursos naturales.
- **Plan Estratégico del Patrimonio Natural y de la Biodiversidad 2011-2017**, aprobado por Real Decreto 1274/2011, de 16 de septiembre, en aplicación de la Convención de Diversidad Biológica y el compromiso del Reino de España para el desarrollo del Plan de acción mundial para los recursos zoogenético de la FAO, que marca el establecimiento de un nuevo sistema y unas nuevas normas internacionales, europeas y nacionales en relación al acceso a los recursos genéticos y el reparto justo y equitativo de los beneficios que se deriven de su utilización
- **Real Decreto 2129/2008**, de 26 de diciembre, **actualmente derogado**, por el que se establece el Programa nacional de conservación, mejora y fomento de las razas ganaderas, que se constituyó como el eje fundamental para las razas puras y para la aplicación de las normas zootécnicas europeas, que estaban incorporadas al mismo, a excepción de las referentes a los porcinos reproductores híbridos, que dada su especificidad mantuvieron normativa propia a través del Real Decreto 1108/1991, de 12 de julio, sobre normas zootécnicas aplicables a los reproductores porcinos híbridos.
- **Reglamento (UE) 2016/1012**, del Parlamento Europeo y del Consejo, de 8 de junio de 2016, relativo a las condiciones zootécnicas y genealógicas para la cría, el comercio y la entrada en la Unión de animales reproductores de raza pura, porcinos reproductores híbridos y su material reproductivo, y por el que se modifican el Reglamento (UE) n.º 652/2014 y las Directivas 89/608/CEE y 90/425/CEE del Consejo y se derogan determinados actos en el ámbito de la cría animal («Reglamento sobre cría animal»).
- **Real Decreto 45/2019**, de 8 de febrero, por el que se establecen las normas zootécnicas aplicables a los animales reproductores de raza pura, porcinos reproductores híbridos y su material reproductivo, se actualiza el Programa nacional de conservación, mejora y fomento de las razas ganaderas y se modifican los Reales Decretos 558/2001, de 25 de mayo; 1316/1992, de 30 de octubre; 1438/1992, de 27 de noviembre; y 1625/2011, de 14 de noviembre. Este nuevo marco normativo, compila en el ámbito europeo la normativa comunitaria en materia de zootecnia para las diversas especies y razas puras,

incluido el porcino híbrido, para unificar las condiciones zootécnicas y genealógicas para la cría de todos los animales incluidos en su ámbito de aplicación

El presente real decreto responde por lo tanto a la necesidad de adaptar y actualizar el Real Decreto 2129/2008, de 26 de diciembre, a las modificaciones introducidas por el nuevo marco legal europeo, Reglamento(UE)2016/1012, manteniendo las particularidades propias estructuradas en torno al Programa nacional de conservación, mejora y fomento de razas ganaderas y regulando aquellos aspectos que garantizan el respeto de los compromisos adquiridos en materia de zootecnia por nuestro país en el ámbito internacional.

MATERIAL NO OFICIAL

## **BIBLIOGRAFIA**

Real Decreto 2129/2008, de 26 de diciembre, por el que se establece el Programa nacional de conservación, mejora y fomento de las razas ganaderas

Real Decreto 45/2019, de 8 de febrero, por el que se establecen las normas zootécnicas aplicables a los animales reproductores de raza pura, porcinos reproductores híbridos y su material reproductivo, se actualiza el Programa nacional de conservación, mejora y fomento de las razas ganaderas y se modifican los Reales Decretos 558/2001, de 25 de mayo; 1316/1992, de 30 de octubre; 1438/1992, de 27 de noviembre; y 1625/2011, de 14 de noviembre.

Plan de Desarrollo del Programa Nacional de Conservación, Mejora y Fomento de las Razas Ganaderas

Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. Buscador de asociaciones de criadores <https://servicio.mapa.gob.es/arca/flujos.html? flowId=buscadorAsociacionCriadores-flow&isMapa=1>.

Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. Programas de cría. <https://www.mapa.gob.es/es/ganaderia/temas/zootecnia/razas-ganaderas/programas-mejora/>

**MATERIAL PARA LA PREPARACIÓN DEL TEMA 39**

**REGISTRO DE EXPLOTACIONES ANIMALES E IDENTIFICACIÓN ANIMAL EN LAS ESPECIES GANADERAS. SISTEMA INTEGRAL DE TRAZABILIDAD ANIMAL (SITRAN). MARCO LEGAL.**

*Este material no tiene carácter oficial, por lo que en ningún caso vinculará al Tribunal Calificador. Constituye, únicamente, un instrumento complementario que servirá de apoyo al opositor para enfocar cada uno de los epígrafes, pero nunca de forma exclusiva ni excluyente. El Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación no se hace responsable del contenido del mismo.*

*Los materiales no serán objeto de actualización constante.*

## **ÍNDICE**

### **1. REGISTRO DE EXPLOTACIONES E IDENTIFICACIÓN ANIMAL: IMPORTANCIA Y OBJETIVOS**

1.1. SITRAN: REGA, RIIA y REMO.

### **2. SISTEMAS DE IDENTIFICACIÓN ANIMAL**

2.1. ASPECTOS GENERALES

2.2. IDENTIFICACIÓN POR ESPECIES

2.2.1. Bovinos

2.2.2. Ovinos y caprinos

2.2.3. Porcinos

2.2.4. Equinos

2.2.5. Cunícola

2.2.6. Animales de compañía

### **3. MARCO LEGAL**

MATERIAL NO OFICIAL

## 1. REGISTRO DE EXPLOTACIONES E IDENTIFICACIÓN ANIMAL: IMPORTANCIA Y OBJETIVOS

Hoy en día, la identificación de los animales y de las explotaciones ganaderas es un instrumento esencial en la trazabilidad de los animales y de sus productos derivados, imprescindible para garantizar la seguridad alimentaria y la salud pública. En el sector agroalimentario se entiende por **trazabilidad** la capacidad de rastrear un alimento, un pienso, un animal productor de alimentos o cualquier sustancia que vaya a ser usada para ser incorporada a ellos, a través de todas las etapas de producción, elaboración y distribución que forman la cadena alimentaria. Las ventajas que estas bases de datos ofrecen son innegables y pueden clasificarse en tres categorías:

- **Finalidad zootécnica:**

La identificación individual de los animales permite el control de los rendimientos productivos y reproductivos para determinar el valor genético de cada animal, siendo necesaria para la inscripción en los libros genealógicos y constituyendo una pieza clave para la mejora genética.

Por otra parte, la identificación también permite hacer un seguimiento individualizado de los animales y de sus constantes fisiológicas con el objetivo de racionalizar el consumo de comida hasta sus niveles óptimos productivos y colaborando con el manejo de los animales para, por ejemplo, la detección de celos a través de sistemas informatizados.

A estas aplicaciones hay que añadir la mediación en la identificación individualizada de los animales para el cobro de primas en el contexto de la Política Agraria Común (PAC), tales como las ayudas acopladas o los propios pagos directos.

- **Finalidad sanitaria:**

Desde el punto de vista sanitario, la identificación individual de los animales permite la puesta en marcha de programas sanitarios y de vacunación que, siguiendo las directrices legales, se ajusten a las peculiaridades y condiciones de cada individuo.

Asimismo, la identificación es fundamental para la prevención, vigilancia epidemiológica, control y erradicación de enfermedades, así como el seguimiento de los mismos y para poder asegurar una rápida respuesta ante riesgos inminentes de naturaleza sanitaria, controlando una eventual difusión del mismo.

A esto se le añade la necesidad de garantizar la trazabilidad a lo largo de toda la cadena alimentaria que comienza con la producción primaria y que permite cumplir el conocido lema de las políticas de seguridad alimentaria de la UE, “desde la granja a la mesa”.

- **Finalidad comercial:**

Muy relacionado con las funciones sanitarias, la identificación de los animales también hace posible ofrecer todas las garantías necesarias para el comercio interior y exterior de los animales que, a fin de cuentas, es la parte más importante para la valorización de la producción primaria.

En este sentido, cabe mencionar que la obligatoriedad de identificación y registro de los animales está recogida en la normativa de la UE pero también en los tratados internacionales de la Organización Mundial del Comercio (OMC), el Codex Alimentarius y la Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE).

### **1.1 SITRAN: REGA, RIIA y REMO**

Estos aspectos han conducido al desarrollo de herramientas que permitan aglutinar toda la información relativa a los animales, sus movimientos y las explotaciones ganaderas en forma de registros. Estos registros son accesibles por medio de bases de datos informatizadas que se organizan, por una parte, en el **Registro General de Explotaciones Ganaderas (REGA)**, regulado por el Real Decreto 479/2004 y, por otra parte, en el **Registro de Identificación Individual de Animales (RIIA)** y el **Registro General de Movimientos del Ganado (REMO)**, regulados por el Real Decreto 728/2007.

De manera concreta, el **REGA** tendrá carácter público e informativo y se constituirá en una base de datos informatizada. Se nutre de los datos aportados por los titulares de las explotaciones que deberán notificárselo a las autoridades competentes de cada Comunidad Autónoma al comienzo de la actividad y que serán los responsables del registro informático de los datos correspondientes.

Este registro está regulado por el **Real Decreto 479/2004** donde se recoge, en su anexo I, aquellas especies a las que es aplicable y que incluyen, con carácter general, a los animales de producción y no a los animales de compañía ni a los animales silvestres. Además, la norma también regula, en su Anexo II, el contenido que se debe informar. Entre estos datos se recoge:

- El código de explotación,
- El titular de la misma,
- La ubicación,
- Los responsables sanitarios de la explotación,
- Las especies animales y su aptitud
- El censo,
- La clasificación según la forma de cría: de producción, reproducción o mixta

En el Anexo IV del citado Real Decreto se recogen los datos mínimos que el titular de la explotación deberá facilitar a las autoridades competentes. Dentro de ellas se encuentra la obligatoriedad de comunicar los cambios en los datos consignados en el registro a la autoridad competente en el plazo que ésta determine, que no podrá exceder un mes desde que se produzcan. Además, los datos sobre los **censos** de las explotaciones se comunicarán a la autoridad competente al menos una vez al año. A este respecto, el censo se comunicará antes del 1 de marzo de cada año, indicándose el censo medio del año anterior o el censo que se establezca en las disposiciones normativas específicas de cada sector, en la forma que determine la autoridad competente. No será aplicable a las explotaciones equinas que sean

centros de concentración, mataderos y todas aquellas que no alojen o alberguen animales de forma permanente.

Otro aspecto muy importante, regulado por el Real Decreto 479/2004 es la asignación del **código de explotación**. En este sentido, las autoridades competentes de las comunidades autónomas procederán a asignar a cada explotación un código de identificación, que garantice su identificación de forma única. La estructura de dicho código será:

- a) «ES» que identifica a España.
- b) Dos dígitos que identifican la provincia, según la codificación del Instituto Nacional de Estadística.
- c) Tres dígitos que identifican el municipio, según la codificación del Instituto Nacional de Estadística.
- d) Siete dígitos que identifican la explotación dentro del municipio de forma única.

Asimismo, el Anexo III del citado Real Decreto describe la **clasificación de los tipos de explotación**. Así, por ejemplo, se incluyen:

- Explotaciones ganaderas de producción y reproducción: aquellas que mantienen y crían animales, bien con el objeto de obtener un fin lucrativo de sus producciones (incluyendo los animales selectos, semen o embriones), o bien para su destino al consumo familiar.
- Explotaciones ganaderas especiales: en esta categoría se contemplan las explotaciones de tratantes u operadores comerciales, centros de concentración de animales, explotaciones de ocio, enseñanza e investigación, mataderos, plazas de toros, centros de inspección, centros de cuarentena, puntos de parada, pastos, centros de sacrificio domiciliario, establecimientos de transformación autorizados para el sacrificio de animales de la acuicultura a efectos de control de enfermedades, así como centros de recogida y centros de depuración, de expedición o centros similares de moluscos y espacios cinegéticos.

La importancia de esta base de datos queda constatada con sus cifras: en la actualidad el REGA incluye los datos básicos de más de 900.000 explotaciones ubicadas en España y relativos a más de 150 especies diferentes de animales de producción.

Por su parte, el **Registro de Identificación Individual de Animales** hace mención a la identificación individualizada de animales pertenecientes a las especies bovina, ovina y caprina. Este registro está regulado por el **Real Decreto 728/2007** y obliga a comunicar a la autoridad competente de la comunidad autónoma correspondiente, entre otros:

- El código de identificación asignado a cada animal
- El método de identificación que se emplea (crotal, bolo ruminal, otro)
- La especie, la raza y el sexo
- La fecha de nacimiento
- El código de explotación del lugar de nacimiento.

Por su parte, la base legal del movimiento pecuario en España se encuentra en la Ley 8/2003, de Sanidad Animal, que establece en su artículo 7.1 la obligación de los propietarios o responsables de los animales de comunicar a las Administraciones públicas los datos relativos

a las entradas y salidas de animales. Además, en el artículo 51.1 de dicha ley, y también relacionado con el movimiento pecuario, se establece que cuando se realice un movimiento de animales entre comunidades autónomas, la comunidad autónoma de origen deberá comunicarlo a la de destino. Por último, en su artículo 53 se establece que la AGE creará un registro nacional de carácter informativo, en la forma y condiciones que se determinen reglamentariamente, en el que se incluirán los datos básicos de los movimientos de animales dentro del territorio nacional.

Las bases de datos sobre movimientos de animales en España tienen su antecedente las herramientas SIMOGAN en el ganado vacuno y SIMOPORC en el ganado porcino. En la actualidad, es el ya mencionado Real Decreto 728/2007, de 13 de junio, el que establece y regula el **Registro general de movimientos de ganado (REMO)**.

Esta norma fija el contenido mínimo del documento de movimiento que deberá acompañar a los animales en sus desplazamientos y que servirá para la comunicación por parte de los titulares de explotaciones o poseedores de animales a la autoridad competente de los movimientos de animales para su inclusión en REMO. Entre la información que contiene ese documento de movimiento se incluye la identificación del origen y destino del movimiento, los animales implicados y los datos relativos al transporte, que servirán a su vez de garante en el cumplimiento de la normativa de bienestar animal. En la misma línea, se dispone la inclusión de información acerca del estado sanitario en origen y la obligatoriedad de notificar entre CC.AA. aquellos movimientos que se realicen de una región a otra.

Con el objetivo de simplificar el acceso a toda la información relativa a los animales de producción y para unificar la información de los distintos registros autonómicos, los tres registros electrónicos (REGA, RIIA y REMO) han quedado integrados en un registro único de carácter nacional denominado como **Sistema Integral de Trazabilidad Animal**, conocido como **SITRAN**, cuyo acceso está restringido en base a al Reglamento (UE) 2016/679 relativo a la protección de las personas físicas en lo que respecta al tratamiento de datos personales y a la libre circulación de estos datos (Reglamento general de protección de datos).

Esta base de datos, SITRAN, sigue la siguiente estructura:

- Un servidor central en el MAPA.
- Un canal de comunicaciones entre el MAPA y todas las comunidades autónomas.
- Los datos mínimos, establecidos para REMO, RIIA y REGA, y que residen en cada servidor autonómico.

De esta forma, el SITRAN se trata de una base de datos informatizada de carácter nacional y central que recoge los datos más relevantes de las bases de datos autonómicas relativas a las explotaciones ganaderas, así como a los animales de producción y los movimientos a los que éstos son sometidos. Todos estos instrumentos utilizados de manera combinada permiten garantizar la trazabilidad de los animales vivos desde su nacimiento hasta su sacrificio.

Cabe reseñar que el transporte de los animales vivos es una actividad sujeta a determinados requisitos cuyo propósito es garantizar la protección de los animales durante el viaje. Para

este fin, **SIRENTRA** es el registro que contiene información sobre los transportistas de animales vivos, sus medios de transporte y sus contenedores.

Anualmente, se pone a disposición del público en general la información más relevante acerca del censo de explotaciones ganaderas y animales de producción a través de un Informe SITRAN en aras de la transparencia informativa.

## **2. SISTEMAS DE IDENTIFICACIÓN ANIMAL**

### **2.1. ASPECTOS GENERALES**

La identificación animal consiste en la obtención y recogida de los signos y caracteres naturales o artificiales, existentes en un animal que permite diferenciar un individuo de forma inequívoca de cualquier otro de su misma especie.

Originariamente la identificación de los animales atendía a motivos productivos, para tener conocimiento de qué animales presentaban mayores rendimientos y, por tanto, interesaba utilizarlos para la reproducción.

Sin embargo, en la actualidad, la identificación animal va mucho más allá y resulta fundamental para conceptos tan relevantes como la trazabilidad, la seguridad alimentaria, la mejora genética, los programas sanitarios o el comercio exterior, ofreciendo información concreta sobre el estado de un animal, los tratamientos y vacunaciones que le han sido suministrados y permitiendo entablar un vínculo con los productos que de él deriven para poner solución de la forma más eficaz posible a cualquier peligro que surja.

De modo general, podemos clasificar los sistemas de identificación de los animales en tres tipos:

- **Caracteres naturales:**

Se trata de aquellos caracteres propios de los animales que no pueden modificarse y que, tradicionalmente, se plasmaban en la reseña, el siluetado, la fotografía, el nasograma o el palatograma. Estos métodos resultaban confusos y poco prácticos a la hora de referirnos a un animal concreto por lo que en la actualidad no se utilizan.

Sin embargo, dentro de esta misma categoría, pero de aparición más reciente, podemos incluir el análisis de los polimorfismos de nucleótido único (del inglés, *Single Nucleotide Polymorphism*, SNPs), de origen genético, que son mucho más determinantes y fiables, aunque de un coste asociado mayor por la complejidad de su determinación.

- **Signos artificiales:**

Por su parte, la identificación mediante signos artificiales consiste en el uso de señas o marcas referidas a un individuo que requiere su inscripción para relacionar el número o símbolo asignado inequívocamente con un individuo. Son más fiables y sencillos que los anteriores y

no inducen a confusión, aunque pueden caerse o extraviarse y la recogida de datos es más laboriosa y compleja.

Algunos ejemplos en esta categoría se incluyen el marcado a fuego, tatuaje, medallas, collares, anillos tarsianos o crotales.

- **Sistemas de identificación electrónicos:**

Frente a los inconvenientes planteados por los caracteres naturales o los signos artificiales, la identificación electrónica constituye una solución tecnológica novedosa que facilita el registro individual de los animales, simplifica la recogida de datos y su colocación es similar a la de los signos artificiales.

Estos sistemas constan de dos componentes: un elemento inyectable y un lector.

- **Elemento inyectable:** contiene el código alfanumérico que se le asigna a cada individuo. Se trata del microchip o transponder. En la práctica hay tres tipos:
  - **Inyectables:** microchip de pequeño tamaño, encapsulado en material biocompatible, habitualmente inyectado por vía subcutánea.
  - **Crotales:** transponders recubiertos de material plástico para colocarse en las orejas mediante un dispositivo de fijación.
  - **Bolos ruminales:** transponders introducidos en una cápsula de elevado peso específico (cerámica) que son administrados oralmente y permanecen en el retículo de los rumiantes.
- **Lector:** que emite una señal de radio de baja frecuencia que activa al elemento inyectable respondiendo con un campo magnético que codifica la secuencia alfanumérica correspondiente al individuo y que percibe el lector.

La lectura de los elementos inyectables puede realizarse en dos condiciones:

- **Lectura estática:** el animal permanece inmóvil y se procede a la lectura de su chip con un lector portátil.
- **Lectura dinámica:** los animales pasan por un arco que actúa de lector y que recoge informáticamente los datos mientras se trasladan por una manga de manejo.

## 2.2. IDENTIFICACIÓN POR ESPECIES

Una vez vistas estas generalidades, es preciso definir el sistema de identificación hoy en día vigente para cada especie ganadera.

### 2.2.1. Bovinos

El sistema actual de identificación de bovinos se implantó a raíz de la crisis de la EEB con objeto de poder garantizar la trazabilidad de los animales y sus productos en toda la Unión Europea.

La identificación ha de realizarse en un máximo de 20 días desde el nacimiento de los animales, excepto en extensivo donde se permite un plazo de hasta 6 meses. En caso de pérdida o deterioro, el crotal será sustituido por uno nuevo con el mismo código. Esta

identificación se lleva a cabo con dos **marcas auriculares** de color naranja con el mismo código alfanumérico, cuyo contenido es:

- Código ISO del país (ES para España)
- Un dígito que determine la autoridad competente (0 para España)
- Un dígito de verificación o control
- Dos dígitos de identificación a la CC.AA
- Ocho dígitos de identificación individual del animal.



Además, contendrán este código en forma de código de barras.

En los toros de lidia, registrados como tal en los libros genealógicos, se podrá sustituir las marcas auriculares por una marca a fuego de la ganadería y otra del libro genealógico o bien retirar las marcas auriculares antes de su traslado a la plaza de toros.

No obstante, la identificación individual de los bovinos no es efectiva hasta la emisión del **Documento de Identificación Bovina (DIB)**. Este documento deberá acompañar al animal durante toda su vida y en todos sus movimientos. Además, se dispondrá de dos ejemplares, uno que acompañará al animal cuando abandone la explotación y otro en poder del ganadero o, en su caso, de la autoridad competente. El DIB será expedido por la autoridad competente y en él constarán los datos del propietario y de la explotación donde resida, de forma que, si el animal cambia de explotación, deberá solicitarse un nuevo DIB.

DOCUMENTO DE IDENTIFICACION PARA BOVINOS	
ejemplar [T] de acompañamiento del animal	
NUMERO DE IDENTIFICACION <b>ES 05 07 0150 8111</b>	
Recuadro reservado para anotar el identificador de los toros de lidia	
<b>DATOS DEL ANIMAL</b>	
FECHA DE NACIMIENTO 01/01/2000 SEXO macho RAZA avileña PAÍS DE NACIMIENTO España	
Código de la Madre ESBA0000AA EXPLOTACIÓN DE NACIMIENTO ES000000000000	
PAÍSES DE ENGORDE	
<b>DATOS DE LA EXPLOTACION</b>	
Código ES000T000	TITULAR XXXXX XXXXX XXXXX
ES000000000000	DNI/CIF 00000000B
FECHA DE INCORPORACION A LA EXPLOTACION 00/00/0000	
<b>DATOS DE LA MUERTE, SACRIFICIO O EXPORTACION A PAIS NO PERTENECIENTE A LA U.E.</b>	
Muerto en explotación <input type="checkbox"/> Sacrificado en Matadero <input type="checkbox"/> Exportado a otro país <input type="checkbox"/>	
FIRMA O SELLO	
ANUAL Día <input type="text"/> Mes <input type="text"/> Año <input type="text"/>	
<b>DATOS SOBRE PRIMAS</b>	
SOLICITADA PRIMA ESPECIAL <input type="checkbox"/>	
Día <input type="text"/> Mes <input type="text"/> Año <input type="text"/>	
espacio de libre disposición para la inclusión de otras informaciones por la autoridad competente	
ES 05 07 0150 8111 01 01 2000 01 1121 ESBA0000AA	

Además de las marcas auriculares y el DIB, los animales deberán estar inscritos en el **libro de explotación** que tendrá que mantenerse actualizado, anotando las entradas y salidas para su comunicación a autoridad competente durante los tres primeros meses del año.

En caso de muerte, el DIB será entregado a la autoridad competente en los siete días siguientes al fallecimiento. Si la muerte se produce por sacrificio en un matadero, el responsable de entregar el DIB será el gestor del matadero.

### 2.2.2. Ovinos y caprinos

En cuanto a los pequeños rumiantes, estos deben ser identificados mediante una **marca auricular** y un **sistema de identificación electrónico**, autorizado por la autoridad competente.

En la práctica esto se traduce en un crotal de plástico amarillo, colocado en la oreja derecha, y un bolo ruminal. Ambos dispositivos llevarán el mismo código que constará de:

- Código ES o 724 para identificar al país de origen, España en este ejemplo.
- Dos dígitos correspondientes a la Comunidad Autónoma
- 10 dígitos de identificación individual.



Estos sistemas de identificación se colocarán en un plazo máximo de 6 meses desde su nacimiento que podrá ampliarse hasta 9 meses en el caso de ganaderías extensivas y, en cualquier caso, siempre antes de abandonar la explotación.

### 2.2.3. Porcinos

Los animales de la especie porcina se identifican antes de salir de la explotación con un **crotal auricular electrónico**, de plástico o latón o un tatuaje en el que se lea el código asignado a la explotación.

La marca de identificación, por tanto, identificará la explotación de procedencia que constará de:

- Dos dígitos de identificación de la provincia.
- Tres dígitos correspondientes al municipio.
- Siete dígitos de identificación de la explotación.
- Para animales destinados al comercio exterior, la marca se completa con la indicación ES al comienzo de la secuencia.

Asimismo, se contempla la posibilidad de una identificación individual cuando acciones sanitarias concretas lo requieran o en el caso de reproductores.

### 2.2.4. Equinos

Por su parte, la identificación de equinos se compone de tres elementos:

- Documento de identificación único, correspondiente con un código para toda la vida del animal denominado **UELN (Universal EquineLifeNumber)**, formado por 15 caracteres en el que se reconoce el país de procedencia, el organismo que ha emitido el documento y el propio animal.
- Un método para garantizar un vínculo inequívoco entre el documento de identificación y el animal. Este vínculo se establece mediante un **microchip inyectable** en las tablas del cuello del lado izquierdo. El código alfanumérico que codifica el microchip queda reflejado en el documento de identificación único y constituye el vínculo entre animal y UELN.
- **Documento de Identificación Equino (DIE)**: este documento sirve de base de datos donde se recogen todos los detalles identificativos del animal, es decir, el UELN y la secuencia codificada por el microchip. Este documento será único para toda la vida del animal y deberá acompañarle durante todos sus desplazamientos.

La identificación por medio de estos tres sistemas se debe realizar antes de cumplir el primer año de vida.

Como excepción a esta normativa, se exime de la obligación de identificación aquellos équidos que vivan en condiciones silvestres o semisilvestres o bien aquellos équidos que, desde la explotación de origen, van directos a matadero antes de los 12 meses de vida.

### 2.2.5. Cunícola

Respecto a los conejos, se deberán identificar individualmente aquellos animales cuyo destino sea diferente del matadero antes de abandonar la explotación con el código de la explotación

de origen mediante una marca indeleble y fácilmente legible que consistirá en un crotal o un tatuaje auricular.

Para el resto de los casos, es decir, cuando se destinen a matadero, los animales se transportarán en un recipiente precintado en el que vaya inscrito el código de la explotación de origen.

### 2.2.6. Animales de compañía

En último lugar, la identificación de los animales de compañía está regulada por las CC.AA. De modo general, se establece que perros, gatos y hurones deberán estar identificados con un documento veterinario en el que consten los datos de su propietario y del animal y, además, será obligatoria la identificación mediante un microchip que deberá ser colocado durante los tres primeros meses de vida.

De manera paralela al SITRAN con las especies ganaderas, existe una **Red Española de Identificación de Animales de Compañía (REIAC)** que unifica los datos de los animales de compañía de las CC.AA. facilitando el cambio de titularidad cuando se trate de propietarios que se ubican en distintas CC.AA.

## 3. MARCO LEGAL.

La normativa legal que regula la identificación de los animales asienta sus bases en la **Ley 8/2003, de Sanidad Animal** que recoge en su artículo 7 que los propietarios o responsables de los animales deben tener adecuadamente identificados a sus animales y que deben informar de los movimientos a los que esos animales sean sometidos a la autoridad competente. Asimismo, esta norma también fija en su artículo 38.1 que todas las explotaciones animales deben estar registradas en la comunidad autónoma en la que se ubiquen.

En un principio, las especies bovina, porcina, ovina y caprina estaban reguladas por el Real Decreto 205/1996, si bien es cierto que en la actualidad solo es de aplicación para el porcino.

Por su parte, la identificación de los **bovinos** está regulada a nivel comunitario por el **Reglamento 1760/2000** que surgió para dar respuesta a la necesidad de una identificación individual tras la crisis de la EEB, adaptada a nuestra legislación en el Real Decreto 1980/1998, sobre sistemas de identificación y registro de los animales de la especie bovina.

Asimismo, de modo excepcional, la identificación de toros destinados a manifestaciones culturales y deportivas (de lidia) estará recogida por el Reglamento 2680/1999.

Por otro lado, la identificación de **ovinos y caprinos** recae sobre el **Reglamento 21/2004**, adaptado en España mediante el **Real Decreto 685/2013**, sobre el sistema de identificación y registro de los animales de las especies ovina y caprina.

La identificación de **équidos** se realiza por medio del **Reglamento 504/2008**, concretada en España por el **Real Decreto 676/2016**, sobre los sistemas de identificación y registro de los animales de la especie equina.

La identificación de las **aves** se realiza en las jaulas de forma conjunta en el momento que abandonan la explotación, mientras que la identificación de **conejos** (Real Decreto 1546/2004) y **abejas** (Real Decreto 209/2002) están regulados por su normativa sectorial.

En último lugar, la **Ley 50/1999** regula la identificación de **animales potencialmente peligrosos** a los que obliga a identificarse mediante un microchip.

No obstante, esta normativa se completa con los siguientes aspectos:

- Los sistemas de identificación de cada animal o grupo de animales, según su especie.
- Libro de Registro: que recoge la identificación de cada animal por lotes, según su estado fisiológico y donde se relacionan los tratamientos médicos, farmacéuticos y alimentación asociada a cada individuo; además de las entradas y salidas, nacimientos y muertes de los animales de la explotación.
- Libro de Registro Electrónico: con el auge del *big data*, los libros electrónicos de registro constituyen una excelente herramienta de recopilación, análisis y seguimiento de la información que además simplifica mucho la gestión de los datos.
- Documento de movimiento: aquel documento que recoge los animales, y su identificación, que llegan o salen de la explotación, así como el origen o destino de los mismos.

Todos estos documentos, así como la información que contienen, son accesibles a través de la base de datos electrónica SITRAN que integra el registro e identificación de explotaciones (REGA) así como los sistemas de registro de identificación y movimientos animales (RIIA y REMO).

Como epílogo del tema reincidir en la importancia de la identificación y registro de las explotaciones y de los animales como herramienta zotécnica y base de la trazabilidad que posibilita el mantenimiento de bases de datos que contribuyen a rentabilizar las producciones y garantizar la seguridad alimentaria y la sanidad animal y, por ende, la salud pública.

## **BIBLIOGRAFÍA**

Página web del Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación (MAPA). Registro: Sistema Integral de Trazabilidad Animal (SITRAN).

<https://www.mapa.gob.es/es/ganaderia/temas/trazabilidad-animal/registro/default.aspx>

Real Decreto 479/2004, de 26 de marzo, por el que se establece y regula el Registro general de explotaciones ganaderas.

Real Decreto 728/2007, de 13 de junio, por el que se establece y regula el Registro general de movimientos de ganado y el Registro general de identificación individual de animales.

Orden ARM/687/2009, de 11 de marzo, por la que se modifica el anexo XI del Real Decreto 728/2007, de 13 de junio, por el que se establece y regula el Registro general de movimientos de ganado y el Registro general de identificación individual de animales

**MATERIAL PARA LA PREPARACIÓN DEL TEMA 40**

**MARCADORES GENÉTICOS MOLECULARES: MICROSATÉLITES Y POLIMORFISMOS DE ÚNICO NUCLEÓTIDO (SNPS). CONCEPTO, ANÁLISIS (DETERMINACIÓN) Y APLICACIONES EN SANIDAD Y GENÉTICA ANIMAL.**

*Este material no tiene carácter oficial, por lo que en ningún caso vinculará al Tribunal Calificador. Constituye, únicamente, un instrumento complementario que servirá de apoyo al opositor para enfocar cada uno de los epígrafes, pero nunca de forma exclusiva ni excluyente. El Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación no se hace responsable del contenido del mismo.*

*Los materiales no serán objeto de actualización constante.*

## **ÍNDICE**

### **1. CONCEPTO DE MARCADORES GENÉTICOS MOLECULARES**

### **2. MICROSATÉLITES**

2.1. CONCEPTO

2.2. DETERMINACIÓN

### **3. POLIMORFISMOS DE NUCLEÓTIDO ÚNICO (SNPs)**

3.1. CONCEPTO

3.2. DETERMINACIÓN

### **4. OTROS MARCADORES GENÉTICOS MOLECULARES**

4.1. POLIMORFISMOS DE LONGITUD DE FRAGMENTOS DE RESTRICCIÓN (RFLPS)

4.2. ADN POLIMÓRFICO AMPLIFICADO AL AZAR (RAPDS)

4.3. POLIMORFISMOS DE LONGITUD DE FRAGMENTOS AMPLIFICADOS (AFLPS)

4.4. MINISATÉLITES

4.5. MLVA

### **5. APLICACIONES EN LABORATORIOS DE SANIDAD Y GENÉTICA ANIMAL**

5.1. IDENTIFICACIÓN INDIVIDUAL DE LOS ANIMALES Y CONTROL DE FILIACIONES

## 1. CONCEPTO DE MARCADORES GENÉTICOS MOLECULARES

Los **marcadores genéticos** son fragmentos del ADN presentes en un **determinado locus**, cuya ubicación es conocida.

Estas secuencias **no tienen por qué presentarse en regiones codificantes**, es decir, los marcadores genéticos no necesariamente deben estar incluidos dentro de un gen. En función de su **posición** en el genoma, los marcadores genéticos pueden presentar diferentes interpretaciones y, por tanto, también diferentes utilidades. Por ejemplo, aquellos marcadores que se encuentren incluidos en la secuencia de un gen permitirán identificar variaciones genéticas y polimorfismos que pueden ser determinantes para el desarrollo de un determinado carácter. Los marcadores que se encuentren en regiones no codificantes del genoma serán de gran utilidad para otros aspectos como la **identificación individual** o el **análisis de filiaciones**.

Los marcadores pueden ser de muchos tipos, pudiendo diferenciarse, entre otros, marcadores morfológicos, bioquímicos (como las isoenzimas, más eficientes que los morfológicos), fisiológicos, o moleculares. Con los avances en el estudio del genoma y las secuencias genómicas, los marcadores genéticos moleculares se convirtieron en el tipo **más sencillo y económico** de detectar e interpretar, al no estar condicionados por el ambiente u otros factores. Así, los **marcadores genéticos moleculares** supusieron una verdadera revolución en el estudio de la genética.

Antes del desarrollo de estas técnicas, la identificación individual se realizaba únicamente a partir de la **información fenotípica**. Sin embargo, estos criterios eran frecuentemente subjetivos y podían ser ambiguos, además de que muchas de las características empleadas estaban dadas por la acción de múltiples genes actuando simultáneamente, sin poder olvidar además que el fenotipo es el resultado del genotipo y la acción que el ambiente ejerce sobre el mismo. Por ello, este tipo de marcadores resultaba **impreciso**.

El estudio de los marcadores genéticos **moleculares** se realiza a través de técnicas asimismo moleculares, como la **secuenciación**, el **southern blot** o la **PCR**. Este tipo de marcadores presenta múltiples ventajas frente a los marcadores fenotípicos, incluyendo su fácil identificación, o su neutralidad frente a agentes externos como el ambiente. Además, presentan una elevada capacidad de detectar diferencias entre individuos, para lo cual debe tratarse de regiones del ADN con unas determinadas características.

Las **principales características** de los marcadores genéticos moleculares para que puedan resultar de utilidad en el análisis genético son:

- **Heredabilidad.** Debe tratarse de fragmentos de ADN **heredables** siguiendo las leyes de la herencia **mendeliana**, de tal forma que el estudio de las secuencias permita identificar los alelos heredados por vía paterna y materna, lo cual resulta fundamental para realizar análisis de filiaciones.

- **Polimorfismo.** Debe tratarse de regiones **polimórficas**, pudiendo identificarse al menos dos alelos; las secuencias que se mantienen invariables entre los individuos no tienen utilidad como marcadores genéticos. Para que una región se considere polimórfica, las variaciones con respecto a la secuencia salvaje deben estar presentes en la población con una frecuencia superior al 1% (de lo contrario, se considerarán “mutantes raros”). Para estudios como los análisis de filiaciones o la identificación individual, además, serán de mayor utilidad las regiones con altos niveles de polimorfismo, siendo preferible que presenten un alto número de alelos.

Existen múltiples tipos de marcadores genéticos moleculares, entre los cuales se puede destacar:

- Polimorfismos de **longitud de fragmentos de restricción (RFLPs, “restriction fragment length polymorphism”)**
- ADN **polimórfico** amplificado al azar (**RAPDs, “randomly amplified polymorphic DNA”**)
- Polimorfismos de **longitud de fragmentos amplificados (AFLPs, “amplified fragment length polymorphism”)**
- Repeticiones en **tándem de número variable (VNTRs, “variable number tandem repetitions”)**. Entre ellos, cabe destacar:
  - **Minisatélites** (repeticiones de motivos de más de 6 pares de bases, generalmente de 7 a 25-30 pares de bases). En múltiples ocasiones, el término VNTR se acota para referirse únicamente a este tipo de marcador.
  - **Microsatélites** (repeticiones de motivos de hasta 6 pares de bases). También se pueden encontrar en la literatura bajo la denominación de **repeticiones en tándem cortas (STR, “short tandem repeats”)** o **repeticiones de secuencia simple (SSR, “simple sequence repeats”)**
  - **MLVA, “multiple locus variable-number tandem repeat analysis”.**
- Polimorfismos de **nucleótido único (SNPs, “single nucleotide polymorphism”)**
- Otros tipos de marcadores: se pueden mencionar, entre otros, los polimorfismos oligonucleotídicos (OP), cebadores asociados específicos de alelo (ASAP), repeticiones etiquetadas con secuencia inversa (ISTR), o los polimorfismos amplificados entre retrotransposones (IRAP).

En la actualidad, los **marcadores genéticos moleculares** empleados con **mayor frecuencia** en las áreas de sanidad y genética animal son, probablemente, los **microsatélites** y los **polimorfismos de nucleótido único**, aunque otras técnicas presentan también una gran utilidad.

## 2. MICROSATÉLITES

### 2.1. CONCEPTO

Los **microsatélites** (también denominados SSR, *Simple Sequence Repeats*, o STR, *Short Tandem Repeats*) son **secuencias constituidas por motivos básicos** cortos, de 1 a 6 pares de bases, que se repiten un número elevado de veces.

Los motivos más frecuentes que se pueden encontrar constituyendo este tipo de secuencias son los **dinucleótidos o los trinucleótidos**. Así, el microsatélite quedará definido como una secuencia en la que dos o tres nucleótidos se repiten un número elevado de veces. En cualquier caso, también pueden encontrarse microsatélites constituidos por la repetición de mononucleótidos, tetra, penta o hexanucleótidos.

Estas secuencias se encuentran localizadas en el genoma en regiones **no codificantes**, y se encuentran distribuidos a lo largo de todo el genoma: se calcula que se puede encontrar un microsatélite aproximadamente cada 10 Kb.

Por su conformación, se trata de regiones en las que la polimerasa tiende a cometer errores, por lo que presentan una alta tasa de mutación (estimada entre  $10^{-2}$  y  $10^{-5}$  en cada generación).

Esta **alta variabilidad** se manifiesta como **diferencias en la longitud** entre los distintos alelos, incorporando generalmente **una repetición más o bien una repetición menos del motivo básico**.

Así, el análisis de los mismos no se basará en el estudio de la secuencia, sino en el estudio de su **longitud**, que permitirá diferenciar los **diversos alelos que presentarán un número mayor o menor de repeticiones del motivo básico**.

A pesar de la alta variabilidad de los microsatélites con sus altas tasas de mutación, presentan regiones flanqueantes **altamente conservadas** que permiten dirigir los cebadores para realizar su amplificación mediante PCR.

Los microsatélites pueden ser:

- Microsatélites **puros**: se trata de repeticiones sin interrupción y sin otras repeticiones adyacentes (por ejemplo, "TGTGTGTGTGTGTGTGTG").
- Microsatélites **interrumpidos**: las repeticiones se interrumpen por un máximo de 4 pares de bases ("TGTGTGTGTGTGAAAATGTGTGTGTGTG").
- Microsatélites **compuestos**: se componen de dos o más motivos básicos que se repiten. Pueden ser **puros o interrumpidos** ("TGTGTGTGCCGCCGCCGCCG" o "TGTGTGTGAAACGCCGCCGCCG").
- Microsatélites **complejos**: compuestos por **combinaciones** de cualquiera de los tipos anteriores.

Teniendo en cuenta estos conceptos sobre las características de los microsatélites, pueden comprenderse algunas de las principales **ventajas** de este tipo de marcadores genéticos moleculares:

- Al tratarse de regiones altamente repetitivas en su secuencia, y además no ser codificantes, presentan una **alta tasa de mutación**.
- Dada su alta tasa de mutación, se trata de regiones **altamente polimórficas**, es decir, existen múltiples alelos en la población. Esto resulta tremendamente útil para su interpretación, ya que permite una mayor confianza al realizar análisis de filiaciones o de identificación individual: si únicamente existen dos alelos, la probabilidad estadística de un individuo de presentar uno de ellos es del 50%, mientras que cuantos más alelos existan, más se reducirá esta probabilidad.
- Puesto que los diferentes alelos se definen por la **longitud de la secuencia**, **no existen alelos nulos**: es decir, ninguno de los alelos se caracteriza por la ausencia total de dicha secuencia en el genoma. En el caso de detectarse un único alelo mediante su análisis, esto implicará necesariamente **que el individuo es homocigoto para dicho alelo** (a excepción de los microsatélites situados en los cromosomas sexuales, situación particular que se mencionará más adelante).
- La existencia de **regiones altamente conservadas** en ambos extremos de los microsatélites permite diseñar de forma sencilla cebadores para realizar técnicas moleculares de amplificación dirigidas a la región de interés.
- Además, presentan **herencia mendeliana simple** (en cada individuo se identificará un alelo obtenido por vía materna y uno obtenido por vía paterna) y son **codominantes**, pudiéndose diferenciar los individuos homocigotos de los heterocigotos.

Así, se trata de marcadores genéticos moleculares **que permiten obtener información fiable**, con una determinación **simple** desde el punto de vista analítico, y cuyos resultados son **reproducibles**.

Además, presentan **pocas desventajas**, pero, como todas las técnicas, no resultan infalibles. Se debe considerar que, en caso de aparecer mutaciones en las regiones a las que se dirigen los cebadores, podría no llevarse a cabo la amplificación de la región y por tanto aparecer **alelos nulos**.

En cuanto a su lectura, puede verse dificultada ya que suelen aparecer **bandas tartamudas**, que se corresponden a productos de la amplificación mediante PCR que difieren en longitud, con respecto al alelo original, en una o varias repeticiones del motivo básico. Estas bandas tartamudas son características de los microsatélites, no apareciendo en otros tipos de marcadores moleculares, y en ciertos casos podrían dificultar su lectura e interpretación. También es relativamente frecuente ver un pico adyacente al alelo, con una longitud de un nucleótido más, correspondiendo al denominado **pico "+A" (denominándose el pico del alelo propiamente dicho "pico -A")**, producido por la tendencia de la polimerasa a añadir una alanina al final de la cadena durante la PCR.

## 2.2. DETERMINACIÓN

Para su determinación y análisis se emplean métodos basados en la **amplificación de la región** mediante **PCR** y su posterior visualización, para lo cual se suelen emplear **técnicas de electroforesis**. Los cebadores para la amplificación irán dirigidos a las regiones altamente conservadas que flanquean los marcadores, siendo así aplicables a todos los individuos a pesar de la alta variabilidad de los microsatélites propiamente dichos.

Para la visualización y análisis de los fragmentos obtenidos, se emplean técnicas para la **separación de los fragmentos**:

- **Electroforesis**. Se trata de la técnica más empleada para el análisis de los fragmentos amplificados, y presenta múltiples variantes:
  - **Electroforesis en gel de agarosa**. Se debe tener en cuenta que los fragmentos correspondientes a alelos diferentes únicamente diferirán en tamaño en tantos pares de bases como nucleótidos conformen el motivo básico. Por ejemplo, en un microsatélite conformado por la repetición en tándem de un **trinucleótido**, el alelo que presente **una repetición más que otro alelo** será **tres pares de bases más largo** que dicho alelo. La electroforesis en gel de agarosa es, por tanto, una técnica que, en general, no posee la resolución suficiente para permitir la diferenciación de alelos, por lo que su utilización no es frecuente. En algunos casos en que los alelos a diferenciar presenten una diferencia de tamaño suficiente, pueden emplearse geles de agarosa, siempre y cuando se empleen a una concentración mínima que permita la correcta separación.
  - **Electroforesis en gel de poliacrilamida**. En general, poseen mayor capacidad de resolución que los geles de agarosa. La visualización puede realizarse mediante la tinción posterior de los fragmentos o bien empleando cebadores marcados radiactivamente o con fluoróforos.
  - **Electroforesis capilar**. Se trata de la técnica empleada más frecuentemente, ya que permite una **altísima resolución**, pudiendo diferenciar fragmentos con hasta un único nucleótido de diferencia en su longitud (pudiéndose visualizar las ya mencionadas “bandas tartamudas” y los picos +A y -A). Además, el marcado con **diferentes fluorocromos** permite la detección simultánea de varios productos de PCR, pudiendo emplearse PCR múltiple (dirigidas a varias regiones simultáneamente). Así, se podrá obtener en cada pocillo información sobre **un panel completo de microsatélites para un individuo**. Para poder optimizar esta técnica, será fundamental diseñar las PCR de tal manera que no existan en el mismo panel dos microsatélites cuyos alelos presenten tamaños en el mismo rango marcados con el mismo fluorocromo, ya que esto impediría su diferenciación.
- Se pueden emplear otro tipo de métodos que permitan la diferenciación de los fragmentos generados en la PCR en función de su longitud, como el **southern blot** o

las técnicas de “**high resolution melting**”. En cualquier caso, dada la gran utilidad de las técnicas de electroforesis, en la actualidad apenas se utilizan.

En cuanto a la **interpretación de los resultados**, tras la PCR y el análisis de los fragmentos mediante electroforesis se obtendrá una serie de **picos** o de **bandas** que representarán la longitud de los fragmentos generados.

Así, un individuo presentará para un determinado marcador **dos picos o dos bandas** en caso de ser un individuo **heterocigoto**, cada uno de los cuales corresponderá al alelo recibido por vía paterna o vía materna. En caso de presentar **un único pico o una única banda** (generalmente de mayor intensidad), se tratará de un individuo **homocigoto**, pues se presentará el mismo alelo en ambos cromosomas del par cromosómico correspondiente.

Un caso particular es el de los **microsatélites** presentes en los cromosomas sexuales. Se suelen incluir en los paneles, bien para determinar **el sexo del individuo**, o bien para valorar la posibilidad de que se den **anomalías de los cromosomas sexuales** como el síndrome de Klinefelter.

Para el análisis de microsatélites mediante electroforesis capilar existen **programas informáticos** que permiten definir los “compartimentos” (“*bin*”) de la lectura en la que se espera encontrar los picos correspondientes a los diferentes alelos.

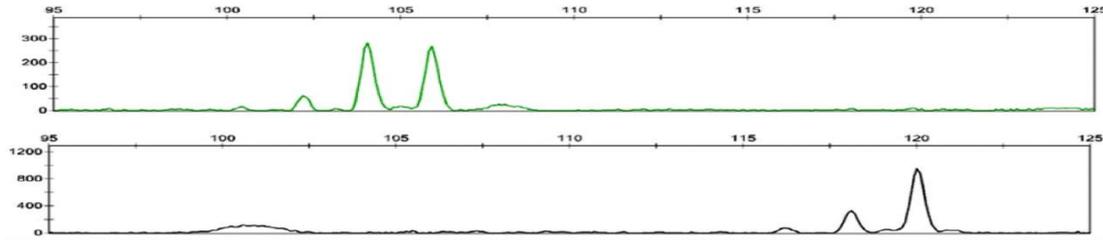
*Por ejemplo, si se ha diseñado una PCR dirigida a un microsatélite compuesto por repeticiones de un trinucleótido para el cual se han identificado ocho alelos, que van desde las 20 repeticiones (longitud total:  $3 \times 20 = 60$  pb) hasta las 27 repeticiones (longitud total:  $3 \times 27 = 81$  pb), y cuyos cebadores presentan longitudes de 20pb cada uno, se seleccionarán como regiones o compartimentos esperados los puntos separados entre sí en 3 pares de bases entre la longitud del fragmento correspondiente al menor número de repeticiones (20 pb cebador forward + 60 pb de la secuencia repetida + 20 pb cebador reverse = 100pb) y la longitud del fragmento correspondiente al mayor número de repeticiones (20 + 81 + 20 = 121pb). Así, estos compartimentos se colocarán en las posiciones 100, 103, 106, 109, 112, 115, 118 y 121. Un pico en cada una de estas posiciones implicará la presencia de un alelo diferente.*

Además, para la interpretación es fundamental **diferenciar los microsatélites de otros picos**, que pueden aparecer en el electroferograma debido a interferencias de la técnica. Para ello, se debe atender a **dos características fundamentales**:

- Los microsatélites **presentarán bandas tartamudas**, correspondientes a picos de menor tamaño y menor intensidad (es decir, menor altura) que se corresponderán a los fragmentos generados con una, dos o tres repeticiones del motivo básico menos que el alelo verdadero.
- En caso de **heterocigosis**, el alelo **más pequeño** (con menos repeticiones, y que por tanto se visualizará a la izquierda en la gráfica de picos) presentará **mayor intensidad (es decir, mayor altura)** que el alelo más grande.

Estas características pueden observarse en la Imagen 1 presentada a continuación, que refleja la representación gráfica de un **electroferograma**, es decir, el gráfico generado por un

programa informático a partir de los resultados de una electroforesis capilar. En este electroferograma puede observarse el resultado obtenido para **dos marcadores de tipo microsatélite**, cada uno de ellos teñido con un fluorocromo diferente, de tal forma que los picos se presentan de distinto color:



1. Microsatélite con dos alelos en heterocigosis (verde) y microsatélite con un único alelo (negro). Se puede observar la presencia de bandas tartamudas como picos de menor tamaño a la izquierda del alelo. Fuente: PLOS ONE. doi: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0012299.g002>

En este caso, el individuo será heterocigoto para el microsatélite teñido con el fluorocromo **verde**, presentando los alelos de longitud 104 y 106, y será homocigoto para el microsatélite teñido de **negro**, con dos copias del alelo de longitud 120.

Los alelos generalmente se denominan directamente con su **longitud**, aunque en casos particulares (como en los microsatélites empleados para la identificación y los análisis de filiaciones en la especie **equina**) estos pueden denominarse mediante **letras**.

### 3. POLIMORFISMOS DE NUCLEÓTIDO ÚNICO

#### 3.1. CONCEPTO

Los polimorfismos de nucleótido único o **SNPs** son, como su propio nombre indica, **polimorfismos** (o mutaciones cuya frecuencia de aparición en la población es superior al 1%) que afectan a **un único nucleótido**.

Este tipo de polimorfismos, a diferencia de los microsatélites, no cambian la longitud total de la región de ADN, sino que **afectan únicamente a la secuencia de bases orgánicas nitrogenadas** en el genoma.

Se tratan de la **sustitución de un nucleótido por otro**, por lo que presentan únicamente **dos alelos simples posibles (se trata de marcadores bialélicos)**. En teoría, se podrían presentar hasta cuatro alelos en cada marcador (correspondientes a las cuatro bases orgánicas nitrogenadas que pueden estar presentes en cada nucleótido del ADN), pero resulta muy poco probable que más de dos alelos se fijen en la población y se presenten en más de un 1% de los casos. Por esto, resultan notablemente menos informativos que los microsatélites, debiendo emplearse combinaciones que incluyan un alto número de marcadores.

Son también muy abundantes, presentándose un SNP cada 600-1000 pares de bases aproximadamente. En cuanto a su localización, pueden localizarse tanto en **regiones no codificantes** (y por tanto no tener un impacto directo en el fenotipo del individuo), como **en**

**genes** o en regiones que **influyen en la expresión génica**. En estos casos, los SNPs pueden ser de gran utilidad para detectar mutaciones asociadas a determinadas **características fenotípicas**, aunque las mutaciones pueden ser **sinónimas** (es decir, que la secuencia de aminoácidos en la proteína codificada se mantenga inalterada).

El **haplotipo** es la combinación de los **alelos** de marcadores de tipo SNP presentes en **diferentes loci de un cromosoma** y que por lo tanto están **ligados** y se transmiten de forma conjunta. Dado el número de alelos que conforman el haplotipo, la probabilidad de que dos individuos no relacionados entre sí presenten el mismo haplotipo es prácticamente nula, por lo que los SNPs también son de utilidad para la determinación de relaciones de parentesco.

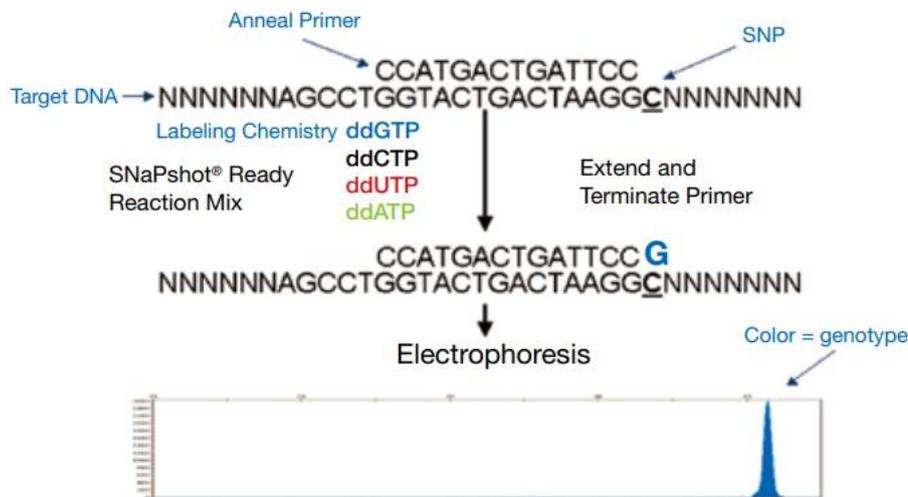
### 3.2. DETERMINACIÓN

Puesto que en el caso de los SNPs resultará de interés determinar **la secuencia de bases orgánicas nitrogenadas** en ese locus, y no su longitud como en el caso de los microsatélites, las estrategias para su análisis y determinación también diferirán.

Algunas de las técnicas que se pueden emplear incluyen:

- **Microarrays o chips** de ADN. Se trata de la técnica más empelada para la detección de SNPs y el análisis de haplotipos, ya que permite la detección simultánea de múltiples SNPs. Los microarrays son matrices bidimensionales en cuya superficie se encuentran unidas múltiples **sondas**, consistentes en moléculas de ADN, generalmente cortas (oligonucleótidos, frecuentemente denominados "*oligos*"). Las moléculas problema hibridarán con estas sondas únicamente en caso de que su secuencia sea complementaria; así, la inclusión de sondas con **la secuencia complementaria a un determinado alelo** para un SNP permitirá la **detección únicamente en caso de que el individuo problema presente dicho alelo**. Las moléculas problema se marcarán, generalmente con moléculas fluorescentes (aunque pueden emplearse otros métodos) para poder ser detectadas.
- **Secuenciación**. Los métodos de secuenciación más empleados son los métodos de primera generación, fundamentalmente la secuenciación de **Sanger** y la **secuenciación automática**. En cualquier caso, la localización de SNPs en el genoma también se puede realizar en el marco de estudios genómicos más amplios que utilicen técnicas de secuenciación de nueva generación.
- **Primer extension** (también denominada tecnología **SNaPshot o minisequenciación**). Se trata de un método que puede considerarse incluido dentro de las técnicas de secuenciación. Se basa en diseñar un cebador dirigido a la región inmediatamente anterior al nucleótido de interés, de tal manera que en la amplificación se **añada únicamente un nucleótido más a la cadena, que será el complementario al presente en la secuencia de interés en el SNP**. Para ello, se emplearán ddNTPs, de tal manera que al añadirse se termine la polimerización, de forma análoga a lo sucedido en la secuenciación de Sanger. Además, estos nucleótidos se marcan con fluoróforos, de tal manera que se pueda realizar su detección mediante una electroforesis capilar,

obteniendo un pico correspondiente al **color de la base complementaria a la que se encuentra en la posición de interés en la secuencia problema.**



2. Desarrollo de la técnica SNaPshot. Fuente: Applied Biosystems.

- **PCR específica de alelo.** Es posible diseñar PCRs con cebadores que **se dirijan directamente a la región** donde se presenta la mutación, incluyendo la posición del SNP en su secuencia. Así, únicamente se dará la amplificación en caso de que el nucleótido incluido en esa posición del cebador sea complementario al que está presente en la muestra. De esta forma, se puede diseñar una PCR múltiplex que permita la determinación del alelo, incluyendo dos parejas de cebadores (cada una de las cuales presentará el nucleótido complementario a uno de los alelos posibles) que den lugar a dos bandas de diferente tamaño, para poder diferenciar los posibles fragmentos generados. Las PCR diseñadas pueden ser tanto clásicas, requiriendo la posterior detección de los fragmentos mediante electroforesis, como a tiempo real.

#### 4. OTROS MARCADORES GENÉTICOS MOLECULARES

Existen otros múltiples tipos de marcadores genéticos moleculares, que se diferencian tanto en su **estructura** como en los **métodos** empleados para su determinación.

##### 4.1. POLIMORFISMOS DE LONGITUD DE FRAGMENTOS DE RESTRICCIÓN (RFLPs)

Son marcadores genéticos determinados por la **presencia o ausencia** de **sitios de restricción** que actúen como diana de **endonucleasas**. Esta presencia o ausencia estará determinada por mutaciones que den lugar a cambios en las bases orgánicas nitrogenadas presentes en su secuencia, o bien adiciones o deleciones de fragmentos de ADN en su secuencia o en las regiones entre sitios de restricción. Además, dada la incapacidad de algunas endonucleasas

de acceder a los sitios de restricción en caso de presencia de citosinas metiladas, también permiten detectar cambios o variaciones en los patrones de metilación.

Para su estudio, en primer lugar se somete a la muestra a una **digestión por enzimas de restricción**, para posteriormente analizar los fragmentos de ADN generados. Los polimorfismos en los sitios de restricción se detectarán como **diferencias en la longitud** de los fragmentos.

Para el análisis de los fragmentos generados, generalmente se emplean técnicas de transferencia a membranas de nitrocelulosa (southern blot) e hibridación con sondas complementarias.

El estudio de los RFLPs permite analizar los **genes asociados a ellos**, y resultan de gran utilidad ya que no están influenciados por el ambiente y son codominantes. Sin embargo, se trata de una técnica más costosa para su realización (y, sobre todo, para su interpretación) que otros tipos de marcadores moleculares.

#### **4.2. ADN POLIMÓRFICO AMPLIFICADO AL AZAR (RAPDs)**

Este tipo de marcadores viene caracterizado por la **técnica empleada para su detección**, ya que se basa en una **amplificación empleando cebadores con secuencia arbitraria**.

Así, esta técnica se desarrolla de forma similar a una PCR, pero con dos diferencias fundamentales: se emplea **un único cebador** que además presenta una **secuencia arbitraria**.

De esta forma, para que se produzca la amplificación de un fragmento, este debe estar flanqueado por **dos secuencias, ambas cuales deberán ser complementarias al cebador empleado**. Estas secuencias deberán estar lo suficientemente próximas (aproximadamente unos 400 pb) y encontrarse en **orientación opuesta**, de tal manera que permitan su actuación como sitios de unión de un cebador "*forward*" y un cebador "*reverse*" respectivamente. Para que la técnica tenga éxito es fundamental aumentar la probabilidad de que el cebador hibride con la secuencia molde, por lo que se suelen emplear **cebadores cortos**, de unos 10 pb.

Los fragmentos generarán un **patrón de bandas** de diferentes tamaños (en función de la separación de las secuencias complementarias al cebador), que podrá ser visualizado mediante **electroforesis en geles de agarosa o de poliacrilamida**.

Los **polimorfismos** se detectarán en un determinado individuo como la **ausencia de una banda**, o bien la aparición de bandas de un tamaño diferente al observado en otros individuos. Así, se pueden reflejar **diferencias en la secuencia que evitan la hibridación en los cebadores**, o bien **inserciones o deleciones** en la región amplificada que den lugar a diferencias en la longitud de los fragmentos.

### 4.3. POLIMORFISMOS DE LONGITUD DE FRAGMENTOS AMPLIFICADOS (AFLPs)

Se trata de una técnica basada tanto en las **técnicas de restricción mediante enzimas** como en la **amplificación mediante PCR**.

Para ello, en primer lugar se realiza la **digestión con dos enzimas de restricción**, una de las cuales se considera de “corte raro” y reconoce secuencias de 6pb, y otra considerada de “corte frecuente” que reconoce secuencias de 4pb. La secuencia diana de estas enzimas será conocida, de tal manera que se puedan diseñar adaptadores que hibriden en sus extremos. Posteriormente, se acoplan dichos **adaptadores específicos a los extremos de los fragmentos generados**.

Estos **adaptadores específicos** permitirán llevar a cabo la **amplificación selectiva mediante PCR** empleando cebadores dirigidos a su secuencia.

Los fragmentos amplificados podrán estudiarse mediante técnicas de electroforesis. Los polimorfismos se detectarán, como en el caso de los RAPDs, como ausencia de bandas o presencia de bandas de tamaño diferente.

La principal ventaja de esta técnica es que **no requiere el conocimiento de la secuencia** problema. Así, permitirá, por ejemplo, realizar técnicas de identificación individual o filiaciones en **especies cuya secuencia no está publicada**. Este tipo de marcadores presenta un alto grado de polimorfismo, y permite obtener una gran cantidad de fragmentos, aumentando la fiabilidad de la técnica en términos estadísticos.

### 4.4. MINISATÉLITES

Los minisatélites son **secuencias repetitivas en tándem**, que se diferencian de los microsátélites fundamentalmente en la **longitud de la secuencia de los motivos básicos repetidos**. Así, si en el caso de los microsátélites se hablaba de repeticiones de entre 1 y 6 nucleótidos, los **minisatélites** son repeticiones de más de 6 nucleótidos, generalmente hasta 25 nucleótidos.

Las técnicas empleadas para su determinación son similares a las utilizadas para el análisis de microsátélites, pudiendo amplificar los fragmentos por PCR y posteriormente visualizarlos mediante una electroforesis, bien en gel (como un patrón de bandas) o bien capilar (visualizándolos como picos). En el caso de los minisatélites, no suelen visualizarse las bandas tartamudas que caracterizaban a los microsátélites. También pueden emplearse enzimas de restricción dirigidas a regiones flanqueantes del minisatélite para la digestión del ADN, y realizar el estudio de los fragmentos mediante otras técnicas como el southern blot.

A partir del conocimiento y análisis de los minisatélites se desarrolló la técnica de **“fingerprinting del ADN”**, consistente en el análisis del patrón de bandas característico de cada individuo al analizar un número alto de microsátélites a lo largo del genoma.

#### 4.5. MULTIPLE LOCUS VARIANT ANALYSIS, MLVA

El análisis MLVA se trata de otro tipo de análisis de **marcadores basados en variaciones del número de repeticiones en tándem** (VNTR), como los minisatélites y los microsatélites, que se emplea fundamentalmente para el análisis de **genomas bacterianos**.

Como tal, su análisis e interpretación es similar a lo descrito para los otros tipos de VNTRs, con algunas peculiaridades:

- Presentan, de forma general, un **bajo número de alelos** en comparación con los mini y microsatélites.
- Pueden existir alelos **que no amplifiquen**, por lo que se recomienda el uso de paneles que incluyan un número alto de marcadores para descartar errores en la técnica.
- En bacterias existe **un único cromosoma**, por lo que nunca se presentarán dos picos para el mismo marcador. En caso de hacerlo, se tratará de artefactos o bien de contaminación por otros microorganismos.
- Pueden presentarse picos “+A” y “-A” como en el caso de los microsatélites. El pico +A tiende a ser muy alto. Nunca presentan bandas tartamudas.
- Los cebadores a utilizar para la amplificación suelen ser publicados por los Laboratorios Europeos de Referencia para el patógeno del que se trate.

El análisis de este tipo de marcadores resulta muy útil para el **seguimiento de brotes** y para determinar la filogenia de los agentes patógenos bacterianos.

#### 5. APLICACIONES EN LABORATORIOS DE SANIDAD Y GENÉTICA ANIMAL

Algunas de las aplicaciones más importantes de los análisis de marcadores genéticos moleculares ya han sido comentadas a lo largo del desarrollo del tema.

En cuanto a las aplicaciones en **laboratorios de sanidad animal**, pueden ser útiles fundamentalmente para la **caracterización de aislados** bacterianos mediante el uso de marcadores de tipo MLVA, pudiendo determinar el **origen de brotes** y la **filogenia** de las cepas.

En cualquier caso, se trata de análisis cuya aplicación resulta de fundamental importancia en el ámbito de la **genética animal**. Algunas de las principales aplicaciones en los laboratorios de genética animal incluyen:

- Determinación de **caracteres de interés**. Ciertos caracteres de interés ganadero están determinados por alelos de SNPs, por lo que su determinación puede contribuir al conocimiento del genotipo de los animales y al diseño de programas de **mejora de las razas** para una determinada aptitud. Un ejemplo de esto es, por ejemplo, el gen de la **miostatina** en equinos de competición. En razas ganaderas, resulta de especial importancia el estudio de este tipo de marcadores.

- Estudio de **genes causantes de enfermedades hereditarias**. En el caso de que los polimorfismos se encuentren en regiones codificantes, no solamente pueden afectar al desarrollo de determinados caracteres de interés ganadero, sino que también pueden determinar la probabilidad de padecer algunas enfermedades hereditarias.
- Determinación del **sexo** en animales en los cuales el sexado mediante caracteres fenotípicos resulta difícil, fundamentalmente en **aves**. A partir del análisis de marcadores moleculares presentes en los cromosomas sexuales resulta fácil determinar el sexo de los individuos, así como el estudio de posibles aberraciones cromosómicas en los cromosomas sexuales. Así, en **mamíferos**, en los cuales las hembras presentan dos cromosomas X, estas presentarán **dos copias** de marcadores que se encuentren en este cromosoma (que podrán presentarse en homocigosis o en heterocigosis), mientras que no presentarán ninguna copia de marcadores presentes en el cromosoma Y. En el caso de las **aves**, resulta fundamental recordar que se da el **caso contrario**: los **machos presentan dos copias del cromosoma Z**, y no presentan ninguna copia del cromosoma **W**.
- Determinación de **especies animales** o de **hibridación de especies**. Mediante el diseño de marcadores específicos de especie se pueden emplear este tipo de técnicas para determinar a qué especie pertenece la muestra. Por ejemplo, esta técnica se emplea para analizar la hibridación en perdices entre la especie autóctona (perdiz roja, *Alectoris rufa*) y una especie invasora, *A. chukar*, cuyo impacto en el ecosistema puede ser relevante, permitiendo evitar la liberación en el ambiente de individuos que presenten genética de la especie invasora.
- **Identificación individual de los animales y control de filiaciones**. Se trata, probablemente, de las aplicaciones más extendidas e importantes en la actualidad de los marcadores genéticos moleculares en el área de la genética animal, por lo que serán objeto de un desarrollo en mayor profundidad.

### 5.1. IDENTIFICACIÓN INDIVIDUAL DE LOS ANIMALES Y CONTROL DE FILIACIONES

En especies de interés ganadero, así como en **razas** que requieran la **inscripción en libros genealógicos**, la **identificación genética de los animales** y la realización de análisis de **filiación** son fundamentales para garantizar la fiabilidad y credibilidad de los libros genealógicos y la correcta ejecución de los programas de fomento y mejora de las razas.

A este respecto, la institución encargada de **estandarizar las técnicas a emplear** es la Sociedad Internacional de Genética Animal (ISAG). Para ello, el método de elección ha sido el estudio de **microsatélites**, debido a las claras ventajas que este tipo de marcadores presenta frente a otros. La ISAG publica listas completas de marcadores a utilizar en las diferentes especies según el propósito de la prueba, así como normativa y recomendaciones al respecto, por ejemplo sobre el número mínimo de marcadores a incluir en un panel.

En cuanto a la **identificación individual**, el análisis de **paneles de marcadores** (ya sean microsatélites u otro tipo de marcadores) permite la obtención de una “**huella genética**” específica de cada individuo.

La inclusión de un número alto de marcadores en el panel permite obtener un nivel de fiabilidad tan alto que encontrar otro individuo que comparta **todos los alelos** sea **prácticamente imposible** (a excepción del caso de gemelos univitelinos, caso poco frecuente en animales). Así, se puede realizar la **identificación individual inequívoca** con un alto nivel de fiabilidad, que será mayor al aumentar el número de marcadores incluidos en el panel.

El poder de discriminación de un panel de marcadores para identificación individual se define a partir de la probabilidad de que dos individuos tomados al azar de la población diana presenten el mismo genotipo. Esta probabilidad debería encontrarse entre  $10^{-5}$  y  $10^{-14}$  según el tamaño de la población, pudiendo obtener estos valores con un panel de microsatélites que incluya entre 8 y 15 marcadores. Se entiende, por tanto, la gran utilidad de estos marcadores a este efecto.

La identificación individual es fundamental para la inscripción de los animales en ciertos libros genealógicos, y puede resultar útil por ejemplo en caso de producirse el robo de animales de alto valor biológico, si se dieran problemas con otros métodos de identificación individual, o para comprobar la identidad de los individuos cuando en los laboratorios de sanidad animal se obtienen resultados discordantes en los análisis realizados sobre muestras que en teoría proceden del mismo animal.

En cuanto a los análisis de **control de filiaciones**, son fundamentales para el mantenimiento de los programas de mejora y fomento de las razas de animales, y en muchos casos su realización es obligatoria en el marco de dichos programas.

Lo más frecuente es realizar análisis denominados “**de exclusión de paternidad**”, en los cuales se determina **si el genotipo de un individuo es compatible o no con los genotipos de dos individuos propuestos como sus padres**. Para que el análisis resulte **compatible**, debería ser posible obtener el genotipo del hijo a partir de una combinación de los alelos de los padres, ya que dado el modelo de herencia de los microsatélites cada uno de los alelos de un individuo para un determinado marcador debe haber sido heredado de uno de sus padres. La eficiencia de la prueba se determina en función del **poder de exclusión** (relacionado con la probabilidad de excluir como padre a un individuo tomado al azar de la población). Este valor debe tenerse en cuenta para diseñar el panel de marcadores a emplear, exigiéndose un poder de exclusión no menor al 99,9%.

En caso de detectarse en algún análisis que los padres propuestos son **compatibles con el individuo hijo** a excepción de uno o dos marcadores como máximo, es posible realizar el análisis sobre un **panel secundario** de microsatélites, aumentando el número de marcadores y por tanto el poder de exclusión de la técnica.

Es fundamental tener en cuenta que la asignación de **compatibilidad o no compatibilidad** no dependerá únicamente de los genotipos del hijo y de los padres por separado, sino que se

debe analizar la posibilidad de **combinación entre ambos**. Así, un padre y una madre pueden ser compatibles con el hijo de forma individual, pero **no resultar compatibles como pareja**.

Un ejemplo de esto es el caso de un **hijo heterocigoto** que comparte un alelo con ambos padres, pero siendo el alelo en común **el mismo para ambos padres**, por lo que no se puede explicar la presencia del otro alelo en el hijo.

En cualquier caso, resulta importante considerar que es posible que dos individuos relacionados presenten un resultado **incompatible**, que puede deberse a una **mutación del microsatélite** discordante (por ejemplo, la introducción de una repetición más del motivo básico, que dé lugar a un alelo diferente), a errores durante la amplificación o a contaminaciones. Además, en caso de animales recién nacidos de partos gemelares, se debe tener en cuenta la posibilidad de que haya existido circulación de sangre entre hermanos, dando lugar a resultados aberrantes.

MATERIAL NO OFICIAL

## **BIBLIOGRAFÍA**

Marcadores genéticos. Universidad Tecnológica de Pereira (Colombia). [Internet].

<https://blog.utp.edu.co>

Baltián, L.R. Aplicaciones de los marcadores genéticos en la identificación individual de animales domésticos. Cátedra de Genética y Mejoramiento animal, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de la Pampa (Argentina).

Picó Sirvent, M.B.; Esteras Gómez, Cristina. Marcadores moleculares basados en PCR: Marcadores SSR o STR. Microsatélites. Departamento de Biotecnología, Universitat Politècnica de València.

Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO). Marcadores moleculares: una herramienta para explotar la diversidad genética. [Internet]. Disponible en:

<https://fao.org>

Cañón, J.; Parra, D.; Dunner, S. Control de paternidad y Pedigrí Genético. Laboratorio de Genética, Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense de Madrid.

## **MATERIAL PARA LA PREPARACIÓN DEL TEMA 41**

### **ORGANISMOS MODIFICADOS GENÉTICAMENTE (OMG): CONCEPTO Y LEGISLACIÓN.**

*Este material no tiene carácter oficial, por lo que en ningún caso vinculará al Tribunal Calificador. Constituye, únicamente, un instrumento complementario que servirá de apoyo al opositor para enfocar cada uno de los epígrafes, pero nunca de forma exclusiva ni excluyente. El Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación no se hace responsable del contenido del mismo.*

*Los materiales no serán objeto de actualización constante.*

## **ÍNDICE**

### **1. ORGANISMOS MODIFICADOS GENÉTICAMENTE (OMG): CONCEPTO**

1.1. INTRODUCCIÓN

1.2. CONCEPTO

1.3. OBTENCIÓN DE UN OMG

1.3.1. Métodos de obtención de organismos modificados genéticamente en animales

1.3.2. Métodos de obtención de organismos genéticamente modificados en plantas y vegetales

1.4. APLICACIONES DE OMG

### **2. ORGANISMOS MODIFICADOS GENÉTICAMENTE (OGM): LEGISLACIÓN**

2.1. LEGISLACIÓN EUROPEA

2.2. LEGISLACIÓN NACIONAL

2.3. LEGISLACIÓN INTERNACIONAL

2.3.1. Protocolo de Cartagena

2.3.2. Convenio de Aarhus

2.3.3. Convención para la Prohibición de las Armas Biológicas

## **1. ORGANISMOS MODIFICADOS GENÉTICAMENTE (OGM): CONCEPTO**

### **1.1. INTRODUCCIÓN**

Con los avances de la industria Biotecnológica y mediante la aplicación de la ingeniería genética, se ha logrado la manipulación y transferencia de genes entre organismos vivos de diferentes especies. Sin embargo, en el caso particular de los productos obtenidos por medios biotecnológicos, se hace necesario incrementar el rigor científico que garantice la inocuidad y seguridad de estos organismos, utilizados como alimentos, principios activos de fármacos, como modelos animales o como bioproductos que interactúan con el medio ambiente.

En la actualidad mediante el uso de diversas técnicas de la biología molecular, capaces de detectar la mínima variación en el genoma de las especies transgénicas, se han desarrollado un conjunto de normas y procedimientos que garantizan la inocuidad de los seres humanos y la seguridad del equilibrio natural. Estos controles han ido en ascenso con el desarrollo de las investigaciones; pero, en muchos casos el crecimiento exponencial no ha ido aparejado al crecimiento del desarrollo biotecnológico.

Cuando la posibilidad de transferencia de genes entre organismos no relacionados era ya un hecho, y por tanto posible la generación de organismos modificados genéticamente (OMG), en 1975 se celebró la Conferencia de Asilomar, donde científicos expertos en biología molecular se reunieron para revisar el progreso técnico en la investigación utilizando las nuevas técnicas de ADN recombinante y para discutir las condiciones de seguridad bajo las cuales dichos experimentos tenían que proceder.

Ante la trascendencia social de la investigación con los nuevos métodos biotecnológicos los propios científicos tomaron conciencia tanto de los beneficios que esta nueva tecnología podía aportar, como de los posibles riesgos que su actividad conllevaba y, en esa línea, se elaboró un informe sobre las recomendaciones para adecuar los distintos procedimientos y medidas de contención seguras al material genético utilizado en la experimentación científica, de acuerdo con el riesgo biológico esperado.

A la mencionada Conferencia, le siguieron otras reuniones de la comunidad científica con el objetivo de establecer los niveles de seguridad más apropiados para los diferentes ensayos genéticos. La Organización para la Cooperación y Desarrollo Económico (OCDE) fue el primer Organismo Internacional que tomó medidas en esta materia, de tal modo, que en 1986 reunió un grupo de expertos mundiales que elaboraron un documento titulado "Consideraciones de seguridad del ADN recombinante" ('The Blue Book', OECD, 1986) donde se establecen los principios generales para el desarrollo seguro de organismos obtenidos mediante técnicas recombinantes en la industria, la agricultura y el medio ambiente. Estos conocimientos y recomendaciones sirvieron de base para que, en países como EE.UU. Canadá y Japón, y posteriormente en la Unión Europea (UE) y sus Estados miembros, se establecieran recomendaciones, directrices y normativas nacionales e internacionales sobre

bioseguridad y comercialización que regularán de manera estricta su uso de la Biotecnología de manera particular y en cualquier actividad comercial de manera general.

## 1.2. CONCEPTO

El enorme avance de la investigación biotecnológica en los últimos años ha favorecido el desarrollo de técnicas que permiten introducir, eliminar o modificar de forma específica un gen, o determinados tipos de genes, en el genoma de un organismo para producir seres vivos (animales, plantas y microorganismos) con nuevas y mejores características. Este tipo de técnicas, se encuadran dentro de lo que se denomina **Ingeniería Genética** y los seres vivos que así se obtienen son los llamados **Organismos Modificados Genéticamente**.

La Ingeniería Genética incluye un conjunto de métodos que permiten aislar y fraccionar el ADN, y ensamblar los fragmentos obtenidos con otras moléculas de ADN. El resultado de estas manipulaciones se conoce como **ADN recombinante** y es un ADN híbrido que contiene el fragmento de ADN de interés que se desea expresar en una célula, unido a un ADN vector mediante un enlace covalente. Los genes de interés (contenidos en fragmentos de ADN) se obtienen cortándolos de su cadena de ADN originaria mediante enzimas de restricción. Posteriormente, se unen al ADN que actúa como vector mediante enzimas ligasas.

Podemos definir un Organismo modificado genéticamente (OMG) como el organismo, con excepción de los seres humanos, **cuyo material genético haya sido modificado de una manera que no se produce naturalmente en el apareamiento ni en la recombinación natural**.

Un Organismo Modificado Genéticamente se obtiene mediante técnicas que permiten la inclusión en un organismo de material genético procedente de una especie diferente, lo que no se podría conseguir de modo natural (por ejemplo, un gen de bacteria en una planta). Ello incluye tanto la supresión como la introducción de material genético ajeno a través de medios biotecnológicos modernos<sup>1</sup>.

Además, las técnicas de modificación genética permiten la inclusión de una característica concreta de manera dirigida en una especie determinada, a diferencia de las técnicas de mejora genética clásica, que se basan en la generación de una gran variabilidad genética para a continuación seleccionar el organismo que contiene la característica deseada, frecuentemente junto a otras características que no eran el objeto de la mejora.

De igual manera, en el ámbito de la industria agroalimentaria, podemos definir como **alimentos modificados genéticamente o transgénicos** tanto aquellos OGM destinados al

---

<sup>1</sup> Por biotecnología moderna se entiende la aplicación de (Protocolo de Cartagena):

- a) Técnicas in vitro de ácido nucleico, incluido el ácido desoxirribonucleico (ADN) recombinante y la inyección directa de ácido nucleico en células u orgánulos
- b) La fusión de células más allá de la familia taxonómica, que superan las barreras fisiológicas naturales de la reproducción o de la recombinación y que no son técnicas utilizadas en la reproducción y selección tradicional

consumo (animal o humano), como los alimentos que los contienen o que han sido producidos a partir de éstos.

### 1.3. OBTENCIÓN DE OMG

Para crear un OMG y que funcione correctamente, se tiene que introducir el transgén bajo el control de una secuencia específica del tejido en el que queremos que se exprese la proteína.

Los pasos básicos para generar un transgénico serían los siguientes:

- **Identificación del gen** y de la secuencia del tejido en donde queremos que se exprese.
- **Construcción** del ADN recombinante.
- Obtención de un **número suficiente** de copias de ADN recombinante.
- **Introducción** del ADN recombinante en la célula huésped.
- Obtener un **número significativo de OMG idénticos** a partir del inicial.

Es importante tener en cuenta que el transgén permite identificar cualquier OMG, con una simple muestra que contenga ADN, mediante técnica de PCR y amplificando la secuencia conocida que buscamos.

#### 1.3.1. Métodos de obtención de organismos modificados genéticamente en animales

Las técnicas utilizadas para la generación de animales modificados genéticamente se pueden dividir en dos grandes grupos: **la transgénesis y la transferencia nuclear**.

- **La transgénesis**

La transgénesis es un procedimiento biotecnológico por el que se introduce un gen foráneo (transgén) en el genoma de un ser vivo. En la transgénesis se busca que el transgén se integre en la línea germinal (gametos) de una manera estable, asegurando así que ese nuevo gen incorporado pueda ser heredado por la descendencia.

En los animales superiores, la información genética se transmite por reproducción sexual. Es lo que se conoce como transmisión genética vertical. Sin embargo, en 1981, Gordon y Ruddle demostraron la integración y transmisión estables (a través de la línea germinal) de genes inyectados en pronúcleos de cigotos de ratón obtenidos por fecundación "in vitro". Eran los primeros ratones transgénicos. Es decir, se trataba de una transmisión genética horizontal, que se denominó transgénesis.

En ganadería, la transgénesis ofrece un método más rápido de mejora genética que las técnicas de selección y reproducción tradicionales. Permite la introducción de genes nuevos y deseables en los animales domésticos sin tener que recurrir al cruzamiento entre los mismos.

Un transgén es una construcción de ácido **desoxirribonucleico (ADN)** que contiene:

- una secuencia que codifica una proteína específica que es la que aporta la mejora genética deseada (**exón**);
- una región que confiere a esta secuencia la capacidad de expresarse de forma ubicua o en tejidos específicos (**promotor**);
- y una serie de **secuencias aisladoras y reguladoras** que protegen y modulan la expresión del gen introducido.

Para conseguir una buena expresión del gen de interés, es necesario incluir todas las secuencias que modulan su expresión, de manera que se necesita un vector que admita grandes transgenes. Para ello, se han desarrollado los transgenes genómicos, basados en cromosomas artificiales de levaduras y bacterias, que son capaces de transportar grandes fragmentos de ADN en los que se pueden incluir todos los elementos reguladores del gen. Estos transgenes son los YACs y los BACs (cromosomas artificiales de levaduras y cromosomas artificiales de bacterias, respectivamente).

De las técnicas utilizadas para la producción de animales transgénicos, es decir, para introducir el transgén en el genoma, destacan las siguientes:

### 1. La microinyección pronuclear de ADN (MIP)

La microinyección pronuclear (MIP) de ADN consiste en la microinyección directa de ADN desnudo en el pronúcleo masculino de un embrión fertilizado. Si el material genético se integra en uno de los cromosomas embrionarios, el animal nacerá con esta nueva información en cada célula.

La microinyección es un método para generar animales transgénicos muy ineficiente, debido a que conlleva la integración aleatoria del gen foráneo en el genoma receptor con las siguientes consecuencias:

- El transgén se introduce en el genoma receptor de forma aleatoria, por lo que sólo en un pequeño porcentaje se sitúa en el lugar adecuado para conseguir una buena expresión en el animal transgénico.
- No todos los animales que nacen han incorporado a su genoma el transgén (no son transgénicos, por tanto).
- El gen exógeno puede insertarse en un lugar erróneo, por ejemplo, en medio de un gen del genoma receptor, interrumpiéndolo y causando su mutación y, con ello, la muerte del embrión o alteraciones en el animal transgénico nacido.
- Se produce un patrón variable de expresión del gen exógeno en la progenie transgénica, a menudo en mosaico.
- En ocasiones, el transgén microinyectado no es heredable porque no se inserta en la línea germinal del animal transgénico.
- No se pueden encontrar dos animales transgénicos fundadores con el transgén insertado en el mismo lugar, por lo cual, para conseguir animales homocigóticos para este gen exógeno sólo pueden ser fabricados mediante el cruce de los nacidos de un único animal fundador (en el caso de la vaca, la producción de una línea homocigótica a partir de un único fundador requiere alrededor de 5 años).

## **2. Transferencia de genes mediada por espermatozoides**

En 1989, se describió por primera vez un nuevo método para la generación de animales transgénicos: la transferencia de genes mediada por esperma (SMGT), que se basa en la capacidad intrínseca de los espermatozoides de unirse e internalizar ADN exógeno que, posteriormente, podrá ser transferido al ovocito durante la fertilización. El ADN de interés puede ser incorporado al espermatozoide, previo a la fertilización, mediante coincubación, electroporación o lipofección de los espermatozoides.

Esta habilidad de los espermatozoides por capturar ADN exógeno fue descubierta en 1971 (Brackett, 1971), pero el hallazgo, con sus importantes implicaciones, fue ignorado durante cerca de 20 años.

El primer procedimiento de SMGT se realizó en un modelo de animal pequeño, el ratón, y demostró ser muy eficiente. Posteriormente, esta técnica se adaptó a grandes animales, siendo exitosa en la generación de diversas líneas de cerdos transgénicos. Se considera que la SMGT puede ser utilizada en todas las especies animales con reproducción sexual mediada por gametos, siendo una técnica de aplicación potencialmente universal.

En síntesis, la aplicación de la SMGT consiste en:

- Obtención del eyaculado a partir de animales previamente seleccionados.
- Conversión de los espermatozoides del eyaculado en células transgénicas mediante la incubación conjunta del esperma con el plásmido que contiene el DNA de interés. En este proceso se suceden las siguientes etapas:
  - la unión del DNA exógeno a la superficie del espermatozoide;
  - seguida de la internalización de este DNA en el espermatozoide;
  - y, posteriormente, la integración del transgén en el genoma del espermatozoide (hecho que se ha demostrado que no ocurre al azar, sino en lugares concretos del genoma).
- Inseminación artificial, con el esperma transgénico, de hembras previamente sincronizadas (en cerdos) o inyección intracitoplasmática de esperma (ICSI, "intracytoplasmic sperm injection") transgénico en ovocitos para generar embriones que posteriormente sean transferidos a hembras sincronizadas para gestarlos (en ratones).
- Obtención de las camadas, seguida del estudio de la eficiencia de la transgénesis en ellas, seleccionando los animales transgénicos fundadores que serán capaces de transmitir el transgén a las sucesivas generaciones.

Los eventos moleculares que median la internalización del ADN en los espermatozoides se desconocen; es necesario evaluar un gran número de sementales antes de encontrar uno con las características adecuadas para el procedimiento. Este método se caracteriza por su baja reproducibilidad.

### 3. Gene Targeting

La mayoría de las técnicas utilizadas para la introducción de ADN exógeno en células producen una integración aleatoria en el genoma celular del ADN introducido, con los consiguientes inconvenientes.

La técnica de “gene targeting” evita esos problemas, al generar una modificación genética dirigida, específica y controlada, basada en la introducción o en la eliminación de ADN en lugares precisos del genoma, utilizando la recombinación homóloga de esas secuencias de ADN foráneas con los genes autóctonos. Esta técnica requiere la utilización de células madre embrionarias (ES “cells”, “embryonic stem cells”), que son pluripotentes y que, una vez modificadas genéticamente, son inyectadas en blastocistos para generar embriones quimera.

La obtención de células embrionarias totipotentes consiste en la integración de un transgén determinado en el genoma de células embrionarias totipotentes, mediante recombinación homóloga. Estas células son microinyectadas en blastocistos, a partir de los cuales se obtienen animales quiméricos. Si las células microinyectadas contribuyen a la formación de la línea germinal, entonces la descendencia de este ratón quimérico será transgénica.

Se han encontrado células similares a las CET en muchas especies animales, incluyendo, ratas, hámster, cerdos, ovejas y monos. Solo las CET de ratón han sido capaces de contribuir a la línea germinal; constituyendo así una ruta para la generación de animales transgénicos.

Los tipos de modificaciones genéticas que se pueden obtener por “gene targeting” son:

- “Knockouts” o inactivación génica. Si se bloquea la expresión de un gen concreto (eliminando un fragmento del mismo o introduciendo una mutación en su secuencia que impida su traducción), estamos produciendo una inactivación génica y generando un animal knockout. Este animal permite estudiar qué ocurre cuando se elimina un gen concreto y, así, conocer su función.
- “Knockins”: si se introduce una mutación en un gen o se sustituye un gen por otro. En ocasiones, la modificación genética que introducimos puede causar la letalidad del embrión. Para evitarlo, se puede controlar la expresión de la modificación genética introducida en lugar y tiempo:
- “Knockouts” o “knockins” específicos de tejido. En ellos la modificación sólo se expresa en los tejidos que nos interesa, utilizando promotores específicos de tejido (por ejemplo, que el gen se exprese en hígado y no en adipocitos).
- “Knockouts” o “knockins” condicionales o inducibles. En ellos controlamos el momento de la expresión de la modificación genética. Por ejemplo, una vez que el animal ya haya nacido (con lo que evitamos la posible muerte embrionaria por la modificación introducida).

### 4. Microinyección de vectores lentivirales

Un método alternativo es la transgénesis viral: el uso de virus recombinantes para introducir genes en el embrión. Los vectores retrovirales han sido estudiados extensamente para terapia génica humana.

Estos vectores han demostrado transferir eficientemente genes en embriones murinos, bovinos y porcinos. Sin embargo, los retrovirus están sometidos a modificación epigenética y la expresión retroviral se corta durante la embriogénesis o es breve después del nacimiento.

Se ha conseguido una mejora sustancial con el uso de vectores derivados de lentivirus, que proceden de una familia de retrovirus complejos. Estos vectores tienen la capacidad de atravesar la membrana nuclear y alcanzar el genoma de las células, cualquiera que sea la fase del ciclo celular en la que se encuentren, incluyendo células quiescentes y embrionarias, y cualquiera que sea el tipo celular. Los vectores lentivirales han demostrado que transducen células madre embrionarias humanas y embriones de ratón y rata preimplantación.

En el caso de los cerdos, se ha conseguido la expresión ubicua de los genes portados por vectores lentivirales en los distintos tejidos del animal y con una correlación lineal entre la expresión del transgén y el número de provirus que se ha integrado en el genoma.

En animales de granja, la eficiencia de la transgénesis con vectores lentivirales es 50 veces superior a la que se consigue con la microinyección pronuclear de DNA. Su mayor limitación es que no pueden transportar transgenes con más de 8-9 kb de DNA y, además, los sitios en los que se produce su integración de forma preferente son regiones codificantes de los genes de las células que infectan.

Los vectores lentivirales penetran en el embrión, se retrotranscriben y se integran en el genoma. Este método presenta una elevada eficiencia de transgénesis, es una metodología poco invasiva, y permite la integración en zonas transcripcionalmente activas. Además, no se integran en forma de tándem, y el número de copias integradas se correlaciona con los niveles de expresión. Esta técnica tiene la particularidad que la capacidad de clonaje no excede los 8.5 kb, presenta dificultad para la construcción de vectores multigenes y el establecimiento de líneas homocigóticas similares al animal fundador.

- **Transferencia Nuclear**

En la transferencia nuclear (TN) se utiliza el núcleo de una célula procedente del animal que queremos clonar para introducirlo en un ovocito receptor previamente enucleado. Este ovocito se activa eléctricamente, o por otros métodos, para que re programe al núcleo y éste comience la generación de un embrión que tendrá un 98-99% de la información genética procedente del núcleo del animal a clonar y un 1-2% procedente del ADN contenido en las mitocondrias y otras organelas presentes en el citoplasma del óvulo receptor. Consecuentemente, el organismo resultante no será un clon exacto del animal donante del núcleo.

Durante el desarrollo, el contenido genético de cada célula se mantiene, con unas pocas excepciones, idéntico al que tenía el cigoto. Por lo tanto, las células diferenciadas (adultas) poseen en su núcleo toda la información necesaria para generar un organismo completo. Esto es lo que se conoce como totipotencia nuclear.

En sus inicios, la TN se desarrolló como un medio de comprobar, de forma experimental, este concepto de totipotencia, mediante la clonación de animales a partir de células adultas. Los núcleos de estas células adultas se reprograman con la información que hay en el

citoplasma del ovocito, de manera que se silencian algunos genes y comienzan a funcionar otros, produciéndose la parada de la fase adulta para encenderse la embrionaria. Esta reprogramación permite que las células donantes de los núcleos para la TN puedan ser fetales, embrionarias o somáticas. Como es posible obtener un número ilimitado de células somáticas a partir de un animal, la clonación constituye una tecnología que puede ser utilizada para la producción de un gran número de animales genéticamente idénticos entre sí (clonación reproductiva), aunque difieran en algo de su progenitor donante del núcleo.

Muchos animales de granja, tales como vacas, cerdos y ovejas, han sido clonados de forma satisfactoria utilizando esta técnica. La oveja Dolly, en 1996, fue el primer animal clonado a partir de una célula somática adulta (célula de la glándula mamaria de una oveja de 6 años, Wilmut y col., 1997).

Las líneas celulares obtenidas a partir de células somáticas permiten la manipulación de los genomas de los animales de granja "in vitro", lo cual permite crear células transgénicas de ovejas, cerdos y vacas cuyos núcleos, posteriormente, pueden ser transferidos a un ovocito enucleado para generar un animal transgénico mediante transferencia nuclear: clonación a partir de una célula transgénica.

Polly fue la primera oveja transgénica producida por transferencia nuclear (Schnieke y col. 1997). Fue generada a partir de fibroblastos fetales que fueron previamente modificados genéticamente mediante la adición del gen humano que codifica el factor IX de coagulación, introducido en un vector que portaba un promotor que dirigía la expresión a la glándula mamaria. Polly excretaba el factor IX de coagulación humano en su leche.

Por otra parte, si un embrión obtenido por NT de células somáticas se detiene en fase de blastocisto y de él se obtienen células ES, éstas pueden cultivarse "in vitro" para diferentes usos potenciales (clonación terapéutica): terapias de reemplazo y regeneración celular; investigación médica; e, incluso, se puede realizar la modificación genética de estas células ES para corregir un defecto genético del individuo donante.

### **1.3.2. Métodos de obtención de organismos genéticamente modificados en plantas y vegetales**

Los métodos más utilizados para la obtención de plantas transgénicas son los siguientes: la infección por *Agrobacterium tumefaciens*, la biolística, la microinyección, y la electroporación de células intactas.

- **Infección por la *Agrobacterium tumefaciens***

La infección por la *Agrobacterium tumefaciens* se basa en la capacidad de esta bacteria de infectar las células de las plantas con un fragmento de su ADN. Cuando el ADN bacteriano se integra en un cromosoma de la planta, puede secuestrar efectivamente la maquinaria celular de esta y usarla para asegurar la proliferación de la población bacteriana.

La bacteria *Agrobacterium tumefaciens* transfiere el ADN de una región del plásmido Ti hacia el genoma de la célula vegetal de algunas plantas (dicotiledóneas) a través de heridas. Las

cepas virulentas de *Agrobacterium* contienen un plásmido denominado Ti (Tumor-inductor) que es capaz de inducir la formación de agallas, o tumores, en diferentes zonas de las plantas. Esta región se denomina T-DNA (Transfer-DNA) y contiene genes que se expresan únicamente al ser integrados al genoma.

Por sus características, este método no permite la inserción de moléculas de gran tamaño y solo es aplicable a plantas dicotiledóneas.

- **La biolística**

La biolística consiste en la introducción de ADN en células mediante la aceleración (“disparo”) de proyectiles de muy pequeño tamaño. Los microproyectiles son cubiertos de ADN, y posteriormente acelerados mediante pólvora, una descarga eléctrica, o utilizando gases a presión; los genes que recubren la partícula recuperan posteriormente su actividad biológica. De esta manera, se puede introducir ADN en prácticamente cualquier tejido de cualquier especie vegetal.

Otra aplicación de esta técnica es producir daños mecánicos, disparando proyectiles sin ADN sobre las células a ser transfectadas, y posteriormente, usar la bacteria *Agrobacterium tumefaciens* como vector de transmisión génica.

Una de las principales desventajas de este método es que no es posible controlar el lugar de integración del gen en el genoma de la planta. Puede suceder que el transgén se rompa durante el proceso, y se integren fragmentos de ADN de partida, o que se integren múltiples transgenes, y por lo tanto, la planta reaccione silenciándolos, es decir, impidiendo la expresión del gen. Además, las partículas deben alcanzar células competentes, que por lo general son escasas, con la excepción de los tejidos embrionarios.

- **La microinyección**

La microinyección es una de las técnicas más precisas para incorporar ADN en compartimentos celulares, y se realiza mediante dispositivos micro capilares junto con la microscopía, lo que posibilita introducir el ADN sin causar daños. Además, permite un control visual de la célula a transformar, es aplicable a pequeñas estructuras (microsporas y cigotos), y al introducir el gen en el núcleo, éste no se expone a agresiones propias del citoplasma, como la degradación por DNAsas.

La microinyección es un proceso lento que requiere aplicar el método célula a célula así como precisa una mayor habilidad del analista y el uso de equipamiento científico mucho más complejo.

- **La electroporación de células intactas**

La electroporación de células intactas se basa en la aplicación de un elevado voltaje a las células por un período muy corto de tiempo. Durante este proceso las células despolarizan sus membranas y se forman pequeños orificios por donde penetran las moléculas de ARN y ADN que se encuentran alrededor. Pasada la despolarización, muchas células sufren daños irreparables y mueren, en muchos casos, más del 90% pero las que logran recuperarse incorporan las moléculas deseadas.

#### 1.4. APLICACIONES DE LOS OMG

Entre las aplicaciones de los OMG se pueden destacar:

- Aplicaciones terapéuticas: productos farmacéuticos (antibióticos, vacunas...), hormonas, terapias génicas.
- Diagnósticos: para salud humana, agricultura y ganadería, ensayos para calidad de alimentos, ensayos para calidad ambiental.
- Alimentación: mejora de procesos tradicionales de obtención de alimentos y bebidas, creación de nuevos alimentos y bebidas, nutraceuticos: alimentos con perfiles determinados de nutrientes, y para la mejora de la salud, aditivos alimentarios.
- Medio ambiente: tratamiento de residuos urbanos, agrícolas e industriales, producción de energía a partir de biomasa.

En este sentido, podemos enumerar a modo de ejemplo algunas ventajas del uso de los OMG:

- a) Ventajas económicas por un abaratamiento de los costes de producción. Un ejemplo de esto sería la utilización de plantas transgénicas que, aunque las semillas sean inicialmente más caras, estas necesitan menor cantidad de pesticidas y herbicidas y tienen una mayor productividad en comparación a los cultivos convencionales. Además, este hecho también supone una ventaja medioambiental ya que la mayoría de estos productos agroquímicos son contaminantes medioambientales. Al reducir el uso de estos productos también disminuye la emisión de CO<sub>2</sub> por parte de la maquinaria implicada en la fumigación de los cultivos
- b) Ventajas en la salud humana por la obtención de productos farmacológicos que mejoran la calidad de vida de las personas. Así, La generación de animales transgénicos como modelos de enfermedades humanas permite estudiar sus causas y consecuencias, y encontrar nuevas terapias y agentes terapéuticos. También la utilización de plantas transgénicas contribuye a la mejora de la salud humana puesto que por un lado aumenta la calidad nutritiva de los alimentos en áreas determinadas (como las afectadas por falta de vitamina A) y por el otro disminuye el número de intoxicaciones debido al uso de pesticidas y herbicidas.

Entre los **OMG vegetales** más conocidos se encuentran:

- Maiz Bt al que se le ha introducido un gen procedente de una bacteria del suelo que produce una proteína insecticida de modo que este tipo de maíz resiste al ataque de la plaga conocida con el nombre de taladro.
- **Soja transgénica** que le confiere resistencia al herbicida glifosato.
- **Patata transgénica** que actúa como una vacuna frente al cólera.
- **Arroz dorado** que contiene provitamina A para combatir la avitaminosis que se produce en aquella población cuya dieta está basada únicamente en arroz.

Entre las **aplicaciones de los animales modificados genéticamente** podemos encontrar:

- **Aplicaciones orientadas a la investigación en ciencias básicas:** identificación de genes, conocimiento de su estructura, función y regulación; el estudio de procesos fisiológicos específicos; o el estudio a nivel molecular, del desarrollo embrionario y su regulación.
- **Aplicaciones con interés en salud humana y biomedicina:** el desarrollo de modelos animales para el estudio de enfermedades humanas; la utilización de animales modificados genéticamente como donantes de órganos para humanos (xenotransplantes); o la utilización de animales transgénicos en terapia génica.
- **Aplicaciones en la industria farmacéutica:** animales modificados genéticamente utilizados como biorreactores para la síntesis de proteínas recombinantes de alto valor con aplicaciones terapéuticas; ensayos de seguridad de vacunas y productos químicos; peces cebra con elementos de respuesta a contaminantes del agua (emiten luz frente a un contaminante en el agua).
- **Aplicaciones en la zootecnia:** cambios en la composición de la leche en el ganado; modificación en los índices de crecimiento y de la composición de la canal; animales resistentes a enfermedades; o mejora de los rendimientos reproductivos y de la prolificidad.

## 2. ORGANISMOS MODIFICADOS GENÉTICAMENTE (OGM): LEGISLACIÓN

La voluntad para conciliar los intereses del desarrollo biotecnológico con la protección de la salud y el medio ambiente condujo al establecimiento desde principios de los años 90 de una legislación específica sobre OMG para proteger la salud de los ciudadanos y del medio ambiente, a la vez que se creaba un mercado único para la biotecnología.

### 2.1. LEGISLACIÓN EUROPEA

Se crean dos tipos diferentes de normativa:

- **Una de tipo horizontal**, que inicialmente cubre a todos los productos obtenidos por la moderna biotecnología utilizando técnicas de ADN recombinante. Este conjunto de normas son todas del mismo rango normativo, es decir todas son Directivas Europeas y abarca todo tipo de actividades desde la actividad comercial a la actividad experimental. Dentro de estas normativas se encuentran las siguientes:
  - **Directiva 90/219/CEE** del Consejo, del 23 de abril de 1990, relativa a la utilización confinada de microorganismos genéticamente modificados.
  - **Directiva 98/81/CE del Consejo**, del 28 de octubre de 1997, por la cual se modifica la Directiva 90/219/CEE, relativa a la utilización confinada de microorganismos genéticamente modificados.
  - **Recomendación de la Comisión**, del 23 de julio de 2003, sobre las directrices para la elaboración de estrategias y mejoras prácticas nacionales con la finalidad

de garantizar la coexistencia de los cultivos modificados genéticamente con la agricultura convencional y ecológica

- **Directiva 2009/41/CE**, relativa a la utilización confinada de OGM. Regula las actividades que se realizan en centros de investigación y en instalaciones industriales con vistas a asegurar que no suponen un riesgo para la salud humana o el medio ambiente.
- **Decisión de la Comisión 2009/770/CE**, de 13 de octubre de 2009 por la cual se establecen los modelos normalizados para la presentación de los resultados del seguimiento de la liberación intencional al medio ambiente de organismos modificados genéticamente, como productos o componentes de productos, para su comercialización, de conformidad con la Directiva 2001/18/CE del Parlamento Europeo y del Consejo.
- **Directiva 2001/18/CE**, sobre la liberación intencional en el medio ambiente de OGM. Contempla tanto los ensayos experimentales que se realizan a pequeña y mediana escala como la comercialización de productos (no solo alimentos) que incorporen OMG.
- El Parlamento Europeo aprobó **la propuesta de modificación de la Directiva** en julio de 2011, con una serie de objeciones a la Comisión, como que los estados miembros puedan alegar **motivos medioambientales** para la restricción o prohibición de los OMG: resistencia a pesticidas, preservación de la biodiversidad o falta de pruebas sobre los posibles efectos negativos del cultivo de transgénicos en el medio ambiente.
- **Directiva 94/55/CE** y sus posteriores modificaciones, sobre el transporte de mercancías peligrosas por carretera.
- **Directiva 2000/54/CE** sobre protección de los trabajadores frente a los riesgos relacionados con la exposición a los agentes biológicos durante el trabajo.
- **Directiva (UE) 2015/412 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 11 de marzo de 2015**, por las que se definen las actuaciones a realizar en zonas fronterizas con otros Estados miembros vecinos que hayan prohibido el cultivo con objeto de evitar una posible contaminación transfronteriza.
- **Decisión de Ejecución (UE) 2018/1790 de la Comisión**, de 16 de noviembre de 2018, que deroga la Decisión 2002/623/CE, por la que se establecen unas notas de orientación sobre **la evaluación del riesgo** para el medio ambiente de los organismos modificados genéticamente
- **Directiva (UE) 2018/350 de la Comisión**, de 8 de marzo de 2018, por la que se modifica la Directiva 2001/18/CE del Parlamento y del Consejo en lo que respecta a la evaluación del riesgo para el medio ambiente de los organismos modificados genéticamente.
- **Otra de tipo transversal**, que abarca varios reglamentos que son de directa aplicación por parte de los EEMM y que afecta a productos que por su importancia

económica requiere una reglamentación más específica. Dentro de ellas podemos destacar:

- **Reglamento 726/2004**, que tiene por objeto el establecimiento de un procedimiento centralizado para la autorización, control y farmacovigilancia en lo relativo a los medicamentos de uso humano y veterinario, incluidos aquellos que contengan o se compongan de OMG. En este Reglamento se cambia la denominación de la Agencia Europea del Medicamento que será el organismo en instaurar el procedimiento comunitario centralizado de autorización obligatoria para los medicamentos de alta tecnología.
- **Reglamento 1829/2003, sobre alimentos y piensos modificados genéticamente**, donde se establece el procedimiento único de autorización (ventanilla única/ one door-one key) para productos de alimentación humana o animal que son OMG o producidos a partir de éstos. Este Reglamento es un acto base, pues deriva del Reglamento 178/2002 por el que se establecen los principios y los requisitos generales de la legislación alimentaria y se crea la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) y se fijan procedimientos relativos a la seguridad alimentaria.
- **Reglamento 1830/2003, sobre etiquetado y trazabilidad**, donde se obliga a que todo producto alimentario incluido los piensos para animales a indicar en su etiquetado que contiene OMG o procede de ellos siempre que supere un 0,9 % del OGM o de un 0,5% en caso de que aún no se haya autorizado por la UE.

**Estos dos Reglamentos, el 1829/2003 y el 1830/2003 introducen nuevas obligaciones:**

- **La obligación de informar** al cliente cuando se comercializa un OMG o un derivado de OMG y la obligación de trazabilidad para todos los eslabones de la cadena.
- **La obligación del etiquetado.** Los alimentos y los piensos modificados genéticamente deben etiquetarse, incluso si no contienen trazas de ADN ni de proteína derivada de la modificación genética. También se define la trazabilidad como la capacidad de seguir la traza de OMG y los productos producidos a partir de OMG en todas las fases de la comercialización a lo largo de la cadena de producción y distribución. Todo alimento que sea OMG, o él o sus ingredientes (incluidos aditivos y aromas) contengan, o estén producidos a partir de OMG, siempre que vayan a consumidor final o a colectividades están sometidos a estas reglas de etiquetado, independientemente de la vía por la que llegue al consumidor.
- **El umbral de presencia adventicia o accidental** para el etiquetado pasa del 1% anterior al 0,9% y se establece un nuevo umbral (transitorio) del 0,5 % para los OGM con una evaluación de riesgo favorable, pero que todavía no ha recibido la autorización administrativa correspondiente en la UE.

El expediente y sus partes sobre la evaluación del riesgo para el medio ambiente y la seguridad alimentaria han de ser evaluados por la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria y los métodos de detección indicados por el solicitante deben ser evaluados y validados por el Laboratorio europeo de Referencia.

- **Reglamento 1946/2003 relativo a los movimientos transfronterizos de los OMG.** Este Reglamento implementa en la UE el Protocolo de Cartagena sobre bioseguridad de las Naciones Unidas. Dicho protocolo tiene por objeto garantizar un nivel adecuado de protección en la esfera de la transferencia, manipulación y utilización de OMG que puedan tener efectos adversos sobre el medio ambiente y la Salud humana en los movimientos transfronterizos.
- **Reglamento (CE) núm. 641/2004 de la Comisión, de 6 de abril de 2004, sobre las normas de desarrollo del Reglamento (CE) núm. 1829/2003 del Parlamento Europeo y del Consejo** por lo que atañe a la solicitud de autorización de nuevos alimentos y piensos genéticamente modificados, la notificación de productos existentes y la presencia accidental o técnicamente inevitable de material genéticamente modificado, evaluación de riesgo de la cual haya sido favorable.
- **Recomendación 2004/787/CE de la Comisión, del 4 de octubre de 2004** relativa a las directrices técnicas de muestreo y detección de organismos genéticamente modificados y de material producido a partir de organismos **genéticamente modificados**, como productos o incorporados a productos en el marco del Reglamento (CE) núm. 1830/2003.
- **Reglamento (CE) núm. 1981/2006 de la Comisión, del 22 de diciembre de 2006**, sobre las normas de desarrollo del artículo 32 del Reglamento (CE) núm. 1829/2003 del Parlamento Europeo y del Consejo, por lo que hace referencia al laboratorio comunitario de referencia para los organismos modificados genéticamente.
- **La publicación de la Recomendación (2010/C 200/01) 25 de la Comisión de 13 de julio de 2010** sobre directrices para el desarrollo de medidas nacionales de coexistencia destinadas a evitar la presencia accidental de OMG en cultivos convencionales y ecológicos. En ella se ofrece mayor flexibilidad para que los estados miembros definan sus medidas de coexistencia, por ejemplo, estableciendo unos niveles de presencia de OMG no intencionales inferiores al 0,9% para su etiquetado.
- **Reglamento (UE) 2019/1381 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 20 de junio de 2019, sobre la transparencia y la sostenibilidad de la determinación o evaluación del riesgo en la UE en la cadena alimentaria**, y por el que se modifican los Reglamentos (CE) n.º 178/2002, (CE) n.º 1829/2003, (CE) n.º 1831/2003, (CE) n.º 2065/2003, (CE) n.º 1935/2004, (CE) n.º 1331/2008, (CE) n.º 1107/2009 y (UE) 2015/2283, y la Directiva 2001/18/CE y dada la nueva planta departamental.

- **El Reglamento (UE) 625/2017, relativo a los controles y otras actividades oficiales realizados para garantizar la aplicación sobre alimentos y piensos, y de las normas sobre la salud y bienestar de los animales, sanidad vegetal y productos fitosanitarios** incluye dentro de su ámbito de aplicación los controles oficiales en el ámbito de la liberación intencionada en el medio ambiente de OMG con la finalidad de producir alimentos y piensos. El artículo 23 establece las normas específicas aplicables a los controles oficiales y a las medidas adoptadas por las autoridades competentes por lo que respecta a los OMG para la producción de alimentos y piensos y los alimentos y piensos modificados genéticamente.

La Subdirección General de Medios de Producción Agrícola y Oficina Española de Variedades Vegetales puso en marcha en el año 2020 el primer **PROGRAMA NACIONAL DE CONTROL OFICIAL DE LA LIBERACIÓN VOLUNTARIA DE ORGANISMOS MODIFICADOS GENÉTICAMENTE (OMG) PARA LA PRODUCCIÓN DE ALIMENTOS Y PIENSOS.**

El objetivo estratégico del programa de control de la liberación intencionada de OMG para producir alimentos y piensos es garantizar que dicha liberación se ajusta a los requisitos establecidos en la normativa vigente. Para conseguir este objetivo estratégico se realizarán controles oficiales en estas tres áreas con los correspondientes objetivos específicos:

- Cultivo de OMG para la producción de alimentos y piensos, autorizado con arreglo a la normativa de la UE.<sup>2</sup>
- Ensayos de campo de OMG para la producción de alimentos y piensos MG autorizados con arreglo a la normativa comunitaria y/o nacional.<sup>3</sup>
- Semillas para la producción de alimentos y piensos modificados genéticamente.<sup>4</sup>

Actualmente, en la UE el único evento autorizado para cultivo es el maíz MON 810, resistente frente a ciertas plagas de lepidópteros. En este evento es de aplicación la Decisión de la Comisión, de 22 de abril de 1998, relativa a la comercialización del maíz (*Zea mays*, Línea MON 810) modificado genéticamente. En dicha Decisión no se establecen condiciones y restricciones de uso y manejo. No obstante, en el preámbulo de dicha Decisión se hace mención a una serie de requisitos en materia de etiquetado.

<sup>2</sup> Parte C Directiva 2001/18/CE y/o Reglamento 1829/2003.

- Objetivo 1: Garantizar el cumplimiento de todos los requisitos o condiciones legales para realizar el cultivo comercial de cada OMG autorizado con arreglo a la parte C de la Directiva o el Reglamento (CE) 1829/2003 de alimentos y piensos modificados genéticamente.
- Objetivo 2: Prevenir que no se producen liberaciones intencionadas al medioambiente de OMG que no cuentan con la correspondiente autorización con arreglo a la parte C de la Directiva o al Reglamento (CE) 1829/2003 de alimentos y piensos modificados genéticamente

<sup>3</sup> Parte B de la Directiva 2001/18/CE

- Objetivo 1: Garantizar el cumplimiento de todos los requisitos previstos en las autorizaciones de cultivo/ensayos de campo de OMG con arreglo a la parte B de la Directiva
- Objetivo 2: Prevenir que no se producen liberaciones intencionadas al medioambiente de OMG que no cuentan con la correspondiente autorización con arreglo a la parte B de la Directiva.

<sup>4</sup> El Laboratorio Central de Sanidad Animal en Algete es el responsable de los controles de OMG en semillas.

El Reglamento (CE) 1830/2003 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 22 de septiembre de 2003, relativo a la trazabilidad y al etiquetado de organismos modificados genéticamente y a la trazabilidad de los alimentos y piensos producidos a partir de estos, contempla que los Estados Miembros adoptarán medidas de inspección y control para garantizar el cumplimiento de lo dispuesto en este Reglamento.

De esta forma, en su artículo 34, se establecen los requisitos de etiquetado y trazabilidad aplicados a las semillas destinadas al cultivo de OMG para la producción de alimentos y piensos modificados genéticamente.

## **2.1. LEGISLACIÓN NACIONAL**

En España, existen así mismo un conjunto de normas que incorporan a nuestro ordenamiento jurídico la legislación comunitaria relacionada con la bioseguridad en la producción, uso y comercialización de OGM, en concreto aquellas directivas europeas relacionadas con la utilización confinada de MMG y con la liberación intencional de OGM. Aunque las directivas europeas hacen referencia a los requisitos mínimos para los MMG, la normativa española engloba a todos los OGM y no solo a los microorganismos. Incluye, por tanto, a los animales y a las plantas MG en situación de confinamiento.

Este conjunto de normas se resume en una Ley y en un Real Decreto:

- **La Ley 9/2003**, de 25 de abril, por la que se establece el régimen jurídico de la utilización confinada, liberación voluntaria y comercialización de Organismos Modificados Genéticamente, incorpora al ordenamiento jurídico español las normas sustantivas de las Directivas europeas sobre organismos modificados genéticamente, así como diversas decisiones de la Comisión y del Consejo que han ido complementando el contenido de dicha directivas o normas. Transpone parcialmente las Directivas Europeas.
- **Real decreto 1697/2003**, de 12 de diciembre, por el cual se crea la **Comisión Nacional de Biovigilancia**
- **El Real Decreto 178/2004**, modificado por los Reales Decretos 367/2010 y 191/2013 desarrolla el contenido de la Ley 9/2003, de 25 de abril, y finaliza el proceso de incorporación al ordenamiento español de las directivas y demás normas comunitarias.
- **Orden ARM/2616/2010**, de 5 de octubre, por la cual se establece la **composición y el funcionamiento** del Comité de Participación en el marco del Consejo Interministerial de Organismos Modificados Genéticamente.
- **Real Decreto 191/2013, de 15 de marzo, por el que se modifica el Real Decreto 178/2004**, de 30 de enero, por el que se aprueba el Reglamento general para el desarrollo y ejecución de la Ley 9/2003, de 25 de abril, por la que se establece el régimen jurídico de la utilización confinada, liberación voluntaria y

comercialización de organismos modificados genéticamente. Con esta modificación se adapta la composición del Consejo Interministerial de Organismos Modificados Genéticamente y la Comisión Nacional de Bioseguridad sustituyendo las referencias a los anteriores órganos por los actualmente competentes en el ámbito de los organismos modificados genéticamente. Asimismo, introduce un cambio en la designación del Punto Focal Nacional y Autoridad Nacional Competente para el Protocolo de Cartagena sobre Bioseguridad, y modificaciones en el régimen competencial de las sanciones.

- **Real Decreto 364/2017**, de 17 de abril, por el que se **modifica el Reglamento general para el desarrollo y ejecución de la Ley 9/2003**, de 25 de abril, por la que se establece el régimen jurídico de la utilización confinada, liberación voluntaria y comercialización de organismos modificados genéticamente, aprobado mediante Real Decreto 178/2004, de 30 de enero. Con esta modificación se añade un requisito por el que, a partir del 3 de abril de 2017, los Estados miembros en los que se cultiven OMG adoptarán medidas adecuadas en las zonas fronterizas de su territorio con el fin de evitar una posible contaminación a los Estados miembros vecinos en los que esté prohibido el cultivo de esos OMG, a menos que dichas medidas sean innecesarias debido a unas condiciones geográficas específicas.
- **Orden APA/1083/2018**, de 8 de octubre, por la que se dictan **medidas para evitar la contaminación transfronteriza** derivada del cultivo de **maíz modificado genéticamente** hacia los estados miembros vecinos en los que esté prohibido el cultivo de dichos organismos modificados genéticamente.
- **Real Decreto 1378/2018**, de 8 de noviembre, por el que se modifican los Reales Decretos 1075/2014, 1076/2014 y 1078/2014, todos ellos de 19 de diciembre, dictados para **la aplicación en España de la Política Agrícola Común**.
- **Real Decreto 452/2019**, de 19 de julio, por el que se modifica el Real Decreto 178/2004, de 30 de enero, por el que se aprueba el Reglamento general para el desarrollo y ejecución de la Ley 9/2003, de 25 de abril, por la que se establece el régimen jurídico de la utilización confinada, liberación voluntaria y comercialización de organismos modificados genéticamente, y el Real Decreto 511/2017, de 22 de mayo, por el que se desarrolla la aplicación en España de la normativa de la Unión Europea en relación con el programa escolar de consumo de frutas, hortalizas y leche.
- **Orden APA/455/2021, de 30 de abril**, por la que se designa el laboratorio nacional de referencia para la detección e identificación de organismos modificados genéticamente en semillas. El Laboratorio Central de Veterinaria en Algete es el designado para este fin.
- **Real Decreto 406/2021, de 8 de junio**, por el que se modifica el Real Decreto 178/2004, de 30 de enero, por el que se aprueba el Reglamento general para el desarrollo y ejecución de la Ley 9/2003, de 25 de abril, por la que se establece el régimen jurídico de la utilización confinada, liberación voluntaria y

comercialización de organismos modificados genéticamente. Con este RD se actualiza el Reglamento 2019/1381 del Parlamento Europeo y del Consejo con respecto por el que se modifica la Directiva 2001/18/CE.

Esta Ley y este RD 178/2004 se ha inspirado en los siguientes principios:

- **El principio de prevención y cautela**, que implica adoptar las medidas adecuadas para evitar los potenciales efectos adversos para la salud humana y el medio ambiente.
- **El principio de caso por caso**, esto es, la evaluación de los riesgos asociados a los OGM para cada uno de ellos.
- **El principio de paso por paso**, que supone ir avanzando en la investigación y desarrollo de estos organismos a medida que se van descartando riesgos para la salud y el medio ambiente.
- Y por último, **el principio de información y participación pública**, garantizando la consulta al público antes de autorizar algunas actividades de utilización confinada, así como todas las de liberación voluntaria y las de comercialización de Organismos Modificados Genéticamente o productos que los contengan, y el acceso de los ciudadanos a la información sobre las liberaciones o comercializaciones autorizadas.

Son varios los puntos que se tratan en esta ley y que se desarrolla posteriormente en el Real Decreto:

1. **Regulación de todos los OMG, incluidos los animales y las plantas en situación de confinamiento.** Estas normas regulan la secuencia lógica de actividades desde que se realiza la modificación genética en el laboratorio hasta que se comercializa el producto, pasando por los niveles de ensayos experimentales necesarios. De ahí el concepto de paso a paso, en el que no se puede avanzar en la investigación y desarrollo sin tener autorizados, con todas las garantías de seguridad, las actividades previas y el principio de precaución, en el que no se puede poner en el mercado un OGM hasta que se hayan evaluado y estudiados sus posibles efectos sobre la salud humana y medio ambiente y descartado los riesgos no asumibles.
2. Establece **la distribución de las competencias** entre la Administración General del Estado y las Comunidades Autónomas.
3. **Los requisitos y procedimientos para la realización de actividades de utilización confinada, liberación voluntaria y comercialización de OMG** y las normas sobre información, vigilancia y control de estas actividades.
4. **Las infracciones y sanciones** de los incumplimientos de la norma.
5. **Composición y competencias del Consejo Interministerial de OMG** y de la **Comisión Nacional de Bioseguridad** que son dos órganos colegiados que establece la ley. El consejo Interministerial de OMG es un Órgano adscrito al MAPA y le

corresponde otorgar las autorizaciones de las que es competente el propio Ministerio. Este consejo funciona en coordinación con la Comisión Nacional de Bioseguridad que es un órgano colegiado de carácter consultivo y eminentemente técnico, también adscrito al MITECO, y se encarga de realizar las evaluaciones de riesgo de cada OMG procedente de otros estados miembros antes de su comercialización y también de informar preceptivamente todas las solicitudes de autorización de actividades con OMG, tanto de competencia estatal como autonómica.

**El proceso de autorización** es el siguiente:

Con anterioridad al comienzo de cualquier actividad con OGM, las personas físicas o jurídicas que se propongan realizarlas están obligadas a remitir una comunicación a la autoridad competente según el caso. Esta comunicación está encaminada a realizar la evaluación del riesgo para la salud humana y el medio ambiente que pudiera suponer el desarrollo de la actividad en la instalación que se declara por primera vez o para sucesivas actividades en instalaciones ya registradas. En todos los casos, la solicitud de comunicación o autorización tendrán que ser firmadas por el representante legal de la institución.

Las autoridades competentes en la autorización, vigilancia y control son dos:

1. **Administración General del estado:** por medio del consejo interministerial de OMG (CIOGM) en los siguientes supuestos:
  - a. Cuando su objeto sea la posible incorporación del OMG a medicamentos de uso humano y veterinario, así como a los demás productos y artículos sanitarios y a aquellos que, por afectar al ser humano, puedan suponer un peligro para su salud.
  - b. Cuando se disponga de financiación estatal y/o sea realizado por órganos u organismos dependiente de ellas.
2. Para el resto de las situaciones son las CCAA las que otorgan las autorizaciones en relación con las actividades de utilización confinada de OMG.

La autoridad competente en la evaluación del riesgo asociada a las actividades con OMG es, en todos los casos la **Comisión Nacional de Bioseguridad (CNB)**. Es el órgano colegiado de carácter consultivo de la AGE y de las CCAA. Su función es informar sobre las solicitudes de autorización correspondientes a los OMG. Está adscrita a la Dirección General de Calidad y Evaluación ambiental del Ministerio para la Transición Ecológica y Reto Demográfico, y compuesta por representantes de los diferentes Ministerios implicados y por representantes de las CCAA, así como de personas e instituciones expertas en la materia.

Para evaluar el riesgo, la CNB ha desarrollado unos formularios en los que se especifica la información que es necesario cumplimentar para realizar dicha evaluación.

El contenido de la comunicación y los plazos de respuesta por parte de la autoridad competente serán diferentes dependiendo fundamentalmente del tipo de riesgo que se determine para la actividad y por tanto el nivel de contención de la instalación.

Si la CNB necesitara más información para la evaluación de riesgo de la actividad o sobre las condiciones de la instalación, se podría en contacto directo con el solicitante. Una vez estudiado el expediente, la CNB elaborará el informe que remitirá a la autoridad competente correspondiente, y esta última responderá al solicitante.

El solicitante es quien determina el tipo de riesgo de la actividad y las medidas de control y de confinamiento que son exigibles.

Para la evaluación del riesgo, se tendrá en cuenta los siguientes aspectos:

- OMG con el que se vaya a trabajar: microorganismo, planta o animal
- Características de inocuidad, patogenicidad o riesgo ambiental del organismo receptor.
- El material genético del donante utilizado.
- El vector
- El OGM resultante

Tras esta evaluación, el OGM se clasificará en una de las cuatro categorías siguientes:

- **OGM tipo 1:** probabilidad insignificante de causar una enfermedad en los seres vivos.
- **OGM tipo 2:** aquél que pueda causar una enfermedad a los seres vivos, siendo poco probable que se propague a la colectividad y existiendo generalmente profilaxis o tratamiento eficaz; o puede causar un efecto adverso bajo en el medio ambiente.
- **OGM tipo 3:** aquél que puede causar una enfermedad grave a los seres vivos, con riesgos de que se propague a la colectividad y existiendo generalmente una profilaxis o tratamiento eficaz; o puede causar un efecto adverso moderado en el medio ambiente.
- **OGM tipo 4:** aquél que puede causar una enfermedad grave a los seres vivos con muchas probabilidades de que se propague a la colectividad y sin que exista generalmente una profilaxis o un tratamiento eficaz; o puede causar un efecto adverso alto en el medio ambiente.

Teniendo en cuenta la categoría del OGM y las características de la actividad que se va a desarrollar, el solicitante debe realizar una evaluación del riesgo para la salud y el medio ambiente de las actividades que se pretende llevar a cabo.

Conforme a esta evaluación de riesgo realizada, se clasificará la actividad en uno de los cuatro grupos de riesgo que figura en el RD 178/2004, y en consecuencia, se establecerán las medidas de confinamiento que la misma normativa establece:

- **Actividades de utilización de tipo 1:** son actividades de riesgo nulo o insignificante.
- **Actividades de utilización de tipo 2:** son actividades de bajo riesgo.

- **Actividades de utilización de tipo 3:** son actividades de riesgo moderado.
- **Actividades de utilización de tipo 4:** son actividades de alto riesgo.

De esta manera, cuando se quiere solicitar una actividad de utilización confinada de OGM es necesario presentar la siguiente información:

1. **Información sobre el OGM y la actividad** que se va a realizar sobre ella.
2. **Descripción de las instalaciones** donde se van a desarrollar la actividad.
3. **Evaluación del riesgo** de esa actividad en esa instalación.

Si se considera que se trata de una actividad de tipo 1, esta actividad podrá iniciarse inmediatamente a su comunicación. Solo será necesario el disponer de un registro de todas las actividades de este tipo que se realizan en la instalación.

Para actividades de tipo 2, se podrá empezar la actividad después de los 45 días de haber solicitado la actividad y siempre que la autoridad competente no requiera más información y alargue este periodo. En este último caso no podrá iniciarse la actividad hasta que se haya recibido una autorización expresa. En el caso de nuevas actividades de tipo 2 podrán iniciarse inmediatamente.

Para actividades de tipo 3 y 4 siempre se requiere de recibir autorización expresa para inicio de la actividad después de un periodo máximo de 90 días para la primera actividad y de 45 días para actividades posteriores. Además, se deberá presentar un plan de emergencia con las actuaciones a realizar en caso de escape.

## 2.3. LEGISLACIÓN INTERNACIONAL

### 2.3.1. PROTOCOLO DE CARTAGENA

Este Protocolo internacional del Convenio de Diversidad de Naciones Unidas tiene como objetivo principal garantizar que el movimiento transfronterizo de organismos vivos modificados genéticamente (OVM) se haga en condiciones seguras para la conservación de la biodiversidad y la salud humana.

En el Protocolo de Cartagena sobre Bioseguridad (PCB) se define “**Organismo Vivo Modificado (OVM)**” como cualquier organismo vivo que posea una combinación nueva de material genético que se haya obtenido mediante la aplicación de la biotecnología moderna, con lo que OVM y OMG vienen a ser equivalentes. Hay que subrayar que el protocolo habla de organismos vivos modificados ya que sólo regula los OMG vivos que pueden tener efectos adversos sobre la biodiversidad y no afecta a los productos transformados.

El Protocolo de Cartagena contempla una serie de aspectos de gran importancia: la aplicación del Principio de Precaución, el procedimiento para la importación de los OVM, la identificación de los productos que contengan transgénicos y las relaciones entre este Protocolo y la Organización Mundial del Comercio, o dicho de otra forma, las relaciones entre los intereses ambientales y los intereses económicos.

El elemento clave lo constituye el procedimiento de información y autorización es el denominado Acuerdo Fundamentado Previo (AFP), a través del cual se establecen las reglas del juego de la exportación/importación de los OVM, que muy similar al adoptado en otros Acuerdos internacionales relativos al movimiento de sustancias peligrosas. El AFP está recogido en los Artículos 8 a 10 del Protocolo, y presenta los siguientes elementos esenciales:

- Notificación del exportador al País de importación para proporcionar información completa y precisa sobre el movimiento transfronterizo, asegurando la veracidad de la misma.
- Evaluación del riesgo sobre las posibles consecuencias para la parte importadora.
- Obligación de recibir un consentimiento escrito o el rechazo de la importación por parte de la Autoridad competente nacional de la Parte de importación.
- Sistema regulador en cada País para asegurar la concesión del AFP.
- Creación del Centro de Intercambio de Información sobre Seguridad de la Biotecnología (CIISB).

El PCB contiene disposiciones sobre evaluación del riesgo (Artículo 15 y Anexo III) y sobre gestión del riesgo (Artículo 16) de los OVM. En el Anexo III del PCB se desarrolla la metodología para llevar a cabo dicha evaluación cuyo objetivo es determinar y evaluar los posibles efectos adversos de los OVM en la conservación y utilización sostenible de la diversidad biológica en el probable medio receptor, teniendo también en cuenta los riesgos para la salud humana. Las Autoridades competentes utilizarán la evaluación del riesgo para, entre otras cosas, la toma de Decisiones fundamentadas (AFP) en relación con la importación/exportación de los OVM con fines de ensayos experimentales o la comercialización.

La utilización confinada de los OVM está excluida del AFP, pero se tienen que cumplir una serie de obligaciones de información que tiene que ir incluida en la documentación de acompañamiento en la importación/exportación. En este sentido en la documentación deberá acompañarse siempre de la siguiente información:

- Identificación clara como “organismos vivos modificados” incluidos los nombres comunes y científicos de los organismos y la mención “destinados a uso confinado”;
- Nombre y domicilio del consignatario y del exportador o importador, según proceda, incluidos los detalles de contacto necesarios para comunicarse con la mayor rapidez en caso de emergencia;
- Cualquier requisito para la manipulación, almacenamiento, transporte y uso seguros de los organismos vivos modificados en el marco de los instrumentos internacionales ya existentes, que se aplican al caso, como las Recomendaciones de las Naciones Unidas relativas al Transporte de Mercancías Peligrosas, la Convención Internacional de Protección Fitosanitaria y la Organización

International de Epizootias, los marcos normativos nacionales o de cualquier otro acuerdo celebrado entre el importador y el

- En los casos que sea procedente, otra información tendría que comprender, de existir, los nombres comerciales de los organismos vivos modificados, los nuevos rasgos o los modificados y las características como suceso o sucesos de transformación, la clase de riesgo, la especificación del uso, así como cualquier otra identificación exclusiva, de contarse con ella, como una clave para tener acceso a la información del Centro de Intercambio de Información sobre Seguridad de la Biotecnología.
- Por último, el Reglamento (CE) nº 1946/2003, relativo al movimiento transfronterizo de organismos modificados genéticamente, implementa el Protocolo de Cartagena sobre Bioseguridad en la UE. La Comisión y los Estados miembros deben declarar centros focales (entidades que aseguran en su nombre la relación con la Secretaría del Protocolo) y deben designar asimismo autoridades nacionales competentes.

### **2.3.2. CONVENIO DE AARHUS**

El Convenio de Aarhus sobre acceso a la información, participación pública en la toma de decisiones y acceso a la justicia en temas medioambientales de la UNECE, reconoce los derechos públicos sobre el acceso a la información, a la participación pública y el acceso a la justicia, en los procesos de toma de decisiones gubernamentales en materias que afecten al medio ambiente local, nacional o transfronterizo. Este convenio fue aprobado en la ciudad danesa de Aarhus el 25 de Junio de 1998 en el marco de la cuarta Conferencia Ministerial del Medio ambiente para Europa.

### **2.3.3. CONVENCIÓN PARA LA PROHIBICIÓN DE LAS ARMAS BIOLÓGICAS**

La Convención para la Prohibición de las Armas Biológicas (CABT) tiene como fin prohibir y evitar que los agentes biológicos puedan ser utilizados como armas de destrucción masiva contra seres humanos, animales o plantas.

## BIBLIOGRAFÍA

COLVEMA Colegio Oficial de Veterinarios de Madrid.

<http://www.colvema.org/pdf/amg1>

COLVEMA. Colegio Oficial de Veterinarios de Madrid. Aplicaciones de los animales modificados genéticamente.

<https://www.colvema.org/pdf/6473geneticaii.pdf>

Gobierno de España. Ministerio para la transición ecológica y el Reto Demográfico.

<https://www.miteco.gob.es/es/calidad-y-evaluacion-ambiental/temas/biotecnologia/organismos-modificados-geneticamente-omg/>

Gobierno de España. Ministerio de Transición Ecológica y Reto Demográfico. Legislación Española sobre OMG. [https://www.miteco.gob.es/es/calidad-y-evaluacion-ambiental/temas/biotecnologia/organismos-modificados-geneticamente-omg-/legislacion-general/Legislacion\\_espaniola.aspx](https://www.miteco.gob.es/es/calidad-y-evaluacion-ambiental/temas/biotecnologia/organismos-modificados-geneticamente-omg-/legislacion-general/Legislacion_espaniola.aspx)

Gobierno de España. Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición

[https://www.aesan.gob.es/AECOSAN/web/para\\_el\\_consumidor/ampliacion/omgs.htm](https://www.aesan.gob.es/AECOSAN/web/para_el_consumidor/ampliacion/omgs.htm)

Gobierno de España. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación.

<https://www.mapa.gob.es/es/agricultura/temas/biotecnologia/omg/>

Convenio de Aarhus. <https://unece.org/environment-policy/public-participation/aarhus-convention/introduction>

Convenio de Aarhus. Comisión Económica para Europa. Comité de Política Ambiental.

[https://www.miteco.gob.es/es/calidad-y-evaluacion-ambiental/temas/biotecnologia/Convenio\\_Aarhus\\_2\\_tcm30-188810.pdf](https://www.miteco.gob.es/es/calidad-y-evaluacion-ambiental/temas/biotecnologia/Convenio_Aarhus_2_tcm30-188810.pdf)

Convención para la Prohibición de las Armas Biológicas.

[https://www.miteco.gob.es/es/calidad-y-evaluacion-ambiental/temas/biotecnologia/Convenci%C3%B3n%20Armas%20Biol%C3%B3gicas%20e\\_s\\_tcm30-190284.pdf](https://www.miteco.gob.es/es/calidad-y-evaluacion-ambiental/temas/biotecnologia/Convenci%C3%B3n%20Armas%20Biol%C3%B3gicas%20e_s_tcm30-190284.pdf)

Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación

[https://www.mapa.gob.es/es/agricultura/temas/biotecnologia/pncocaomg2021-2025\\_tcm30-559445.pdf](https://www.mapa.gob.es/es/agricultura/temas/biotecnologia/pncocaomg2021-2025_tcm30-559445.pdf)

Nota informativa sobre los métodos de análisis para la detección e identificación de organismos modificados genéticamente (OMG) en semillas de algodón, maíz, colza y soja.

[https://www.mapa.gob.es/es/agricultura/temas/biotecnologia/notainformativametodosdeanalis11-01-2022\\_tcm30-584547.pdf](https://www.mapa.gob.es/es/agricultura/temas/biotecnologia/notainformativametodosdeanalis11-01-2022_tcm30-584547.pdf)

Asociación Nacional de Obtentores Vegetales.

<https://www.anove.es/>

**MATERIAL PARA LA PREPARACIÓN DEL TEMA 42**

**ORGANISMOS MODIFICADOS GENÉTICAMENTE (OMG): TÉCNICAS ANALÍTICAS PARA SU DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN**

*Este material no tiene carácter oficial, por lo que en ningún caso vinculará al Tribunal Calificador. Constituye, únicamente, un instrumento complementario que servirá de apoyo al opositor para enfocar cada uno de los epígrafes, pero nunca de forma exclusiva ni excluyente. El Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación no se hace responsable del contenido del mismo.*

*Los materiales no serán objeto de actualización constante.*

## **ÍNDICE**

### **1. INTRODUCCIÓN**

### **2. DEFINICIONES**

2.1. OMG

2.2. EVENTO

2.3. ENDÓGENO

2.4. SONDAS

2.5. MEZCLA MAESTRA O MASTER MIX

### **3. DETECCIÓN DE OMG**

3.1. CARACTERÍSTICAS

3.2. ETAPAS

3.3. CLASIFICACIÓN

3.3.1. Métodos que detectan proteínas

3.3.2. Métodos que detectan ácidos nucleicos

3.3.2.1. PCR a tiempo a real.

3.3.2.2. PCR digital

## **1. INTRODUCCIÓN**

La Normativa Europea obliga al etiquetaje de los alimentos y piensos cuando el contenido de Organismos Genéticamente Modificados o OMG, es superior al 0,9%. Esto ha incidido en la necesidad de poner a punto unos métodos de detección de OMG que respondan a la legislación establecida por la Unión Europea. No obstante, dicha legislación no evita la presencia de ingredientes procedentes de OMG en los alimentos comercializados, los cuales pueden estar presentes en alimentos siempre y cuando su contenido sea inferior al 0.9 % en masa, ni implica la necesidad de una etiqueta indicando el uso de OMG en productos tales como huevos, leche y carne provenientes de animales a los que se les ha suministrado alimentos con OMG.

La Resolución de 17 de diciembre de 2020 por la que se regula el protocolo del plan de control, muestreo y análisis de semillas para la detección de la presencia de OMG, establece que los operadores pondrán a disposición de las autoridades competentes pruebas analíticas en relación a la presencia de OMG para garantizar el cumplimiento de la normativa aplicable.

Mediante la publicación de la Orden APA/455/2021, de 30 de abril se designó al Laboratorio Central de Veterinaria como laboratorio nacional de referencia para la detección e identificación de organismos modificados genéticamente en semillas.

Los métodos de análisis que detectan el ADN transgénico son los más utilizados. La técnica conocida como Reacción en Cadena de la Polimerasa o PCR, permite obtener gran cantidad de ADN idéntico al de partida, camino indispensable para llegar a detectar, identificar y cuantificar el OMG de interés.

## **2. DEFINICIONES**

### **2.1. OMG**

Podemos definir un Organismo modificado genéticamente (OMG) como el organismo, con excepción de los seres humanos, cuyo material genético haya sido modificado de una manera que no se produce naturalmente en el apareamiento ni en la recombinación natural. Para considerarse como tal debe ser una unidad biológica capaz de multiplicarse y transmitir material genético.

Aplicado a las plantas se llaman OMGs a aquellas que hayan introducido uno o más genes procedentes de otras especies.

### **2.2. EVENTO**

Un evento es una recombinación o inserción particular de ADN en el genoma vegetal en forma estable y conjunta, de uno o más genes que forman parte de una construcción definida.

Los eventos de transformación son únicos, y difieren en los elementos y genes insertados, los sitios de inserción en el genoma de la planta, el número de copias del inserto, los patrones y niveles de expresión de las proteínas de interés.

### 2.3. ENDÓGENO

Secuencia de un ADN diana de un gen propio y exclusivo de la especie vegetal a analizar utilizado como referencia en la cuantificación o en la determinación de la especie vegetal.

### 2.4. SONDAS

Molécula sintética constituido de 10 a 30 nucleótidos marcado con una o varias moléculas fluorescentes. En el procedimiento de detección de OMG se suelen usar sondas de hidrólisis o sondas Taqman marcadas con un emisor (fluorocromo) en el extremo 5' y un quencher (una molécula aceptadora) en el extremo 3'.

### 2.5. MEZCLA MAESTRA O MASTER MIX

Premezcla de reactivos que se usa preparada a la cantidad adecuada. Consta de tampón de reacción, desoxirribonucleótidos, Mg<sup>2+</sup>, sondas, enzimas degradadoras de Uracilo y enzimas polimerasas.

Se suele usar una enzima polimerasa de ADN inactiva a temperatura ambiente y que se activa a 95 grados Centígrados durante 10 min con lo que evitamos inespecificidades de posibles amplificaciones mientras se realiza la PCR.

## 3. DETECCIÓN DE OMG

Con el objetivo de facilitar el cumplimiento de los Reglamentos Europeos, el análisis de material transgénico en alimentos debe ser aplicable tanto a materias primas como a alimentos procesados y debe permitir detectar y cuantificar la presencia o ausencia de material transgénico.

### 3.1. CARACTERÍSTICAS.

Estos métodos deben presentar las siguientes **características**:

**Específicos**, es decir, tienen que ser capaces de detectar e identificar el OMG buscado.

**Sensibles**, es decir, tienen que ser capaces de detectar un porcentaje de OMG igual o inferior al límite marcado por la normativa europea.

**Precisos**, es decir, a partir del uso de materiales de referencia, tenemos que demostrar que son métodos estadísticamente representativos.

**Repetibles**, es decir, el resultado de un análisis tiene que ser el mismo cuando este se repite con el mismo método, con idénticas características del test, en el mismo laboratorio, por el mismo analista y utilizando el mismo equipo dentro de un intervalo corto de tiempo.

**Reproducibles**, es decir, el resultado de un análisis tiene que ser el mismo cuando éste se repite con el mismo método, con idénticas características del test, en diferentes laboratorios, por diferentes analistas y utilizando equipos diferentes.

Como se ha indicado con anterioridad, el método más fiable para saber si un alimento es transgénico es analizar su material genético o ADN o analizar su composición para identificar la presencia de proteínas derivadas de la actividad del ADN transgénico.

Los métodos moleculares fiables y sensibles, funcionan muy bien con material vegetal fresco o poco procesado, pero tienen menos sensibilidad cuando este material ha sido sometido a procesos industriales de elaboración de alimentos preparados o de purificación de sus componentes.

Diferentes procesos químicos, físicos o enzimáticos pueden contribuir a la degradación del ADN. Incluso en alimentos que por su proceso han sufrido una gran degradación de su ADN o de sus proteínas no se pueden hacer estos análisis ya que no se encuentran restos de éste, o casi no quedan trazas en forma de fragmentos cortos de los productos de degradación.

Para asegurar la calidad del ensayo se deben evaluar parámetros como la selectividad o especificidad, el intervalo lineal, exactitud del método, en términos de su precisión y veracidad, límites de detección y cuantificación, tanto en simplex como multiplex, empleando materiales certificados de referencia como controles internos, de modo que se garantice que el método así desarrollado es adecuado para el fin previsto.

La unión europea dispone de una base de datos para métodos de referencia para análisis de OMG (GMOMETHODS, <http://gmocrl.jrc.ec.europa.eu/gmomethods/>) que proporciona información detallada de los parámetros de desempeño y los criterios de aceptación empleados en la validación de las metodologías de detección de un amplio número de OMG, a nivel de evento, elemento regulador o elemento específico, tanto cuantitativos como cualitativos.

### **3.2. ETAPAS:**

El proceso de detección de OMG engloba tres etapas:

- Detectar la presencia o ausencia de OMG.
- Identificar los eventos que contienen la muestra matriz.
- Cuantificar si los OMG identificados no superan el 0,9% permitido en la UE (Reglamento 1830/2003).

### 3.3. CLASIFICACIÓN:

A partir de la capacidad de detección de los métodos, los podemos clasificar en dos grandes grupos:

- los que detectan la expresión del gen, es decir, proteínas: Método **ELISA**.
- los que detectan el gen responsable, es decir, ADN: Método **PCR**.

#### 3.3.1. Métodos que detectan proteínas. método enzyme-linked immunosorbent assay: **ELISA**.

Los métodos de detección basados en proteínas comprenden las diferentes tecnologías de inmunoensayos con anticuerpos mono o policlonales y varían según la especificidad del sistema de detección, la aplicación particular y el costo; y poseen límites de detección entre el 0.25% - 1% (FAO, 2007). Entre los ensayos disponibles se encuentran: **ELISA, tiras de flujo lateral y Western Blot**. Los dos primeros son los más utilizados para la detección de proteínas por su bajo costo, facilidad y los escasos requerimientos para el manejo de la muestra.

Sin embargo, la exactitud de estos métodos en términos de su veracidad y precisión puede verse afectada por efectos de la matriz y por la heterogeneidad de la concentración de la proteína a lo largo de la planta. Los resultados pueden depender del origen de la muestra.

Además, existe la probabilidad de falsos negativos, especialmente en alimentos procesados, puesto que el método solamente detecta proteínas y estas pueden degradarse en el procesamiento de la muestra, limitando el uso de estos métodos.

#### 3.3.2. Métodos que detectan ácidos nucleicos. reacción en cadena de la polimerasa: **PCR**

El objetivo de la PCR es la obtención de gran cantidad de ADN. A partir de una muestra que contenga una cantidad mínima de material genético difícil de manipular o detectar se puede obtener una gran cantidad de ADN idéntico al de partida.

El ADN es una molécula termoestable y está presente en todas las células de un organismo. Estas características lo convierten en la diana perfecta para detectar la presencia de OMG en materias primas y alimentos. La PCR es capaz de detectar la presencia de ADN, aunque se encuentre en cantidades muy pequeñas.

Este método permite una rápida detección del material transgénico basándose en la amplificación de un fragmento de ADN específico que se quiere detectar.

El proceso de detección de transgénicos engloba una **serie de etapas sucesivas**:

**a) Homogeneización de la muestra recibida:** según la Recomendación de la Comisión, de 4 de octubre de 2004, relativa a las directrices técnicas de muestreo y detección de organismos

modificados genéticamente y de material producido a partir de organismos modificados genéticamente, como productos o incorporados a productos, en el marco del Reglamento (CE) nº 1830/2003. Para ello, se suele **moler la muestra o triturarla**.

**b) Extracción del ADN:** El objetivo de la extracción del ADN es obtener la suficiente cantidad de ADN y que sea de buena calidad, es decir, el menos degradado posible y libre de contaminantes. La degradación de ADN y las contaminaciones reducen la eficiencia de la PCR y puede llevar a resultados erróneos.

La **ISO 21571:2005** de Productos alimenticios encuadra los métodos de análisis para la detección de organismos modificados genéticamente y productos derivados y dentro de esta lo métodos específicos para la extracción de ácidos nucleicos.

Se han descrito muchos métodos para extraer ADN de materias primas y productos finales, algunos de ellos más indicados para un tipo de matriz determinada y otros de aplicación más amplia.

Para la extracción del ADN es necesario producir una **lisis** celular, inactivar las endonucleasas celulares y separar el ácido nucleico del resto de estructuras celulares. Este proceso se puede realizar por:

- Rotura mecánica: trituración, lisis hipotónica
- Tratamiento químico: detergentes, agentes caotrópicos...
- Digestión enzimática: proteinasa K

Posteriormente se realiza la **purificación** del ácido nucleico a partir de los extractos celulares mediante la combinación de dos o más técnicas de las siguientes:

- Extracción/precipitación
- Centrifugación
- Separación por afinidad.

Tras extraer y purificar el ADN, este es amplificado en un termociclador. El éxito de la amplificación de la región de interés depende de la cantidad y de la calidad del ADN molde.

**c) Control de calidad del ADN extraído:** La calidad del ADN extraído se controla mediante varios métodos:

- Medidas espectrofotométricas con un espectrofotómetro UV-VIS de barrido espectral que mida la variación de la absorbancia con la longitud de onda empleando solo una microgota para determinar la pureza, usando como indicador la relación de absorbancias a las longitudes de onda de 230nm, 260nm y 280nm (ratio A260/A280 y ratio A260/230).
- Medidas de fluorescencia con un fluoróforo, para determinar la concentración del ADN de doble cadena.

- Electroforesis en gel de agarosa, para determinar la integridad y el tamaño de la molécula de ADN y/o productos de amplificación.
- Digestión con enzimas de restricción, para determinar la funcionalidad del ADN en muestras de alto rendimiento.

En función de la concentración obtenida deberán hacerse diluciones para conseguir una concentración homogénea en muestras y patrones y así poder comparar correctamente los resultados.

#### **d) Cribado o Screening mediante secuencias reguladoras**

Después de comprobar que la muestra tiene un ADN de calidad, el siguiente paso es ver si contiene o no contiene OMG.

El Laboratorio Europeo de Referencia aporta métodos validados con los que detectar secuencias de ADN que se encuentran en varios, pero no necesariamente en todos los eventos de transformación.

La detección del transgén o ADN transgénico se realiza mediante la amplificación específica de un fragmento del mismo utilizando la técnica de la PCR.

Los métodos de cribado detectan secuencias de ADN que pueden ser **elementos reguladores** (como el promotor 35S y el terminador T-Nos), **construcciones** (como el CTP2-CP4) o **genes** (como el PAT) que se encuentran en la mayor parte de los OMG.

Esta etapa de cribado comprende la identificación de aquellos eventos que no contienen ninguno de estos elementos reguladores y que podrían escapar al análisis si el cribado de los elementos reguladores diera resultado negativo. Se denomina Identificación de cribado

#### **e) Identificación y cuantificación.**

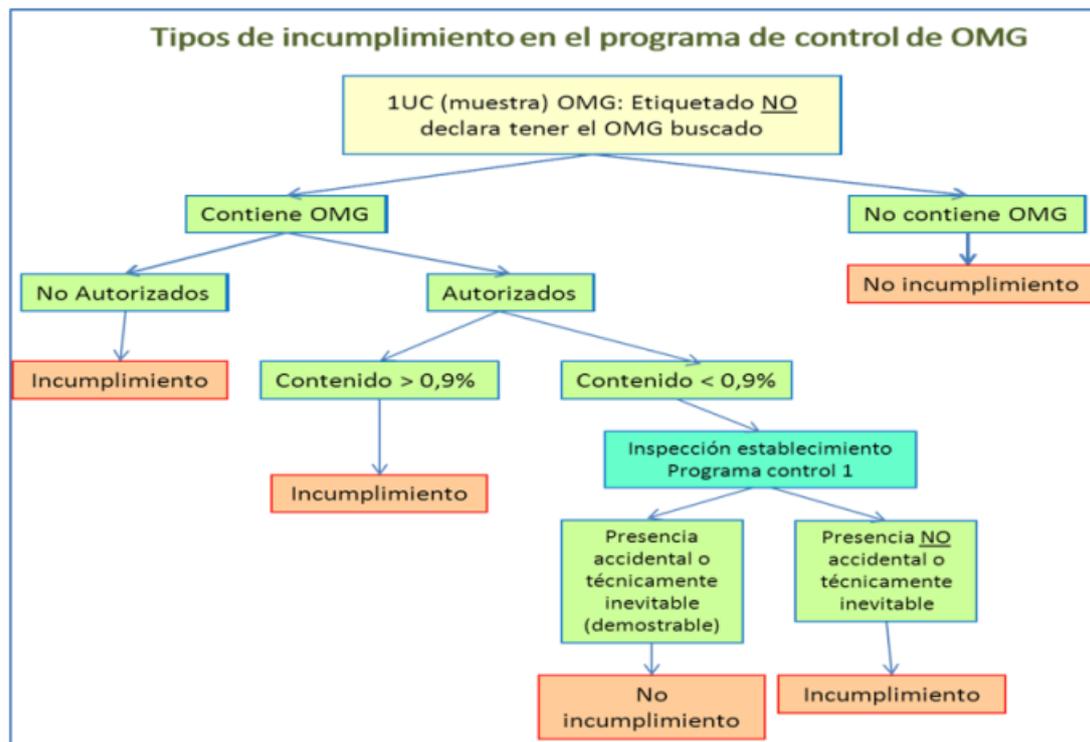
Después de detectar mediante el cribado la presencia de OMG, se identifica de cual se trata mediante la amplificación por **PCR de secuencias específicas de evento**. Esto significa que las secuencias de ADN detectadas son específicas del material derivado de dicho evento de transformación y suelen abarcar la unión entre el ADN insertado y el genoma del huésped.

La ISO 21570:2005 de Productos alimenticios expone los métodos de análisis para la detección de organismos modificados genéticamente y productos derivados en cuanto a métodos cuantitativos basados en ácidos nucleicos.

En cuanto a la cuantificación de OMG ha llegado a ser muy importante en los últimos años, a raíz de la normativa europea (Reglamento (CE) Nº 1829/2003, de 22 de septiembre de 2003, sobre alimentos y piensos modificados genéticamente)

El umbral obligatorio de etiquetaje del 0.9% de OMG establecido por la UE hace que cada vez sean más necesarios los análisis cuantitativos que indican la proporción de OMG en la muestra, en lugar de los cualitativos que sólo nos indican la presencia o la ausencia de OMG.

En el siguiente árbol de decisiones se relacionan los distintos tipos de incumplimiento en el marco de la normativa europea:



**Figura 1:** Plan Nacional de Control Oficial de la Cadena Alimentaria 2021-2025 Programa 6 Organismos Modificados Genéticamente (OMG) Versión 1 Aprobado en Comisión Institucional 16 de diciembre de 2020 AESAN

## f) Controles de calidad

Durante el proceso de análisis de muestras se llevan a cabo distintas acciones para asegurar la calidad de este.

### Descripción de los controles:

**Control ambiental (C.AMB):** Consiste en un tubo de agua libre de ácidos nucleicos que se ha dejado abierto al aire a lo largo del proceso de homogeneización y pesada de la muestra (si la muestra viene en forma de harina, se coloca en el proceso de pesada) y que se somete al proceso de extracción de manera similar a las muestras a analizar. Se introduce uno por cada tanda de extracción de muestras o MRC. Este control sirve para determinar si existe contaminación por ácidos nucleicos en el aire del laboratorio y se introduce en los casos detallados en la tabla que aparece más adelante.

**Control de extracción (C.EXT):** Se toma como “muestra” un tubo de agua libre de ácidos nucleicos que se somete al proceso de extracción de la misma forma que las muestras a analizar. Se introduce un control de extracción en cada tanda de extracción realizada. Este control se usa para determinar si se produce contaminación cruzada durante el proceso de extracción.

**Control de reactivos de PCR (C.MIX):** Consiste en un tubo que contiene todos los reactivos de amplificación (MIX PCR) y en el que en lugar de ADN se adiciona un volumen equivalente de agua libre de ácidos nucleicos. Se introduce uno por cada mix de PCR que se prepare. Este control sirve para comprobar si los reactivos usados están contaminados y se introduce en todos los análisis (cribado, endógenos, identificación y cuantificación).

**Control negativo de amplificación de ADN diana (CA-):** Consiste en un ADN procedente de un MRC o muestra negativa conocida que no contenga la secuencia diana sobre el que se lleva a cabo el análisis de PCR de manera similar a las muestras. Este control sirve como control de la especificidad de la reacción y se introduce únicamente en el análisis de cribado del gen CP4-EPSPS tipo I y II.

**Control de inhibición de la PCR:** Se usa en los casos en los que haya dudas sobre las interferencias que la muestra (bien sea por la naturaleza de la propia matriz o por cómo ha ido el análisis en los pasos previos) puede ocasionar en la reacción de PCR.

Si se trata de una matriz de la que disponemos de método de detección de endógeno, en la reacción de PCR se introduce la muestra y una dilución 1/10 de la misma y se analiza el endógeno. Si no disponemos de método para la detección de ese endógeno se dopa la muestra, es decir, se añade una cantidad conocida de ADN diana. Se realiza una PCR específica para el ADN diana que hayamos usado para el dopaje en el que tendremos que meter nuestra muestra y su dilución 1/10, la muestra dopada y una dilución 1/10 dopada (el dopaje se realiza sobre la dilución 1/10 de igual modo que sobre la muestra sin diluir). La comparación de los datos de Ct de las distintas muestras (dopadas y no, diluidas y no) nos indican si existe inhibición.

**Control positivo de amplificación de ADN diana (CA+):** Consiste en un ADN procedente de un MRC o una muestra conocida positiva de la secuencia diana.

### **3.3.2.1. PCR a tiempo real**

Las características de la **PCR a Tiempo Real** hacen de ella un proceso idóneo como mecanismo de detección de OMG:

- Método que responde a las necesidades creadas por la normativa europea.
- Se basa en la cuantificación exacta del porcentaje de producto transgénico presente en la muestra.
- Mide la cantidad del producto amplificado después de cada ciclo de la PCR mientras ésta está en marcha.
- El resultado final es la emisión de fluorescencia, la cual es proporcional a la cantidad del producto amplificado.

- La fluorescencia emitida se convierte en cantidad de OMG gracias al tratamiento informático de los datos y permite expresar los resultados en porcentaje de OMG en la muestra.

La PCR en tiempo real se puede utilizar de manera cuantitativa. Existen dos tipos principales de PCR cuantitativa en tiempo real: ensayos de cuantificación relativa y ensayos de cuantificación absoluta.

En el caso de una **cuantificación relativa**, la determinación del porcentaje de transgénico de la muestra se lleva a cabo mediante la realización de dos PCR a Tiempo Real en paralelo, una de ellas para **detectar el evento transgénico** y la otra para la **detección de un gen endógeno específico** para la especie de la muestra en la que se trabaja.

Para ello se generan 2 rectas patrón con Material de Referencia Certificado (MRC) a una serie de diluciones o concentraciones determinadas:

- Una para la detección de la **secuencia transgénica**
- Otra para la detección de la **secuencia endógena de la especie**.

Cabe reseñar que al ser un MRC va acompañado de un documento en el que se certifica la cantidad y la incertidumbre asociada de dicho material. A continuación se muestran unos ejemplos de MRC a diferentes concentraciones (MON 863 x MON 810 MAIZE, 0'1, 1 y 10%). (Figura 2).



### CERTIFICATE OF ANALYSIS

ERM<sup>®</sup>- BF417b

	DRIED MAIZE POWDER	
	Mass Fraction	
	Certified value <sup>1)</sup> [g / kg]	Uncertainty <sup>2)</sup> [g / kg]
MON 863 x MON 810 maize	1.0	-0.2 ; +1.0

1) The certified value is based on the mass fraction of dried non-genetically modified powder and dried genetically modified powder mixed and corrected for the water content. The certified value is traceable to the SI.  
2) The certified uncertainty is the expanded uncertainty estimated in accordance with the Guide to the Expression of Uncertainty in Measurement (GUM) with a coverage factor k = 2, corresponding to a level of confidence of about 95 %.

This certificate is valid for one year after purchase.  
Sales date:  
The minimum amount of sample to be used is 100 mg.

**NOTE**  
European Reference Material ERM<sup>®</sup>-BF417b was originally certified as IRMM-417-1. It was produced and certified under the responsibility of the IRMM according to the principles laid down in the technical guidelines of the European Reference Materials<sup>®</sup> co-operation agreement between BAM-IRMM-LGC. Information on these guidelines is available on the Internet (<http://www.erm-crm.org>).

### CERTIFICATE OF ANALYSIS

ERM<sup>®</sup>- BF417c

	DRIED MAIZE POWDER	
	Mass Fraction	
	Certified value <sup>1)</sup> [g / kg]	Uncertainty <sup>2)</sup> [g / kg]
MON 863 x MON 810 maize	9.8	-0.7 ; +1.2

1) The certified value is based on the mass fraction of dried non-genetically modified powder and dried genetically modified powder mixed and corrected for the water content. The certified value is traceable to the SI.  
2) The certified uncertainty is the expanded uncertainty estimated in accordance with the Guide to the Expression of Uncertainty in Measurement (GUM) with a coverage factor k = 2, corresponding to a level of confidence of about 95 %.

This certificate is valid for one year after purchase.  
Sales date:  
The minimum amount of sample to be used is 100 mg.

**NOTE**  
European Reference Material ERM<sup>®</sup>-BF417c was originally certified as IRMM-417-2. It was produced and certified under the responsibility of the IRMM according to the principles laid down in the technical guidelines of the European Reference Materials<sup>®</sup> co-operation agreement between BAM-IRMM-LGC. Information on these guidelines is available on the Internet (<http://www.erm-crm.org>).

### CERTIFICATE OF ANALYSIS

ERM<sup>®</sup>- BF417d

	DRIED MAIZE POWDER	
	Mass Fraction	
	Certified value <sup>1)</sup> [g / kg]	Uncertainty <sup>2)</sup> [g / kg]
MON 863 x MON 810 maize	98.5	-2.0 ; +2.4

1) The certified value is based on the mass fraction of dried non-genetically modified powder and dried genetically modified powder mixed and corrected for the water content. The certified value is traceable to the SI.  
2) The certified uncertainty is the expanded uncertainty estimated in accordance with the Guide to the Expression of Uncertainty in Measurement (GUM) with a coverage factor k = 2, corresponding to a level of confidence of about 95 %.

This certificate is valid for one year after purchase.  
Sales date:  
The minimum amount of sample to be used is 100 mg.

**NOTE**  
European Reference Material ERM<sup>®</sup>-BF417d was originally certified as IRMM-417-3. It was produced and certified under the responsibility of the IRMM according to the principles laid down in the technical guidelines of the European Reference Materials<sup>®</sup> co-operation agreement between BAM-IRMM-LGC. Information on these guidelines is available on the Internet (<http://www.erm-crm.org>).

Figura 2. Ejemplos de certificados de MRC.

Es importante tener en cuenta que el MRC usado para la obtención de los datos de ambas rectas debe ser el mismo y que el ADN que se introduce en cada uno de los mixes de PCR debe provenir de la misma alícuota.

El factor de dilución que se usa para preparar las diluciones seriadas (por ejemplo se pueden preparar 5 diluciones de P1 a P5) del MRC depende del % de evento transgénico del material

de partida y de la especie. Aplicando el % de transgénico del material de referencia se calcula el **número teórico de copias de ADN transgénico diana** en la PCR.

Ambas rectas estarán formadas por los resultados de PCR obtenidos (cada una con su mix correspondiente) para 5 puntos que cubren el rango de cuantificación exigido por el ENGL (Red Europea de Laboratorios de OMG's). Dicho rango comprende entre 1/10 y al menos 5 veces la concentración diana de corte para el etiquetado según la legislación (0.9%).

Una vez que se han realizado las PCR, se han obtenido las curvas de amplificación y las correspondientes curvas de calibrado para cada uno de los puntos (o diluciones), se interpola el valor obtenido para el análisis de la muestra problema (OMG) y el valor conocido de gen endógeno.

**Cabe reseñar que la cantidad de ADN presente en cada punto de la recta se corresponde con un nº de copias de gen endógeno (diferente para cada especie) y un número de copias de evento transgénico (diferente para cada %).**

Los métodos validados del EURL establecen la relación entre la cantidad de ADN y el número de copias para cada especie vegetal. De modo que para cada punto de ambas rectas patrón sabremos:

- Cantidad de ADN
- Nº de copias de ADN
- Valor de Ct obtenido

De esta forma, los valores de Ct son directamente asociados a un número de copias conocido.

El valor de Ct obtenido para la muestra se convierte al correspondiente número de copias de ADN por interpolación en la recta patrón (análisis de regresión lineal). Esto se hace tanto para el análisis del evento transgénico como del gen endógeno.

**La relación obtenida en número de copias entre el evento transgénico y el material endógeno se utiliza para determinar la cantidad en tanto por ciento de material transgénico en la muestra.**

A continuación se muestra las ecuaciones de acuerdo con EURL y ENGL:

$$\% \text{ OMG} = \frac{\text{N}^{\circ} \text{ de copias evento transgénico}}{\text{N}^{\circ} \text{ copias endógeno}} \times 100$$

### **3.3.4. PCR digital**

Otra forma de cuantificar es mediante el empleo de la PCR digital, con la que se pueden obtener mayor precisión, sensibilidad y cuantificación absoluta.

La PCR digital (dPCR) es un nuevo enfoque para la detección y cuantificación de ácidos nucleicos que ofrece un método alternativo a la PCR cuantitativa en tiempo real (qPCR) para la cuantificación absoluta, ya que cuenta directamente el número de moléculas diana en lugar de depender de patrones de referencia o controles endógenos.

La dPCR mide la fracción de réplicas negativas para determinar copias absolutas, mientras que la qPCR mide la amplificación a tiempo real.

Tanto en la dPCR como qPCR existe cuantificación, la dPCR se refiere a la fracción de reacciones de PCR negativas que se ajusta a un algoritmo estadístico de Poisson; mientras que qPCR la cuantificación se realiza analizando la cantidad del producto de PCR (datos recopilados durante la fase de crecimiento exponencial (log) de la PCR) la cual es directamente proporcional a la cantidad de ácido nucleico molde.

La PCR digital funciona de la siguiente manera:

Se parte de una muestra que contiene ADN o ADNc y se parte o distribuye en una placa en la que se realizarán reacciones de PCR individuales en paralelo.

Cada uno de los pocillos está cargado con una mezcla de muestra, mezcla maestra y reactivos de ensayo TaqMan® con sondas marcadas con moléculas fluorescentes para detectar la señal posteriormente; y se analiza individualmente para detectar la presencia (positivo) o ausencia (negativo) de una señal de criterio de valoración. Algunos de los pocillos contendrán la molécula/secuencia objetivo, lo cual proporcionará reacciones positivas, y otros pocillos no la contendrán, lo cual dará reacciones negativas.

Se emplea un chip nanofluídico que proporciona un mecanismo cómodo y sencillo para ejecutar miles de reacciones de PCR en paralelo.

Cuando no hay ninguna secuencia de destino presente, no se acumula ninguna señal. Tras el análisis de PCR, la fracción de reacciones negativas se usa para generar un recuento absoluto del número de moléculas de la muestra, sin necesidad de estándares ni controles endógenos.

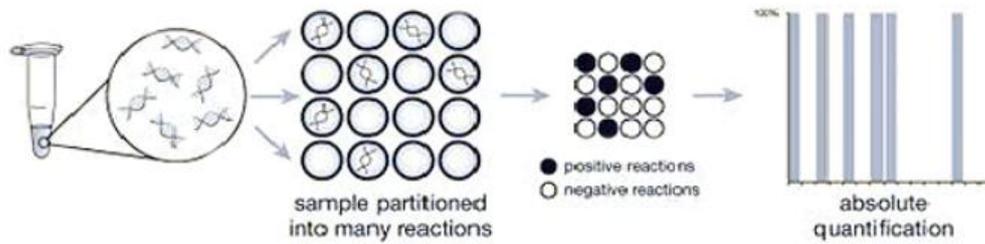
Para representar los pocillos que pueden haber recibido más de una molécula de la secuencia objetivo, se aplica un factor de corrección mediante el modelo de Poisson.

En el Anexo 1 se muestra un ejemplo gráfico de los resultados de dPCR y qPCR .

Ventajas de la PCR digital

- No es necesario depender de referencias o estándares.
- Capacidad para aumentar la precisión mediante más repeticiones de PCR.
- Alta tolerancia a los inhibidores.
- Capacidad para analizar mezclas complejas.

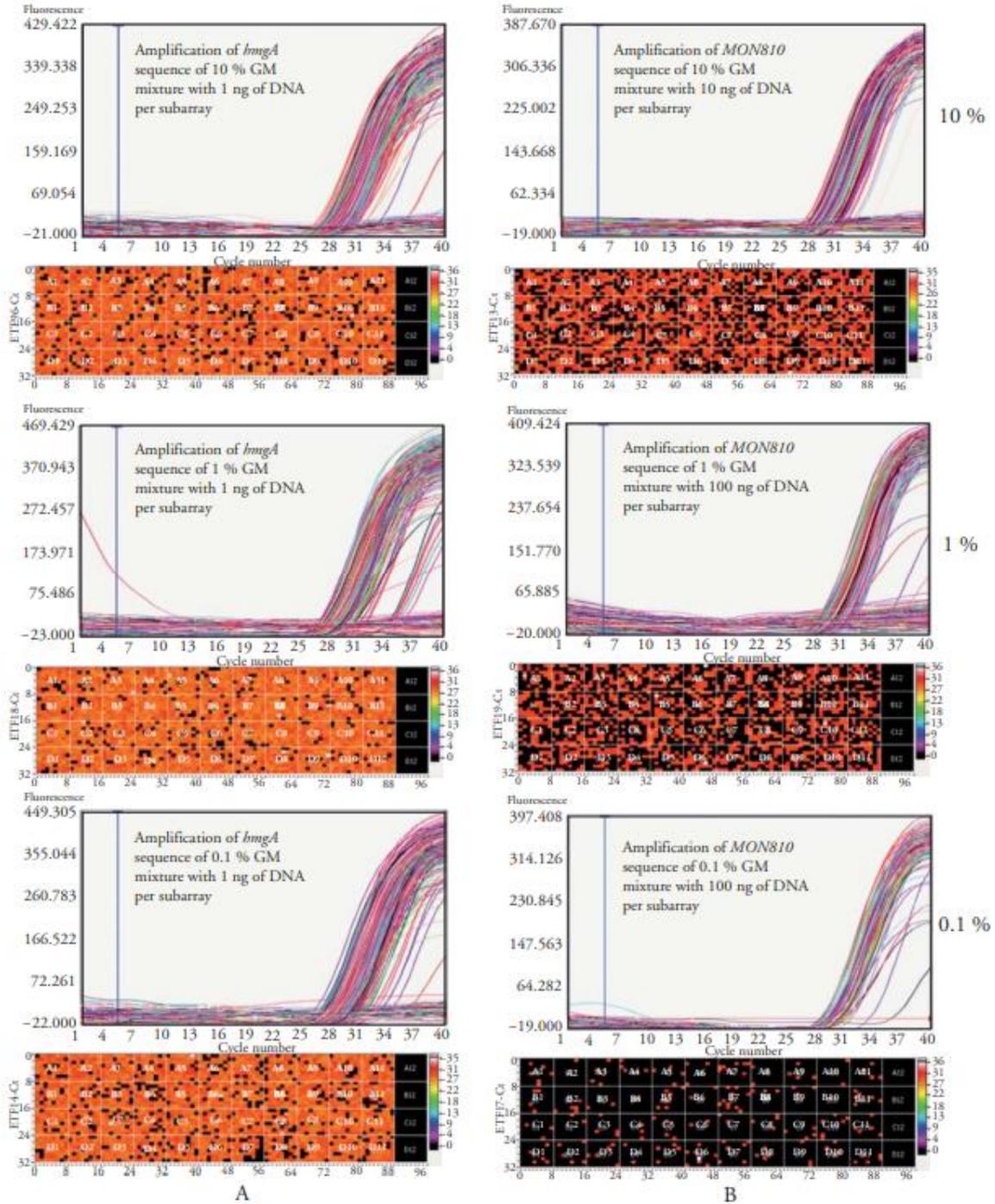
- Detección lineal de pequeños cambios de plegado



**Figura 3.** La PCR digital utiliza la relación de reacciones de PCR positivas (negro) a negativas (blanco) para contar el número de moléculas objetivo.

## ANEXO 1

Imágenes de los resultados de cuantificación de maíz genéticamente modificado mediante las técnicas de qPCR y dPCR. Curvas y mapas de amplificación de Mezcla GM al 10, 1 y 0.1 %. Columna A, resultados de amplificación secuencias *hmgA* (gen endógeno). Columna B, resultados de amplificación de secuencia MON810



## BIBLIOGRAFÍA

**EN ISO 21570: 2005.** Foodstuffs Methods of analysis for the detection of genetically modified organisms and derived products Quantitative nucleic acid based methods. CEN/TC 275/WG 11.

**EN ISO 21571: 2005.** Foodstuffs Methods of analysis for the detection of genetically modified organisms and derived products Nucleic acid extraction. CEN/TC 275/WG 11.

Mecanismos de detección de organismos genéticos.

<https://www.phytoma.com/la-revista/phytohemeroteca/185-enero-2007/mecanismos-de-deteccion-de-organismos-geneticamente-modificados>

Nota informativa sobre los métodos de análisis para la detección e identificación de organismos modificados genéticamente (OMG) en semillas de algodón, maíz, colza y soja.

[https://www.mapa.gob.es/es/agricultura/temas/biotecnologia/notainformativametodosdeanalisis11-01-2022\\_tcm30-584547.pdf](https://www.mapa.gob.es/es/agricultura/temas/biotecnologia/notainformativametodosdeanalisis11-01-2022_tcm30-584547.pdf)

Organismos modificados genéticamente en el agricultura y la alimentación. Comité Asesor de Ética en la Investigación Científica y Técnica. Fundación española para la Ciencia y la tecnología.

Panorama general de los organismos genéticamente modificados en Colombia y en el mundo: Capacidad nacional de detección. JE Leguizamon Guerrero et al. Rev. Colomb. Biotecnol. Vol. XX No. 2 Julio - Diciembre 2018, 101 – 116

Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. Biotecnología: Detección y Control

[https://www.mapa.gob.es/fr/agricultura/temas/biotecnologia/mejora-genetica/deteccion\\_control.aspx](https://www.mapa.gob.es/fr/agricultura/temas/biotecnologia/mejora-genetica/deteccion_control.aspx)

LGC Group, National Measurement Institute for chemical and bioanalytical measurements.

<https://www.lgcstandards.com/ES/es/search?q=mon810%3Arelevance%3Aitemtype%3ALGCProduct%3Aitemtype%3AATCCProduct%3AcategoryName%3AGMO>

Cuantificación de maíz genéticamente modificado mediante las Técnicas de qPCR y dPCR. Agrociencia, vol. 49, núm. 4, mayo-junio, 2015, pp. 373-394.

**MATERIAL PARA LA PREPARACIÓN DEL TEMA 43**

**IDENTIFICACIÓN DE ESPECIE ANIMAL POR MÉTODOS MOLECULARES:  
CONCEPTO Y TIPO DE MÉTODOS ANALÍTICOS APLICABLES.**

*Este material no tiene carácter oficial, por lo que en ningún caso vinculará al Tribunal Calificador. Constituye, únicamente, un instrumento complementario que servirá de apoyo al opositor para enfocar cada uno de los epígrafes, pero nunca de forma exclusiva ni excluyente. El Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación no se hace responsable del contenido del mismo.*

*Los materiales no serán objeto de actualización constante.*

## **ÍNDICE**

### **1. INTRODUCCIÓN**

### **2. MARCO LEGAL**

2.1. LEGISLACIÓN EUROPEA

2.2. LEGISLACIÓN ESPAÑOLA

### **3. SISTEMAS BASADO EN LA DETECCIÓN DE PROTEINAS.**

3.1. ELECTROFORESIS EN GELES DE POLIACRILAMIDA CON SDS (SDS-PAGE)

3.2. ISOELECTROENFOQUE NATIVO

3.3. TÉCNICAS CROMATOGRÁFICAS

3.4. ESPECTROMETRÍA DE MASAS

3.5. TÉCNICAS INMUNOLÓGICAS

### **4. SISTEMAS BASADOS EN LA DETECCIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS.**

4.1. PCR ESPECIE-ESPECÍFICA

4.2. PCR-RFLP

4.3. FINS

4.4. MICROARRAYS

4.5. CUANTIFICACIÓN MEDIANTE PCR A TIEMPO REAL

## **1. INTRODUCCIÓN**

La identificación de especies de interés comercial está tomando mucha importancia en la industria agroalimentaria para evitar fraudes en el etiquetado de productos procesados. La autentificación de los productos comercializados es un grave problema desde el momento en que se pierden las características externas en el procesamiento del producto haciendo imposible la identificación de la especie de origen. Así mismo, es una necesidad creciente por la práctica de la sustitución de especies de alto valor genético por otros de precio inferior. También en el campo de la detección de especies no autorizadas usadas en la industria alimentaria.

Por poner un ejemplo, en la industria de los productos marinos se estima que cerca de veinticinco mil especies carecen de control en cuanto a su denominación exacta, lo que se presta a un etiquetado fraudulento. En la industria cárnica, la adulteración y la sustitución de la carne con especies no declaradas se ha convertido en un problema no sólo desde el punto de vista económico, sino también en el campo de la salud pública, de los factores éticos y religiosos y la competencia desleal en el mercado.

En definitiva, la creciente preocupación de la sociedad se evidencia en los siguientes aspectos:

- La aparición de la encefalopatía espongiforme bovina que supuso la prohibición en la elaboración de harinas de carne y huesos para la alimentación de los animales.
- Las malas prácticas por parte de algunos productores de alimentos en las que se reemplazaban materias primas de una especie de mayor valor comercial en pescados, carnes o leches por otros de menor valor, sobre todo cuando existen marcadas diferencias de precio o problemas de disponibilidad en el mercado. Un ejemplo claro fue la utilización de carne de caballo en preparados cárnicos de bovino, o la sustitución de atún rojo por el de otra especie de mucho menor valor económico.
- La presencia de productos alimenticios adulterados de gran importancia para ciertos grupos religiosos, como es la presencia de carne de vacuno en preparados cárnicos para el hinduismo o la presencia de carne de cerdo en estos preparados para los colectivos musulmanes o hebreos.
- La presencia de determinados ingredientes que no vienen en el etiquetado y que pueden suponer un grave riesgo de salud para aquellos a los que le son alérgicos.
- El tráfico ilegal de animales o de sus productos pertenecientes a especies protegidas o en peligro de extinción.
- En la determinación de especies cuya captura o cría está sujeta a restricciones como en la captura de peces con restricciones a la talla.
- Muchas especies protegidas, incluidas en la reglamentación CITES, de las que sólo pueden comercializarse ejemplares nacidos en cautividad de parejas de reproductores legalmente reconocidos son sometidas a un verdadero expolio. Este expolio es posible por la dificultad para contrastar el origen genético de muchos animales identificados con CITES fraudulentos. En muchos casos sería suficiente un simple análisis de filiación para demostrar el fraude. Dentro de este ejemplo se incluiría el caso del halcón peregrino (*Falco peregrinus*).

- La asignación de muestras anónimas a determinadas poblaciones animales, que de una manera u otra, empiezan a afectar a numerosas especies de interés cinegético como la perdiz roja, conejo, ciervo, corzo y jabalí, por citar las más emblemáticas. En todos estos ejemplos el problema que se plantea es el de detectar la presencia de genomas foráneos en el genoma de la especie autóctona que va a ser liberado a la naturaleza, fenómeno denominado introgresión. Estas actuaciones afectan a la integridad genética de las especies autóctonas y pueden dar lugar a un deterioro genético de la biodiversidad.
- la identificación de especies es importante para verificar el cumplimiento de las prohibiciones y vedas que establece la ley de caza. La caza furtiva, junto con el comercio de especies protegidas, ha contribuido a poner en peligro la supervivencia de un elevado número de especies de aves.

La necesidad de cumplir con los requerimientos legales impuestos por la Unión Europea hace necesario disponer de técnicas de autenticación muy fiables para los productos agrícolas, pesqueros y ganaderos.

Durante años, la identificación de especie se basaba en la aplicación de métodos de análisis sobre las proteínas. Sin embargo, estos análisis estaban caracterizados por la alta variabilidad en sus resultados (por ejemplo, dependían de la edad del animal) y la degradación que sufrían durante los procesos térmicos en su procesado.

Más recientemente los métodos más aplicados en la identificación de especies en alimentos se basan en la utilización de métodos de análisis sobre el ADN.

Se han incorporado nuevas técnicas como PCR a tiempo real, ya que presenta la ventaja de permitir una identificación en productos donde hay más de una especie, y otras como los microarrays.

## **2. LEGISLACIÓN.**

### **2.1 LEGISLACIÓN EUROPEA**

Diversas crisis alimentarias en la década de los 90, como la crisis de las vacas locas en 1999 o la de las dioxinas, hizo que la Unión Europea emitiera una serie de Reglamentos para controlar la trazabilidad alimentaria.

La libre circulación de alimentos seguros y saludables es un aspecto esencial del mercado interior y contribuye significativamente a la salud y el bienestar de los ciudadanos, así como a sus intereses sociales y económicos. En la ejecución de las políticas comunitarias debe asegurarse un nivel elevado de protección de la vida y la salud de las personas. Sólo puede conseguirse la libre circulación de alimentos y piensos dentro de la Comunidad si los requisitos de seguridad alimentaria y de los piensos no difieren significativamente de un Estado miembro a otro.

Reglamentos como el 178/2002 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 28 de enero, por el que se establecen los principios y los requisitos generales de la legislación alimentaria, se crea la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria y se fijan procedimientos relativos a la

seguridad alimentaria, fueron fundamentales para establecer una cadena alimentaria segura. Con este Reglamento se asentaron las bases en este ámbito a nivel europeo consolidando el papel de los laboratorios como herramienta de soporte al control oficial en el campo de la gestión de riesgos alimentarios.

Con posterioridad aparecieron otros como el Reglamento 1169/2011 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 25 de octubre, sobre la información alimentaria facilitada al consumidor, cuyo objetivo es proteger la salud y los intereses de los consumidores, proporcionándoles la composición exacta de cada alimento, así como la identidad de los productos que los integran.

## **2.2 LEGISLACIÓN ESPAÑOLA**

Ley 11/2001, de 5 de julio, por la que se crea la Agencia Española de Seguridad Alimentaria. La Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición (AESAN) integra y desempeña, en el marco competencial de la Administración General del Estado, las funciones relacionadas con la seguridad alimentaria y la nutrición saludable.

Ley 44/2006, de 29 de diciembre, de mejora de la protección de los consumidores y usuarios.

Real Decreto 44/2021, de 26 de enero, por el que se crea la Comisión de Coordinación entre el Ministerio de Consumo, el Ministerio de Sanidad y el Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, en relación con la Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición.

## **3. SISTEMAS BASADOS EN LA DETECCIÓN DE PROTEÍNAS.**

Como se ha mencionado con anterioridad se pueden aplicar sistemas basados en la detección de proteínas o sistemas basados en la detección de ácidos nucleicos. La selección de la técnica a utilizar va a depender de diversos factores, fundamentalmente del tipo de muestra a analizar, si se trata de un producto fresco, congelado, con un elevado grado de procesado, etc. En el caso de analizar una muestra que ha sido sometida a un tratamiento térmico se suele tener preferencia por una técnica basada en el ADN, debido a la mayor termoestabilidad de la molécula frente a la que presentan las proteínas y a su presencia en todos los tejidos.

Los métodos basados en **proteínas** se utilizan especialmente en **productos frescos o poco procesados** ya que su eficiencia disminuye cuando se trata de productos con un alto grado de calentamiento o secado, como puede ser un proceso de esterilización, en el que se ve afectada la integridad estructural de las proteínas y en consecuencia sus propiedades bioquímicas.

Del mismo modo, la eficiencia de las técnicas de análisis de proteínas disminuye cuando se pretende la diferenciación de productos elaborados a partir de especies filogenéticamente cercanas.

Diferencias entre métodos proteicos y métodos genéticos	Métodos basados en el análisis de proteínas	Métodos genéticos
<b>Ventajas</b>	Rapidez Bajo coste Sencillez  Amplia disponibilidad de datos	Poca cantidad de muestra Permite analizar muestras procesadas y esterilizadas  Elevada sensibilidad Ubicuidad del ADN
<b>Inconvenientes</b>	Dificultad para analizar muestras procesadas. Buen estado de las muestras  Variabilidad de las proteínas dependiendo del tejido	Más lentos y caros Técnica más compleja Personal más especializado

Los métodos de análisis de proteínas utilizados se pueden clasificar en los siguientes grupos:

- Electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS (SDSPAGE).
- Isoelectroenfoque nativo (IEF).
- Métodos cromatográficos
- Métodos de espectrometría de masas
- Métodos inmunológicos

### 3.1. Electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS (SDS-PAGE).

El fundamento de esta técnica radica en la separación de las proteínas en un gel de poliacrilamida en función de su masa molecular.

Se trata de una técnica sencilla, barata y no requiere un conocimiento previo de la muestra. Es posible su aplicación en productos que hayan sufrido un proceso de condiciones desnaturizantes, como el aplicado a productos cocinados. El inconveniente radica en que no es posible su utilización en muestras mezcla y por lo general, no es muy exacto para la identificación de especies filogenéticamente próximas.

### 3.2. Isoelectroenfoque nativo (IEF).

Con esta técnica se consigue la separación de las proteínas en función de su punto isoeléctrico. Se trata de una técnica ampliamente utilizada en la identificación de especies de pescado.

A pesar del amplio uso, presenta el inconveniente de no ser posible su utilización con proteínas que hayan sufrido cambios en su estructura como, por ejemplo, después de un procesado térmico.

Es el caso de identificación a través de metodologías proteómicas de especies de peces procedentes de pesca extractiva, la clasificación diferencial de diez especies comerciales estrechamente relacionadas de la familia Merlucciidae, o el análisis de los péptidos y las proteínas constituyentes del extracto soluble de quesos preparados con leche de vaca, oveja o cabra.

### **3.3 Métodos cromatográficos**

Los métodos electroforéticos son relativamente lentos, requieren varios pasos previos a la visualización del gel (teñido, lavado, etc.) y el resultado final depende mucho del tipo de gel, buffer, reactivos y temperatura ambiente. Una alternativa a la electroforesis son las técnicas cromatográficas. Dentro de éstas los métodos más habituales en la separación de proteínas y péptidos son los que utilizan cromatografía líquida de alta eficiencia en fase reversa (RP-HPLC). Empleada inicialmente en la identificación de especies filogenéticamente alejadas.

A pesar de que existen algunos trabajos de diferenciación a nivel de familia sigue sin ser aplicable a muestras que hayan sufrido un tratamiento térmico.

### **3.4. Espectrometría de masas**

Se trata de una técnica analítica de alta sensibilidad, pero la interpretación de los espectros de masas, a partir de los cuales es posible la obtención de la secuencia aminoacídica, es compleja y, en la mayor parte de los casos, es necesario contrastar la información obtenida con la recogida en bases de datos de proteínas previamente caracterizadas.

Ha sido posible detectar especies cárnicas, con límites de detección próximos al 1%, mediante la detección de péptidos específicos, tras digestión de miosina con tripsina, por espectrometría de masas MALDI-TOF.

### **3.3 Métodos inmunológicos**

Todas las técnicas inmunológicas se fundamentan en la interacción antígeno-anticuerpo, lo que les confiere especificidad y sensibilidad. Entre las técnicas inmunológicas utilizadas en la identificación de especies en alimentos se encuentran la **inmunolectroforesis, la inmunodifusión, el Western blot y distintas variantes de la técnica ELISA.**

Con diferencia, son las más empleadas en los últimos años en la autenticación de alimentos, ya que pueden utilizarse en **productos sometidos a tratamientos térmicos elevados.**

Sin embargo, los inmunoensayos pueden ser poco efectivos con especies muy próximas filogenéticamente y se requiere del desarrollo, preferiblemente, de anticuerpos monoclonales contra la proteína específica de interés, ya que los anticuerpos policlonales pueden dar lugar a reacciones cruzadas inespecíficas.

La especificidad de los anticuerpos no siempre permite diferenciar entre especies muy próximas filogenéticamente ya que la especificidad de las regiones antigénicas es menor cuanto mayor sea el parentesco filogénico. Al obtener anticuerpos frente a una proteína que actúa como antígeno, esos anticuerpos reaccionarán positivamente al ponerse en contacto con esa proteína, pero también darán reacciones positivas al ponerlos en contacto con proteínas de otras especies filogenéticamente próximas. La intensidad aumentará cuanto mayor sea la semejanza entre las proteínas, y ésta cuanto mayor sea el parentesco entre las especies.

Además, la identificación depende de la disponibilidad de anticuerpos específicos para esa especie. Especies no habituales, o alimentos en los que la variedad posible de especies es muy elevada, como ocurre con los alimentos derivados de la pesca, dificultan la elaboración de sistemas de identificación económicamente viables.

La detección depende de la conservación de la estructura del antígeno. Esta es una limitación importante puesto que en alimentos procesados, sometidos frecuentemente a etapas de esterilización por calor, las proteínas pueden perder la conformación requerida para la unión del anticuerpo. Por lo tanto, para que sea efectivo con productos cárnicos procesados, enlatados, etc., es necesaria la selección de péptidos resistentes a la desnaturalización por calor. En la actualidad existen varios kits comerciales que permiten la identificación inmunológica de las especies más comunes de la industria cárnica y láctea, con sistemas capaces de funcionar incluso con muestras calentadas a 100°C, pero no con muestras calentadas a temperaturas superiores.

La inmunodetección ha encontrado aplicación sobre todo en la detección de especies de mamíferos y aves (Bovino, oveja/cabra, pollo), y en particular en la industria láctea.

#### **4. SISTEMAS BASADOS EN LA DETECCIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS.**

En cuanto a las técnicas de análisis de ácidos nucleicos, existe una amplia gama de técnicas desarrolladas en los últimos años con el objetivo de identificar especies en las muestras a analizar. Las técnicas genéticas de identificación están basadas en la **detección de secuencias de ADN únicas para cada especie.**

La molécula de ADN ofrece una serie de ventajas cuando se compara con los marcadores proteicos. En primer lugar, la información genética que contienen los tipos celulares de un individuo es idéntica y por tanto la identificación es independiente del tejido. En cambio, las proteínas son el resultado de la expresión génica, que puede ser distinta según el tejido, la etapa del desarrollo, el ambiente e incluso de la época del año.

Otra ventaja deriva de la **degeneración** del código genético, por la existencia de más codones que aminoácidos. El que un determinado aminoácido pueda estar codificado por más de un triplete, otorga al ADN un carácter más informativo debido a su mayor variabilidad. En la identificación molecular de especies es importante tener en cuenta que las regiones de ADN seleccionadas deben acumular mutaciones a una velocidad suficiente como para que especies estrechamente relacionadas presenten secuencias de nucleótidos diferentes, permitiendo su diferenciación, pero a su vez, que esta velocidad sea lo suficientemente lenta como para que tales diferencias no aparezcan dentro de la misma especie.

Otra de las características del ADN es su **estabilidad** a altas temperaturas. En los procesos de elaboración de conservas en los que se alcanzan elevadas presiones y temperaturas, las proteínas se desnaturalizan y se degradan mientras que el ADN sufre fragmentación, reduciéndose hasta un tamaño medio de 100-200 pb. Aunque la molécula de ADN se fragmenta debido a estos procesos, la información de la secuencia de los fragmentos sigue siendo útil para la identificación siempre que éstos tengan la longitud suficiente para ser analizados. La práctica totalidad de los sistemas de identificación de especies en alimentos basados en ADN utilizan la amplificación mediante PCR, ya que permite detectar cantidades muy pequeñas de ADN a partir de los materiales más diversos. En general se considera que, en una misma muestra procesada, las proteínas pierden antes su capacidad de identificación por métodos inmunológicos que el ADN su viabilidad para ser amplificado por PCR. Otra de las ventajas importantes del uso de ADN, es que los datos de secuencia pueden analizarse atendiendo a distintos niveles de especificidad desde grupos o especies hasta incluso variantes o modificaciones genéticas de individuo.

Actualmente, debido al mayor conocimiento del genoma de muchos organismos y la a disponibilidad de mejoras en los métodos de amplificación, los sistemas de detección e identificación basados en ADN han tenido un desarrollo importante, complementado o sustituyendo en algunos casos las técnicas basadas en proteína. Todas las técnicas basadas en ADN tienen ventajas e inconvenientes particulares dependiendo de las características del análisis. Entre las cualidades de estos sistemas, se ha demostrado que los métodos basados en ADN consiguen la detección con gran precisión y poder de resolución, se logra con facilidad la adaptación de los test a aplicaciones para otras especies y permite la incorporación de nuevas tecnologías surgidas de la investigación genómica. Entre las desventajas se encuentra su coste económico, aunque cada vez van siendo más accesibles, y la relativa facilidad de contaminación de las muestras, de forma que ADN contaminante puede ser amplificado fácilmente dando lugar a falsos positivos. Igualmente, posibles contaminaciones con DNAsas pueden afectar a los resultados. Otras posibles desventajas pueden proceder de la necesidad de cualificación del personal en las técnicas, tanto para su ejecución como para la interpretación de resultados. La selección de la herramienta molecular dependerá por lo tanto del tipo de problema por resolver, del coste de la técnica, del número de muestras a analizar y de la disponibilidad de medios materiales y humanos.

Por lo tanto la elección de unas técnicas u otras depende de varios factores, como el tipo de muestra, el coste de la técnica, el equipamiento necesario, la reproducibilidad, la fiabilidad, la

viabilidad en productos comerciales, la aplicación en matrices complejas o en mezclas de especies, etc.

Las técnicas que en la última década se han utilizado en el 90% de los trabajos de investigación de identificación de especies en alimentos son:

- PCR Especie-específica
- PCR-RFLP
- FINS
- Microarrays
- Cuantificación mediante PCR a tiempo real

#### **4.1. PCR ESPECIE-ESPECÍFICA**

Esta técnica consiste en el diseño de cebadores específicos que permitan amplificar únicamente el ADN de la especie objetivo, es decir, especie para la cual han sido diseñados los cebadores, de manera que, al realizar una PCR con dichos cebadores, únicamente existirá amplificación si está presente ADN de dicha especie.

Para tal fin es necesario conocer la secuencia diana en la que se van a diseñar los cebadores, tanto en la especie de interés como en otras especies filogenéticamente cercanas y que existan diferencias en la secuencia correspondiente a la unión de los cebadores entre la especie objeto y el resto de las especies.

Esta técnica permite la posibilidad de combinar varios cebadores especie-específicos en una misma reacción, PCR múltiple, permitiendo la identificación de varias especies a la vez.

La región del ADN a amplificar debe estar limitada por oligonucleótidos definidos que hibridan con la molécula diana. Esto significa que la secuencia de ADN debe ser ya conocida, o al menos predecible con un 90% de certeza en las regiones donde el cebador hibrida. El grado de variación genética a lo largo del genoma de una especie no es constante, por lo que su identificación molecular debe dirigirse a áreas del genoma que sean suficientemente significativas para diferenciarlas de otras especies cercanas.

Los **genes mitocondriales** son idóneos para la identificación de especies debido a que la tasa de mutación del ADN mitocondrial de los animales es superior a la del ADN nuclear. Esto lo hace más útil para analizar diferencias de los individuos dentro de las especies y de especies estrecha o moderadamente relacionadas. No obstante, la menor tasa mutacional que presentan los genes estructurales nucleares no impide que su análisis permita definir eficientemente cebadores útiles para distinguir entre especies. De hecho, el uso de **genes nucleares** como marcadores complementarios de los genes mitocondriales permite diseñar sistemas de cebadores y sondas comunes para un mayor número de especies y aumentar tanto la versatilidad como la seguridad de los diagnósticos.

Sin embargo, el hecho de que la proporción de ADN mitocondrial es mayor (aproximadamente 1000 X copias de ADN nuclear) en las muestras a analizar, ha favorecido hasta ahora el uso de ADN mitocondrial en sistemas de identificación de especies. Una alternativa al ADN

mitocondrial es el uso de regiones de ADN nuclear que contienen secuencias repetidas, generalmente procedentes de retrotransposones, SINES y LINES (short y long interspersed nuclear elements), los cuales se encuentran en grandes cantidades en el ADN nuclear de eucariotas y conjugan un elevado número de copias. Estas características los hacen útiles para detectar pequeñas cantidades de ADN por PCR, y debido a su localización nuclear, se evita la variabilidad asociada al número de mitocondrias por célula dependiente de tejido.

Los **genes mitocondriales cytB y la COXI** son los más utilizados para estudios de filogenia ya que disponen de regiones conservadas, sobre las que se pueden diseñar cebadores “universales” que pueden usarse para la amplificación de un amplio número de especies, y regiones variables, lo que permite la identificación a nivel de especie por secuencia, y el diseño de cebadores para la amplificación específica de especies. Sin embargo, en el caso de la identificación de variedades, orígenes geográficos o de individuos, resultan más apropiados por su mayor variabilidad la **región de control D-loop** del ADN mitocondrial, o **secuencias de ADN nuclear tales como microsatélites o polimorfismos** en genes asociados a alguna característica diferenciadora de la variedad o raza. También ha sido utilizado en varias ocasiones la combinación tRNAGlu y cytB del genoma mitocondrial como marcador diferencial de vertebrados mediante RFLP.

Se trata de una técnica de relativo bajo coste, que necesita poco equipamiento, pero con el requerimiento de contar con una base de datos de secuencias nucleotídicas a partir de las cuales se pueda realizar el diseño de los cebadores.

Esta técnica se ha utilizado en la identificación de una amplia gama de especies, tanto en productos frescos como en alimentos procesados.

#### **4.2. PCR-RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism)**

La técnica que consiste en la digestión de un producto de PCR con enzimas de restricción se conoce como **PCR-RFLP**. Las enzimas de restricción reconocen y cortan de forma específica secuencias de entre 4 y 8 nucleótidos dando lugar a fragmentos de ADN que, separados en un gel de agarosa o poliacrilamida mediante electroforesis, presentan un patrón de bandas característico.

Con un conocimiento previo de la secuencia de la especie que se quiere determinar, se seleccionan las enzimas de restricción adecuadas para que se produzca un **patrón de bandas especie-específico** que se distinga del patrón de otras especies.

Si existen variaciones de la secuencia debido a cambios puntuales de nucleótidos o bien inserciones, deleciones o traslocaciones, el patrón de corte puede variar y por lo tanto la digestión del ADN con enzimas de restricción da lugar a fragmentos cuyo número o tamaño pueden ser distinto entre individuos, poblaciones, especies u otros niveles taxonómicos.

Algunos de los inconvenientes que se plantean con esta técnica es que la diferencia entre los tamaños de los fragmentos ha de poder resolverse mediante electroforesis, bien en geles de

agarosa o poliacrilamida. Esta técnica puede dar lugar a errores de identificación si existe una variabilidad intraespecífica elevada, ya que sería posible localizar variaciones en la secuencia de las dianas de las enzimas que origina en un patrón que no se corresponde con el esperado.

La aplicación de esta técnica en productos con un alto grado de procesamiento podría verse limitada a utilizar únicamente productos de PCR pequeños y por lo tanto disminuir su capacidad resolutive.

Por otro lado, si en el producto analizado están presentes dos o más especies distintas, los patrones electroforéticos obtenidos pueden ser difíciles de interpretar.

En este caso también es necesario, a la hora de diseñar un sistema de identificación, un conocimiento previo de la secuencia de la especie de interés, así como de especies próximas.

Dentro de estas técnicas también podemos encontrar la denominada **PCR-SSCP (Single Strand Conformation Polymorphism)**. Al igual que la técnica de PCR-RFLP se parte de un producto de PCR que se desnatura y se hace migrar mediante electroforesis en un gel de poliacrilamida. Cada hebra de ADN desnaturada adopta una estructura secundaria en el gel que dependerá de su estructura primaria, es decir, de su secuencia. Pequeñas variaciones de secuencia, incluso de un único nucleótido, dan lugar a cambios en la estructura secundaria y por lo tanto en el patrón electroforético.

Aunque en principio con esta metodología no es necesario un conocimiento previo de la secuencia, excepto en la zona de diseño de los cebadores, sí que es necesaria la migración de patrones de especies de referencia al mismo tiempo que las muestras problema, dado que dependiendo de las condiciones electroforéticas el patrón resultante puede variar.

Con este método se ha podido identificar carne de especies de codorniz, faisán, perdiz, pintada, urogallo, becada, paloma torcaz y zorzal, para diferenciarlo de especies como el pollo, pavo, pato de berbería y oca. Para ello, se seleccionó como marcador genético el gen que codifica para la **subunidad 12S del ARNr**. Los genes mitocondriales, y en concreto la región 12S, cumplen muchas de las cualidades exigidas para el desarrollo de las técnicas de identificación de especies.

#### **4.3. FINS (Forensically Informative Nucleotide Sequencing)**

El nombre FINS (Forensically Informative Nucleotide Sequencing) hace referencia a un procedimiento que incluye una **amplificación** del ADN mediante PCR, seguida de la **secuenciación** y el posterior **análisis de las secuencias** nucleotídicas para la identificación de especies.

La secuencia problema se compara con secuencias de referencia, a través de programas informáticos de filogenia molecular, en los que se aplican modelos de sustitución nucleotídica y estimación de distancias génicas para obtener los correspondientes **árboles filogenéticos** en los que la especie problema aparece agrupada con el grupo taxonómico al que pertenece.

Un requisito fundamental para la aplicación de esta técnica es el tener acceso a una base de datos de secuencias de referencia. Una de las ventajas a este respecto es la gran cantidad de secuencias disponibles en bases de datos públicas internacionales, como puede ser el **GenBank**.

Otro punto a considerar para realizar una buena identificación es la selección del marcador molecular a emplear. En el proceso de selección ha de tenerse en cuenta la variabilidad nucleotídica.

Si el objetivo es la identificación de especies filogenéticamente cercanas ha de emplearse un marcador con una alta variabilidad nucleotídica (variabilidad interespecífica) que nos permita diferenciar especies próximas, pero sin llegar a presentar variabilidad entre individuos de la misma especie (variabilidad intraespecífica) que impida una identificación correcta.

La mayor parte de los marcadores utilizados son fragmentos de **ADN mitocondrial**, ya que éste ha sido ampliamente utilizado en estudios filogenéticos previos a la aplicación de metodologías de identificación de especies en productos comerciales, al igual que existe una gran cantidad de secuencias mitocondriales accesibles en el Genbank.

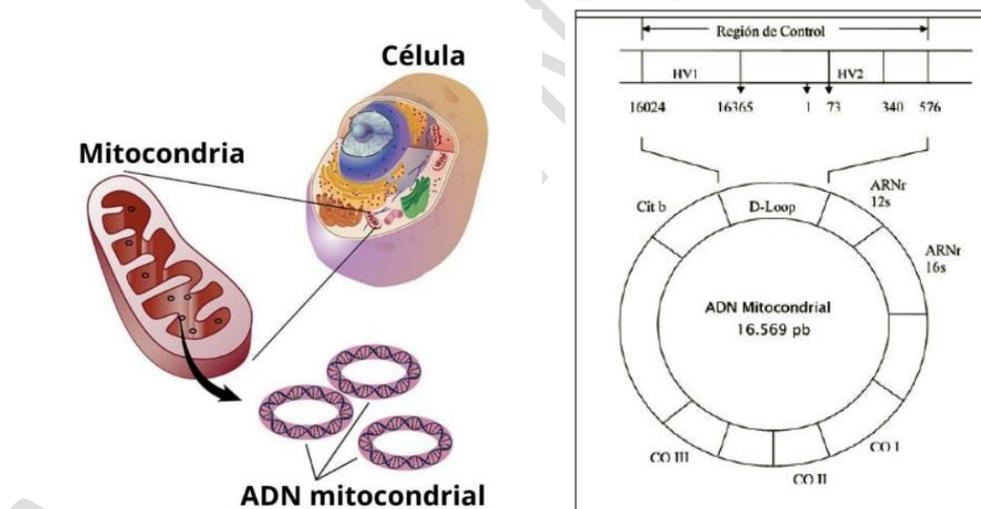


Figura 1. Estructura de ADN mitocondrial

Entre las características del ADN mitocondrial destaca su pequeño tamaño, entre 16.000 y 17.700 pares de bases en los vertebrados (codifica para 13 proteínas, 2 ARN ribosómicos y 22 ARN transferentes), es haploide, con escasa o nula recombinación, en la mayoría de las especies de **herencia exclusivamente materna** y con un porcentaje de sustitución nucleotídica mayor que el del ADN nuclear. Además, existe un gran número de taxones para los cuales están disponibles las secuencias de genes mitocondriales en bases de datos como el GenBank.

Los **genes mitocondriales** más utilizados en la identificación de especies son el **citocromo b**, **citocromo oxidasa I**, **16S ARNr** y **la región control**. Dentro de los **nucleares**, los más utilizados son el **gen del 18 S ARNr** y **la región ITS1**.

Esta técnica ha sido empleada, para llevar a cabo estudios de posibles fraudes en atunes rojos, autenticación genética de las especies thynnus, albacares, alalunga y obesus dentro del género Thunnus, así como para el estudio de poblaciones e identificación de las zonas de pesca de especies como las merluza o el bacalao.

En todos estos casos, las secuencias de las muestras problema se comparan con secuencias estándar de las diferentes especies, se construye un árbol filogenético y se asignan porcentajes de similitud entre las diferentes secuencias. El programa informático usado como herramienta en este caso es MEGA. Este software gratuito es una herramienta capaz de realizar alineamientos de las secuencias así como construir árboles filogenéticos.

Para la identificación genética de especies del género Thunnus, se dispone de parejas de cebadores para la amplificación de 3 regiones de ADN mitocondrial (Citocromo B, Región Control y Citocromo oxidasa I) y parejas de cebadores para la amplificación de dos regiones de ADN nuclear (ITS1 y Tmo-4C4R).

El análisis para la identificación de especies de túnidos incluye la amplificación de una región de ADN mitocondrial denominada Citocromo B (Cyt B), Citocromo Oxidasa (COI) o la denominada Región Control (CSBDH).

#### **4.4. MICROARRAYS**

Los microarrays de ADN diseñados para la identificación de especies consisten en unos pequeños soportes de superficie de vidrio o silicio, similares a un portaobjetos, en los que es posible inmovilizar, a modo de microgotas ("spots"), sondas (pequeños oligonucleótidos) especie-específica. Por lo general contiene varias sondas específicas de una determinada especie.

El proceso de identificación se inicia realizando una PCR con cebadores universales que permitan obtener producto de PCR de un amplio rango de especies.

Durante la reacción de PCR o posteriormente se realiza el marcaje de los productos con una molécula fluorescente. A continuación, se aplican los productos de PCR desnaturalizados a los "spots" del microarray.

Únicamente existirá hibridación entre el producto de PCR añadido y la sonda inmovilizada en aquellos "spots" que tengan las sondas especie-específicas de la especie del producto de PCR. Después de realizar una serie de lavados se detecta la señal de fluorescencia únicamente en los "spots" donde ha habido hibridación, ya que en el resto de "spots" el producto de PCR se ha eliminado por los lavados. Esta técnica permite realizar un rastreo de un gran número de muestras a la vez.

El proceso del diseño del microarray es largo y requiere que una comprobación de la especificidad de las sondas para evitar falsos positivos. De igual modo, se necesita una gran información acerca de las secuencias de ADN de la especie o especies a identificar para realizar el diseño de las sondas. Comparada con otras técnicas de ADN de identificación es más laboriosa y costosa.

Por su capacidad, este tipo de tecnología es más adecuada para la discriminación de especies en los casos en los que la variabilidad es muy elevada, como es el caso de las especies procedentes de pesca extractiva. Se han descrito ADN microarrays de oligonucleótidos para la identificación de 11 a 50 especies de peces de importancia comercial. El sistema utilizaba una estación automatizada para el procesamiento de las placas de array, lo que permitía realizar la hibridación y escaneo de la matriz en 1 hora.

#### **4.5. CUANTIFICACIÓN MEDIANTE PCR TIEMPO REAL**

La identificación del origen de las distintas materias primas que integran los piensos y otros productos alimenticios tiene una gran importancia para garantizar su trazabilidad. El Reglamento (CE) nº 178/2002 (Parlamento Europeo, 2002) establece desde enero de 2005 la obligatoriedad de que todas las empresas alimentarias y de piensos dispongan de un sistema de trazabilidad que permita garantizar la seguridad de los productos comercializados. Además, la prohibición de la Unión Europea de alimentar a rumiantes y otros animales de abasto con proteínas derivadas de animales, como medida preventiva para evitar la propagación de la Encefalopatía Espongiforme Bovina (Comisión de las Comunidades Europeas, 2002), ha potenciado la búsqueda y desarrollo de técnicas analíticas que permitan la detección e identificación de tejidos animales en piensos.

Por otro lado, la existencia de normas de etiquetado que obligan a declarar las cantidades de determinados ingredientes en alimentos (Directiva de la UE 2000/13/E) hace imprescindible que se desarrollen técnicas que permitan, no sólo la identificación, sino también la cuantificación de dichos ingredientes.

Los sistemas de PCR en tiempo real se caracterizan por detectar la amplificación de la secuencia diana a medida que se produce. La principal ventaja del uso del PCR en tiempo real es la posibilidad de cuantificar el ADN de partida gracias al registro del aumento de fluorescencia por la hidrólisis de la sonda<sup>1</sup> en el transcurso de los ciclos de PCR.

Este método es empleado para la identificación y cuantificación de ingredientes o materias primas en alimentos y piensos, como por ejemplo la detección y cuantificación de ADN bovino en piensos de origen vegetal mediante el diseño de los cebadores de especie-específicos que permita amplificar los fragmentos seleccionados.

Otro ejemplo sería la identificación y cuantificación de músculo de caballa en surimi o la cuantificación de surimi de abadejo de Alaska en productos comerciales.

---

<sup>1</sup> Consultar los tipos de sondas en el tema 31 de PCR

## BIBLIOGRAFIA

Ministerio de consumo. Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición.

[https://www.aesan.gob.es/AECOSAN/web/seguridad\\_alimentaria/seccion/legislacion\\_seg\\_alimentaria.htm](https://www.aesan.gob.es/AECOSAN/web/seguridad_alimentaria/seccion/legislacion_seg_alimentaria.htm)

Identificación y Cuantificación de Especies del Género *Merluccius* Mediante la Utilización de PCR a Tiempo Real. Ana Cristina Sánchez Díaz.

<https://www.megasoftware.net/>

Tesis Doctoral, Identificación y cuantificación de especies en productos alimenticios mediante PCR en tiempo real, 2013.

PCR en tiempo real para la detección cuantitativa de ADN bovino en piensos vegetales. Revistas científicas UCM, RCCV. (ISSN 1988-2688, RCCV Vol. 1 (2).2007.

MATERIAL NO OFICIAL

**MATERIAL PARA LA PREPARACIÓN DEL TEMA 44**

**TEMA 44. ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN Y LEGISLACIÓN APLICABLE.  
GESTIÓN DE PROCEDIMIENTOS Y PROYECTOS.**

*Este material no tiene carácter oficial, por lo que en ningún caso vinculará al Tribunal Calificador. Constituye, únicamente, un instrumento complementario que servirá de apoyo al opositor para enfocar cada uno de los epígrafes, pero nunca de forma exclusiva ni excluyente. El Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación no se hace responsable del contenido del mismo.*

*Los materiales no serán objeto de actualización constante.*

## **ÍNDICE**

### **1. INTRODUCCIÓN**

### **2. PRINCIPIO DE LAS 3 R's**

2.1. PRINCIPIO DE REEMPLAZO

2.2. PRINCIPIO DE REDUCCIÓN

2.3. PRINCIPIO DE REFINAMIENTO

### **3. LEGISLACIÓN APLICABLE**

### **4. GESTIÓN DE PROCEDIMIENTOS Y PROYECTOS**

4.1. CLASIFICACIÓN DE PROYECTOS

4.2. AUTORIZACIÓN DE LOS PROYECTOS

4.3. INFORMACIÓN Y TRANSPARENCIA

4.3.1. Resúmenes no técnicos

4.3.2. Informes estadísticos

MATERIAL NO OFICIAL

## **1. INTRODUCCIÓN**

La relación entre el ser humano y los animales ha sido estrecha desde el inicio de la domesticación. Sin embargo, en los últimos años, los parámetros que ha regulado esta relación han variado, apareciendo aspectos como bienestar animal, enriquecimiento ambiental, angustia o punto final humanitario que con anterioridad no estaban bien definidos.

Todos estos aspectos se han integrado en una sociedad cada vez más demandante de transparencia e información en cuanto a esta relación con los animales. Los poderes públicos, como responsable de dar respuesta a esta demanda, ha creado un marco normativo que regula todos estos aspectos, desde su manejo y producción, hasta su transporte y sacrificio. Los animales utilizados con fines experimentales no escapan de esta regulación siendo en la actualidad uno de los sectores con grandes cambios legislativos en los últimos años.

Toda norma relacionada con los animales de experimentación se fundamenta en un axioma: eliminar el uso de animales con fines científicos incluida la docencia. Sin embargo, aunque se ha avanzado en este fin, todavía se está lejos de lograrlo. Por tanto, es esencial, que mientras que esto se consigue, toda acción que sea realizada con animales en la experimentación debe estar perfectamente regulada y controlada por órganos competentes en esta materia y basada en el cumplimiento del llamado **principio de las tres erres**, establecidos por Russell y Burch en 1959 de **Reemplazo, Reducción y Refinamiento** y que representa el pilar por el que se cimenta toda normativa sobre bienestar animal en animales de experimentación.

## **2. PRINCIPIO DE LAS 3 R's**

### **2.1. PRINCIPIO DE REEMPLAZO**

Este principio consiste en evitar la utilización de animales en experimentación si existen métodos alternativos "in vitro" disponibles que permitan abordar dicha experimentación alcanzando los mismos objetivos.

En muchos casos, en Biología y Biomedicina, el reemplazo total no es posible (Ej; generación de un animal modificado genéticamente, eficacia vacunal en la especie de destino, etc.) mientras que en otras ocasiones se han encontrado métodos alternativos eficaces que sustituyen el uso del método "in vivo"(Ej; comprobar la toxicidad general de determinados compuestos en cultivos celulares, determinación de la virulencia de una determinada cepa de influenza aviar con fines diagnósticos y epidemiológicos por medio de métodos moleculares en vez de valorar el índice de virulencia mediante la administración de la muestra en pollitos, sistemas informáticos con fines formativos...).

La búsqueda de métodos alternativos en los proyectos científicos es uno de los pasos esenciales a realizar cuando se quiere poner en marcha un proyecto de investigación.

## 2.2. PRINCIPIO DE REDUCCIÓN

Este principio consiste en la menor utilización posible de animales que permita obtener conclusiones significativas del experimento. Este principio no debe confundirse con una simple reducción del número de animales si la variabilidad del experimento requiere el uso de un número mayor.

En este principio, también se debe incluir el concepto de repetición innecesaria de experimentos con animales por lo que se hace necesario el obtener la mayor información posible de cada experimento y compartir estos resultados con el resto de la comunidad científica.

## 2.3. PRINCIPIO DE REDUCCIÓN

Este principio se basa en la utilización de los métodos más avanzados y optimizados permitiendo que el dolor y sufrimiento del animal sea el mínimo posible. La aplicación de anestesia o analgesia en cualquier intervención sencilla, la formación continuada del personal o el uso de métodos telemétricos para la medición de parámetros fisiológicos en un animal son buenos ejemplos de refinamiento animal.

## 3. LEGISLACIÓN APLICABLE

Durante muchos años, la experimentación animal estuvo regulada por la Directiva 86/609/CEE. Sin embargo, no conseguía armonizar los criterios que debían regular el bienestar animal en la experimentación animal en los distintos países miembros de la UE.

El Tratado de Funcionamiento de la Unión Europea (TFUE) incluye en su artículo 13, la obligación de la Unión y de los Estados miembros de tener plenamente en cuenta el bienestar de los animales cuando formulen y apliquen algunas políticas, tales como la política de investigación, de desarrollo tecnológico y de mercado interior.

Por otra parte, la Comisión Europea, a través de la **Recomendación 2007/526/CE**, de 18 de junio de 2007, estableció las directrices relativas al alojamiento y al cuidado de los animales utilizados para experimentación y otros fines científicos que, por otra parte, se había adoptado en el ámbito del Consejo de Europa como **Apéndice A del Convenio Europeo sobre la protección de los animales vertebrados utilizados con fines experimentales u otros fines científicos (ETS 123)**.

En consonancia con el TFUE y con los nuevos avances científicos en los conocimientos sobre la percepción del dolor en los animales y la búsqueda de un mercado único real en esta materia han hecho que la Directiva 86/609/CEE fuese derogada por la que está actualmente en vigor, **la Directiva 2010/63/UE relativa a la protección de los animales utilizados para fines científicos**.

La nueva directiva ha supuesto un importante avance en materia de bienestar animal, no solo porque adapta los requisitos generales mínimos a los avances científicos, sino también porque

amplía el ámbito de aplicación de las normas de protección a los cefalópodos y a determinadas formas fetales de los mamíferos, y porque establece como principio general la promoción e implementación del «principio de las tres erres», es decir el reemplazo, la reducción y el refinamiento de los procedimientos, fomentando el uso de métodos alternativos a la experimentación con animales vivos.

Esta Directiva 2010/63/UE ha sido traspuesta a nuestro ordenamiento jurídico mediante el **Real Decreto 53/2013 de 1 de febrero por el que se establecen las normas básicas aplicables para la protección de los animales utilizados en experimentación y otros fines científicos, incluida la docencia**, y que deroga al Real Decreto 1201/2005, trasposición de la Directiva del año 86.

El RD 53/2013 intenta regular todos aquellos elementos que intervienen en la experimentación animal determinando que **solo se podrán utilizar animales cuando su uso esté justificado por la finalidad que se persigue** valorando la oportunidad siempre en términos de sus potenciales beneficios.

Los elementos que intervienen en todo proyecto de investigación y por tanto regulados por la normativa mencionada, donde son utilizados, criados o suministrados los animales con fines científicos o de docencia los podemos agrupar en tres grandes apartados: los animales utilizados en los proyectos, las instalaciones que alojan estos animales, el personal que trabaja con ellos y la gestión de los proyectos donde están incluidos<sup>1</sup>.

#### A. LOS ANIMALES

El Real Decreto aplica a todos los animales utilizados **en procedimientos** entendiendo como tal, a la utilización, tanto invasiva como no invasiva, de un animal con fines experimentales u otros fines científicos, cuyos resultados sean predecibles o impredecibles, o con fines educativos siempre que dicha utilización pueda causarle al animal un **nivel de dolor, sufrimiento, angustia o daño duradero equivalente o superior al causado por la introducción de una aguja** conforme a las buenas prácticas veterinarias. Por lo tanto, cualquier acción que produzca en un animal un dolor *equivalente o superior* al causado por la introducción de una aguja es considerado como procedimiento y entra en el ámbito de este Real Decreto.

Asimismo, se considera procedimiento cualquier intervención que de forma intencionada o casual provoque, o pueda provocar, el nacimiento de un animal, la eclosión de un huevo o la creación y mantenimiento de una línea de animales modificados genéticamente en las condiciones de dolor, sufrimiento, angustia o daño duradero como se ha citado anteriormente<sup>2</sup>.

Los animales que el presente RD incluye son los siguientes:

- los animales vertebrados no humanos vivos incluidos las larvas autónomas para su alimentación,

<sup>1</sup> Se hablará de este apartado en el punto 4 del tema.

<sup>2</sup> No se considera procedimiento la eutanasia de los animales cuando se realiza con el único fin de utilizar sus órganos o tejidos.

- los fetos de mamíferos a partir del último tercio de su desarrollo normal,
- y los cefalópodos vivos.

El articulado de este RD se aplicará asimismo a los animales que se encuentran en una fase de desarrollo anterior si se va a permitir que viva más allá de esa fase de desarrollo y como resultado de los procedimientos realizados sea probable que padezca dolor, sufrimiento, angustia o daño duradero después de haber alcanzado dicha fase de desarrollo.

El RD establece en su anexo I que todas las especies animales enumeradas en él, para poder ser utilizadas en procedimientos, deben estar criadas para tal fin. Para las especies no enumeradas en este anexo I será el órgano competente quien autorizará su uso si está científicamente justificado. En este punto remarca la prohibición de usar animales de especies amenazadas, de determinados primates como los gorilas, de animales capturados en la naturaleza o de animales asilvestrados y vagabundos de especies domésticas, siempre que no esté claramente justificado científicamente y previa autorización expresa del órgano competente.

Todos los animales incluidos en los procedimientos deben estar debidamente registrados e identificados, anotando en cada momento cada acción que sobre ellos se realice.

#### B. LAS INSTALACIONES.

El segundo elemento que la normativa regula son las instalaciones que críen, mantengan, suministren o usen animales de experimentación. Todas estas instalaciones deben estar debidamente registradas antes de iniciar su actividad. Esto significa que poseen todos los medios necesarios y el personal suficiente in situ para preservar el bienestar animal de las especies que alberguen. Distingue la norma entre tres tipos de instalaciones dependiendo de su finalidad:

- Instalaciones de cría. La normativa define **al criador** a cualquier persona física o jurídica que críe animales de las especies incluidas en el anexo I con el fin de utilizarlos en procedimientos o para utilizar sus tejidos u órganos con fines científicos, así como cualquier persona que críe animales de otras especies principalmente con estos fines, con o sin ánimo de lucro.
- Instalaciones de suministradores, entendiendo como tal a cualquier persona, distinta del criador, que adquiera o mantenga animales con el fin de que éstos se utilicen en procedimientos o de que sus tejidos u órganos se utilicen con fines científicos, y suministre dichos animales con alguno de estos fines, con o sin ánimo de lucro.
- Instalaciones de usuarios definidos como cualquier persona que utilice animales en procedimientos, con o sin ánimo de lucro.

Es necesario pedir solicitud a la autoridad competente para poder realizar cada una de las actividades y la autorización debe renovarse cada 10 años.

Además, el RD en su anexo II determina las condiciones que deben reunir las instalaciones para el mantenimiento del macro y microambiente de los animales. Así regula aspectos como la humedad, la temperatura, el ruido, la intensidad lumínica, por un lado, y el enriquecimiento ambiental, la socialización o las dimensiones de los habitáculos por otro lado.

### C. EL PERSONAL.

De manera similar a las instalaciones, el personal que trabaje en instalaciones donde se críen, mantengan o utilicen animales de experimentación debe estar debidamente capacitado para preservar el bienestar de los animales que manejen. La normativa establece que serán los órganos competentes de cada CCAA quienes acreditarán al personal de los animalarios mediante:

- Convalidación de los reconocimientos previamente adquiridos por histórico/experiencia conforme al RD anterior 1201/05, es decir, todo el personal con capacitación reconocida previa la conservará también con este RD.
- Nueva adquisición de la capacidad mediante una formación oficial en esta materia, reconocida y acreditada por el órgano competente de la CCAA y acompañada para ciertas funciones de una parte teórica llamada "**Trabajo bajo supervisión**"<sup>3</sup> o bien de una formación previa en estudios superiores, como biológicas, ciencias veterinarias u otra relacionadas con el mundo de las Ciencias de la Salud.

El RD 53/2013 divide las tareas del personal en funciones de tal manera que cada trabajador debe estar capacitado mediante formación y acreditado por la CCAA en cada una de las funciones que vaya a realizar. La norma enumera 7 funciones:

- Función a) cuidado de los animales.
- Función b) eutanasia de los animales.
- Función c) realización de los procedimientos.
- Función d) diseño de los procedimientos y proyectos.
- Función e) asumir la responsabilidad de la supervisión in situ del Bienestar Animal.
- Función f) asumir las funciones de veterinario designado.

Sin embargo, no solamente es necesario la adquisición de una determinada competencia para el desempeño de una función, sino que además es necesario el **mantenimiento** de la misma mediante lo que viene a llamar el RD como **formación continua**<sup>4</sup>. Así cada persona, en los siguientes ocho años desde el reconocimiento de capacitación, debe reunir unas horas determinadas de formación reconocida que serán mayores cuanto mayor sea la responsabilidad de la función que esté acreditada.

El desarrollo específico de lo dispuesto en el RD 53/2013, en su artículo 15, en materia de capacitación, se recoge en la **Orden Ministerial ECC/566/2015**, por la que se establecen los requisitos de capacitación que debe cumplir el personal que maneje animales utilizados, criados o suministrados con fines de experimentación y otros fines científicos, incluyendo la docencia. En esta Orden Ministerial se establece que la capacitación del personal podrá tener una estructura modular basada, en su caso, en guías, directrices o recomendaciones de la

---

<sup>3</sup> Definición de TBS: Desarrollo de las funciones en un entorno real de trabajo bajo el seguimiento y control de un profesional competente en las tareas objeto de supervisión, una vez superados los contenidos teórico-prácticos de un curso.

<sup>4</sup> Las actividades de formación continua tendrán por objeto asegurar la mejora y puesta al día de las habilidades y conocimientos inicialmente adquiridos.

Unión Europea, así como que los requisitos mínimos de formación se habrán de expresar en resultados de aprendizaje y que el reconocimiento de la capacitación del personal tendrá validez en todo el territorio nacional.

Otras **normas en el ámbito de la experimentación animal** son las siguientes:

- **Ley 32/2007, de 7 de noviembre, para el cuidado de los animales, en su explotación, transporte, experimentación y sacrificio.** En el artículo 2, ámbito de aplicación, establece que se aplicará a los animales vertebrados de producción o que *se utilicen para experimentación y otros fines científicos*. Esta Ley establece un conjunto de principios sobre el cuidado de los animales y el cuadro de infracciones y sanciones que dota de eficacia jurídica a las obligaciones establecidas en la normativa aplicable
- **Ley 6/2013, para el cuidado de los animales, en su explotación, transporte, experimentación y sacrificio** que acomoda la legislación española a la nueva directiva y que modifica a la ley 32/2007 incluyendo todas las especies animales del RD 53/2013<sup>5</sup> y el régimen de sanciones.
- **El RD 542/2016 de 25 de noviembre, sobre norma de Sanidad y protección animal durante el transporte**, y donde se regula a los transportistas de animales, sus vehículos y los contenedores o medios de transportes adecuándolo a ley 6/2013 y 32/2007 y a la Ley de sanidad animal 8/2003.
- **El RD 1386/2018 por el que se modifica el RD 53/2013** y se corrigen las deficiencias detectadas por los servicios comunitarios en este RD y se garantiza la correcta transposición de la Directiva.
- **Real Decreto 118/2021, de 23 de febrero, por el que se modifica el Real Decreto 53/2013**, de 1 de febrero, por el que se establecen las normas básicas aplicables para la protección de los animales utilizados en experimentación y otros fines científicos, incluyendo la docencia con el fin último de simplificar y optimizar el acceso a la información. Las modificaciones de este RD vienen referidas a la publicación y eventual actualización de **los resúmenes no técnicos** de los proyectos autorizados por los órganos competentes, así como a los informes sobre la aplicación del RD 53/2013 y a la comunicación de datos estadísticos sobre usos de animales de las que se hablará posteriormente en este tema.
- **El Reglamento (UE) 2019/1010 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 5 de junio de 2019, relativo a la adaptación de las obligaciones de información en el ámbito de la legislación relativa al medio ambiente** y por el que se modifican los Reglamentos (CE) n.º 166/2006 y (UE) n.º 995/2010 del Parlamento Europeo y del Consejo, las Directivas 2002/49/CE, 2004/35/CE, 2007/2/CE, 2009/147/CE y 2010/63/UE del Parlamento Europeo y del Consejo, los Reglamentos (CE) n.º 338/97 y (CE) n.º 2173/2005 del Consejo, y la Directiva 86/278/CEE del Consejo, modifica, entre otras normas, la Directiva 2010/63/UE del Parlamento Europeo y del Consejo, de 22 de septiembre de 2010, relativa a la protección de los animales utilizados para fines científicos.

---

<sup>5</sup> Esta Ley incluye a los invertebrados como los cefalópodos y determinadas formas fetales de los mamíferos que la Ley 32/2007 anterior al RD 53/2013 no incluía y donde se ha podido demostrar su capacidad para experimentar dolor, sufrimiento, angustia y daño duradero.

- **Decisión de Ejecución (UE) 2020/569 de la comisión de 16 de abril de 2020 por la que se establecen el formato y el contenido comunes de la información que deben notificar los Estados miembros** con arreglo a la Directiva 2010/63/UE del Parlamento Europeo y del Consejo, relativa a la protección de los animales utilizados para fines científicos, y por la que se deroga la Decisión de Ejecución 2012/707/UE de la Comisión.

#### 4. GESTIÓN DE PROCEDIMIENTOS Y PROYECTOS

Toda utilización de animales con fines experimentales debe estar incluida dentro de un **proyecto de investigación evaluado** por un órgano independiente, llamado **órgano habilitado y autorizado por el órgano competente de la CCAA**. El personal que conforma el órgano habilitado debe tener reconocidos sus conocimientos en el ámbito de la experimentación con animales y autorizado por el órgano competente de la CCAA.

Con el fin de que los proyectos de investigación sean controlados y la población debidamente informada, los procedimientos se deben clasificar según su grado de severidad en leves, moderados, severos o sin recuperación. Estos últimos hacen referencia a aquellos que se realizan en su totalidad bajo anestesia general de la cual el animal no recupera la consciencia.

Se entiende con el termino **proyecto** al programa de trabajo con un objetivo científico definido y que puede incluir uno o varios procedimientos.

##### 4.1 CLASIFICACIÓN DE LOS PROYECTOS

El RD 53/2013 distingue tres tipos de proyectos:

- Tipo 1: aquellos en los que se da simultáneamente las tres circunstancias siguientes:
  - Implican exclusivamente procedimientos clasificados como «sin recuperación», «leves» o «moderados».
  - No utilizan primates.
  - Se realizan para cumplir requisitos legales o reglamentarios, o con fines de producción o diagnóstico por métodos establecidos.
- Tipo 2: Aquellos proyectos en los que se den simultáneamente las circunstancias siguientes:
  - Implican exclusivamente procedimientos clasificados como «sin recuperación», «leves» o «moderados».
  - No utilizan primates.
- Tipo 3: los no incluidos en los tipos I, II, es decir, los que contengan procedimientos severos y/o usen primates.

En general, para que un proyecto sea autorizado es necesario que cumpla las siguientes condiciones:

- que se realice en centros autorizados,
- que se realice por personal capacitado,

- que se evite cualquier tipo de dolor, sufrimiento, angustia o daño duradero innecesarios,
- que tan pronto se haya conseguido la finalidad del procedimiento se deben tomar las medidas adecuadas para minimizar el sufrimiento del animal. Es de especial relevancia el establecer bajo estos parámetros adecuados **criterios de punto final**, evitando en la medida de lo posible la muerte como criterio de punto final.

#### **4.2. AUTORIZACIÓN DE LOS PROYECTOS**

**Los pasos o trámites a seguir para obtener la autorización son los siguientes:**

1. **Elaboración de la propuesta** del proyecto o memoria del proyecto donde se explica el objetivo científico y cómo este se debe realizar. Para ayudar a su elaboración y con el fin de cumplir con todos los puntos de la norma, el RD 53/2013 enumera en su anexo X la información que debe incluir y que debe ante todo, asegurar todo lo descrito con anterioridad (ej.; la identificación del usuario y del establecimiento en el que se llevarán a cabo los procedimientos; animales utilizados, incluyendo su origen, número estimado, especies y etapas de la vida; justificación de los procedimientos a realizar; aplicación del método de las tres erres; uso de anestésicos, analgésicos y otros medios para aliviar el dolor, establecer el punto final siguiendo criterios humanitarios..)

2. **Informe del órgano encargado del bienestar animal** del centro (OEBA o Comité de Ética de Experimentación Animal-CEEA) que actuará de primer filtro indicando que efectivamente ese proyecto puede realizarse en su centro ya que tiene los medios, las instalaciones y el personal adecuado para su desarrollo. Este informe preliminar debe ser favorable.

3. **Evaluación por parte del Órgano Habilitado**, (OH) ese órgano independiente, público o privado, autorizado por el órgano competente con conocimientos técnicos y medios suficientes para el desarrollo de sus funciones. El Órgano Habilitado emitirá su informe al solicitante del proyecto o a petición de éste, al Órgano competente, que debe ser siempre favorable para que pueda seguir su trámite.

La evaluación de cada proyecto se realizará con un nivel de detalle apropiado al tipo de proyecto y consistirá en verificar que el proyecto cumple con los requisitos siguientes:

- Está justificado desde el punto de vista científico o educativo, o debe realizarse por imposición legal o reglamentaria.
- Su finalidad justifica la utilización de animales.
- Está diseñado de manera que los procedimientos se realicen de la forma más humanitaria y respetuosa con el medio ambiente que sea posible.

4. **Autorización por parte del órgano Competente de la CCAA.** Para que la autoridad competente determine un favorable definitivo tiene que contar con el favorable del comité de bienestar animal del centro donde se va a realizar el proyecto y la evaluación favorable del Órgano Habilitado. Tendrá a partir del registro de la solicitud 40 días laborales para emitir un dictamen que podrá ampliarse 15 días más para proyectos de especial complejidad.

Una vez autorizado, el responsable del proyecto dispone de **5 años** para su desarrollo a partir de la cual debe presentar los resultados o solicitar una prórroga del proyecto.

En los casos de proyectos de tipo III o de tipo II que así lo considere el OH se deberá realizar al finalizar el proyecto una **evaluación retrospectiva** como forma de ver la dimensión del impacto del proyecto y valorar si efectivamente:

- Se han alcanzado los objetivos del proyecto.
- Valorar el daño infligido a los animales.
- Si el número de animales y especies utilizados ha sido el adecuado.
- Si el grado de severidad determinado prospectivamente era el real al finalizar el proyecto.
- Valorar cualquier elemento que pueda contribuir a una mejor aplicación del principio de reemplazo, reducción y refinamiento.

### **4.3 INFORMACIÓN Y TRANSPARENCIA**

Un punto importante del RD 53/2013 viene reflejado en su artículo 41 sobre coordinación, deber de información y publicidad de la información. Con este artículo se pretende dar respuesta a la alta demanda social de información en todo lo relacionado con la utilización de animales con fines científicos. De esta manera, los criadores, suministradores y usuarios comunicarán a los órganos competentes todos los datos necesarios para cumplir con las obligaciones establecidas en la normativa nacional y de la UE. Las CCAA transmitirán la información a los puntos de contacto a efecto del cumplimiento de la normativa<sup>6</sup> y éste a la Comisión Europea con una periodicidad anual.

Para dar cumplimiento de la transparencia y de la transmisión de información la normativa vigente establece la elaboración de un **resumen no técnico (RNT)** de cada uno de los proyectos y un informe con **estadísticas de usos de animales** utilizados con fines científicos y de docencia.

#### **4.2.1 Resumen no técnico**

Por un lado, el Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación publica en su página web, información de cada uno de los proyectos para que puedan ser consultados por la ciudadanía en cualquier momento. Son los llamados Resúmenes no técnicos.

Por cada proyecto que se autoriza por parte de la autoridad competente debe publicarse un RNT. Este RNT debe publicarse en un lenguaje suficientemente accesible para personas sin conocimientos científicos específicos y que permita a cualquier ciudadano interesado en saber en qué se utilizan en Europa los animales destinados a experimentación, todos los datos del proyecto en cuestión.

---

<sup>6</sup> El punto de contacto es el Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación.

Un resumen no técnico debe incluir:

- Información sobre los objetivos del proyecto,
- especies y número de animales previstos,
- beneficios que se esperan obtener,
- daños ocasionados a los animales en su realización,
- cómo se han valorado, considerado y aplicado las 3R,
- destino final de los animales,
- Cinco palabras o términos claves del proyecto para facilitar su búsqueda.

Desde 2021 los resúmenes no técnicos se publican en una base de datos común a toda la Unión Europea con el fin de facilitar una vez más las búsquedas y el acceso total a esta información. El formato del mismo se ha estandarizado y modificado. Este formato viene determinado por la Decisión de Ejecución 2020/569, de 16 de abril de 2020.

#### 4.2.2. Informes Estadísticos

Por otro lado, la normativa obliga a la emisión anual y quinquenal por parte de los puntos de contactos de los distintos Estados miembros, de unos informes estadísticos sobre el uso de los animales en la experimentación.

Los informes se realizan con los datos enviados por los centros usuarios a través de una aplicación informática llamada **HAMELIN**. Estos datos son gestionados por los órganos competentes de las CCAA que una vez revisado, envían al MAPA. Finalmente, el MAPA como punto de contacto de la Comisión, lo envía a esta institución a través de la plataforma informática denominada **ALLURES**.

**El informe anual** es público e incluye:

- datos estadísticos de usos que se han dado a los animales de experimentación,
- observaciones y comentarios de esos datos,
- excepciones concedidas sobre los sistemas de eutanasia autorizados,

**El informe quinquenal** incluye a su vez:

Se incluye en este apartado la información sobre el anexo I de la Decisión de Ejecución de la Comisión 2012/707/UE de 14 de noviembre, por la que se establece un formato común para la presentación de la información prevista en el artículo 54, apartado 1, de la Directiva 2010/63/UE del Parlamento Europeo y del Consejo, relativa a la protección de los animales utilizados para fines científicos.

De acuerdo a lo establecido en este anexo debe proporcionarse información sobre:

- el número anual de proyectos autorizados y sobre el número y tipo de los autorizados como “proyectos genéricos múltiples”.

- las circunstancias de aquellas autorizaciones en las que el plazo de 40 días se haya ampliado y,
- la proporción que estas representen dentro del número total de autorizaciones,
- la proporción y el tipo de los proyectos que se hayan sometido a una evaluación retrospectiva, excluidos los que lo hayan sido reglamentariamente,
- procedencia de primates no humanos y forma en que se cumplan los requisitos de los artículos 21.5 y 18 del RD 53/2013.
- las circunstancias en que se hayan concedido exenciones.
- los casos en que se haya suspendido o retirado la autorización de un criador, suministrador o usuario, indicando los motivos.
- frecuencia de las inspecciones incluyendo: los criterios que se hayan empleado y la proporción que hayan representado las inspecciones no anunciadas.
- la retirada de autorizaciones de proyectos indicando sus motivos.
- el tipo de infracciones cometidas y,
- las acciones legales y administrativas que se hayan adoptado a raíz de esas infracciones

La normativa establece, en su artículo 40, la **labor de control** ejercida por los órganos Competentes de las CCAA sobre los centros que usan animales con fines científicos mediante la realización de **inspecciones** anuales a todos los criadores, suministradores y usuarios de primates y a un tercio de los demás usuarios. De esta manera se pueden corregir posibles desviaciones que, en los proyectos, en los animales, en las instalaciones o en el personal se puedan producir con respecto a la normativa vigente.

Para finalizar, en el artículo 44 del RD 53/2013 se crea el **Comité español para la protección de animales utilizados con fines científicos (CEFAPIC)**, órgano colegiado, de carácter interdepartamental, en cargo de asesorar a la Administración General del Estado, las CCAA y las ciudades de Ceuta y Melilla y a los Órganos encargados del Bienestar de los animales en cuestiones relacionadas con la adquisición, cría, alojamiento, cuidado y utilización de animales en procedimientos. Se reúne una vez al año y está constituido por las administraciones públicas, entidades privadas, asociaciones dedicadas al animal de laboratorio y otras en defensa de los animales.

## **BIBLIOGRAFÍA**

Manual sobre la gestión de la información relativa al uso de animales con fines científicos

[https://www.mapa.gob.es/es/ganaderia/temas/produccion-y-mercados-ganaderos/manualesobrelagestiondelainformacionrelativaalusodeanimalesconfinescientificos\\_tcm30-525159.pdf](https://www.mapa.gob.es/es/ganaderia/temas/produccion-y-mercados-ganaderos/manualesobrelagestiondelainformacionrelativaalusodeanimalesconfinescientificos_tcm30-525159.pdf)

Real Decreto 53/2013 de 1 de febrero

<https://www.boe.es/buscar/doc.php?id=BOE-A-2013-1337>

Bienestar de los animales usados en investigación

<https://www.mapa.gob.es/es/ganaderia/temas/produccion-y-mercados-ganaderos/bienestanimal/en-la-investigacion/default.aspx>

Resúmenes no técnicos de los proyectos

[https://www.mapa.gob.es/es/ganaderia/temas/produccion-y-mercados-ganaderos/bienestanimal/en-la-investigacion/Resumenes no tecnicos de los proyectos.aspx](https://www.mapa.gob.es/es/ganaderia/temas/produccion-y-mercados-ganaderos/bienestanimal/en-la-investigacion/Resumenes_no_tecnicos_de_los_proyectos.aspx)

Guía sobre el mantenimiento de la capacitación del personal

[https://www.mapa.gob.es/es/ganaderia/temas/produccion-y-mercados-ganaderos/20210217\\_guiasobremantenimientodelacapacitacion\\_tcm30-558488.pdf](https://www.mapa.gob.es/es/ganaderia/temas/produccion-y-mercados-ganaderos/20210217_guiasobremantenimientodelacapacitacion_tcm30-558488.pdf)

**MATERIAL PARA LA PREPARACIÓN DEL TEMA 45**

**ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN: DEFINICIÓN Y TIPOS DE ANIMALES UTILIZADOS EN PROCEDIMIENTOS. REQUISITOS GENERALES RELATIVOS A LOS ESTABLECIMIENTOS Y AL ALOJAMIENTO Y CUIDADO DE LOS ANIMALES. CAPACITACIÓN DEL PERSONAL. APLICACIONES EN SANIDAD Y GENÉTICA ANIMAL.**

*Este material no tiene carácter oficial, por lo que en ningún caso vinculará al Tribunal Calificador. Constituye, únicamente, un instrumento complementario que servirá de apoyo al opositor para enfocar cada uno de los epígrafes, pero nunca de forma exclusiva ni excluyente. El Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación no se hace responsable del contenido del mismo.*

*Los materiales no serán objeto de actualización constante.*

## **ÍNDICE**

- 1. INTRODUCCIÓN.**
- 2. DEFINICIÓN Y TIPOS DE ANIMALES.**
- 3. CLASIFICACIÓN DE LOS ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN.**
- 4. REQUISITOS GENERALES RELATIVOS A LA ESTABULACIÓN Y AL ALOJAMIENTO Y CUIDADO DE LOS ANIMALES.**
- 5. CAPACITACIÓN DEL PERSONAL.**
- 6. APLICACIONES EN LOS LABORATORIOS DE SANIDAD Y GENÉTICA ANIMAL.**

MATERIAL NO OFICIAL

## **1. INTRODUCCIÓN.**

La experimentación animal se define como una actividad que tiene como misión evidenciar o aclarar fenómenos biológicos sobre especies animales determinadas. No obstante, también es toda acción de carácter científico o experimental que pueda llegar a suponer un ataque al estado de bienestar del animal, susceptible de causarle dolor, sufrimiento, angustia o agravio.

A lo largo de la historia de la experimentación animal, se ha constatado que cada una de las condiciones del entorno donde los animales son manejados, desde su cría y mantenimiento, hasta que son utilizados como reactivos biológicos, tienen una gran influencia en la variabilidad de los resultados experimentales.

Algunas de las variables que actúan sobre la respuesta del animal son: alimentación, condiciones ambientales, alojamiento, estado sanitario y genético y manejo.

Para favorecer que estos parámetros permanezcan homogéneos, se establecen las condiciones mínimas que deben reunir las instalaciones donde son alojados los animales, las condiciones del entorno y cualquier otro parámetro como pudiera ser la correcta manipulación y cuidado de los animales por parte del personal encargado del bienestar de los mismos.

## **2. DEFINICIÓN Y TIPOS DE ANIMALES.**

Comenzaremos resaltando la necesidad de diferenciar entre animales de experimentación y animales de Laboratorio. En este sentido, podemos definir al animal de experimentación como todo aquel animal, incluido o no en el Anexo I del Real Decreto 53/2013, que vaya a ser usado con fines científicos (incluyendo la docencia). Consideramos animal de laboratorio, aquel animal que es engendrado, producido y mantenido en condiciones controladas, que posee claros antecedentes genéticos y microbiológicos, así como, una comprobación sistemática de los mismos.

Los animales de experimentación son todos aquellos animales utilizados en un procedimiento dentro de un proyecto de experimentación, entendiendo como procedimiento la utilización, tanto invasiva como no invasiva, de un animal con fines experimentales u otros fines científicos, cuyos resultados sean predecibles o impredecibles, o con fines educativos siempre que dicha utilización pueda causarle al animal un nivel de dolor, sufrimiento, angustia o daño duradero equivalente o superior al causado por la introducción de una aguja conforme a las buenas prácticas veterinarias.

Asimismo, se considera procedimiento cualquier intervención que de forma intencionada o casual provoque, o pueda provocar, el nacimiento de un animal, la eclosión de un huevo o la creación y mantenimiento de una línea de animales modificados genéticamente en las condiciones de dolor, sufrimiento, angustia o daño duradero citadas en el párrafo anterior.

De esta manera, un cerdo de granja se puede utilizar como animal de experimentación, de hecho, se utiliza para infinidad de proyectos; pero ese animal no se ha criado para este fin, sino en granjas de cebo para alimentación, por lo que si se utiliza con fines científicos es un animal de experimentación, pero no un animal de laboratorio.

Por tanto, los animales que no se han criado para fines científicos no se consideran animales de laboratorio, aunque pudieran llegar a ser animales de experimentación.

En el Capítulo IV del Real Decreto (RD) 53/2013, por el que se establecen las normas básicas aplicables para la protección de los animales utilizados en experimentación y otros fines científicos, incluyendo la docencia, se indican los tipos de animales utilizados en los procedimientos, entre los cuales se encuentran:

- **Animales Criados para ser utilizados en Procedimientos.**

Dentro de este apartado se encuentran las especies enunciadas en el Anexo I del RD, las cuales se podrán usar en procedimientos de experimentación animal siempre y cuando hayan sido criadas para tal fin.

Las especies enunciadas en dicho Anexo son:

- Ratón,
- Hámster enano chino,
- Conejo,
- Rana,
- Rata,
- Hámster sirio,
- Perro,
- Pez cebra,
- Cobaya,
- Jerbo de Mongolia,
- Gato,
- Todas las especies de primates no humanos.

- **Especies Amenazadas**

No se utilizarán en procedimientos de experimentación, los animales de las especies amenazadas incluidas en el anexo A del Reglamento (CE) n.º 338/97, del Consejo, de 9 de diciembre de 1996, relativo a la protección de especies de la fauna y flora silvestres mediante el control de su comercio, que no estén contemplados en los supuestos del artículo 7 de dicho Reglamento, salvo si se cumplen una serie de condiciones, entre las cuales se encuentra el que se haya justificado científicamente que la finalidad del procedimiento no puede conseguirse utilizando animales de otras especies.

- **Primates**

En los procedimientos experimentales no se pueden utilizar animales de las especies: Gorila, Chimpancé, Orangután o Chimpancé pigmeo.

El resto de los primates no se utilizarán salvo si se cumplen una serie de condiciones.

El uso de los primates está muy controlado.

- **Animales capturados en la naturaleza**

No se utilizarán salvo autorización expresa del órgano competente, que podrá concederla previa justificación científica de que la finalidad del procedimiento no puede alcanzarse utilizando animales criados para su utilización en procedimientos.

La captura de animales en la naturaleza únicamente se efectuará por una persona competente, con métodos que no causen dolor, sufrimiento, angustia o daño duradero que pueda evitarse.

- **Animales asilvestrados y vagabundos de especies domésticas.**

Este tipo de animales no se usarán en procedimientos experimentales, aunque el órgano competente podrá excepcionalmente autorizar su uso, siempre que se cumpla lo siguiente:

- La finalidad del procedimiento solo se consigue con ellos.
- Existe una necesidad esencial de realizar estudios relacionados con la salud y bienestar de estos animales o con amenazas graves para el medio ambiente para la salud humana o animal.

### 3. CLASIFICACIÓN DE LOS ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN.

Los animales de experimentación pueden ser clasificados de muy diversas formas. A continuación, veremos la clasificación de los mismos atendiendo a características genéticas, microbiológicas y al tipo de modelo animal.

Desde el **punto de vista genético** los podemos clasificar en:

- **No consanguíneas:** son líneas genéticamente diferentes, sin definir. Se utilizan fundamentalmente para toxicología, fisiología y selección genética. Serían los que mejor representan la variabilidad genética de una población humana estándar.
- **Consanguíneas:** son líneas genéticamente estandarizadas, caracterizadas por ser genéticamente idénticos entre sí, con características propias a esta línea que las diferencias de otras, uniformidad fenotípica y estabilidad genotípica a largo plazo. Son fundamentalmente utilizados en inmunología, cáncer, neurología, comportamiento y genética. Son homocigóticos para todos los loci de su genoma.
- **Híbridos F1:** obtenido por el cruce de dos líneas consanguíneas. Son isogénicos pero heterocigotos para todos los loci de su genoma. Se utilizan para estudios de transgénesis y en carcinogénesis química.
- **Coisogénicas:** son líneas genéticamente idénticas pero difieren en un locus, normalmente debido a una mutación. Ej. ratones nude.

- **Congénicos:** son líneas coisogénicas que son transferidas a un fondo genético de una línea consanguínea estándar.

Por otro lado, los animales se pueden clasificar atendiendo a su **estatus sanitario** en:

- **Convencionales:** son aquellos que se crían y mantienen en sistemas abiertos, sin tener controlado su perfil microbiológico.
- **SPF (specific pathogen free):** animales libres de microorganismos y parásitos específicos pero no necesariamente de otros no especificados. Se mantienen bajo barreras sanitarias controladas.
- **Axénicos:** animales sin ningún tipo de microorganismo. Se producen por histerectomía y se mantienen en regímenes cerrados bajo un sistema de barreras absolutas (en aisladores).
- **Gnotobióticos:** son aquellos animales axénicos que se han puesto en contacto con uno o más cultivos puros de microorganismos, es decir, su carga microbiana es conocida.

El **modelo animal** se define como un sujeto animado de imitación, es decir, una imagen de la especie humana o de cualquier otra especie animal, utilizado para investigar circunstancias fisiológicas o patológicas. Se crea y se utiliza en la investigación de la causa, naturaleza y tratamiento de los fenómenos funcionales y de las enfermedades humanas y animales.

Desde el punto de vista de modelo animal, y en función de la variable a estudiar o a investigar, se pueden diferenciar los siguientes modelos vivos:

- **Modelos inducidos o manipulados:** en ellos, las variables a investigar son provocadas experimentalmente. Según el método utilizado para su inducción se pueden clasificar en cinco grandes grupos:
  - Por administración de sustancias biológicamente activas
  - Por manipulación quirúrgica.
  - Por inducción basada en dietas modificadas.
  - Por inducción debida a cambios etológicos.
  - Por transgenización o mutagenésis dirigida.
- **Modelos generados por modificación genética.** El rápido desarrollo de la ingeniería genética y de la tecnología de manipulación embrionaria durante la pasada década, han generado animales transgénicos y Knock-out (con genes inactivados) que desarrollan enfermedades humanas. Los ratones son los animales más importantes en la investigación transgénica, pero los animales de granja y los peces también reciben considerable interés.
- **Modelos animales espontáneos:** en este modelo, la variable a estudiar aparece de forma natural a partir de la variabilidad genética expresada en una determinada línea animal. Se obtienen por selección de animales consanguíneos o genéticamente uniformes. Un ejemplo de este tipo de modelo sería la rata Wistar, que presentan una elevada y sostenida hipertensión arterial.

- **Modelos animales negativos:** son especies, cepas o razas donde una determinada enfermedad no se desarrolla, como la infección por gonococos en conejos.
- **Modelos animales huérfanos:** en ellos se expresa una determinada variable hasta ahora no conocida o expresada en la especie humana. Cuando dicha variable es descrita también en la especie humana, se dice que estos modelos animales se han "adoptado" y entonces pasarán a incluirse en una de las categorías anteriores.

#### **4. REQUISITOS GENERALES RELATIVOS A LOS ESTABLECIMIENTOS Y AL ALOJAMIENTO Y CUIDADO DE LOS ANIMALES.**

El art. 36.2 de la Ley 8/2003, de sanidad animal, señala que las condiciones sanitarias básicas que deben cumplir las explotaciones de animales serán las que establezca la normativa vigente, y en su disposición final quinta faculta al Gobierno para dictar las disposiciones precisas para la aplicación y desarrollo de la ley. En el RD 53/2013, se desarrolla dicha ley en la medida que afecta a los animalarios como explotaciones.

Antes de avanzar en este apartado debemos de conocer qué se conoce como Animalario. Animalario, es el conjunto de instalaciones destinadas al mantenimiento y/o producción de animales utilizados como reactivos biológicos. Actualmente se llaman centros de producción y/o experimentación animal.

La legislación actual los define como toda instalación, edificio, grupo de edificios u otros locales, incluidos los que no están totalmente cerrados o cubiertos, así como las instalaciones móviles y todas aquellos medios personales y materiales organizados por su titular para la cría, suministro o la utilización de animales en procedimientos de experimentación y docencia.

Según el tipo de uso se diferencian 3 tipos de centros:

- **De cría:** donde nacen y se crían animales de las especies incluidas en el Anexo I del RD 53/2013, destinados a ser utilizados en procedimientos de experimentación y docencia.
- **Proveedor o suministrador:** centro, distinto al criador, que adquiere o mantiene animales con el fin de que éstos se utilicen en procedimientos.
- **Usuarios:** Cualquier centro en el que se utilicen animales para procedimientos de experimentación y docencia.

Todos los centros anteriores están obligados a estar inscritos en el Registro General de Explotaciones Ganaderas.

Independientemente del tipo de instalación que vaya a albergar a los animales, un animalario debe estar dividido en tres áreas bien diferenciadas:

- **Área de animales:** aquí consideramos no solo las dependencias donde se mantienen o crían los animales sino también aquellas dependencias donde se realizan experimentos de forma

más o menos continua y donde es preciso albergar a los animales durante periodos prolongados de tiempo. En esta área podemos diferenciar:

- Cuarentenas: para alojar a los animales que vengan del exterior antes de ser introducidos a su dependencia definitiva o para alojar a los animales que puedan tener alguna patología. Es un área que debe estar alejada del resto de dependencias.
  - Producción y cría.
  - Mantenimiento y stock.
  - Experimentación.
- Área de servicios:
    - Dependencias del personal: vestuarios, despachos, sala de reunión...
    - Salas de limpieza y desinfección: considerada el corazón de cualquier animalario. Se encarga de la limpieza y desinfección o esterilización de todo el material que será empleado en el manejo de los animales.
    - Laboratorios para el procesamiento de muestras y realización de controles sanitarios.
    - Almacenes.
    - Plantas técnicas donde se encuentran los aires acondicionados, UTAs, calderas, incinerador, sistemas de filtración...
  - Área de intercomunicación: donde se asegura una circulación de personas, animales y materiales lo más racional posible, como son los pasillos, las esclusas o los air locks.

En líneas generales, el área de los animales debe representar un 50% de las instalaciones mientras que el área de servicios y de intercomunicación un 40% y un 10% respectivamente.

Las condiciones que deben cumplir los animalarios, así como el alojamiento y los cuidados de los animales en él alojados, se establecen en el citado RD 53/2013. Concretamente, en el artículo 6 del RD 53/2013 "Condiciones generales de alojamiento y cuidado de los animales" se establece lo siguiente:

- Se les proporcionará el alojamiento, entorno, alimentos, agua y cuidados que sean adecuados a su especie, condiciones fisiológicas y estado sanitario
- Se reducirá en lo posible cualquier restricción que impida o limite las posibilidades de los animales de satisfacer sus necesidades fisiológicas y etológicas.
- Se verificarán a diario las condiciones ambientales en las que se críen, mantengan o utilicen los animales.
- Se dispondrá de medios que garanticen la eliminación en el plazo más breve posible de cualquier deficiencia que pueda provocar sufrimiento, dolor, angustia o daño duradero evitables.
- Las normas de trabajo e instrucciones de uso de todos los elementos constarán por escrito
- Se dispondrá por escrito un plan de actuación en caso de emergencia o catástrofe, que contemplará medidas en relación con los animales alojados

En la Sección A del Anexo II del RD 53/2013, se establecen los requisitos generales relativos a los establecimientos y al alojamiento y al cuidado de los animales, mientras que en la Sección

B del mismo Anexo se establecen de forma específica para cada especie, ciertos requisitos de enriquecimiento y dimensiones del alojamiento.

Por tanto, para abordar este apartado nos centraremos en la Sección A del Anexo II del RD 53/2013, el cual se divide en 3 puntos: Instalaciones, el entorno y su control y el cuidado de los animales.

## **1. Instalaciones.**

### **1.1 Funciones y diseño general.**

a) Todas las instalaciones deben construirse de forma que garanticen un ambiente que tenga en cuenta las necesidades fisiológicas y etológicas de las especies alojadas en ellas. Asimismo deben diseñarse y gestionarse con vistas a evitar el acceso de personas no autorizadas y la entrada o la huida de animales.

b) Los establecimientos deben aplicar un programa activo de mantenimiento a fin de evitar y reparar cualquier defecto de los edificios o del material.

### **1.2 Locales de alojamiento.**

a) Los establecimientos deben tener un programa eficiente de limpieza periódica de los locales.

b) Las paredes, los techos y los suelos deben estar recubiertos de un material impermeable (cuando sea necesario) y resistente al gran desgaste causado por los animales y las operaciones de limpieza. Ese material de revestimiento no debe ser perjudicial para la salud de los animales ni propiciar el que los animales se lastimen.

c) Las especies que sean incompatibles, como depredadores y presas, o los animales que necesiten condiciones ambientales diferentes, deben estar alojados en locales diferentes y, en el caso de los depredadores y sus presas, fuera del alcance de su vista, olfato u oído.

### **1.3 Locales con fines generales y especiales para la realización de procedimientos.**

a) Los establecimientos deben disponer, cuando proceda, de instalaciones de laboratorio para realizar pruebas sencillas de diagnóstico, necropsias, o para tomar muestras que deban someterse a investigaciones de laboratorio más amplias en algún otro sitio.

b) Deben existir instalaciones para permitir el aislamiento de los animales recién adquiridos hasta que se determine su estado sanitario y se evalúe y minimice el potencial riesgo sanitario para los demás animales.

c) Debe disponerse de locales para alojar por separado a los animales enfermos o heridos.

### **1.4 Locales de servicio**

a) Los locales de almacenamiento deben diseñarse, utilizarse y mantenerse de manera que se preserve la calidad de los piensos y del material de cama. Esos locales deben ser en la medida de lo posible a prueba de parásitos e insectos. Los materiales de otro tipo, que puedan estar

contaminados o suponer un peligro para los animales o el personal, deben almacenarse por separado.

b) Los locales de limpieza y lavado deben ser lo bastante amplios para alojar las instalaciones necesarias para descontaminar y limpiar el material usado. El proceso de limpieza debe organizarse de tal forma que se mantengan separados los flujos de materiales limpios y sucios para evitar la contaminación del material recién limpiado.

c) Los establecimientos deben adoptar medidas para el almacenamiento y la eliminación segura de los cadáveres y residuos de los animales en condiciones higiénicas satisfactorias.

d) Cuando sea necesario llevar a cabo procedimientos quirúrgicos en condiciones asépticas, se dispondrá de una o más salas debidamente equipadas, así como de instalaciones para la recuperación postoperatoria.

## **2. El entorno y su control.**

### **2.1 Ventilación y temperatura.**

a) El aislamiento, la calefacción y la ventilación de los locales de alojamiento asegurarán que la circulación del aire, los niveles de polvo y las concentraciones de gas se mantengan dentro de unos límites que no sean nocivos para los animales alojados.

b) La temperatura y la humedad relativa en los locales de alojamiento deben estar adaptada a las especies y a los grupos de edad de los animales alojados. La temperatura debe medirse y registrarse diariamente.

c) Los animales no deben estar obligados a permanecer en zonas exteriores en condiciones climáticas que puedan ser potencialmente perjudiciales o puedan causarles angustia.

### **2.2 Iluminación.**

a) Cuando la luz natural no garantice un ciclo adecuado de luz/oscuridad, debe preverse un sistema de iluminación controlada para satisfacer las necesidades biológicas de los animales y disponer de un medio de trabajo adecuado.

b) La iluminación debe ser adecuada para realizar el manejo y la inspección de los animales, sin que esto suponga un estrés para los animales.

c) Deben preverse fotoperiodos regulares, con una intensidad de luz adaptada a las especies.

d) Si se tienen animales albinos, la iluminación debe adaptarse para tener en cuenta su especial sensibilidad a la luz.

### **2.3 Ruido.**

a) Los niveles de ruido, incluidos los ultrasonidos, no deben afectar negativamente al bienestar animal.

b) Los establecimientos deben disponer de sistemas de alarma que, si son acústicos, emitan sonidos fuera del espectro audible sensible de los animales, cuando ello no interfiera con su audibilidad para los seres humanos.

c) Los locales de alojamiento deben disponer, en su caso, de materiales de aislamiento y absorción acústica.

#### 2.4 Sistemas de emergencia y de alarma.

a) Los establecimientos que dependan de dispositivos mecánicos o eléctricos para el control y la regulación de las condiciones ambientales deben disponer de sistemas alternativos que garanticen que sigan funcionando los servicios esenciales y los dispositivos de alumbrado de emergencia, y que eviten que los propios sistemas de alarma dejen de funcionar.

b) Los sistemas de calefacción y ventilación deben disponer de dispositivos de control y de alarma.

c) Deben exponerse en lugar bien visible instrucciones claras sobre las actuaciones a desarrollar en caso de emergencia.

### **3. Cuidados de los animales.**

#### 3.1 Salud.

a) Los establecimientos deben disponer de una estrategia para velar por el mantenimiento de un estado sanitario de los animales que garantice su bienestar y satisfaga los requisitos científicos. Esa estrategia debe incluir el control sanitario periódico, un programa de vigilancia microbiológica y planes de acción frente a los problemas sanitarios, la definición de parámetros sanitarios y protocolos para la introducción de nuevos animales.

b) Una persona capacitada debe realizar al menos una vez al día un control de los animales. Dichos controles deben garantizar que todo animal enfermo o herido sea detectado y reciba los cuidados necesarios.

#### 3.2 Animales capturados en la naturaleza.

a) En los lugares de captura, en caso de que fuera necesario trasladar a los animales para su examen o tratamiento, debe disponerse de contenedores y medios de transporte adaptados a las especies consideradas.

b) Debe concederse una consideración especial y tomarse medidas adecuadas para la aclimatación, cuarentena, alojamiento, zootecnia, cuidados de los animales capturados en la naturaleza y, en su caso, disposiciones para su liberación al término de los procedimientos.

#### 3.3 Alojamiento y enriquecimiento.

a) Alojamiento. Los animales, excepto los que sean por su naturaleza solitarios, deben ser alojados en grupos estables de individuos compatibles. Cuando se permita el alojamiento individual con arreglo al artículo 6.3, su duración debe limitarse al mínimo necesario, y debe mantenerse un contacto visual, auditivo, olfativo y/o táctil. La introducción o reintroducción de animales en grupos establecidos debe ser objeto de un seguimiento cuidadoso para evitar problemas de incompatibilidad o una perturbación de las relaciones sociales.

b) Enriquecimiento ambiental. Todos los animales deben disponer de un espacio de la complejidad suficiente para permitirles expresar una amplia gama de comportamientos

normales. El enriquecimiento ambiental del recinto de animales debe adaptarse a las necesidades individuales y a las propias de la especie. Las estrategias de enriquecimiento de los establecimientos deben revisarse y actualizarse con regularidad.

c) Recintos de animales. Los recintos deben fabricarse con materiales no perjudiciales para la salud de los animales. Deben diseñarse y construirse de manera que eviten causarles heridas. Si no son desechables, deben fabricarse con materiales resistentes a las técnicas de limpieza y descontaminación. El diseño de los suelos de los recintos debe estar adaptado a la especie y la edad de los animales y facilitar la eliminación de excrementos.

### 3.4 Alimentación.

a) La forma, la composición y la presentación de los piensos o de otros alimentos deben responder a las necesidades nutricionales y de comportamiento del animal.

b) La dieta debe ser apetecible y no estar contaminada.

c) El envasado, el empaquetado, el transporte y el almacenamiento de los piensos deben planificarse de manera que se eviten su contaminación, deterioro o destrucción. Todos los comederos, tolvas y demás utensilios utilizados para la alimentación deben limpiarse de forma regular y, si resulta necesario, esterilizarse.

d) Cada animal ha de tener acceso al alimento y disponer de espacio suficiente para limitar la competencia con otros animales.

### 3.5 Agua.

a) Todos los animales deben disponer permanentemente de agua de bebida no contaminada.

b) Cuando se utilicen sistemas automáticos de aporte de agua, su funcionamiento debe ser objeto de inspección, mantenimiento y limpieza periódicos para evitar accidentes. Si se utilizan jaulas de suelo compacto, debe reducirse al mínimo el riesgo de inundación.

### 3.6 Zonas de descanso.

a) Los animales deben disponer siempre de estructuras de descanso o materiales de cama adaptados a la especie, así como estructuras o materiales de nidificación para los animales reproductores.

b) En el recinto de animales, de acuerdo a las necesidades de cada especie, debe proporcionarse una superficie de reposo sólida y confortable para todos los animales. Todas las zonas para dormir deben mantenerse limpias y secas.

### 3.7 Manejo.

Los establecimientos deben elaborar programas de aclimatación y aprendizaje adecuados para los animales, los procedimientos y la duración del proyecto.

## **5. CAPACITACIÓN DEL PERSONAL.**

El personal que trabaje en instalaciones donde se críen, mantengan o utilicen animales de experimentación, debe estar debidamente capacitado para preservar el bienestar de los animales que en ellas se manejen.

El RD 53/2013 divide las tareas del personal del animalario en funciones (artículo 15), de tal manera que cada trabajador debe estar capacitado mediante formación, y acreditado por el órgano competente de la Comunidad Autónoma para cada una de las funciones que vaya a realizar. En el RD se enumeran 7 funciones:

- Función a) cuidado de los animales.
- Función b) eutanasia de los animales.
- Función c) realización de los procedimientos.
- Función d) diseño de los procedimientos y proyectos.
- Función e) asumir la responsabilidad de la supervisión in situ del Bienestar Animal.
- Función f) asumir las funciones de veterinario designado.

Sin embargo, no solamente es necesario la adquisición de una determinada competencia para el desempeño de una función, sino que además es necesario el mantenimiento de la misma mediante una formación continua específica. Así cada persona, en los siguientes ocho años desde el reconocimiento de su capacitación, debe reunir unas horas determinadas de formación reconocida, que serán mayores cuanto mayor sea la responsabilidad de la función que esté acreditada.

El desarrollo específico de lo dispuesto en el RD 53/2013, en materia de capacitación, se recoge en la Orden Ministerial ECC/566/2015, por la que se establecen los requisitos de capacitación que debe cumplir el personal que maneje animales utilizados, criados o suministrados con fines de experimentación y otros fines científicos, incluyendo la docencia. En esta Orden Ministerial se desarrollan principalmente los siguientes aspectos:

- Los requisitos de capacitación propios de cada una de las funciones involucradas en el manejo de los animales. Estos requisitos consisten (con las peculiaridades propias de cada función) en las titulaciones académicas y acreditaciones profesionales pertinentes; los cursos de formación específica, de carácter modular, cuyo contenido se basa en directrices recientemente aprobadas por la Unión Europea, y, en algunas funciones, la realización del trabajo bajo supervisión, como último eslabón para poder desempeñarlas de manera autónoma.
- El reconocimiento de la capacitación por los órganos competentes, mediante la expedición de una certificación que habilite para el desempeño de la función de que se trate de manera autónoma, una vez comprobado el cumplimiento de los requisitos aplicables a dicha función. Este reconocimiento tiene eficacia en todo el territorio nacional y está sujeto a la reciprocidad con otros Estados miembros de la Unión Europea.

- Los requisitos de los cursos de formación y de las entidades que los imparten, así como su reconocimiento por las autoridades competentes.
- El mantenimiento de la capacitación mediante actividades de formación continua.
- El régimen transitorio aplicable a las personas que hubiesen obtenido el reconocimiento de su capacitación conforme a la normativa anterior, contenida en el Real Decreto 1201/2005, de 10 de octubre, sobre protección de los animales utilizados para experimentación y otros fines científicos.

## **6. APLICACIONES EN LOS LABORATORIOS DE SANIDAD Y GENÉTICA ANIMAL.**

Las aplicaciones en sanidad animal son múltiples. Las mayorías de ellas están enfocadas en el estudio o para el estudio de enfermedades de gran repercusión en nuestra cabaña ganadera.

Algunos ejemplos de ellas son las siguientes:

- En el estudio de enfermedades que afecten a los animales, desde su patogenia, diagnóstico o tratamiento. Enfermedades emergentes de las cuales no se conoce como pueden afectar a los animales, vía de entrada, patogenia, sintomatología, índice de morbilidad o mortalidad (como ocurrió cuando apareció la enfermedad producida por el virus Bagaza en aves en el sur de España).
- En el diagnóstico de enfermedades de los animales, como por ejemplo, la utilización de pollitos para la determinación del índice de patogenicidad del virus de Newcastle o del virus influenza, la utilización de ratones convencionales para el diagnóstico de botulismo de otras especies animales o la utilización de ratones albinos para el diagnóstico de rabia.
- En la comprobación de la eficacia de vacunas que se quieren poner en el mercado para el control de una enfermedad que afecta a la cabaña. Un ejemplo sería la vacuna frente a la nueva variante de la enfermedad hemorrágica del conejo, o frente a los distintos serotipos del virus de la lengua azul.
- En la contrastación de lotes de determinadas vacunas (Rabia).
- En la obtención de reactivos biológicos para su utilización en los métodos de diagnósticos de enfermedades en Sanidad Animal. Por ejemplo, glóbulos rojos de carnero para la realización de la prueba de fijación de complemento en el diagnóstico de brucelosis, anemia infecciosa equina o micoplasmosis; la utilización de glóbulos rojos de aves para la realización de la prueba de inhibición de la hemaglutinación en el diagnóstico de la influenza o de la enfermedad de Newcastle aviar. También están incluidos en este punto la obtención de material de referencia positivo o negativo (sangre, suero, plasma, tejido...) para su uso como controles de calidad en los métodos de diagnóstico; un ejemplo de este último caso podría ser la obtención de sueros de referencia mediante hiperinmunización de animales (lengua azul).

- En la contrastación de los distintos lotes de tuberculina empleados en la campaña de erradicación de la tuberculosis bovina.
- Para la obtención de anticuerpos mono o policlonales para su uso posterior en métodos inmunológicos de diagnósticos en enfermedades de sanidad animal. Los ratones y los conejos han sido los animales más utilizados para este fin.

MATERIAL NO OFICIAL

## **BIBLIOGRAFIA**

- J. Martín Zúñiga. J.M<sup>a</sup> Orellana Muriana. J. Tur Marí. Ciencia y tecnología del animal de laboratorio.UAH.
- Convenio ETS 123 sobre la protección de los animales vertebrados utilizados para experimentación y otros fines científicos (1986).
- Directiva 2010/63/UE DEL PARLAMENTO EUROPEO Y DEL CONSEJO de 22 de septiembre de 2010 relativa a la protección de los animales utilizados para fines científicos.
- Real Decreto 53/2013, de 1 de febrero, por el que se establecen las normas básicas aplicables para la protección de los animales utilizados en experimentación y otros fines científicos, incluyendo la docencia.
- Guía sobre el mantenimiento de la capacitación del personal  
[https://www.mapa.gob.es/es/ganaderia/temas/produccion-y-mercados-ganaderos/20210217\\_guiasobremantenimientodelacapacitacion\\_tcm30-558488.pdf](https://www.mapa.gob.es/es/ganaderia/temas/produccion-y-mercados-ganaderos/20210217_guiasobremantenimientodelacapacitacion_tcm30-558488.pdf)

**MATERIAL PARA LA PREPARACIÓN DEL TEMA 46**

**CONTROL DE REACTIVOS DE DIAGNÓSTICO EN SANIDAD ANIMAL.  
REGISTRO. MARCO LEGAL**

*Este material no tiene carácter oficial, por lo que en ningún caso vinculará al Tribunal Calificador. Constituye, únicamente, un instrumento complementario que servirá de apoyo al opositor para enfocar cada uno de los epígrafes, pero nunca de forma exclusiva ni excluyente. El Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación no se hace responsable del contenido del mismo.*

*Los materiales no serán objeto de actualización constante.*

## **ÍNDICE**

### **1. CONTROL DE REACTIVOS DE DIAGNÓSTICO EN SANIDAD ANIMAL**

#### 1.1. INTRODUCCIÓN

### **2. REGISTRO**

#### 2.1. AUTORIZACIÓN PARA LA INSCRIPCIÓN EN EL REGISTRO DE REACTIVOS DE USO VETERINARIO

#### 2.2. RENOVACIÓN DEL REGISTRO DE REACTIVOS DE USO VETERINARIO

#### 2.3. MODIFICACIÓN DEL REGISTRO DE REACTIVOS DE USO VETERINARIO

#### 2.4. CONTRASTACIÓN DE LOTES

### **3. MARCO LEGAL**

#### 3.1. ANTECEDENTES

#### 3.2. REAL DECRETO 867/2020, de 29 de septiembre

##### 3.2.1. Objetivos Fundamentales

##### 3.2.2. Ámbito de Aplicación

##### 3.2.3. Estructura

MATERIAL NO OFICIAL

## 1. CONTROL DE REACTIVOS DE DIAGNÓSTICO EN SANIDAD ANIMAL

### 1.1. INTRODUCCIÓN

Un producto zoosanitario, se puede definir como toda sustancia destinada al diagnóstico, prevención o tratamiento de las enfermedades de los animales, y por extensión, a las empleadas en la explotación zootécnica o actividades relacionadas; dentro de estos productos zoosanitarios incluimos los reactivos de diagnóstico de uso veterinario.

Un **Reactivo de diagnóstico de uso veterinario** es cualquier producto utilizado solo o en asociación con otros, para el estudio de muestras de animales o de su entorno, con el fin de proporcionar información relativa a: sus agentes patógenos, incluyendo los utilizados en pruebas diagnósticas, o sus características genéticas de interés sanitario (RD 867/2020)<sup>1</sup>.

Las consecuencias de su uso indebido, pueden ser muy importantes, no solo a nivel económico sino también a nivel de salud animal y pública, lo que crea la necesidad de ejercer un exigente control sobre los mismos para evitar un empleo nocivo y fraudulento, desde su fabricación hasta su comercialización.

Un correcto control de los mismos exige la existencia de un **Registro** que permita en todo momento conocer la información necesaria para una utilización adecuada, así como la realización de pruebas que aseguren que sus resultados son acordes a la finalidad prevista.

## 2. REGISTRO

**El Registro de Entidades y Productos Zoosanitarios**, dependiente de la Dirección General de Sanidad de la Producción Agraria del Ministerio de Agricultura, Pesca y alimentación (MAPA), es el responsable de:

- **La autorización y registro de los reactivos de diagnóstico de uso veterinario.**
- **Los plaguicidas para el uso en el entorno ganadero** cuyas sustancias activas aún no han sido aprobadas para su inclusión en la lista de sustancias de la Unión Europea aprobadas por la Comisión Europea.
- las inscripciones de productos de los **sistemas de control de parámetros fisiológicos.**
- Los productos destinados **al mantenimiento de material reproductivo animal.**

Además, la Dirección General de Sanidad de la Producción Agraria, a través del Servicio de Entidades y Productos Zoosanitarios, ejerce la competencia de autorización, inscripción y registro de las **entidades titulares elaboradoras, importadoras y otras entidades de productos zoosanitarios.**

---

<sup>1</sup> Real Decreto 867/2020, de 29 de septiembre, por el que se regulan los productos zoosanitarios de reactivos de diagnóstico de uso veterinario, los sistemas de control de parámetros fisiológicos en animales y los productos destinados al mantenimiento del material reproductivo animal.

En la actualidad, es el **Real Decreto 867/2020, de 29 de septiembre**, el que establece los procesos que deben ser realizados para la autorización, inscripción, comercialización y uso de los productos zoonosanitarios.

## **2.1. AUTORIZACIÓN PARA LA INSCRIPCIÓN EN EL REGISTRO DE REACTIVOS DE DIAGNÓSTICO DE USO VETERINARIO (art. 7 y art. 8 RD 867/2020)**

Para la concesión de la autorización de un determinado reactivo de diagnóstico y su incorporación al registro, la entidad solicitante deberá presentar **una memoria técnica** que incluya los **estudios o pruebas de validación del reactivo en cuestión** y el material de acondicionamiento (textos para su comercialización, etiquetas, etc.). **La memoria técnica deberá contener:**

- Principios de la técnica y, en su caso, bibliografía más relevante.
- Descripción detallada del reactivo y sus componentes.
- Breve reseña del proceso de producción y loteado, así como de los controles de calidad del producto acabado.
- **Estudio de validación:** sensibilidad y especificidad analítica y diagnóstica, repetibilidad y reproducibilidad, frente a patrones nacionales e internacionales de referencia, en su caso; robustez, periodos de vida útil y de estabilidad real y forzada.
- Correlación con otras técnicas, cuando sea necesario.
- **Declaración de método validado**, fechada, sellada y firmada por el responsable técnico en la que se detallen:
  - Objetivos de validación.
  - Diseño de validación.
  - Resultados de los parámetros del estudio de validación.
  - Procedencia y número de muestras usadas en la valoración de cada parámetro.
  - Metodología utilizada para el cálculo de resultados.
  - Correlación con otras técnicas, en su caso.
  - Valoración final de la validación.
  - Firma del técnico responsable.
- Situación legal del país de origen, cuando proceda, junto con los textos informativos que acompañan el producto.
- Material de acondicionamiento y textos que se proponen para su comercialización en la lengua oficial del Estado.

- Propuestas de etiquetas de los diversos formatos en los que se presente el producto.

Además, dependiendo de la enfermedad de que se trate, el solicitante, deberá remitir la/s unidad/es del lote de prueba o del primer lote de fabricación necesarias para llevar a cabo su testado, de esta manera (Tabla 1):

**a. Serán testados:**

- Los reactivos de diagnóstico de uso veterinario de las enfermedades incluidas **en la parte A y C del Real Decreto 526/2014, de 20 de junio, por el que se establece la lista de las enfermedades de los animales de declaración obligatoria y se regula su notificación.**
- Los que por razones de orden sanitario, zootécnico o tecnológico así se establezca,

**Podrá valorarse no testar** aquellos reactivos de diagnóstico de uso veterinario, **cuando hayan sido validados** por laboratorios nacionales de referencia de Estados Miembros de la Unión Europea, de referencia de la Unión Europea, o de referencia de la Organización Mundial de la Sanidad Animal (OIE), o hayan sido validados conforme a normas reconocidas internacionalmente por organismos de certificación.

**b. En el resto de reactivos de diagnóstico de uso veterinario:**

Se realizará **una evaluación documental** de los estudios de validación que se aporten en la documentación técnica que acompañe a la solicitud, tras lo cual emitirá el correspondiente informe, que será preceptivo para su autorización.

**Tabla 1. Autorización de la Inscripción y Registro de los reactivos de diagnóstico de uso veterinario**

REGISTRO REACTIVOS DE DIAGNÓSTICO DE USO VETERINARIO	Evaluación documental	Contrastación
Real Decreto 526/2014 (EDO)	si	si
Real Decreto 526/2014 (EDO)		
-validados por Lab. Ref. de EE.MM de la UE	si	valorar
-validados Lab. Ref. de la UE	si	valorar
-validados Lab. Ref. de la OIE	si	valorar
-validados conforme a normas reconocidas internacionalmente por organismos de certificación	si	valorar
Razones de orden sanitario, zootécnico o tecnológico	si	si
Resto de Reactivos de Diagnóstico	si	no

Todos estos procesos, serán llevados a cabo por el laboratorio nacional de referencia correspondiente a cada enfermedad o por el laboratorio oficial que designe la Dirección General de Sanidad de la Producción Agraria del MAPA.

En cualquier caso, **será preceptivo el informe favorable** de dicho laboratorio para su inscripción de oficio en el Registro de Entidades y Productos Zoonosanitarios, con la asignación del número correspondiente, que se comunicará al interesado en el plazo máximo de treinta días desde la inscripción y que contendrá información relevante sobre los usos previstos, fabricante/s y entidad titular del mismo.

El plazo máximo para resolver y notificar al interesado los procedimientos de suspensiones, modificaciones o revocaciones será de seis meses, ampliable como máximo por otros seis meses.

**Las autorizaciones e inscripciones en el Registro de los reactivos de diagnóstico, tienen un periodo de validez de 5 años**, salvo que por razones de orden sanitario, zootécnico, medioambiental o tecnológico justificadas, se establezcan motivadamente periodos más cortos o experimentales.

## **2.2. RENOVACIÓN DEL REGISTRO DE REACTIVOS DE DIAGNÓSTICO DE USO VETERINARIO (art. 10 RD 867/2020)**

Como norma general, las autorizaciones de comercialización de los reactivos de diagnóstico **deberán ser renovadas cada 5 años**, en caso contrario se procederá a su cancelación de oficio. Las solicitudes de renovación de la autorización e inscripción en el Registro deben presentarse, como mínimo, tres meses antes de que finalice el plazo de validez de la autorización.

## **2.3. MODIFICACIÓN DEL REGISTRO DE REACTIVOS DE DIAGNÓSTICO DE USO VETERINARIO (art. 10 RD 867/2020)**

En el caso en que se realice **algún cambio en el reactivo de diagnóstico de uso veterinario** que afecte al protocolo, incluido cualquier modificación del inserto que acompañe al producto y cualquier cambio de etiquetado, a alguno de los componentes, o **al uso previsto** del mismo (por ejemplo, cambio de matriz o de especie animal a las que aplica), deberá presentarse la correspondiente solicitud de modificación del registro y junto a ella se aportará la documentación haciendo especial referencia a:

- La descripción de las modificaciones realizadas.
- Los estudios de validación realizados.
- La Declaración de Método Validado (DMV) actualizada.

**Las modificaciones de las autorizaciones e inscripciones** en el Registro de un reactivo de diagnóstico de uso veterinario **no modifican el periodo de validez de 5 años** establecido en su momento.

## 2.4. CONTRASTACIÓN DE LOTES (art. 11 RD 867/2020)

Según establece el RD (Tabla 2), **los lotes de reactivos de diagnóstico de uso veterinario**, de las enfermedades de los animales **objeto de programas nacionales de prevención, control, lucha y erradicación en vigor, serán testados de forma aleatoria o dirigida**, en función de criterios sanitarios, zootécnicos o tecnológicos, previamente a su distribución o suministro. Estos análisis serán realizados por el laboratorio oficial designado a tal efecto por el MAPA.

Ante situaciones de crisis sanitaria, en especial ante la aparición de una enfermedad emergente o de una enfermedad de alta difusión, podrá establecerse, mediante resolución de la Dirección General de Sanidad de la Producción Agraria, que se publicará en el «Boletín Oficial del Estado», la obligación de contrastación previa de los lotes de los reactivos de diagnóstico de uso veterinario de dicha enfermedad. Dicha obligación se establecerá temporalmente y, como máximo, hasta que se recupere la normalidad sanitaria o se declare extinguida la enfermedad.

**Tabla 2. Contrastación de lotes de los reactivos de diagnóstico de uso veterinario**

<b>CONTROL DE LOTES DE REACTIVOS DE DIAGNÓSTICO</b>	<b>Contrastación</b>
Programas Nacionales de prevención, control, lucha y erradicación	si
Situaciones de crisis sanitaria (temporal)	si

## 3. MARCO LEGAL

### 3.1. ANTECEDENTES

Para llevar a cabo el control de los reactivos de diagnóstico de uso veterinario, hacía falta, establecer un marco jurídico donde se reconociera la necesidad de control sobre estos productos y estableciera las bases para su desarrollo (Tabla 3).

Surge así **el Real Decreto 163/1981, de 23 de enero, sobre productos zoonutricionales y otras sustancias utilizadas en la producción animal**, donde se definían y clasificaban los productos zoonutricionales y se actualizaban los requisitos y exigencias de su producción, distribución, utilización y control. Pero tenía en cuenta bases de la antigua Ley de Sanidad Nacional del año 1944 y la ley de epizootias del año 1952.

Posteriormente, se elaboran numerosas normas más específicas como la **Orden de 13 de junio de 1983** por la que se dan normas sobre productos zoonutricionales y otras sustancias utilizadas en la producción animal y que derogaba parcialmente este RD quedando excluido del mismo, los medicamentos veterinarios, los medicamentos veterinarios homeopáticos, los piensos medicamentosos y los biocidas de uso ganadero.

Pero no fue hasta la aprobación de la **Ley 8/2003, de 24 de abril, de Sanidad Animal**, cuando se sientan las bases que regulan en la actualidad la autorización, uso y comercialización de los productos zoonutricionales. **En su Título IV, Capítulo II** sobre otros productos zoonutricionales,

establece ya la obligación de una autorización, expedida por el Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente, para la puesta en el mercado de cualquier reactivo de diagnóstico de enfermedad animal así como de las entidades elaboradoras. Para el resto de productos zoonosanitarios será suficiente una declaración responsable de la entidad elaboradora.

Esta ley en el ámbito de los productos zoonosanitarios se desarrolla gracias al **Real Decreto 488/2010 del 23 de abril**, por el que se vuelven a regular los productos zoonosanitarios, en cuanto a la autorización, comercialización y uso de los mismos excluyendo los medicamentos veterinarios, los medicamentos veterinarios homeopáticos, los piensos medicados, los biocidas y los productos para la alimentación animal que se registrarán por una normativa específica.

### 3.2. REAL DECRETO 867/2020

El Real Decreto anterior (RD 488/2010), ha sido derogado y sustituido por el **Real Decreto 867/2020, de 29 de septiembre**, por el que se regulan los productos zoonosanitarios de reactivos de diagnóstico de uso veterinario, los sistemas de control de parámetros fisiológicos en animales y los productos destinados al mantenimiento del material reproductivo animal, siendo, el que en la actualidad, establece las directrices para el control de los reactivos de diagnóstico de uso veterinario y de sus lotes tal y como se ha comentado en los puntos anteriores.

#### 3.2.1. Objetivos Fundamentales

Los objetivos fundamentales de este Real decreto son:

- **Regular los procedimientos de autorización e inscripción** de los productos zoonosanitarios, simplificándolos y haciéndolos más eficaces.
- Efectiva utilización de los medios electrónicos con la entrada en vigor de la Ley 39/2015, de 1 de octubre, del Procedimiento Administrativo Común de las Administraciones Públicas, **que establece la obligatoriedad de relacionarse con la Administración de forma electrónica.**
- Denominación del Registro, que pasa a denominarse **Registro de Entidades y Productos Zoonosanitarios.**
- Sólo se inscribirán en el Registro, **mediante declaración responsable, los productos y entidades titulares de los sistemas de control de parámetros fisiológicos en animales** (glucosímetros, parámetros hematológicos, químicos y bioquímicos) y de **productos destinados al mantenimiento del material reproductivo animal.**
- **Se elimina la obligatoriedad** de declaración responsable, y posterior inscripción, **del resto de productos y entidades titulares de productos de higiene, cuidado y manejo de los animales y resto del material de utillaje zoonosanitario**, de manera que se cancelan las actuales inscripciones existentes respecto de dichos productos.

- **Se establece un desarrollo detallado de los distintos procedimientos y modelos de solicitud o declaración responsable**, relativos tanto a las empresas como a los productos zoonosanitarios.
- Se indica la información que debe contener **el envasado y etiquetado** de los productos.
- La Dirección General de Sanidad de la Producción Agraria, cuando lo estime necesario, podrá ejercer **actuaciones de inspección o control para** la autorización o inscripción de entidades elaboradoras de los mismos.

### **3.2.2. Ámbito de Aplicación**

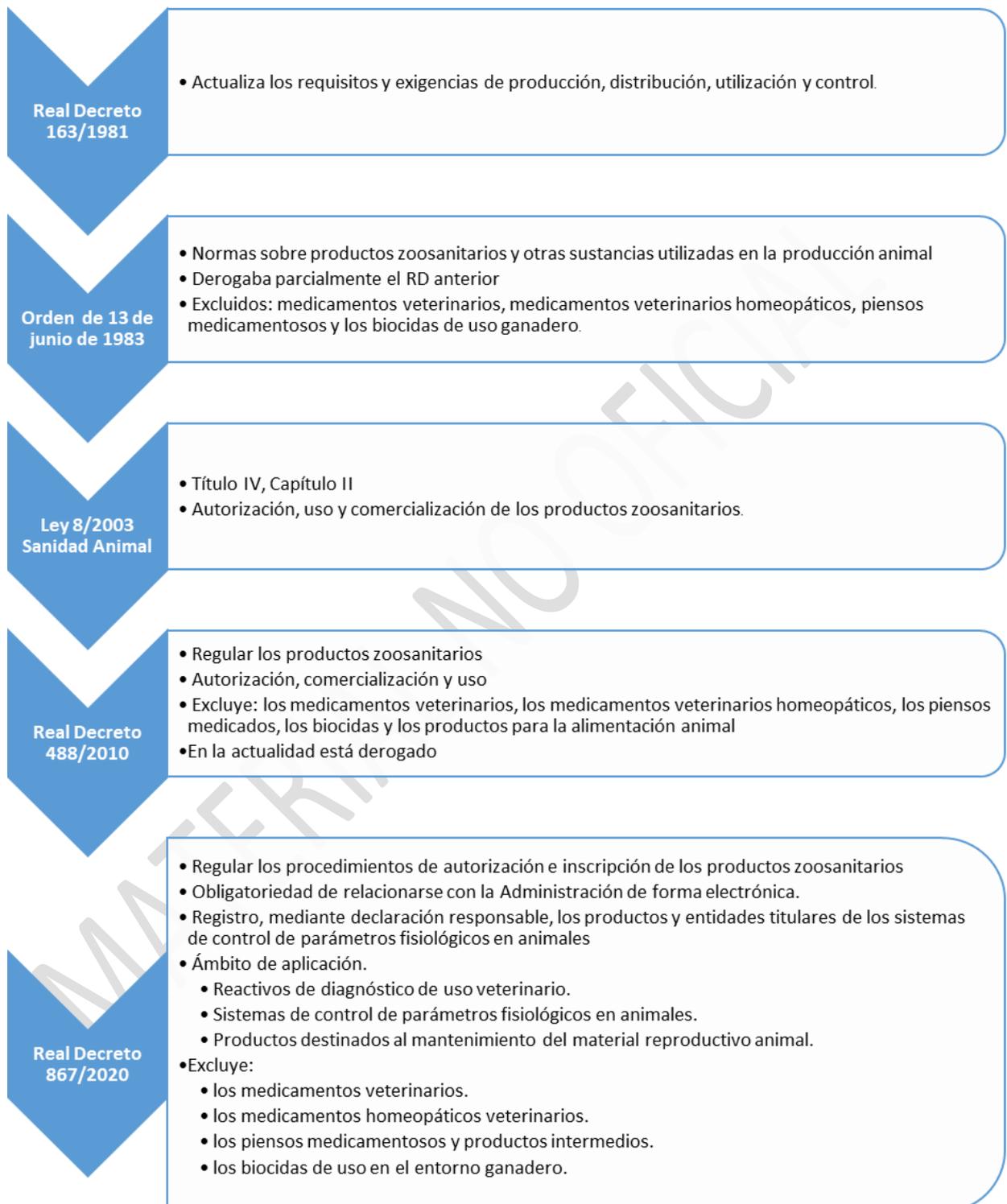
**El ámbito de aplicación de este RD es:**

- **Reactivos de diagnóstico de uso veterinario.**
- **Sistemas de control de parámetros fisiológicos en animales.**
- **Productos destinados al mantenimiento del material reproductivo animal** (conservantes y diluyentes de semen, ovocitos y embriones) contemplados en el Real Decreto 841/2011, de 17 de junio, por el que se establecen las condiciones básicas de recogida, almacenamiento, distribución y comercialización de material genético de las especies bovina, ovina, caprina y porcina, y de los équidos, que no contengan sustancias con acción medicamentosa, excepto aquellas sustancias cuya acción sea la de preservación del producto.

**Quedan excluidos de este RD**

- los medicamentos veterinarios.
- los medicamentos homeopáticos veterinarios.
- los piensos medicamentosos y productos intermedios.
- los biocidas de uso en el entorno ganadero.

**Tabla 3. Cronología de la legislación para el control de los reactivos de uso veterinario**



### 3.2.3. Estructura

Este RD se divide en tres bloques básicos:

- a. **Sobre autorizaciones tanto para entidades como para los reactivos de diagnóstico:** donde se desarrolla las premisas establecidas ya previamente en la ley 8/2003.

**En su Capítulo II (art. 6 y 7)** tanto las **entidades titulares de reactivos de diagnóstico, como los reactivos de diagnóstico de uso veterinario, deberán ser autorizados** previamente para su comercialización por la Dirección General de Sanidad de la Producción Agraria, e **inscritos** por la Subdirección General de Sanidad e Higiene Animal y Trazabilidad en el Registro de Entidades y Productos Zoonosanitarios.

Por otro lado establece (art. 8) las enfermedades animales cuyos reactivos de diagnóstico deberán ser testados previamente a su autorización, así como (art. 11) la contrastación de sus lotes.

**En su Capítulo VI (art. 20)** se indica, que podrán concederse **autorizaciones excepcionales** para la comercialización de productos zoonosanitarios en los siguientes supuestos:

- Si ante la aparición de una enfermedad animal o por razones urgentes de sanidad animal, no existiera ningún producto zoonosanitario adecuado autorizado, o aun habiéndolo, exista riesgo de desabastecimiento, y cuando se trate de un producto utilizado o autorizado habitualmente en otro u otros terceros países para el uso o finalidad previstos.
- Si el producto va a ser utilizado exclusivamente por los órganos competentes en materia de sanidad animal de las administraciones públicas.

La duración de la autorización excepcional vendrá determinada en cada caso en la correspondiente resolución, **y será como máximo de un año**. Dicha autorización podrá ser anulada o revocada si, antes de finalizar el periodo establecido, desaparecen los motivos que la originaron.

- b. **Sobre comercialización y uso:**

**En el Capítulo VII (art.22)** se establece que en el momento de su comercialización, **los productos zoonosanitarios estarán debidamente envasados e identificados** con la etiqueta correspondiente donde debe figurar el número de registro y acompañado de las instrucciones de uso y conservación. Estos datos deberán estar redactados en la lengua oficial del Estado.

**c. Control y régimen sancionador:**

En su **Capítulo VIII (art. 25)**, establece el control o inspección de la elaboración, almacenamiento y comercialización o uso de los productos zoonosanitarios, así como, el régimen sancionador por el incumplimiento de la norma.

- La Administración General del Estado ejercerá dichas funciones en materia de importación o exportación de los productos incluidos en el ámbito de aplicación de este real decreto, así como de las entidades titulares o elaboradoras de los mismos.
- Los órganos competentes de las comunidades autónomas y ciudades de Ceuta y Melilla serán los encargados de la realización de las inspecciones y controles en materia de distribución, uso, suministro o venta de productos zoonosanitarios.

Para el régimen sancionador, se remite a lo establecido en la Ley 8 /2003, de sanidad Animal y demás normativa aplicable en cada caso, sin perjuicio de las responsabilidades civiles, penales o de otro orden que pudieran concurrir.

## BIBLIOGRAFÍA

Real Decreto 163/1981, de 23 de enero sobre productos zoonosanitarios y otras sustancias utilizadas en la producción animal.

<https://www.boe.es/buscar/doc.php?id=BOE-A-1981-3153>

Orden de 13 de junio de 1983 por la que se dan normas sobre productos zoonosanitarios y otras sustancias utilizadas en la producción animal.

<https://www.boe.es/buscar/doc.php?id=BOE-A-1983-16948>

Ley 8/2003, de 24 de abril, de Sanidad Animal.

RD 488/2010 del 23 de abril por el que se regulan los productos zoonosanitarios. Disposición derogada.

<https://www.boe.es/buscar/doc.php?id=BOE-A-2010-6486>

Real Decreto 526/2014, de 20 de junio (*enfermedades de declaración obligatoria*).

Real Decreto 867/2020, de 29 de septiembre de septiembre *por el que se regulan los productos zoonosanitarios de reactivos de diagnóstico de uso veterinario, los sistemas de control de parámetros fisiológicos en animales y los productos destinados al mantenimiento del material reproductivo animal.*

<https://www.boe.es/boe/dias/2020/09/30/pdfs/BOE-A-2020-11424.pdf>

**MATERIAL PARA LA PREPARACIÓN DEL TEMA 47**

**ZOONOSIS PARASITARIAS OBJETO DE CONTROL DE LA UE: MARCO LEGAL. DIAGNÓSTICO DE LABORATORIO.**

*Este material no tiene carácter oficial, por lo que en ningún caso vinculará al Tribunal Calificador. Constituye, únicamente, un instrumento complementario que servirá de apoyo al opositor para enfocar cada uno de los epígrafes, pero nunca de forma exclusiva ni excluyente. El Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación no se hace responsable del contenido del mismo.*

*Los materiales no serán objeto de actualización constante.*

## **ÍNDICE**

### **1. INTRODUCCIÓN: CONCEPTO DE ZONOSIS PARASITARIAS**

- 1.1. INTRODUCCIÓN
- 1.2. CLASIFICACIÓN DE ZONOSIS

### **2. MARCO LEGAL**

- 2.1. ÁMBITO COMUNITARIO
- 2.2. ÁMBITO NACIONAL

### **3. DIAGNÓSTICO DE LABOTARORIO**

- 3.1. CRIPTOSPORIDIOSIS
- 3.2. GIARDIASIS
- 3.3. TOXOPLASMOSIS
- 3.4. TRIQUINELOSIS
- 3.5. EQUINOCOCOSIS/HIDATIDOSIS
- 3.6. CISTICERCOSIS
- 3.7. ANISAKIASIS

MATERIAL NO OFICIAL

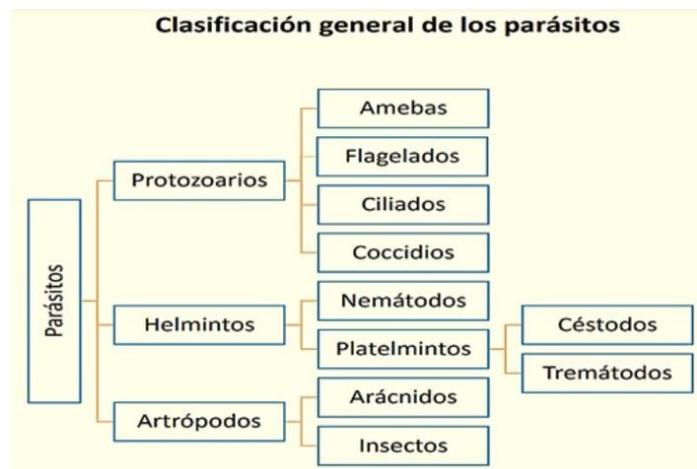
## 1. INTRODUCCIÓN: CONCEPTO DE ZOONOSIS PARASITARIAS

El conocimiento de que existen enfermedades comunes al hombre y a los animales de su entorno puede considerarse tan antiguo como la propia humanidad. A lo largo de la historia, las civilizaciones han dejado constancia de ello, estableciendo indicaciones (rituales, tratamientos naturales, cambios en hábitos cotidianos, ...) ya sea para evitar padecerlas o para intentar curar la enfermedad. Sin embargo, a pesar de resultarnos tan familiar, el vocablo “zoonosis” es etimológicamente inexacto y su concepto admite múltiples aproximaciones, viniendo a complicarse con el hecho de las diversas clasificaciones a las que se somete.

Teniendo en cuenta numerosas definiciones ya existentes (de la Oficina Panamericana de Salud, numerosos expertos...) y con intención de sintetizar el concepto, la propia OMS ha definido a las **zoonosis** como *aquellas enfermedades que se transmiten de forma natural de los animales al hombre y viceversa, bien sea directamente, bien a través del medio ambiente, incluidos portadores, reservorios y vectores*, concepto que queda recogido también en la Ley 8/2003 de Sanidad Animal.

Según el concepto de zoonosis que se maneje y atendiendo también a las clasificaciones, cambiará el número de procesos que se consideren como tales. La OMS elevó el número de zoonosis a 233 en 2012. Si este número ya revela la importancia de las zoonosis, no menos importante es el hecho de que bastantes de ellas son consideradas zoonosis emergentes: según la revista médica Lancet, “todas las enfermedades infecciosas humanas que han emergido en los últimos 20 años han tenido un origen/fuente animal”.

En este tema nos centraremos en las zoonosis parasitarias, que son aquellas en las que el agente que provoca la enfermedad es un parásito. De manera general, podríamos decir que un parásito es un organismo animal o vegetal que vive a costa de otro de distinta especie, viviendo sobre él o en su interior. El organismo parasitado se denomina huésped u hospedador, y generalmente sufre consecuencias negativas, viéndose debilitado en algún aspecto, pero sin llegar a morir por ello.<sup>1</sup>



<sup>1</sup> Fuente imagen: <https://corporacionbiologica.info/microbiologia/atlas-de-parasitologia/>

## **2. MARCO LEGAL**

La alta incidencia que pueden presentar ciertas zoonosis, así como la importante repercusión sanitaria, social y/o económica de algunas de ellas, justifican la necesidad de establecer herramientas normativas que permitan realizar una permanente vigilancia epidemiológica, así como adoptar las medidas necesarias para impedir su presentación o difusión. A continuación se incluyen referencias normativas tanto de salud pública como de sanidad animal, donde se incluyen las enfermedades parasitarias de carácter zoonótico desarrolladas en este tema.

### **2.1. ÁMBITO COMUNITARIO**

**DIRECTIVA 2003/99/CE DEL PARLAMENTO EUROPEO Y DEL CONSEJO de 17 de noviembre de 2003 sobre la vigilancia de las zoonosis y los agentes zoonóticos y por la que se modifica la Decisión 90/ 424/CEE del Consejo y se deroga la Directiva 92/117/CEE del Consejo**

A través de esta norma se estableció:

Por un lado, que los Estados Miembros deben recopilar y publicar toda la información posible sobre presencia de zoonosis y agentes zoonóticos y sobre resistencia antimicrobiana ligada a ellos, garantizando la cooperación y el intercambio de información.

También manifiesta la obligación de los Estados Miembros de implementar programas nacionales de:

1. Vigilancia de las zoonosis y los agentes zoonóticos
2. Vigilancia de las resistencias a los antimicrobianos relacionadas con dichos agentes/zoonosis,

De modo que dicha vigilancia se llevará a cabo en la o las fases de la cadena alimentaria más apropiada según el agente zoonótico.

Por otro lado, les obligaba también a realizar investigación epidemiológica de los brotes de las enfermedades transmitidas por alimentos.

En último lugar, también se estableció el deber de intercambiar información con la Comisión y los EEMM, sobre las zoonosis y los agentes zoonóticos

Todo ello, con el fin primordial de conocer al máximo cada agente patógeno, sus mecanismos de transmisión y los factores dependientes del procesamiento alimentario que intervienen en la producción de brotes de origen alimentario.

El Anexo I de esta norma recoge los agentes/enfermedades objeto de vigilancia (mencionares sólo los que son objeto de este tema):

### **A. Zoonosis y agentes zoonóticos que deben ser objeto de vigilancia**

- Equinocosis y sus agentes causales
- Triquinosis y sus agentes causales

### **B. Lista de zoonosis y agentes zoonóticos que deben ser objeto de vigilancia en función de la situación epidemiológica**

- Anisakiasis y sus agentes causales
- Criptosporidiosis y sus agentes causales
- Cisticercosis y sus agentes causales
- Toxoplasmosis y sus agentes causales

### **REGLAMENTO DE EJECUCIÓN (UE) 2018/1882 DE LA COMISIÓN de 3 de diciembre de 2018 relativo a la aplicación de determinadas normas de prevención y control a categorías de enfermedades enumeradas en la lista y por el que se establece una lista de especies y grupos de especies que suponen un riesgo considerable para la propagación de dichas enfermedades de la lista**

Esta norma surge considerando el Reglamento (UE) 2016/429 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 9 de marzo de 2016, relativo a las enfermedades transmisibles de los animales, de modo que ambas normas entraron en vigor a la vez.

Se basa en aplicar ciertas normas y medidas a las especies que puedan transmitir las enfermedades de la lista, ya sea porque son especies sensibles o por ser portadoras. El abanico de medidas aplicables variará según el impacto de la enfermedad a diferentes niveles (salud pública, sanidad animal, economía, medio ambiente...).

El Artículo 1 de este reglamento recoge textualmente:

*“A los efectos del presente Reglamento, se entenderá por:*

*1) «enfermedad de categoría A»: una enfermedad de la lista que no esté presente normalmente en la Unión y en relación con la cual deben tomarse medidas de erradicación inmediatas tan pronto como se detecte su existencia, como señala el artículo 9, apartado 1, letra a), del Reglamento (UE) 2016/429;*

*2) «enfermedad de categoría B»: una enfermedad de la lista que debe controlarse en todos los Estados miembros con el objetivo de erradicarla en toda la Unión, como señala el artículo 9, apartado 1, letra b), del Reglamento (UE) 2016/429;*

*3) «enfermedad de categoría C»: una enfermedad de la lista con importancia para determinados Estados miembros y sobre la que deben adoptarse medidas para evitar su propagación a regiones de la Unión declaradas oficialmente libres de ella o que cuentan con programas de erradicación de la enfermedad de la lista de que se trate, como señala el artículo 9, apartado 1, letra c), del Reglamento (UE) 2016/429;*

4) «enfermedad de categoría D»: una enfermedad de la lista sobre la que deben adoptarse medidas para evitar su propagación en relación con su introducción en la Unión o con desplazamientos entre Estados miembros, como señala el artículo 9, apartado 1, letra d), del Reglamento (UE) 2016/429; 5) «enfermedad de categoría E»: una enfermedad de la lista sobre la que es necesario que la Unión ejerza vigilancia, como señala el artículo 9, apartado 1, letra e), del Reglamento (UE) 2016/429.”

De acuerdo con lo anterior, la norma establece lo siguiente:

Nombre enfermedad incluida en la lista	Categoría de la enfermedad incluida en la lista	Especies incluidas en la lista
Infestación por E. multilocularis	C+D+E	Canidae
Surra (T. evansi)	D+E	Equidae, Artiodactyla Portadora: Tabanidae
Tricomonosis	D+E	Bison spp, Bubalus spp, Bos spp
Durina	D+E	Equidae

De estas enfermedades parasitarias, sólo la primera se considera zoonosis.

#### **DECISIÓN DE EJECUCIÓN (UE) 2018/945 DE LA COMISIÓN de 22 de junio de 2018 sobre enfermedades transmisibles y problemas sanitarios especiales relacionados que deben estar sujetos a vigilancia epidemiológica, así como las definiciones de casos pertinentes**

Esta norma establece, en el contexto comunitario, los procesos zoonóticos de mayor relevancia de la UE y que, como consecuencia, deberán ser objeto de vigilancia epidemiológica. Presente un enfoque dirigido a notificación de casos humanos, si bien cabe mencionar las enfermedades consideradas zoonosis parasitarias. Estas enfermedades quedan recogidas en su Anexo I.

**ANEXO I** Enfermedades transmisibles y problemas sanitarios especiales relacionados que debe cubrir la red de vigilancia epidemiológica:

**Criptosporidiosis, Equinocosis, Giardiasis (lambliasis), Toxoplasmosis congénita, Triquinosis.**

## **2.2. ÁMBITO NACIONAL**

**Real Decreto 1940/2004, de 27 de septiembre, sobre la vigilancia de las zoonosis y los agentes zoonóticos.**

Es una trasposición de la Directiva 2003/99, por lo que los objetivos y las zoonosis parasitarias mencionables son los mismos que se enuncian en el apartado de dicha

directiva. Destacar que incluye los laboratorios implicados en la vigilancia y control de las zoonosis/agentes zoonóticos (que deberían aparecer en el tema específico al respecto).

Este real decreto se complementa con la **Orden APA/1808/2007, de 13 de junio, por la que se modifica el anexo V del Real Decreto 1940/2004, de 27 de septiembre, sobre la vigilancia de las zoonosis y los agentes zoonóticos**, donde se modifica el listado de laboratorios nacionales de referencia y sus competencias. Así, en lo que respecta a este tema, el Laboratorio Central de Sanidad Animal, sito en Santa Fe, tiene asignado, textualmente, "*leishmaniasis y sus agentes causales, equinococosis y sus agentes causales, triquinosis y sus agentes causales, criptosporidiosis y sus agentes causales, cisticercosis y sus agentes causales, toxoplasmosis y sus agentes causales, anisakiasis y sus agentes causales, y otras parasitosis en productos para la alimentación animal y en animales vivos, salvo los sospechosos de rabia*".

**Real Decreto 2210/95 de 28 de diciembre, por el que se crea la Red Nacional de Vigilancia Epidemiológica, relativos a la lista de enfermedades de declaración obligatoria, modalidades de declaración y enfermedades endémicas de ámbito regional.**

Establece la Red Nacional de Vigilancia Epidemiológica (=RENAVE) y sus características básicas, y especifica en su Anexo I las enfermedades objeto de declaración obligatoria<sup>2</sup>.

Pero dicho anexo no consideraba la situación epidemiológica actualizada de España y no abarcaba toda la lista de enfermedades que las normas de los organismos internacionales requieren a los EEMM, por lo que fue necesario modificar dicho anexo para adaptarlo a estos requerimientos, así como los anexos II y III. Esta modificación se llevó a cabo a través de la **Orden SSI/445/2015, de 9 de marzo**.

Los objetivos genéricos de este RD son la detección precoz de los problemas de salud y la posibilidad de actuar de modo inmediato sobre los mismos. Para ello, incorpora un sistema básico de vigilancia, que incluye:

- La notificación obligatoria de enfermedades\*
- La notificación de situaciones epidémicas y brotes
- La información microbiológica

---

<sup>2</sup>Desde que se aprobó, los organismos internacionales en los que España está representada, OMS y Comisión Europea, han elaborado normativa para prevenir y controlar la propagación internacional de las enfermedades transmisibles. El aumento de los viajes y el comercio internacional, así como la aparición de nuevas enfermedades y reaparición de enfermedades eliminadas o controladas que pueden suponer una emergencia de salud pública de importancia internacional, motivó que los EEMM de la OMS solicitaran una revisión del Reglamento Sanitario Internacional, con el objetivo de mejorar la respuesta mundial a estas situaciones. Se adoptó por consenso el Reglamento Sanitario Internacional 2005, que entró en vigor el 15 de junio de 2007 y que obliga a los Estados a tener capacidad para detectar, evaluar y notificar eventos que puedan constituir una emergencia de salud pública; además, aporta criterios para decidir que eventos deben ser notificados a la OMS.

Se establecen al respecto 4 modalidades de declaración:

- Urgente [no incluye ninguna zoonosis parasitaria]
- Semanal, acompañada de datos epidemiológicos básicos: hidatidosis, leishmaniosis, triquinosis.
- Con datos epidemiológicos básicos agrupados en períodos de 4 semanas: criptosporidiosis, giardiasis.

### 3. DIAGNÓSTICO DE LABOTARORIO

#### 3.1. CRIPTOSPORIDIOSIS

##### Descripción de la enfermedad y riesgo para la salud humana

La criptosporidiosis es el trastorno que deriva de la infección por el protozoo **Cryptosporidium**. Tras la infección, el ciclo de vida de *Cryptosporidium*, que incluye fases asexuales y fases sexuales, termina en un único hospedador, produciendo ooquistes esporulados. Existen al menos 32 especies “válidas” de *Cryptosporidium*, algunas de las cuales causan enfermedad en el ser humano, en el ganado, en aves de corral y en aves cinegéticas, así como en animales de compañía. ***Cryptosporidium parvum*** es la especie zoonótica más importante. Infecta principalmente el tracto gastrointestinal y causa diarrea en animales de producción antes del destete. La mortalidad suele ser baja, pero en ocasiones pueden tener lugar brotes graves. Los animales destetados y adultos no suelen presentar signos de la enfermedad, pero pueden excretar ooquistes que pueden contaminar el entorno y facilitar la posterior transmisión.

La criptosporidiosis humana suele ser una enfermedad gastrointestinal aguda y autolimitante que se caracteriza por una diarrea acuosa, espasmos abdominales, vómitos, fiebre baja y pérdida de apetito. Los síntomas pueden durar hasta 1 mes, durante el cual tienen lugar recaídas en alrededor de un tercio de los casos. La infección por *Cryptosporidium* se ha asociado a secuelas a largo plazo, pero se precisa más investigación. Los pacientes con inmunodeficiencia grave pueden sufrir una criptosporidiosis crónica, grave e intratable que conduzca a una mortalidad considerable. En los niños con malnutrición, la infección causa una morbilidad y una mortalidad considerables. Además de las especies zoonóticas de *Cryptosporidium*, ***C. hominis*** también es una causa importante de enfermedad gastrointestinal en el ser humano. Aunque sí se dispone de algunos datos sobre las infecciones por *C. hominis* en los ganados bovino y ovino, no existen pruebas de que esta infección se mantenga en los rebaños o manadas o de que se transmita entre estos, así como tampoco de signos clínicos en los animales.

La transmisión tiene lugar por vía feco-oral y en ella pueden intervenir elementos como alimento o agua de bebida contaminados. *C. parvum* es muy infeccioso para ganado de corta edad y personas jóvenes; el ganado de más edad puede quedar infectado y excretar ooquistes que podrán transmitirse a otros hospedadores susceptibles. La transmisión de *C. hominis* se considera antroponótica (=sólo la transmiten los humanos). La infectividad de

cada cepa es distinta, y la susceptibilidad está influida por factores relacionados con el hospedador. En modelos de dosis-respuesta se observa que existe una probabilidad alta de infección de personas y de ganado aun no destetado por cifras muy bajas de ooquistes de *C. parvum*, y también que existe una relación entre los anticuerpos pre-existentes y la protección frente a la infección.

### **Diagnóstico de laboratorio**

Para establecer un diagnóstico es necesaria la identificación a nivel de laboratorio. Lo habitual es llevar a cabo una observación microscópica de los ooquistes, aplicando a frotis fecales una tinción de Ziehl-Neelsen con solución de alcohol ácido, auramina con fenol o inmunofluorescente.

También se utilizan mucho los enzoinmunoanálisis, pero pueden proporcionar poca especificidad. Por otra parte, cada vez se dispone de más pruebas de diagnóstico molecular. La especie infectante no se puede identificar ni por la morfología de los ooquistes ni por el resultado de las pruebas basadas en anticuerpos, pero sí con un análisis del ADN amplificado mediante la reacción en cadena de la polimerasa. La mayoría de casos de criptosporidiosis en ganado mamífero de corta edad están causados por *C. parvum*, que también es la especie zoonótica más importante. No existe ningún proceso de subtipificación estandarizado, pero la secuenciación del gen gp60 podría dar información relevante para el estudio de un brote. Se están elaborando sistemas de subtipificación multilocus pero todavía no están estandarizados. Los ooquistes pueden sobrevivir en entornos húmedos durante muchos meses, y tiene lugar una transmisión mediante el alimento y el agua. No obstante, resulta difícil aplicar la genotipificación a las pequeñas cantidades de ooquistes que por lo general se hallan en el alimento, el agua y el medio ambiente.

**Tabla 2.** Métodos analíticos disponibles para el diagnóstico de la criptosporidiosis y su propósito

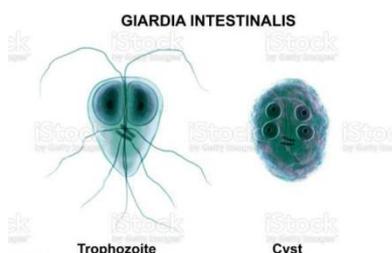
Método	Propósito					
	Demostrar ausencia de infección en la población	Demostrar ausencia de infección en animales individuales antes de los desplazamientos	Contribuir a las políticas de erradicación	Confirmar casos clínicos	Determinar la prevalencia de la infección – vigilancia	Determinar el estado inmunitario en animales o poblaciones tras la vacunación
<b>Identificación del agente<sup>1</sup></b>						
Microscopía convencional	–	–	–	+++	++	–
FAT	–	–	–	+++	++	–
Detección de antígeno por IC	–	–	–	+	+	–
Detección de antígeno por ELISA	–	–	–	+++	+++	–
PCR	–	–	–	+++	+++	–
<b>Detección de respuesta inmunitaria</b>						
Detección de anticuerpos por ELISA	–	–	–	–	++	–

Clave: +++ = método recomendado para este propósito; ++ = método recomendado pero tiene limitaciones; + = método adecuado en muy pocas situaciones; – = no adecuado para este propósito.  
FAT = prueba de fluorescencia directa; IC = inmunocromatografía;  
PCR = reacción en cadena de la polimerasa; ELISA = enzimoimmunoanálisis.

Aunque no todas las pruebas clasificadas como +++ o ++ han sido validadas formalmente, su uso sistemático y el hecho de que se hayan utilizado ampliamente sin resultados dudosos las hacen aceptables.

### 3.2. GIARDIASIS

#### Descripción de la enfermedad y riesgo para la salud humana



<sup>3</sup>La giardiasis es una enfermedad provocada por un parásito microscópico llamado *Giardia lamblia* (o *G. duodenalis* o *G. intestinalis*). Se trata de un protozoo flagelado que parasita el intestino delgado de su hospedador provocando síndrome diarreico, ya sea agudo, crónico o intermitente. En algunos casos, los hospedadores no presentan síntomas, actuando como portadores. La giardiasis es la protozoosis entérica más

frecuente del mundo, y queda recogida en la Decisión 2000/96/CE como una de las enfermedades relevantes objeto de vigilancia en la UE. Sin embargo, la OIE no la incluye en

<sup>3</sup> Fuente imagen: <https://www.istockphoto.com/es/foto/protozoo-de-giardia-intestinalis-gm1076736652-288367593>

su listado, no le dedica ningún capítulo específico; más aún, usando “giardia” en la web como criterio de búsqueda, no genera resultados. Puede que su vigilancia se base en la notificación de casos humanos.

*Giardia* es un parásito cosmopolita, distribuido mundialmente; numerosas especies de mamíferos pueden servirle como hospedador (gatos, perros, ganado bovino, ciervos, humanos...).

Presenta dos formas: trofozoíto (=el que prolifera) y quiste (= forma infectante). Tiene un ciclo directo, que comienza con la ingestión de ooquistes por el nuevo hospedador; la exposición al ácido gástrico induce la activación del quiste en reposo. En respuesta al pH alcalino, las proteasas del intestino y señalizaciones propias del parásito, emerge una célula que se divide 2 veces sin replicación del DNA, produciendo eventualmente 4 trofozoítos. Cuando pasan al colon se enquistan, reforzando su pared externa, lo que otorga protección suficiente en el medio exterior. Esta actividad parasitaria provoca una serie de síntomas en el hospedador, que suelen aparecer 1 -3 semanas postinfección, tales como diarrea (el principal), flatulencias, náuseas, deshidratación... generalmente desaparecen 2-6 semanas después. Los ooquistes producidos se liberan por las heces, contaminando el medio exterior (suelo, agua, alimentos, objetos...), donde puede sobrevivir semanas-meses. Ej: podemos infectarnos por tomar verduras crudas o poco cocinadas, que se hayan regado con aguas contaminadas.

## **Diagnóstico de laboratorio**

### Identificación del agente

El diagnóstico se basa en confirmar la presencia de *Giardia* en las heces (humana o animal). Los quistes predominan en las heces formadas y los trofozoítos en las heces diarreicas; los métodos de preservación y procesamiento de las muestras variarán para cada caso.

A) Métodos de concentración: Destacan el método de flotación y el de sedimentación. Son útiles para la demostración de quistes. Como los quistes de este parásito se eliminan de manera intermitente, se deben tomar al menos 3 muestras de heces, tomadas en días alternos, para excluir la infección (y aumentará la sensibilidad de la prueba). El pasaje de trofozoítos también es irregular; para su búsqueda se recomienda el examen simultáneo de muestras frescas (donde se sospecha del parásito por su típico movimiento flagelar) en solución salina y lugol, y de muestras fijadas y teñidas (donde se identifica el parásito por su morfología característica), para lo que se suelen emplear tinciones tricromáticas. [Algunos especialistas recomiendan tomar hasta 6 muestras].

B) Detección de Ag en muestras de heces (Ag-ELISA): Utiliza Ac monoclonales o policlonales. Es recomendable, sobre todo, para laboratorios con un gran volumen de muestras, pero es más costoso que los métodos de anteriores y requiere disponer de espectrofotómetro. Hay algunos kits comerciales disponibles, como por ejemplo, el kit ProsSpect Giardia Rapid

Assay<sup>4</sup>, que presente sensibilidad y especificidad muy altas. Según un estudio comparativo<sup>5</sup>, su eficacia es superior a un examen coprológico y comparable a la obtenida en dos exámenes en días diferentes, usando métodos de concentración y observación microscópica prolongada.

C) Inmunofluorescencia: el empleo de Acs fluorescentes específicos contra los quistes facilita su visualización al microscopio, con una sensibilidad 2,3 veces mayor que observar sin fluorescencia.

D) Inmunocromatografía<sup>6</sup>: se comercializan kits de diagnóstico rápido basados en este concepto. La ventaja es que ofrecen un diagnóstico muy rápido y no requieren alta cualificación ni equipos costosos de lectura (ejemplo a la derecha).

E) PCR: es la única técnica que puede emplearse para identificar subtipos de *Giardia*, por medio de la detección de polimorfismos en regiones específicas (loci específicos) y no específicas del genoma de esta especie. Algunos genes, como los que codifican para la subunidad pequeña ribosomal y otros que codifican ciertas enzimas del metabolismo basal, han demostrado gran especificidad para la caracterización de este parásito.

F) A pesar de la presencia de anticuerpos y de reacciones de inmunidad mediada por células en los pacientes, los procedimientos inmunobiológicos son poco específicos y o permiten identificar si se trata de una infección presente o si se trata de residuos de infecciones anteriores.

---

<sup>4</sup> <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/R2458496>

<sup>5</sup> Comparación de técnicas de laboratorio para el diagnóstico de *Giardia intestinalis*. Calchi L. C. Marinella<sup>1\*</sup>, Acurero E.<sup>1</sup>, Villalobos R.<sup>2</sup>, Colina M.<sup>3</sup>, Di Toro L.<sup>3</sup>, Villalobos C<sup>3</sup>

<sup>6</sup> <http://www.elsevier.es/es-revista-enfermedades-infecciosas-microbiologia-clinica-28-articulo-evaluacion-dos-metodos-inmunocromatograficos-comerciales-S0213005X10004416>

### 3.3. TOXOPLASMOSIS

#### Descripción de la enfermedad y riesgo para la salud humana

La toxoplasmosis es una infección zoonótica de los animales causada por *Toxoplasma gondii*, un protozoo parásito intracelular obligado que tiene la capacidad de infectar a todos los animales de sangre caliente. Aunque la infección no causa enfermedad clínica en la mayor parte de las especies de animales, en algunas de ellas causa enfermedad aguda potencialmente mortal y, en otras, sobre todo en ovejas y cabras, se manifiesta como enfermedad de la gestación multiplicándose en la placenta y el feto. La infección aguda fatal afecta a los monos del Nuevo Mundo, los marsupiales y a otros pocos animales (provocando neumonía y síntomas de tipo nervioso, entre otros). Las ovejas, cabras y cerdos contraen una infección primaria durante la gestación que puede provocar infertilidad manifiesta, mortinatos y aborto, dependiendo de la fase de la gestación en la que se contrae la infección. Las madres que resultan infectadas en la última etapa de la gestación previsiblemente producirán descendencia infectada pero clínicamente normal.

La infección en los cerdos puede provocar graves pérdidas fetales en cerdas gestantes, pero en las explotaciones ganaderas intensivas modernas, como suele ser mínima o inexistente la contaminación de las instalaciones y los alimentos por ooquistes de *T. gondii*, es presumible que en general la infección tenga poco impacto y cause solamente síntomas leves o imperceptibles. En general, cuanto más extensiva es la explotación, más probable que los cerdos entren en contacto con ooquistes, por lo que es de esperar que sea mayor la presencia de la infección en esos casos.

*Toxoplasma gondii* tiene un ciclo asexual extraintestinal de dos fases en los animales de sangre caliente (mamíferos y aves) y un ciclo sexual en el epitelio entérico de los félidos.

En el **ciclo asexual**, los dos estadios de desarrollo son el taquizoíto (de multiplicación rápida) y el bradizoíto (de multiplicación lenta): en el hospedador intermediario (donde se incluyen el hombre y el gato) el ciclo comienza con la ingestión de agua/comida contaminada por ooquistes esporulados (infectantes); los parásitos se liberan en el intestino delgado e invaden las células epiteliales, donde se multiplican hasta que las rompen y quedan liberados localmente; entonces, se difunden por la linfa o la sangre, ya sea de forma libre o en el interior de macrófagos o leucocitos. La mayoría son capturados en los ganglios linfáticos, pero algunos los sobrepasan y llegan a distribuirse por todo el organismo. Estos parásitos continúan con su gran actividad de invasión-multiplicación-rotura celular hasta que el hospedador desarrolla inmunidad; en ese momento, el parásito mantiene su tamaño y forma originales pero se transforma en el estadio de bradizoíto y se multiplica más lentamente y se van acumulando en el citoplasma de las células parasitadas y se rodean de una membrana para formar los quistes tisulares, hasta establecer una infección persistente. Estos quistes tisulares microscópicos están presentes con mayor frecuencia en el cerebro y en el músculo esquelético y representan la etapa latente o crónica del parásito dentro del hospedador, (pueden persistir en el huésped durante toda su vida.)

El **ciclo sexual** ocurre de manera exclusiva en las células enteroepiteliales del hospedador definitivo (FELINO); cuando éste ingiere quistes tisulares (ej: caza un ratón infectado), los bradizoítos del quiste se liberan e invaden las células intestinales del felino y se multiplican asexualmente varias veces; después pasan a multiplicarse sexualmente y producen ooquistes inmaduros que rompen las células del hospedador y son liberados al exterior con las heces. Esto desemboca en la producción de ooquistes de *Toxoplasma* [por tanto, el gato puede ocupar el papel de hospedador intermedio y de hospedador definitivo] que madurarán en pocos días, convirtiéndose en ooquistes esporulados, muy resistentes a las condiciones medioambientales, y con capacidad infectiva durante un año o más. El gato puede eliminar ooquistes en las heces durante varios días ciclo se cierra cuando un animal susceptible ingiere ooquistes esporulados, liberándose los esporozoitos en su intestino, los cuales penetran el recubrimiento intestinal, se convierten en taquizoítos y establecen la infección.

*Toxoplasma gondii* infecta fácilmente a los seres humanos y, mientras la infección es relativamente común (aproximadamente el 30% de la población), la enfermedad clínica es relativamente inusual. Especialmente corren el riesgo de desarrollar la enfermedad clínica las mujeres embarazadas, los individuos en estado de inmunosupresión, niños y ancianos.

Las principales fuentes de infección humana son la ingestión de carne poco cocinada o cruda que contiene quistes tisulares de *T. gondii* vivos, la ingestión de verduras crudas o poco cocidas contaminadas con ooquistes o la exposición a ooquistes procedentes de heces de gato (Ej: en jardines y arena de parques infantiles). La toxoplasmosis también se considera una zoonosis de transmisión hídrica, en zonas donde el tratamiento de las aguas es ineficaz o inexistente, habitualmente contaminada por heces de gatos infectados. Se conoce que mamíferos marinos se están infectando con aguas de terrenos contaminados y con aguas sucias vertidas sin tratar.

## **Diagnóstico de laboratorio**

### Identificación del agente

A) Histopatología Resulta de vital importancia para orientar el diagnóstico el realizar una necropsia reglada y observar las lesiones de meticulosamente. En casos de muerte aguda, las lesiones pueden afectar a diversos órganos (hígado, corazón, pulmones), siendo típico observar taquizoítos de *Toxoplasma* asociados con necrosis e inflamación. En abortos y mortinatos es típico que los cotiledones placentarios afectados contengan grandes focos de necrosis por coagulación, que pueden mineralizarse con el tiempo. También pueden observarse muestras de cerebro fetal con lesiones primarias y secundarias.

La confirmación de la identidad de estructuras tipo *T. gondii* en secciones de tejido procedentes de tales casos, así como de ejemplos de toxoplasmosis aguda puede llevarse a cabo por inmunohistoquímica que marca *T. gondii* intactos o restos antigénicos. El método es fácil y sensible y se emplea con tejidos fijados (incluyendo tejidos de archivo) que pueden también exhibir cierto grado de descomposición, de modo que en este caso el

aislamiento no sería apropiado o posible. Son igualmente adecuados el método ABC indirecto de la inmunoperoxidasa y la técnica peroxidasa–antiperoxidasa (PAP).

B) Métodos de reconocimiento del ácido nucleico: se han desarrollado varias técnicas basadas en la reacción en cadena de la polimerasa para detectar el ADN de *T. gondii*. Las regiones diana principales son la secuencia repetitiva B1 y el elemento de 529 pb de 300 copias, el gen P30 (SAG1) o el ARN ribosómico (ARNr) 18S. La sensibilidad de la PCR depende del número de copias de la secuencia diana. Se dispone comercialmente de oligonucleótidos sintéticos de ADN personalizados. No obstante, aunque la PCR es extremadamente sensible, en caso de ser ese el único método disponible, se obtendrá un diagnóstico más fiable si se utiliza en combinación con otros datos de diagnóstico. Recientemente se ha elaborado una PCR en tiempo real para la amplificar y cuantificar el ADN del gen B1 de *T. gondii*. Esta cuantificación del ADN del parásito puede utilizarse para establecer el número de parásitos en los tejidos y los líquidos, tales como el líquido amniótico de pacientes sospechosos de infección congénita por *T. gondii*. La PCR en tiempo real es un método muy sensible y específico pero requiere sistemas de detección especializados y costosos. En el capítulo correspondiente de la OIE se detalla un método que es una forma combinada de la PCR, que amplifica la secuencia de ADN repetitiva B1. El ADN del parásito puede extraerse y purificarse a partir de varios tejidos, incluyendo la placenta, el sistema nervioso central, el corazón y el músculo esquelético.

C) Detección de ooquistes en agua potable: Se han detectado ooquistes de *Toxoplasma gondii* en agua potable utilizando el método para la detección de ooquistes de *Cryptosporidium*. El método se basa en la recogida de una muestra de agua de gran volumen y en pasarla por un filtro de cartucho.

### Pruebas serológicas

Se dispone de diversas pruebas serológicas para la detección de anticuerpos frente a *T. gondii*:

- En un tipo de prueba el observador juzga el color de los taquizoítos al microscopio
  - La **prueba serológica DT** se considera el “patrón de oro” para Ac anti-*Toxoplasma en humanos*. La prueba DT es sensible y específica en humanos, pero podría ser impracticable en otras especies. Además, es potencialmente peligrosa puesto que se maneja el parásito vivo. Es costosa y requiere un alto grado de experiencia técnica. Por motivos de bienestar animal, si es posible, los taquizoítos deben cultivarse en cultivo de tejidos en vez de hacerlo en peritoneo de ratones.
  - La **prueba IFI** es un método simple y se utiliza ampliamente. El método es relativamente económico y hay kits comerciales disponibles. Pero el método requiere un microscopio de fluorescencia y como los datos son interpretados visualmente, se pueden producir variaciones subjetivas. Puede resultar difícil encontrar algunos conjugados específicos de las especies y existe riesgo de una posible reacción cruzada con anticuerpos frente al factor reumatoide y con Ac antinucleares.

- Otra prueba depende del principio de aglutinación de taquizoítos de *Toxoplasma*, glóbulos rojos o partículas de látex, como sucede con la prueba de aglutinación directa (DAT), la prueba de aglutinación indirecta (IHA) y la prueba de aglutinación con látex (LA), respectivamente.

- La **prueba DAT** es sensible y específica. Se añaden taquizoítos formalinizados de *Toxoplasma* a pocillos con forma de U de placas de microtitulación y se aplican las diluciones de los sueros problema. Las muestras positivas producirán aglutinación que puede ser variable, mientras que las muestras negativas producirán un botón de taquizoítos sedimentados en el fondo del pocillo. La prueba es simple y fácil de realizar aunque se requieren cantidades relativamente grandes de Ag. Se dispone de kits comerciales. Existe una modificación (MAT) ampliamente usada en todas las especies, aunque se conoce que dar falsos negativos en primeros estadíos de infección y en sueros de origen canino.

También está disponible en el mercado una **prueba de aglutinación con látex (LAT)**, pero es relativamente menos sensible que MAT o IFI. DAT y LAT no son específicas de especie y son adecuadas para su utilización con todas las especies.

- Con el ELISA, el cambio en la intensidad de color define la cantidad de anticuerpo específico en una solución dada.

- La técnica original ELISA utiliza una preparación de Ag soluble realizada con taquizoítos de la cepa de *Toxoplasma* RH para tapizar los pocillos de la placa de microtitulación. Es una técnica simple, permite ensayar un gran número de muestras y es fácil de realizar con el conjugado anti-especie elegido. Se dispone comercialmente de conjugados anti-especies, sustratos y kits completos. Pero requiere un espectrofotómetro para leer el cambio de color en los pocillos. Es idónea para laboratorios que analizan gran número de muestras.

Recientemente se ha elaborado un ELISA cinético (KELA). El sistema KELA sirve para medir la tasa de reacción entre el enzima ligado y la solución de sustrato que provoca el desarrollo del color. Se leen tres densidades ópticas (DO) a intervalos de 45 segundos (utilizando el programa de manejo de datos KELA) y se presentan los resultados en forma de pendientes. Se da una correlación muy alta entre el ELISA y el KELA, y, por tanto, las dos pruebas constituyen excelentes herramientas de diagnóstico. A fin de mejorar la especificidad del ELISA convencional, se han elaborado pruebas para utilizar en ovejas, en las que se utilizan antígenos recombinantes y antígenos específicos de *Toxoplasma* purificados por afinidad, pero estas pruebas no se utilizan aún de forma rutinaria. Con el ELISA convencional, la detección de anticuerpos de IgG e IgM específicos para *Toxoplasma* permite un cierto grado de discriminación entre la toxoplasmosis grave y la crónica. Más recientemente se han elaborado pruebas de avidéz. A medida que madura la respuesta inmune, después de haberse establecido la infección, se desarrollan anticuerpos con avidéz creciente (afinidad funcional) de antígenos. Esa avidéz puede medirse y utilizarse para indicar una infección por *T. gondii* activa o reciente. Se ha elaborado una prueba para la detección de la avidéz de IgG por el antígeno P30 de *T. gondii* en ovejas. Esta

prueba es una buena herramienta de diagnóstico para diferenciar las infecciones relativamente recientes de las más antiguas.

### 3.4. TRIQUINELOSIS

#### Descripción de la enfermedad y riesgo para la salud humana

La triquinelosis es la infección por parásitos del género *Trichinella*. Son nematodos y tienen un ciclo de vida directo, es decir, desarrollan todas sus etapas del ciclo en un mismo hospedador, sin necesidad de hospedador intermediario.

En el hombre está causada por el consumo de carne cruda o poco cocida de animales domésticos o de caza infectados por *Trichinella*. Los animales resultan infectados por ingerir músculos infectados por *Trichinella*. Las larvas infectivas se encuentran enquistadas en la musculatura de la presa o en la carne poco cocinada, y al ser ingeridas, maduran y se reproducen en el intestino delgado del nuevo hospedador, que puede pertenecer a un amplio espectro de especies, incluyendo humanos, cerdos, ratas, osos, morsas, ocasionalmente caballos y cualquier otro mamífero carnívoro, y las aves y los reptiles. Los gusanos adultos sobreviven menos de 2 meses. Las larvas producidas migran y persisten en los músculos de sus hospedadores. El ciclo se cierra cuando estos hospedadores sirven de alimento a algún depredador. La triquinelosis en los humanos no presenta una sintomatología definida (a veces llega a pasar desapercibida) y no suele revestir gravedad, excepto en casos de ingestión masiva de larvas o de estado inmunitario deficiente; en los animales esta infección es subclínica, es una enfermedad principalmente importante como zoonosis.

Dentro del género *Trichinella*, se han identificado doce taxones, a ocho de los cuales se les ha asignado la categoría de especie. Los taxones de este género están divididos en dos grupos (clados); uno está caracterizado por larvas que se encapsulan solo en los músculos de mamíferos, y el otro por larvas que no se encapsulan en los músculos, sino que infectan hospedadores mamíferos y aves o bien hospedadores mamíferos y reptiles. La mayoría de las especies y los genotipos de *Trichinella* se han detectado en humanos, y en general se acepta que todos los taxones de *Trichinella* son muy infectivos en las personas, lo cual supone un riesgo considerable para la salud pública. El riesgo de causar infección por *Trichinella* en piaras lo comportan principalmente *T. Spiralis* y, en menor grado, *T. britovi*, *T. Nelsoni*, *T. Pseudospiralis*, *T. Papuae* y *T. Zimbabwensis*, mientras que no hay indicios de que otras especies ni genotipos puedan desempeñar este papel.

Para conocer más en profundidad las características de cada taxón, se recomienda consultar el capítulo on line “Triquinelosis” en el Manual Terrestre de la OIE.

#### Diagnóstico de laboratorio

A nivel comunitario, disponemos de una norma reguladora de este diagnóstico, donde se explica con detalle el método de detección de referencia [Método de digestión de muestras colectivas con utilización de un agitador magnético] y otros métodos considerados equivalentes, así como las cantidades de muestra según musculatura y especie

(Reglamento de ejecución (UE) 2015/1375 de la Comisión de 10 de agosto de 2015, por el que se establecen normas específicas para los controles oficiales de la presencia de triquinas en la carne).

A nivel nacional, disponemos de una **Plan Nacional de Contingencia frente a triquina**, donde se especifica la sistemática de actuación tras la sospecha y /o identificación de triquina en animales domésticos y silvestres destinados al consumo humano o en personas.

La OIE distingue dos grandes grupos de técnicas para esta enfermedad:

1) Detección directa de la primera etapa de la larva enquistada o libre en tejido de músculo estriado

Los únicos procedimientos recomendados para la detección de larvas de *Trichinella* en la carne son las pruebas de digestión, especialmente los recomendados por la Comisión Internacional de Triquinelosis (CIT). Recientemente, se ha publicado la norma ISO 18743:2015 relativa a la detección de larvas de *Trichinella* en animales.

Por otro lado, según las **directrices de la OIE**, la sensibilidad de los métodos analíticos directos depende de la cantidad de tejido examinado y del lugar del que se haya obtenido la muestra. Es preciso que hayan pasado 17 días tras exposición a *T. spiralis* para poder detectar larvas con estos métodos, intervalo que coincide con el tiempo necesario para que las larvas alojadas en los músculos adquieran la capacidad de infectar a un nuevo hospedador. Para muestras de fauna salvaje, se debe analizar mayor cantidad de muestra, para compensar un posible descenso de la sensibilidad por variación en los músculos de elección en estas especies. Los métodos actuales para analizar la inocuidad alimentaria en muestras frescas o para la inspección de animales determinados mediante digestión artificial y mediante el empleo de una muestra de 1 g tienen una sensibilidad de aproximadamente tres larvas/g de tejido, y el análisis de una muestra de 5 g aumenta la sensibilidad a 1 larva por g de tejido. La sensibilidad de esta prueba aumenta considerablemente cuando se dispone de grandes cantidades de tejido (hasta 100 g) para la digestión.

Las muestras a analizar generalmente se toman post mortem, de sitios predilectos, de los pilares del diafragma o de la lengua en el caso de los cerdos, o de la lengua o los músculos maseteros en el caso de los caballos. En fauna salvaje en la que se desconocen cuáles son los mejores puntos de muestreo, es preferible de la lengua.

Con estos métodos simulamos la digestión que sufriría la carne en el estómago del nuevo hospedador, liberando a las larvas de sus quistes. Las larvas recuperadas mediante la digestión del músculo pueden conservarse en etanol al 90–95% o al 70-75% (o al 95% si es una conservación a largo plazo) para la posterior genotipificación mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

En caso de analizarse muestras en grupo y obtenerse resultado positivo, se volverán a analizar las muestras individualmente para determinar qué animal del grupo está infectado.

En el caso de los animales que dan positivo en pruebas serológicas, deben analizarse los tejidos mediante digestión para confirmar el estado de infección y para facilitar la recuperación de larvas y la identificación del genotipo.

#### Otros métodos de detección directa

Existen otros métodos alternativos que pueden consultarse para más detalle en el Manual Terrestre de la OIE:

- Método del embudo de separación doble
- Método de digestión de una muestra combinada asistido mecánicamente /técnica de sedimentación
- Método de digestión automática para muestras combinadas de hasta 35 gramos

#### Otras pruebas

Reacción en cadena de la polimerasa. Utilizar la PCR para detectar el ácido nucleico de las larvas directamente en muestras de musculatura de animales no resulta viable, porque carece de sensibilidad y no es práctico para el uso sistemático en animales de abasto. Pero la identificación de las especies o los genotipos de *Trichinella* recuperados del tejido muscular puede ser útil para entender la epidemiología de los parásitos en animales, para evaluar el riesgo relativo de la exposición humana y para rastrear la explotación en la que se haya originado la infección.

Se han desarrollado cebadores específicos que permiten la identificación a nivel de especie y de genotipo de larvas determinadas, tomadas de tejidos musculares, mediante la PCR.

Triquinoscopia. Este método implica la compresión de múltiples trozos de tejido muscular de 2 x 10 mm entre dos placas de vidrio (*compressorium*) hasta que se vuelven translúcidos, seguida de un examen al microscopio. Se dispone de datos comparativos según los cuales la triquinoscopia no es tan sensible como las pruebas de digestión, por tanto, **ni la CIT (Comisión Internacional para la Triquinelosis) ni la UE recomiendan** la triquinoscopia para el análisis sistemático de las canales.

#### 2) Detección indirecta de la infección mediante pruebas para anticuerpos específicos.

Se han descrito una serie de pruebas para el diagnóstico de la triquinelosis en los animales domésticos y salvajes. Los métodos incluyen las pruebas de IFI, inmunotransferencia enzimática (IEBT), inmunoelectrotransferencia, pruebas de inmunohistoquímica enzimática, y el ELISA. A excepción de ésta última, estas pruebas no han sido estandarizadas y no se dispone de reactivos para uso sistemático. No obstante, la CIT ha ofrecido un

conjunto uniforme de recomendaciones para la elaboración y el uso de las pruebas serológicas para la detección de anticuerpos en circulación.

El ELISA es la única prueba avalada por la CIT. **Está autorizado solamente como herramienta de vigilancia** para la detección de anticuerpos anti-*Trichinella* en los cerdos; **no es fiable para la detección de la infección por *Trichinella* en animales determinados.** Esta prueba permite detectar niveles de infección muy bajos, de 1 larva/100 g de tejido en cerdos. Tan alta sensibilidad hace de esta prueba un método útil para la detección de la transmisión de *Trichinella* en explotaciones o para programas de seguimiento más amplios; como desventaja, cabe mencionar la incidencia de algunos falsos negativos que se han observado en el caso de los animales infectados. Esto se debe principalmente a que la respuesta inmune tras la ingesta de larvas infectivas tarda en producirse: en cerdos, normalmente no hay niveles detectables de Ac hasta 3–5 semanas o más tras la exposición (por esto no se recomienda su uso en las pruebas con canales individuales). En porcino, el nivel de Ac se mantiene durante un largo período después de la infección; sin embargo, en caballos disminuye a los pocos meses de la infección, hasta el punto que el nivel de respuesta termina por descender por debajo de los niveles de diagnóstico a pesar de la presencia de larvas infectantes en los músculos, por lo que en esta especie no se considera un método útil. Se conoce poco acerca de la respuesta de Ac a la infección por *Trichinella* en especies de caza y otros animales salvajes, pero deben obtenerse muestras de suero de gran calidad con el fin de disminuir la probabilidad de falsos positivos. Actualmente, no se dispone de ninguna prueba serológica validada para especies hospedadoras distintas del cerdo.

Para esta técnica pueden utilizarse Ags del esticosoma recogidos de los productos ES de las larvas de *Trichinella* en cultivo; para estandarización, se recomienda usar *T. spiralis* para la producción de antígeno para las pruebas con animales de abasto. Sin embargo, se ha demostrado que el antígeno preparado de cualquier otra especie de *Trichinella* puede usarse para la detección de anticuerpos en animales infectados independientemente de cuál sea la especie que produce la infección.

Las muestras positivas a ELISA pueden ser confirmadas en el Laboratorio <europeo de Referencia (Istituto Superiore di Sanità, Roma) para su confirmación por Inmunoblotting.

### 3.5. EQUINOCOCOSIS/HIDATIDOSIS

#### Descripción de la enfermedad y riesgo para la salud humana

La equinocosis, o enfermedad hidática, es una infección provocada por cestodos del género *Echinococcus*, unos gusanos de pocos milímetros de longitud.

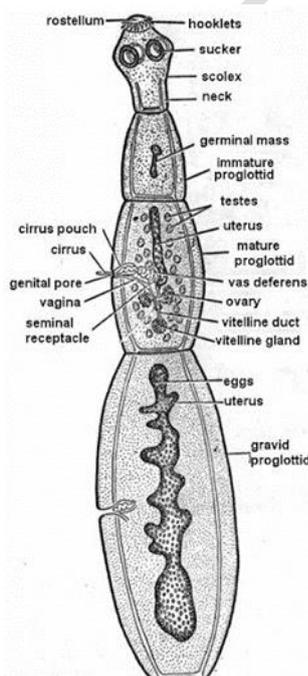
Hasta hace poco se aceptaba que en este género había cinco especies morfológicamente bien diferenciadas: *E. granulosus*, *E. multilocularis*, *E. oligarthra*, *E. vogeli* y *E. shiquicus*, pero actualmente *Echinococcus granulosus* está reconocida como conjunto de especies crípticas, que difieren considerablemente entre sí en cuanto a morfología, desarrollo y especificidad de hospedador (incluida la infectividad o patogenicidad para el ser humano).

Esta diversidad se refleja en los genomas mitocondrial y nuclear. De acuerdo con los caracteres fenotípicos y las secuencias génicas, actualmente *E. granulosus* (en sentido amplio) se subclasifica en:

- *E. granulosus* (en sentido estricto) (incluidas las variantes genotípicas G1-3 identificadas anteriormente)
- *E. felidis* (anteriormente la “cepa del león”)
- *Echinococcus equinus* (la “cepa del caballo”, genotipo G4)
- *E. ortleppi* (la “cepa del ganado vacuno”, genotipo G5)
- *E. canadensis*. Esta última especie es la que presenta la máxima diversidad y está formada por la “cepa del camello”(G6), la “cepa del cerdo”(G7), y dos “cepas de cérvido” (G8 y G10).

Como todos los cestodos, el ciclo biológico de *Echinococcus* se desarrolla en dos animales. En el hospedador definitivo, un carnívoro, donde los gusanos adultos se adhieren a las paredes intestinales. En el hospedador intermediario, que puede ser prácticamente cualquier mamífero, incluido el ser humano, los cestodos forman quistes en distintos órganos.

Los quistes – unas vesículas de crecimiento lento que contienen larvas y líquido – y que en la mayoría de los casos se alojan en el hígado o los pulmones, provocan los síntomas de la enfermedad. Denominados quistes hidáticos, actúan como tumores que alteran las funciones del órgano en el que se encuentran, afectan el crecimiento, reducen la producción de leche y carne e inducen el decomiso de esos órganos en la inspección sanitaria de la carne. En los seres humanos la enfermedad puede ser grave, raramente mortal, y el tratamiento es largo y oneroso. En los intestinos de los carnívoros hospedadores definitivos los *Echinococcus* son benignos.



De conformidad con el *Código Sanitario para los Animales Terrestres* de la OIE la infección por *Echinococcus* es una enfermedad inscrita en la Lista de la Organización y, en cumplimiento de lo estipulado en ese *Código*, debe notificarse obligatoriamente por los Países y Territorios Miembros.

*Echinococcus granulosus* (en sentido amplio) es la única que está presente todo el mundo. *E. multilocularis* se encuentra difundido en el hemisferio norte. *E. oligarthus* y *E. vogeli* están presentes únicamente en Centroamérica y Sudamérica. *E. shiquicus*, se descubrió en la República Popular China en 2006. *E. granulosus* y *E. multilocularis* son los de mayor riesgo zoonótico. Las especies latino americanas raramente afectan al ser humano y el estatus zoonótico de *E. shiquicus* es desconocido.

*E. granulosus* se transmite entre los perros domésticos y varias especies unguladas domésticas. El ciclo más importante es el que afecta al perro y la oveja. También existen hospedadores intermediarios y definitivos salvajes, por ejemplo, lobos y cérvidos.

*E. multilocularis* se transmite principalmente entre los hospedadores definitivos salvajes (cánidos salvajes) y los pequeños roedores arvicólidos.

## Diagnóstico de laboratorio

### Identificación del agente

En el hospedador intermediario, el diagnóstico depende de la detección de las formas larvarias quísticas, que pueden encontrarse en casi todos los órganos, pero particularmente en hígado y pulmones. Habitualmente estas **formas larvarias** se pueden detectar visualmente en los órganos, cuidando no confundirlas con lesiones producidas por *Taenia hydatigena* en las ovejas.

Esta detección puede tener lugar como parte de la inspección postmortem de canales para consumo humano o en estudios de campo de animales salvajes. Las lesiones sospechosas deben manipularse y conservarse adecuadamente (Consultar el capítulo correspondiente del Manual de a OIE para más detalles), y procesarse mediante los métodos convencionales de tinción para poder someterlo a examen histológico, que puede confirmar el diagnóstico: la presencia de una capa laminada acelular, positiva a la tinción de ácido periódico de Schiff, con o sin una membrana germinal nucleada y celular interna, puede considerarse como una característica específica de los metacestodos de *Echinococcus*. En cualquier caso, la única forma de lograr una identificación exacta a nivel de especie/genotipo es la extracción del ADN del material fijado en etanol y el posterior genotipado mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

### Diagnóstico de huevos en muestras medioambientales

Se trata de un método de concentración en el que se utiliza una solución saturada para obtener los huevos de *Echinococcus* de muestras de heces y de suelo.

El diagnóstico de la equinococosis en perros y otros carnívoros requiere la demostración de los cestodos adultos de *Echinococcus* spp. o de sus huevos en las heces o el intestino delgado, o la detección de los coproantígenos específicos (Ag-ELISA) o del copro-ADN(PCR):

- Necropsia: Invariablemente se emplea la necropsia en el estudio de la equinococosis de los animales salvajes y en perros resulta útil si se sacrifican de forma indolora. Generalmente, se ha adoptado el uso de arecolina en los estudios llevados a cabo para determinar la prevalencia de *E. granulosus* en los perros. La manipulación del material infectado representa para el operador el riesgo de contraer la enfermedad que es potencialmente fatal (El material infectante se puede descontaminar congelándolo a  $-80^{\circ}\text{C}$  (temperatura interna central) durante 48 horas o a  $-70^{\circ}\text{C}$  durante 4 días o por calentamiento a  $70^{\circ}\text{C}$  durante 12 horas).

Se debería enfatizar que es necesario aislar e identificar el estado adulto de *Echinococcus*, porque en las condiciones normales del examen fecal, los huevos de *Echinococcus* no se pueden diferenciar de los de *Taenia* spp. Actualmente, los huevos de *E. granulosus* y de *E. multilocularis* se pueden identificar y diferenciar de los de otros ténidos mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

La necropsia se considera como el procedimiento más fiable para el diagnóstico de *E. multilocularis* en los hospedadores definitivos. Se trata de un método barato para establecer la prevalencia en una población y del mejor procedimiento para determinar la carga de gusanos. Pero debemos mantener en las muestras durante más tiempo entre -70 y -80°C para matar los huevos.

- Técnica de la sedimentación y el recuento: Esta conocida técnica se ha utilizado mucho, pero es menos sensible que el copro-ADN (PCR). Consiste en realizar incisiones longitudinales de unos 20 cm en el intestino delgado en estudio y someterlas a lavados y sedimentaciones sucesivas, para ir examinando muestras de sedimento en placas de Petri, contando las formas adultas encontradas.

#### Pruebas coprológicas

Las formas adultas de *Echinococcus* presentes en el intestino liberarán moléculas, ya sean superficiales o secretoras (antígenos), y ADN (normalmente desde el interior de los huevos). Ambos tipos de moléculas pueden ser detectadas analizando muestras fecales. La sensibilidad de las pruebas está claramente influenciada por la carga parasitaria y el grado de madurez del parásito.

#### Pruebas de detección de coproantígenos

El ELISA de coproantígeno o coproELISA constituye un método alternativo para el diagnóstico de la equinococosis canina. En él se utilizan anticuerpos tanto policlonales como monoclonales dirigidos contra antígenos, ya sean somáticos o excretos/secretos (ES). Pero en general se trata de pruebas que no se comercializan, sino que se desarrollan en laboratorios de investigación particulares, por lo que existe cierta variabilidad en cuanto a la sensibilidad y a la especificidad en cada uno de ellos. Los CoproELISA suelen ser específicos de género para *Echinococcus* spp. Para la equinococosis canina debida a *E. granulosus*, la mayoría de autores indica una sensibilidad razonable (78–100%) y una buena especificidad de género, que va desde el 85% a más de un 95%, así como un cierto grado de detección pre-patente. Pueden producirse reacciones cruzadas, generalmente con *Taenia hydatigena*, y los intentos de mejorar la especificidad empleando anticuerpos monoclonales en los coproELISA no han permitido eliminar este problema. La sensibilidad de los coproELISA se correlaciona en gran medida con la carga parasitaria de *E. granulosus*, pero ciertas infecciones de baja intensidad puede dar falsos negativos.

Las pruebas de los coproantígenos también se han utilizado con éxito para evaluar la eficacia de la expulsión de los gusanos de los zorros salvajes infectados con *E. multilocularis* usando cebos con praziquantel.

### Métodos de la prueba copro-ADN.

El ELISA presenta bastantes ventajas frente a la purga con arecolina para la detección premortem de la equinocosis canina, pero su falta de especificidad de especie supone un inconveniente, sobre todo en estudios epidemiológicos. La amplificación de fragmentos pequeños de ADN de *Equinococcus* específicos de especie en huevos o heces mediante PCR se describió por primera vez en infecciones de zorros por *E. multilocularis*, con escasa inhibición y sensibilidad que después mejoraron al aplicar métodos de concentración sobre las muestras fecales (tamizado y flotación con cloruro de zinc). La capacidad de ejecutar una PCR con muestras o extractos fecales directamente sin aislar primero los huevos de las tenias es una ventaja, sobre todo cuando se deben analizar cantidades relativamente grandes de muestras. No obstante, el material fecal conservado en solución salina con formol no es adecuado para la amplificación de ADN, sino que debe utilizarse etanol al 70%. Existen kits comerciales para extraer ADN específicamente de muestras fecales. En los últimos años, se han producido varios avances destinados a simplificar la amplificación del ADN y a mejorar la sensibilidad y la especificidad (como la PCR en tiempo real). Este hecho es importante para el diagnóstico diferencial entre genotipos de *E. granulosus*, *E. multilocularis* y otras tenias existentes en la misma zona geográfica. En concreto, las PCR múltiples son útiles para la detección multiespecie. Actualmente hay varias PCR publicadas para el complejo *E. granulosus* y para *E. multilocularis*, cuya gran utilidad radica en que aportan una especificidad absoluta o extremadamente alta, hasta tal punto que un resultado puede considerarse una alternativa al propio hallazgo de gusanos en la necropsia o purga. Pero no se considera adecuado usar PCR como única estrategia de diagnóstico para los programas de vigilancia o cribado a gran escala por resultar laborioso y costoso. La forma más práctica y eficiente de analizar perros a gran escala es adoptar una estrategia de análisis seriados basada en un cribado inicial de todas las muestras mediante coproELISA, seguido de un análisis de todos los positivos mediante coproPCR y garantizando que se tomen muestras por duplicado de todos los animales y que se fijen de la forma adecuada en cada técnica.

### Pruebas serológicas

- En el **hospedador intermediario**: el diagnóstico serológico se ha considerado durante mucho tiempo una interesante opción para estudios epidemiológicos, pues se ha comprobado que ovejas infectadas experimentalmente ofrecen una respuesta inmune detectable en pocas semanas, pero en infecciones naturales esto resulta muy variable. La bajada de sensibilidad junto a las reacciones cruzadas, tuvo como conclusión que este sistema todavía no es sustitutivo de la necropsia.
- En el **hospedador definitivo**: en un principio, se considera que estas pruebas podrías constituir un sustituto de la purga con arecolina en el serodiagnóstico de la equinocosis canina por *E. granulosus*. En las infecciones naturales, la especificidad diagnóstica fue buena (>90%) pero la sensibilidad en general fue mala (35–40%), y fue muy inferior a la de la detección de coproantígeno. Estudios futuros destinados a evaluar los antígenos

recombinantes existentes o a desarrollar otros nuevos podrían mejorar la sensibilidad de las pruebas serológicas para el diagnóstico de la equinocosis canina.

### 3.6. CISTICERCOSIS

#### Definición y descripción de la enfermedad

La cisticercosis de animales domésticos y salvajes está causada por las formas larvianas (metacestodos) de la familia Taeniidae (tenias), cuyas fases adultas se encuentran en el intestino del hombre y de los perros y cánidos salvajes. La cisticercosis bovina (principalmente en los músculos) y la cisticercosis porcina (principalmente en los músculos, el sistema nervioso central [SNC] y el hígado) están causadas por los metacestodos (cisticercos) de los cestodos humanos *Taenia saginata* y *T. solium*, respectivamente. También los cisticercos de *T. solium* se desarrollan en el SNC y en la musculatura del hombre. *Taenia asiática* es una causa menos frecuente de cisticercosis en el cerdo, con quistes que se localizan en el hígado y las vísceras, y tenias adultas que afectan al ser humano.

La cisticercosis y la cenurosis de las ovejas y cabras, y en ocasiones del ganado vacuno, con quistes que afectan al músculo, el encéfalo, el hígado y la cavidad peritoneal, se deben a *T. ovis*, *T. multiceps* y *T. hydatigena*, cuyas tenias adultas se encuentran en el intestino de los perros y los cánidos salvajes. La mayoría de las infecciones debidas a las formas larvianas o adultas de las tenias causan una enfermedad leve o, en ocasiones, no la producen. Las excepciones son la neurocisticercosis humana (NCC), que es grave y potencialmente letal y está causada por el cisticercos de *T. solium*, y ocasionalmente la neurocenurosis causada por la fase larvaria de *T. multiceps* en humanos. Estos parásitos provocan también signos musculares y oculares en el hombre. La “modorra” causada por la fase larvaria (cenuro) de *T. multiceps* en rumiantes puede requerir cirugía o el sacrificio del animal. La cenurosis aguda debida a *T. multiceps* y la cisticercosis debida a *T. hydatigena* es inusual en ovejas y cabras, pero puede ser letal. La cisticercosis ocasiona pérdida económica por el decomiso de las carnes y despojos infectados.

#### Diagnóstico de laboratorio

##### Identificación del agente

Las tenias adultas del género *Taenia* tienen forma de cinta en el sentido dorsoventral, están segmentadas y son grandes, alcanzando entre los 20 a 50 cm (la especie que afecta al perro) y varios metros (la especie que se encuentra en los humanos). En la parte anterior, el escólex (cabeza) tiene cuatro ventosas musculares y puede tener un rostelo, con frecuencia armado con una doble corona de ganchos, cuya longitud y cantidad es relativamente característica de cada especie. Después del escólex tienen un cuello al que le siguen segmentos inmaduros, a continuación segmentos reproductivos maduros y finalmente los segmentos grávidos que están llenos de huevos. La estructura de los segmentos, aunque de manera poco fiable, puede ayudar en la identificación de la especie.

Los parásitos del género *Taenia* adultos se reconocen en el examen post-mortem o por la expulsión de huevos o segmentos con las heces. Las especies de *Taenia* no pueden diferenciarse por la estructura de los huevos. Los metacestodos están constituidos por una vesícula llena de líquido con uno o más protoescólices invaginados. Cada uno de estos “gusanos vesiculares” se encuentra dentro de una pared quística en la interfase parásito-hospedador. Esta estructura comprende el cisticerco o cenuro. Los metacestodos son visibles macroscópicamente en el examen post-mortem y al inspeccionar la carne, pero las infecciones leves a menudo pasan desapercibidas.

Los metacestodos de *T. solium* o de *T. saginata* pueden ser palpables en la lengua pero, en el animal vivo y en el examen post mortem o en la inspección de canales, la palpación de la lengua sólo es de valor diagnóstico en cerdos o vacas muy infectados por metacestodos; además serán difíciles de diferenciar de los sarcosporidios. Aun así, la inspección de los canales postmortem constituye el principal método diagnóstico de presencia de metacestodos. La NCC puede diagnosticarse mediante técnicas de imagen.

#### Pruebas inmunológicas

Las infecciones por parásitos adultos del género *Taenia* se pueden reconocer mediante la detección de los coproantígenos de *Taenia* en heces empleando un enzimoimmunoanálisis de captura de antígeno (Ag-ELISA), pero la prueba no diferencia las especies. Existe una prueba comercial para la detección de antígeno derivado de parásito circulante en el suero del ganado vacuno o de cerdos o seres humanos con cisticercosis causada por *T. saginata* o *T. solium*. El empleo de técnicas basadas en ADN específico de especie sigue siendo experimental.

#### Pruebas serológicas

Actualmente las pruebas de detección de anticuerpos en el suero no se utilizan para el diagnóstico de la cisticercosis en los animales, excepto con fines epidemiológicos. Existen pruebas para el diagnóstico serológico de la NCC en humanos.

### **3.7. ANISAKIASIS/ANISAQUIASIS**

#### **Definición y descripción de la enfermedad**



El agente de esta parasitosis es la larva de nematodos de los géneros *Anisakis*, *Pseudoterranova* y *Contracaecum*, pertenecientes a la familia *Anisakidae*. La especie más mencionadas en la literatura como parásitos del hombre son *Anisakis simplex* y *Pseudoterranova decipiens*.

En el estado adulto, *Anisakis* y *Pseudoterranova* se alojan en el estómago o intestino delgado de mamíferos piscívoros como delfines, marsopas, ballenas y focas y *Contracaecum* se aloja en el tracto digestivo de los peces; allí donde se alojan en

cada caso, los adultos ponen huevos que salen sin embrionar en las heces del huésped definitivo. Mientras los huevos flotan en el agua se forma una larva del segundo estadio (L-2), que son ingeridas por gran variedad de pequeños crustáceos que actúan como hospedadores intermediarios, de modo que en su interior la L2 se transforma en larva de tercer estadio (L-3). Muchos peces y cefalópodos ingieren esos crustáceos parasitados y actúan como huéspedes de transporte o paraténicos, en los que las L3 se acumulan y enquistan a la espera de llegar al HD. Dichos peces pueden ser ingeridos por peces más grandes o por el hombre, en cuyo caso el gusano sólo se transfiere de un hospedador al otro, o bien ser ingeridos por hospedadores definitivos, en los que el gusano madura, se aparea y comienza a poner huevos (cerrándose el ciclo).

El ser humano es un huésped aberrante, en el cual la larva ingerida L.3 es incapaz de madurar (hay pocas excepciones). La presentación clínica de la enfermedad en humanos adopta varias formas:

- Casos asintomáticos o con síntomas leves, generalmente causados por *Pseudoterranova spp.* Se pueden expulsar larvas en la tos, vómitos o heces.
- En las formas invasoras, las larvas penetran hasta la submucosa gástrica o intestinal, causando edema, erosión, úlcera y hemorragia.
- Síntomas de alergia en muchos pacientes de anisakiasis por *A. simplex*, y a veces, síntomas gástricos comúnmente asociados a alergia al marisco o al pescado.

En la anisakiasis gástrica, los síntomas aparecen de 12-24 h después del consumo de pescado crudo y comprende dolores gástricos, a menudo asociados a náuseas y vómitos. La anisakiasis intestinal tarda unos 7 días en manifestarse y lo hace con dolores fuertes en la parte baja del abdomen, náuseas, vómitos, fiebre, diarrea y sangre oculta en heces.

## Diagnóstico de laboratorio

### Identificación del agente

Las L3 son visibles a simple vista como quiste o como larva, lo que permite su fácil detección. Son blanquecinas, redondas, de cuerpo cilíndrico y alargado, y miden entre 4-30 mm de longitud. Los métodos para la detección del anisakis que más se usan son (la mayoría de ellos exigen deteriorar la pieza):

#### 1. Examen visual simple

Es el método más sencillo. Consiste en buscar las larvas en el músculo del pescado mediante cortes de un espesor de 5mm aproximadamente, usando tijeras y pinzas. Algunos estudios consideran que sólo detecta el 45-83% de las larvas ubicadas en el músculo de algunos tipos de pescado. Ventajas: muy sencillo, no requiere equipos especiales ni personal especializado. Inconvenientes: poco eficaz, inadecuado para pescados grandes y no distingue larvas vivas/muertas.

## 2. Transiluminación

Se utiliza ampliamente para detectar parásitos en la musculatura de los peces. Consiste en proyectar una fuente luminosa por la parte inferior del pescado, normalmente con ayuda de mesas iluminadas, provistas en su parte interior tubos fluorescentes que proporcionen luz blanca. Se fija el filete de pescado sobre la caja; con la luz, las larvas se presentan como sombras oscuras en la carne y se pueden extraer con unas pinzas o cuchillas. Un estudio reciente considera esta técnica de baja eficacia ya que con ella solamente se detecta un 7-10% de las larvas presentes en el pescado. Ventajas: no es destructivo (generalmente), es relativamente rápido y no requiere equipos costosos ni personal especializado. Inconvenientes: baja eficacia, inadecuado para pescado con carne pigmentada, no diferencia parásitos vivos y muertos y no se puede aplicar sobre un pescado entero.

## 3. Iluminación con luz ultravioleta



Muy similar al anterior, pero en vez de luz blanca se utiliza luz UV. En una habitación oscura, se hace incidir la luz UV a unos 10cm de distancia sobre el filete de pescado (por ambos lados). Las larvas de anisakis se verán color fluorescente azulado. Ventajas: no destructivo, relativamente rápido, adecuado para pescados con carne pigmentada. Inconvenientes: para mayor eficacia requiere congelación y descongelación previas. No distingue parásitos vivos y muertos. Inaplicable sobre pescados grandes.

## 4. Digestión

Consiste en reproducir las condiciones físico-químicas del estómago de los mamíferos para recuperar las larvas presentes en el pescado. Básicamente, la muestra de pescado se sumerge en una disolución con pepsina y ácido clorhídrico y se incuba a 37°C en agitación suave 24h. Después se filtra y se observa el filtrado. Ventajas: muy eficaz, distingue vivos y muertos. Inconvenientes: destructiva, tediosa y cara, inadecuada en inspecciones industriales a gran escala.

## 5. Detección de ADN mediante PCR

El Instituto Superior de Sanidad (ISS, Roma) es el Laboratorio Comunitario de Referencia para esta enfermedad, y dispone en su web de un protocolo de identificación de larvas por PCR, ya sea de especímenes aislado de biopsias humanas o de tejidos animales<sup>7</sup>.

---

<sup>7</sup> "Identification of *Anisakidae* Larvae at the species level by multiplex PCR".

## **BIBLIOGRAFÍA**

Fichas de parásitos por orden alfabético

<http://www.cdc.gov/dpdx/az.html>

Manual de las Pruebas de Diagnóstico y de las Vacunas para los Animales Terrestres **2021**.

[Acceso en línea al Manual Terrestre - OMSA - Organisation Mondiale de la Santé Animale \(woah.org\)](https://www.woah.org/)

Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales. 3ª Edición.  
Volumen III. Parasitosis. Pedro N. Acha y Boris Szyfres.

Enlace “Zoonosis” en la web MAPAMA:

Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación.

<https://www.mapa.gob.es/es/ganaderia/temas/sanidad-animal-higiene-ganadera/sanidad-animal/zoonosis-resistencias-antimicrobianas/zoonosis.aspx>

Plan Nacional de Contingencia frente a Triquina:

[https://www.mapa.gob.es/es/ganaderia/temas/sanidad-animal-higiene-ganadera/plancontingenciatriquinaenero2020\\_tcm30-501140.pdf](https://www.mapa.gob.es/es/ganaderia/temas/sanidad-animal-higiene-ganadera/plancontingenciatriquinaenero2020_tcm30-501140.pdf)

**MATERIAL PARA LA PREPARACIÓN DEL TEMA 48**

**BRUCELOSIS. MARCO LEGAL. PROGRAMA NACIONAL DE ERRADICACIÓN.  
DIAGNÓSTICO DE LABORATORIO.**

*Este material no tiene carácter oficial, por lo que en ningún caso vinculará al Tribunal Calificador. Constituye, únicamente, un instrumento complementario que servirá de apoyo al opositor para enfocar cada uno de los epígrafes, pero nunca de forma exclusiva ni excluyente. El Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación no se hace responsable del contenido del mismo.*

*Los materiales no serán objeto de actualización constante.*

## **ÍNDICE**

### **1. BRUCELOSIS.**

- 1.1. ETIOLOGIA.
- 1.2. TRANSMISIÓN, PATOGENIA, SIGNOS CLINICOS Y LESIONES.
- 1.3. SITUACIÓN EPIDEMIOLOGICA ACTUAL EN ESPAÑA.

### **2. MARCO LEGAL.**

### **3. PROGRAMAS NACIONALES**

### **4. DIAGNÓSTICO LABORATORIAL**

- 4.1. TOMA DE MUESTRAS Y CONDICIONES DE TRANSPORTE.
- 4.2. DIAGNOSTICO DIFERENCIAL
- 4.3. DIAGNOSTICO MICROBIOLOGICO
  - 4.3.1. Procesamiento y Aislamiento.
  - 4.3.2. Identificación y Tipificación.
- 4.4. DIAGNOSTICO INMUNOLÓGICO.
  - 4.4.1. Pruebas serológicas
  - 4.4.2. Prueba cutánea de la brucelosis.
- 4.5. DIAGNOSTICO MOLECULAR

## **1. BRUCELOSIS.**

La brucelosis es el nombre general de la infección bacteriana causada por especies del género *Brucella*, en los animales o en el hombre.

La brucelosis afecta a los bovinos, porcinos, ovinos, caprinos, equinos, camélidos y perros. También puede infectar a otros rumiantes, a algunos mamíferos marinos, así como transmitirse de los animales a los humanos (es una zoonosis).

La enfermedad en los humanos es, principalmente, un riesgo ocupacional para los profesionales expuestos al contacto directo con animales o sus productos (veterinarios, granjeros, personal de laboratorio, personal de mataderos).

La importancia de esta enfermedad radica tanto a nivel económico (descenso tasas de nacimientos, restricciones de movimientos del ganado...) como sanitario (zoonosis).

La brucelosis es una Enfermedad de Declaración Obligatoria, tal y como se señala en el Real Decreto 526/2014, de 20 de junio, por el que se establece la lista de las enfermedades de los animales de declaración obligatoria y se regula su notificación.

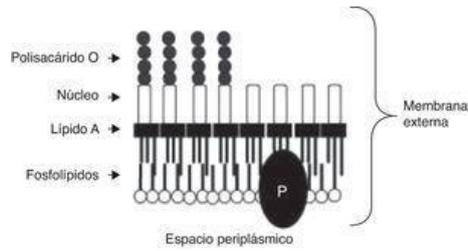
### **1.1. ETIOLOGÍA**

Los microorganismos pertenecientes al género *Brucella* son microorganismos intracelulares facultativos, cocobacilos Gram-negativos, inmóviles, no capsulados, no esporulados y aerobios, salvo algunas especies y biovariedades (biovariedades de *Brucella abortus* y *Brucella ovis*) que si necesitan una atmósfera enriquecida con un 5-10% de CO<sub>2</sub> para su crecimiento (especialmente en el aislamiento primario).

La envoltura celular de *Brucella* spp se corresponde con la estructura típica de las bacterias Gram negativas (una membrana citoplasmática, un espacio periplásmico y una membrana externa).

La membrana externa de *Brucella* es rica en fosfatidilcolina y su componente más estudiado es el Lipopolisacárido (LPS), conocido también como endotoxina. Éste está constituido por 3 regiones: lípido A, oligosacárido intermedio (núcleo) y el polisacárido O o cadena O.

El LPS es un componente estructural y funcional esencial para *Brucella* (Cardoso et al., 2006) y constituye un importante factor de virulencia (Lapaque et al., 2005) cuya estructura permite la diferenciación de las bacterias de este género en dos grupos: lisas (L-LPS: si contiene la cadena O completa, como por ejemplo *B. melitensis*, *B. abortus* y *B. suis*) y rugosas (R-LPS: si dicha cadena es incompleta o ausente, como *B. ovis* y *B. canis*).



Dentro del género *Brucella* se reconocen las siguientes especies: *Brucella abortus*, *Brucella melitensis*, *Brucella suis*, *Brucella canis*, *Brucella ovis*, *Brucella neotomae*, *Brucella ceti*, *Brucella pinnipedialis* y *Brucella microti* que presentan diferente grado de virulencia para los animales a los que infectan específicamente. Recientemente se han identificado nuevas especies: *Brucella inopinata* y *Brucella papionis*.

La brucelosis bovina suele estar causada por *Brucella abortus*, menos frecuentemente por *B. melitensis* y en ocasiones por *B. suis*.

La principal causa de la brucelosis caprina y ovina es *Brucella melitensis* (biovariedades 1, 2 y 3), aunque se han observado casos esporádicos causados por *B. abortus*.

Los humanos son particularmente susceptibles a *Brucella abortus*, *Brucella melitensis* y *Brucella suis*. Por regla general, adquieren la infección de forma accidental a partir de animales infectados y no son, en sí mismos, fuente de contagio para otros humanos.

## 1.2. TRANSMISIÓN, PATOGENIA, SIGNOS CLINICOS Y LESIONES.

En la mayoría de los casos, las vías principales de **transmisión** de *Brucella* son la placenta, los líquidos fetales y las secreciones vaginales expulsadas por los animales infectados, ya sea al abortar o al parir a término. La expulsión de *Brucella* también es frecuente en las secreciones de la ubre y en el semen, y puede aislarse *Brucella* de distintos tejidos, como los ganglios linfáticos de la cabeza, el bazo y los órganos asociados a la reproducción (útero, epidídimo y testículos), así como de lesiones artríticas (Alton et al., 1988).

En referencia a su **patogenia**, las brucelas, inmediatamente después de la penetración e independientemente de la vía de entrada, son transportadas libres o en el interior de células fagocíticas hasta los ganglios linfáticos más próximos al lugar de entrada. Si las bacterias no son destruidas, pueden sobrevivir largos periodos de tiempo en el interior de las células del sistema retículoendotelial.

Los ganglios linfáticos responden a la agresión por medio de una hiperplasia reticuloendotelial y linfática, que puede tardar varias semanas en producirse y persistir durante meses. Cuando las bacterias no son aisladas y destruidas en los ganglios, se produce su diseminación a través de la vía linfática o más frecuentemente a través de la sangre.

La bacteriemia puede persistir intermitentemente durante meses, dependiendo de la resistencia del hospedador. Por tanto, la diseminación hematogena permite la colonización del bazo, útero, placenta, glándula mamaria, ganglios linfáticos y de otros órganos como el testículo, epidídimo y glándulas sexuales accesorias en los machos.

La particular afinidad que estas bacterias tienen por el endometrio grávido y por la placenta fetal, condiciona que la principal manifestación clínica de la infección en los animales sea el aborto durante el último tercio de la gestación o el nacimiento de animales prematuros poco viables, con el consiguiente aumento de la mortalidad perinatal.

**Clínicamente**, la enfermedad se caracteriza por uno o más de los siguientes signos: aborto, retención de placenta, orquitis, epididimitis y, en ocasiones muy infrecuentes, artritis.

En las hembras no gestantes la enfermedad suele ser asintomática. Después de la infección por *B. abortus* o por *B. melitensis*, las hembras adultas gestantes desarrollan una placentitis que, por lo general, provoca el aborto en el último tercio de la gestación.

Los machos adultos pueden desarrollar orquitis, y la brucelosis puede causar la esterilidad en ambos sexos.

La brucelosis es una enfermedad que no presenta **lesiones** de carácter patognomónico. Las principales manifestaciones son, como dijimos anteriormente, fallos reproductivos caracterizados por placentitis necrótica y metritis purulenta con exudado hemorrágico en carúnculas y endometrio de hembras.

Como ya hemos comentado, en los machos produce cambios testiculares palpables, epididimitis y orquitis necrosante, vesiculitis seminal necrótica y prostatitis con una frecuente esterilidad.

Los animales infectados pueden desarrollar lesiones inflamatorias granulomatosas, en gran parte localizadas en tejido linfático, nódulos linfáticos de la ubre, útero, articulaciones y membranas sinoviales.

### **1.3. SITUACIÓN EPIDEMIOLOGICA ACTUAL EN ESPAÑA.**

Tras más de 25 años luchando contra esta enfermedad, en 2021 España fue declarada como país oficialmente indemne de brucelosis ovina y caprina. Seguidamente, en 2022 España fue declarada también oficialmente indemne de brucelosis bovina.

Estos dos acontecimientos han supuesto un hito histórico en el campo de la sanidad animal de nuestro país; este logro se ha conseguido gracias al gran esfuerzo conjunto realizado por las administraciones públicas, los sectores ganaderos y los veterinarios.

## **2. MARCO LEGAL**

El marco de lucha contra las enfermedades producidas por *Brucella abortus*, *Brucella melitensis* y *Brucella suis* es amplio, y debe tener en cuenta la normativa aplicable a los diferentes niveles administrativos: autonómico, nacional, comunitario e internacional.

En el seno de la Unión Europea, la normativa aplicable es la siguiente:

**El Reglamento (UE) 2016/429 del Parlamento Europeo y del Consejo**, de 9 de marzo de 2016, relativo a las enfermedades transmisibles de los animales y por el que se modifican o derogan algunos actos en materia de sanidad animal («Legislación sobre sanidad animal»), incluye en su Anexo II a la infección por *Brucella abortus*, *B. melitensis* y *B. suis*, tras su modificación por el Reglamento Delegado (UE) 2018/1629 de la Comisión, de 25 de julio de 2018, que modifica la lista de enfermedades recogidas en el anexo II del Reglamento (UE) 2016/429 del Parlamento Europeo y del Consejo, relativo a las enfermedades transmisibles de los animales y por el que se modifican o derogan algunos actos en materia de sanidad animal.

**El Reglamento de Ejecución (UE) 2018/1882 de la Comisión**, de 3 de diciembre de 2018, relativo a la aplicación de determinadas normas de prevención y control a categorías de enfermedades enumeradas en la lista y por el que se establece una lista de especies y grupos de especies que suponen un riesgo considerable para la propagación de dichas enfermedades de la lista.

En este reglamento de ejecución, *B. abortus*, *B. melitensis* y *B. suis* aparecen categorizadas como B+D+E para *Bison ssp.*, *Bos ssp.*, *Bubalus ssp.*, *Ovis ssp.* y *Capra ssp.*

**El Reglamento Delegado (UE) 2020/689 de la Comisión**, de 17 de diciembre de 2019, por el que se completa el Reglamento (UE) 2016/429 del Parlamento Europeo y del Consejo en lo referente a las normas de vigilancia, los programas de erradicación y el estatus de libre de enfermedad con respecto a determinadas enfermedades de la lista y enfermedades emergentes.

**El Reglamento Delegado (UE) 2020/688 de la Comisión**, de 17 de diciembre de 2019, por el que se completa el Reglamento (UE) 2016/429 del Parlamento Europeo y del Consejo en lo referente a los requisitos zoonosarios para los desplazamientos dentro de la Unión de animales terrestres y de huevos para incubar.

**La Directiva 2003/99/CE del Parlamento Europeo y del Consejo**, de 17 de noviembre de 2003, sobre la vigilancia de las zoonosis y los agentes zoonóticos.

*A escala nacional*, es de considerar la siguiente normativa:

**La Ley 8/2003**, de 24 de abril, de sanidad animal,

**El Real Decreto 2611/1996**, de 20 de diciembre, y sus modificaciones, por el que se regulan los programas nacionales de erradicación de enfermedades de los animales.

**El Real Decreto 1440/2001**, de 21 de diciembre, por el que se establece el sistema de alerta sanitaria veterinaria.

**El Real Decreto 526/2014**, de 20 de junio, por el que se establece la lista de las enfermedades de los animales de declaración obligatoria y se regula su notificación.

**El Real Decreto 1940/2004**, de 27 de septiembre, sobre la vigilancia de las zoonosis y los agentes zoonóticos, el cual es la transposición de la ya citada Directiva 2003/99/CE.

### 3. PROGRAMAS NACIONALES

Afortunadamente, los programas nacionales de brucelosis han pasado de denominarse “programas de erradicación” a “programas de vigilancia y control”.

Tenemos dos programas nacionales de brucelosis:

- El Programa Nacional de Vigilancia y Control de la Brucelosis Ovina y Caprina (PNVCBoc), y
- El Programa Nacional de Vigilancia y Control de la Brucelosis Bovina (PNVCBb).

La Subdirección General de Sanidad e Higiene Animal y Trazabilidad es la encargada de la **coordinación** de dichos programas, y es quien informa a la Comisión de la evolución de la enfermedad. Por otro lado, los responsables de la **ejecución** de este programa son los Servicios competentes de las CCAA.

Veremos ambos programas en paralelo, resaltando las diferencias entre ellos:

Los programas comienzan con los antecedentes de la **evolución epidemiológica** de la enfermedad objeto (brucelosis bovina u ovina-caprina, según sea el caso), observándose un descenso sostenido de la enfermedad.

Dado que todas las provincias de España están reconocidas como oficialmente libres, tanto para brucelosis bovina (desde 2022) como para brucelosis ovina y caprina (desde Marzo 2021), **el objetivo** de estos programas es mantener y demostrar el mantenimiento de dicho estatus mediante la aplicación de un programa de vigilancia basado en una muestra representativa de todos los establecimientos que tienen bovinos o, caprinos y ovinos (según sea el caso), o bien, mediante una muestra aleatoria o basada en el riesgo.

La **población diana** del PNVCBb serán todos los animales de la especie bovina destinados a reproducción, producción de carne, leche u otras producciones, o a trabajo, certámenes o exposiciones; y a animales mayores de 12 meses (con alguna excepción).

En el caso del PNVCBoc, la población diana serán todas las explotaciones que contengan animales que por su edad o aptitud productiva sean susceptibles de ser chequeados contra la enfermedad, de acuerdo con el artículo 5 del Reglamento Delegado (UE) 2020/689.

Las **principales medidas contempladas** en ambos Planes de Vigilancia y Control, se basan en pruebas de detección de animales positivos y sacrificio obligatorio de los mismos. Siempre que exista confirmación mediante pruebas laboratoriales (aislamiento microbiológico, PCR, tinción inmuno-específica o acidorresistente modificada) de *B. melitensis* o *abortus*, se realizará el vaciado sanitario del establecimiento o unidad epidemiológica; sólo se podrán contemplar excepciones al vaciado sanitario en circunstancias excepcionales, como en el caso de que sea necesaria la protección de recursos genéticos.

Si la especie que se confirma es *B. suis*, se realizarán nuevas pruebas de diagnóstico pasados 90 días de la retirada del animal infectado, realizándose el vaciado si vuelve a aislarse la bacteria en animales adicionales.

La **toma de muestras** se realizará preferentemente por los Servicios Veterinarios Oficiales (SVO) de los animales sacrificados de todos los rebaños M4/B4 en que se suspende o retira la calificación. En rebaños no calificados se realizará siempre que sea posible, especialmente en aquellos con uno o escasos animales positivos.

En cualquier caso, se tomarán muestras si existe notificación de casos humanos por las autoridades competentes de Salud Pública. La toma de muestras se realizará de acuerdo con las directrices establecidas en el Manual de Toma de Muestras 2010.

En cuanto al **control de acceso a pastos** de aprovechamiento común, cada uno de estos pastos se considerará como una unidad epidemiológica, asignando igual calificación sanitaria a todos los rebaños que acuden a dichos pastos, teniendo en cuenta que se adquiere la más baja calificación de entre los rebaños que concurran al pasto.

Con objeto de poder llevar a cabo **investigaciones epidemiológicas** ante un brote, en los Planes Nacionales de Vigilancia y Control se indica que las cepas aisladas en un brote serán remitidas al Laboratorio Central de Sanidad Animal de Santa Fe (Granada), el cual es el Laboratorio Nacional de Referencia de Brucelosis.

Puesto que la brucelosis es una enfermedad de declaración obligatoria en España, ambos planes indican que **la declaración oficial de la enfermedad** se efectuará de conformidad con lo dispuesto en el Real Decreto 526/2014, por el que se establece la lista de las enfermedades de los animales de declaración obligatoria y se da la normativa para su comunicación.

Las **pruebas diagnósticas utilizadas** serán las establecidas en el Real Decreto 2611/1996, de 20 de diciembre y sus modificaciones posteriores, en la sección I del Anexo III del Reglamento Delegado 2020/689 y en los protocolos publicados en la página Web del Laboratorio Europeo de Referencia (ANSES).

La **vacunación** frente a brucelosis ovina-caprina y bovina, se encuentra prohibida (salvo alguna excepción).

En los establecimientos en los que haya aparecido algún animal positivo, se pondrá especial interés en el correcto cumplimiento de las **medidas profilácticas** establecidas en el artículo 21 del Real Decreto 2611/1996.

Por último, reseñar que ambos programas (PNVCBb y PNVCBoc) contemplan el que se deba de hacer una vigilancia pasiva de los abortos compatibles con brucelosis en el **ganado porcino conviviente** con el ganado bovino u ovino-caprino en el mismo establecimiento, así como, una vigilancia activa mediante un muestreo de animales para una prevalencia objetivo del 10% y una confianza del 95%.

#### 4. DIAGNOSTICO LABORATORIAL.

No existe una prueba única que permita la identificación de Brucella. Normalmente se necesita una combinación de las características de crecimiento y métodos serológicos, bacteriológicos y/o moleculares.

Al inicio de este apartado haremos una pequeña introducción sobre cuál serían las muestras de elección para el diagnóstico de la brucelosis, y cuál sería el diagnóstico diferencial a realizar en esta enfermedad, para finalmente pasar a describir el diagnóstico microbiológico, inmunológico y molecular.

##### 4.1. TOMA DE MUESTRAS Y CONDICIONES DE TRANSPORTE.

El éxito en la investigación etiológica del género Brucella depende de la naturaleza y frescura de las muestras, el adecuado acondicionamiento y conservación durante el transporte de las mismas, y de las Buenas Prácticas de Laboratorio.

Como en todo proceso diagnóstico, “no hay un buen resultado, sin una buena muestra” y a partir de ahí es donde comenzamos el diagnóstico propiamente dicho.

Los animales de elección para la toma de muestras serían los animales abortados o con sospecha de aborto.

En el caso del cadáver, por razones prácticas y de seguridad, es necesario ceñirse a los tipos de muestras que a continuación se relacionan, teniendo presente que la toma de las mismas en el ganado bovino es en el matadero, y en el caso del ganado ovino y caprino puede ser en la propia explotación, y en otras ocasiones el matadero.

Las muestras de elección a tomar en los **animales vivos** serán:

- Sangre con y sin anticoagulante (EDTA).
- Hisopo vaginal con medio de transporte (Amies).
- Leche, en el caso de hembras en lactación.
- Semen y líquido articular en determinados casos.

Las muestras de elección **a partir de cadáveres**, además de las indicadas para los animales vivos, serán:

- Linfonódulos supramamarios, o inguinales (en el caso de machos), retrofaríngeos.
- Parénquima mamario colindante con la cisterna del pezón.
- Líquido amniótico obtenido por punción directa y/o cotiledones placentarios.
- Bazo, útero, epidídimo, testículos.

Las muestras fetales presentan un elevado interés por la información potencial que pueden aportar, no obstante, el enorme peligro de contagio y diseminación a partir de las mismas, pone de manifiesto la necesidad de ser conservadores a la hora de manipular muestras de los abortos. En el caso que se den las condiciones adecuadas para la toma de dichas muestras, se recomienda recoger **a partir del feto** las siguientes:

- Contenido estomacal mediante punción con jeringuilla.
- Bazo y pulmón.

De modo general, si el envío de las muestras clínicas obtenidas se prevé que se recepcionen en el laboratorio en 24h desde su toma, dichas muestras podrán enviarse refrigeradas, en cambio, si la recepción en el laboratorio se estima en un tiempo superior a 24 h desde que fueron tomadas, el envío deberá de realizarse en condiciones de congelación ( $\leq -20^{\circ}\text{C}$ ).

Como excepción a esta indicación general, las muestras de sangre sin anticoagulante (para estudios serológicos) y los hisopos vaginales (para aislamiento) deberán ser enviados siempre en condiciones de refrigeración, no siendo adecuada la siembra de los hisopos vaginales transcurridas más de 48h desde su recogida, ya que la viabilidad del agente patógeno se verá seriamente afectada.

El envío de estas muestras clínicas al laboratorio deberá de hacerse siguiendo la normativa vigente, siendo clasificadas como Categoría B (ONU 3373), por lo que deberán de transportarse en un embalaje que cumpla los requisitos de la instrucción de embalaje P650.

En el caso particular de que se enviaran cultivos a partir de aislamientos realizados en otro laboratorio (por ejemplo, al laboratorio nacional de referencia para su tipificación y confirmación), dichas muestras deberán ser clasificadas como Categoría A (ONU 2814) y ser transportadas en un embalaje que cumpla los requisitos de la instrucción de embalaje P620.<sup>1</sup>

#### **4.2. DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL.**

Para poder alcanzar un diagnóstico asertivo de la brucelosis en el ganado, se deben tener en cuenta otras enfermedades que causan abortos o epididimitis y orquitis.

En el ganado bovino, el diagnóstico diferencial debe incluir la Tricomoniasis, Vibriosis, Leptospirosis, Listeriosis, Rinotraqueitis infecciosa bovina y varias micosis.

En el ganado ovino-caprino el diagnóstico diferencial habría que hacerlo con respecto a Toxoplasmosis, Campilobacteriosis, Salmonelosis, Leptospirosis, Clamidiosis, Brucella ovis, Fiebre Q.

#### **4.3. DIAGNOSTICO MICROBIOLÓGICO.**

La detección e identificación mediante técnicas microbiológicas se lleva a cabo mediante una combinación de métodos basados en las características morfológicas (a nivel macroscópico y microscópico), pruebas bioquímicas, requerimientos atmosféricos durante su incubación, siembra en medios selectivos (con colorantes o antibióticos) y pruebas serológicas (aglutinación con sueros monoespecíficos anti-A, anti-M o anti-R).

---

<sup>1</sup> Para más información durante el transporte de muestras infecciosas:  
[https://www.oie.int/fileadmin/Home/esp/Health\\_standards/tahm/1.01.03\\_TRANSPORT.pdf](https://www.oie.int/fileadmin/Home/esp/Health_standards/tahm/1.01.03_TRANSPORT.pdf)

Antes de poder iniciar la identificación y tipificación de la brucella por métodos microbiológicos, tendremos que haberla aislado tras el procesamiento de las muestras clínicas y posterior siembra en medios de cultivos básicos o selectivos:

#### **4.3.1. Procesamiento y Aislamiento**

Según la muestra (sangre, leche, flujo vaginal, membranas fetales o cultivos sólidos), se procederá de distinta manera.

En el caso de muestras de tejidos sólidos, para aumentar las posibilidades de aislamiento, las muestras se trituran en un equipo tipo Stomacher.

La leche se centrifugará, y la crema y la parte depositada se sembrarán en el medio adecuado.

La sangre, los hisopos vaginales, el semen y el líquido articular se sembrarán directamente en los medios.

Para el primoaislamiento se suelen utilizar medios sólidos, ya que nos permiten reconocer sus características morfológicas a nivel macroscópico. Sin embargo, en el caso de muestras voluminosas o cuando se pretenda lograr un enriquecimiento, puede recomendarse el empleo de medios líquidos.

Adicionalmente, cuando se pretende hacer un primoaislamiento, en general se realizará la siembra en medios selectivos (con antibióticos que inhiben el crecimiento de otros microorganismos). Para las diferentes pruebas llevadas a cabo posteriormente para su identificación y tipificación o incluso cuando se pretenda enriquecer la muestra, se pueden usar medios basales como: medio Castañeda (medio bifásico recomendado en muestras de sangre y leche), Agar triptosa, Agar suero-dextrosa, Agar glicerol-dextrosa...

Se recomienda la adición de 2-5 % de suero bovino o equino en dichos medios, ya que algunas cepas necesitan dicho enriquecimiento para crecer (*B.abortus* bv.2). Los medios selectivos empleados pueden ser: Farrell modificado, Thayer-Martin modificado o CITA. Las placas de todos los medios de cultivo se incubarán en paralelo en estufas de aerobiosis y anaerobiosis (con 5-10% CO<sub>2</sub>) a 37°C, de esta forma podremos saber los requerimientos atmosféricos de la cepa aislada (*B. abortus* necesita CO<sub>2</sub> para crecer).

La lectura se realiza a los 4 días, aunque se deben de incubar un mínimo 10 días para concluir que son negativas. Las colonias aisladas compatibles con *Brucella* spp. son (a nivel macroscópico) redondas, con bordes lisos, traslúcidas y de color miel en medio transparente.

#### **4.3.2. Identificación y Tipificación.**

Una vez aisladas las cepas compatibles con brucela, se procederá a su identificación y tipificación mediante una combinación de técnicas o estudios:

### 1) características morfológicas de las colonias,

- a) observación directa de las colonias,
- b) determinación de la fase de disociación, mediante la prueba de la acriflavina descrita por Braun y Bonestell, o mediante el método de White y Wilson de tinción de colonias con cristal violeta (Alton et al., 1988).
- c) tinción de Gram (-) y Stamp (+), pudiéndose realizar sobre improntas de tejidos o a partir de colonias aisladas.

2) **requerimientos de CO<sub>2</sub> para el crecimiento** (importante sobre todo para diferenciar cepas de *B. abortus* vacunales de las cepas de campo),

3) **pruebas bioquímicas** (oxidasa, catalasa, ureasa, producción de sulfhídrico...),

4) **siembra en medios de cultivo con colorantes y antibióticos** (importante para diferenciar cepas vacunales de las cepas de campo),

5) **aglutinación con sueros monoespecíficos** anti-A, anti-M y/o anti-R (importante para poder diferenciar los diferentes biotipos, especialmente en *B. melitensis*),

6) **Fagolisis.**<sup>2</sup>

#### 4.4. DIAGNOSTICO INMUNOLÓGICO.

Para abordar las diferentes técnicas inmunológicas utilizadas en el diagnóstico de la brucelosis, las dividiremos en dos grupos: pruebas serológicas y prueba de la brucelina.

##### 4.4.1. Pruebas serológicas

Dentro de las pruebas serológicas, las dividiremos de nuevo en dos grupos según la muestra utilizada para llevar a cabo las diferentes técnicas de diagnóstico:

- A partir de muestras de sangre:

i) Pruebas del antígeno brucelar tamponado (prueba de Rosa de Bengala)

La prueba de Rosa de Bengala (RBT) consiste en enfrentar un antígeno (Ag) estandarizado frente a un suero problema, y evaluar la aparición de aglutinación. El Ag de Rosa de Bengala está constituido por células muertas de las cepas de *B. abortus* S99 o S1119-3 en suspensión, en una solución de pH ácido, y aglutina cuando es reconocido por los anticuerpos (Ac) presentes en la muestra problema.

La RBT es muy sensible, sin embargo, como toda prueba serológica, a veces puede originar falsos positivos, por lo que deben confirmarse con estrategias confirmativas y/o

---

<sup>2</sup> Para más información sobre las características diferenciales de las especies y biovariedades del género *Brucella* spp., visitar el capítulo de brucelosis del manual online de la OIE:

[https://www.oie.int/fileadmin/Home/esp/Health\\_standards/tahm/3.01.04\\_BRUCELL.pdf](https://www.oie.int/fileadmin/Home/esp/Health_standards/tahm/3.01.04_BRUCELL.pdf)

complementarias (que incluyan tanto la realización de otras pruebas como la investigación epidemiológica).

En ocasiones muy infrecuentes se producen falsos negativos, sobre todo debido a los fenómenos de prozona. Sin embargo, la RBT parece adecuada como prueba para detectar rebaños infectados o para garantizar la ausencia de infección en rebaños libres de brucelosis.

ii) prueba de fijación del complemento

Esta técnica se basa en la capacidad del complemento para unirse a los complejos Ag-Ac. La prueba incluye la adición de eritrocitos sensibilizados con una hemolisina. La hemolisina usada es suero de conejo que contiene Ac policlonales frente a los hematíes del carnero.

Si el suero “problema” tiene anticuerpos específicos, reaccionará el complemento al complejo Ag-Ac formado, y posteriormente no habrá más sistema de complemento, por tanto, no podrá unirse a la hemolisina para lisar los eritrocitos del carnero. En este caso el fondo del pocillo se verá como un botón rojo.

Normalmente, en rebaños libres, el rosa de bengala se usa como prueba de screening, y los positivos son testados en serie mediante la prueba de fijación de complemento. En rebaños infectados habitualmente se usan en paralelo las técnicas de Rosa de Bengala y Fijación de complemento.

iii) ensayo inmunoenzimático indirecto (ELISA indirecto o I-ELISA)

iv) prueba de polarización de fluorescencia (FPA)

Utiliza como Ag un fragmento de bajo peso molecular del polisacárido O del S-LPS de la cepa 1119-3 de *Brucella abortus*, marcado con isotiocianato de fluoresceína. Una vez que el Ag se mezcla con el suero o sangre problema, se mide la polarización de la fluorescencia que nos delatará la existencia de Acs específicos.

La FPA es una técnica sencilla para determinar la interacción Ag/Ac, y puede realizarse en instalaciones de laboratorio o en el campo. Es una prueba muy rápida.

v) ensayo inmunoenzimático competitivo (ELISA competitivo o C-ELISA)

• *b) a partir de muestras de leche*

i) prueba del anillo de leche

La prueba del anillo de leche es una alternativa adecuada cuando no se dispone de ELISA para leche. No obstante, no es adecuada para leche de pequeños rumiantes.

ii) ELISA indirecto

La prueba I-ELISA en leche es sensible y específica, y resulta particularmente útil para analizar rebaños grandes.

#### 4.4.2. Prueba cutánea de la brucelosis

Una prueba inmunológica alternativa es la prueba cutánea de la brucelina (prueba basada en la respuesta inmune celular), que puede utilizarse para el cribado en rebaños no vacunados siempre que se utilice una preparación antigénica purificada (libre de LPS) y estandarizada.

La prueba cutánea de la brucelina tiene una especificidad muy alta, de modo que los animales sin vacunar que son serológicamente negativos y reaccionan positivamente en la prueba de la brucelina deben considerarse animales infectados.

La prueba cutánea de la brucelina también tiene una sensibilidad alta para el diagnóstico de la infección por *B. melitensis* en pequeños rumiantes y, en ausencia de vacunación, se considera una de las pruebas de diagnóstico más específicas.

#### 4.5. DIAGNOSTICO MOLECULAR

La **PCR**, incluido el formato en tiempo real, constituye otro medio de detección e identificación de *Brucella* spp. Pese al alto grado de homología del ADN dentro del género *Brucella*, se han desarrollado varios métodos moleculares que permiten, hasta cierto punto, la diferenciación entre especies de *Brucella* (incluidas las cepas vacunales) y algunas de sus biovariedades.

Actualmente se suelen utilizar una PCR multiplex (Bruce-ladder) para la identificación rápida y en un solo paso de *Brucella*. La principal ventaja de esta prueba respecto a otras PCR descritas, es que permite identificar y diferenciar en un solo paso la mayoría de especies de *Brucella*, así como las cepas vacunales *B. abortus* S19, *B. abortus* RB51 y *B. melitensis* Rev.1. Contrariamente a lo que ocurre con otras PCR, Bruce-ladder también permite detectar ADN de *B. neotomae*, *B. pinnipedialis* y *B. ceti*; además, mediante esta nueva PCR múltiple se pueden detectar las biovariedades 3, 5, 6 y 9 de *B. abortus* y las biovariedades 2, 3, 4, 5 de *B. suis*.

Se ha descrito una actualización del protocolo de PCR Bruce-ladder original. Esta nueva versión (Bruce-ladder v2.0), que se ha validado en varios laboratorios, también permite diferenciar entre *B. suis* y *B. canis*, así como diferenciar *B. microti*. Adicionalmente, se ha creado una nueva PCR multiplex (Suis-ladder) con la cual pueden identificarse con rapidez y exactitud cepas de *B. suis* a nivel de biovariedad (Lopez-Goñi et al., 2011).

Por otro lado, existen métodos que pueden añadir información epidemiológica útil. Uno de estos métodos es el **MLVA** (Multiple Locus Variable-number Tandem Repeat Analysis o, análisis de repeticiones en tándem de un número variable de múltiples locus), el cual se basa en la detección del número de veces que se repiten de forma adyacente estas secuencias dentro del genoma de *Brucella* spp. a través de la amplificación de las secuencias por la técnica molecular de PCR.

Dependiendo de los marcadores concretos escogidos, estos métodos permiten diferenciar las cepas a nivel de especie o incluso subclasificarlas pudiendo llegar a obtener información epidemiológica útil a nivel de subespecie.

Las repeticiones en tándem de número variable (VNTR), son clasificadas como microsatélites (unidades de repetición menores a 8 bp) y minisatélites (unidades de repetición mayores de 9 bp). El análisis de estas regiones en el material genético de la *Brucella* spp, se lleva a cabo en 16 locus. Se utilizaran por tanto 16 parejas de primers, 8 pertenecientes a microsatélites que son usados para identificación de especie, y otros 8 minisatélites con alto poder discriminatorio debido a su alta variabilidad.

MATERIAL NO OFICIAL

## BIBLIOGRAFIA

Capítulo referente a la brucelosis del Manual de las Pruebas de Diagnóstico y de las Vacunas para los Animales Terrestres de la OIE. Edición vigente en el manual on-line.

[fmd with viaa test incl. \(woah.org\)](http://www.woah.org)

Capítulo referente al Transporte del material biológico del Manual de las Pruebas de Diagnóstico y de las Vacunas para los Animales Terrestres de la OIE. Edición vigente en el manual on-line.

[fmd with viaa test incl. \(woah.org\)](http://www.woah.org)

Alton, G.G., JONES, L.M., ANGUS, R.D., VERGER, J.M. 1988. Techniques for the Brucellosis Laboratory. Institut National de la Recherche Agronomique. París.

Development of a Selective Culture Medium for Primary Isolation of the Main Brucella Species. M. J. De Miguel, C. M. Marín, P. M. Muñoz, L. Dieste, M. J. Grilló, and J. M. Blasco.

A novel isolation method of Brucella species and molecular tracking of Brucella suis biovar 2 in domestic and wild animals Carlos Abril, Andreas Thomann, Isabelle Brodard, Natacha Wu, Marie-Pierre Ryser-Degiorgis, Joachim Frey, Gudrun Overesch.

Development and evaluation of a selective medium for Brucella suis. Ferreira AC, Almendra C, Cardoso R, Pereira MS, Beja-Pereira A, Luikart G, Corrêa de Sá MI.

Brucelosis, una zoonosis frecuente. N.E. Álvarez-Hernández, M. Díaz-Flores, M. Ortiz-Reynoso

El Reglamento de Ejecución (UE) 2018/1882 de la Comisión, de 3 de diciembre de 2018, relativo a la aplicación de determinadas normas de prevención y control a categorías de enfermedades enumeradas en la lista y por el que se establece una lista de especies y grupos de especies que suponen un riesgo considerable para la propagación de dichas enfermedades de la lista.

El Reglamento Delegado (UE) 2020/689 de la Comisión, de 17 de diciembre de 2019, por el que se completa el Reglamento (UE) 2016/429 del Parlamento Europeo y del Consejo en lo referente a las normas de vigilancia, los programas de erradicación y el estatus de libre de enfermedad con respecto a determinadas enfermedades de la lista y enfermedades emergentes.

Diferentes documentos disponibles en la página web del Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación:

[https://www.mapa.gob.es/es/ganaderia/temas/sanidad-animal-higiene-ganadera/sanidad-animal/enfermedades/brucelosis-ovino-caprino/brucelosis\\_ovino\\_caprino.aspx](https://www.mapa.gob.es/es/ganaderia/temas/sanidad-animal-higiene-ganadera/sanidad-animal/enfermedades/brucelosis-ovino-caprino/brucelosis_ovino_caprino.aspx) y

[https://www.mapa.gob.es/es/ganaderia/temas/sanidad-animal-higiene-ganadera/sanidad-animal/enfermedades/brucelosis-ovino-caprino/brucelosis\\_ovino\\_caprino.aspx](https://www.mapa.gob.es/es/ganaderia/temas/sanidad-animal-higiene-ganadera/sanidad-animal/enfermedades/brucelosis-ovino-caprino/brucelosis_ovino_caprino.aspx)

**MATERIAL PARA LA PREPARACIÓN DEL TEMA 49**

**TUBERCULOSIS. MARCO LEGAL. PROGRAMA NACIONAL DE  
ERRADICACIÓN. DIAGNÓSTICO DE LABORATORIO.**

*Este material no tiene carácter oficial, por lo que en ningún caso vinculará al Tribunal Calificador. Constituye, únicamente, un instrumento complementario que servirá de apoyo al opositor para enfocar cada uno de los epígrafes, pero nunca de forma exclusiva ni excluyente. El Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación no se hace responsable del contenido del mismo.*

*Los materiales no serán objeto de actualización constante.*

## **ÍNDICE**

### **1. TUBERCULOSIS**

- 1.1. ETIOLOGÍA
- 1.2. CLÍNICA Y PATOGENIA
- 1.3. EPIDEMIOLOGÍA
  - 1.3.1. Distribución
  - 1.3.2. Transmisión
- 1.4. PROFILAXIS

### **2. MARCO NORMATIVO**

- 2.1. NORMAS INTERNACIONALES
- 2.2. NORMAS COMUNITARIAS (UE)
- 2.3. NORMAS NACIONALES

### **3. PROGRAMA NACIONAL DE ERRADICACIÓN**

### **4. DIAGNÓSTICO DE LABORATORIO**

- 4.1. DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL
  - 4.3.1 Interferencias en el diagnóstico antemortem
  - 4.3.2 Interferencias en el diagnóstico postmortem
- 4.2. REQUISITOS PARA ENVÍO DE MUESTRAS AL LABORATORIO
- 4.3. PRUEBAS EN EL ANIMAL VIVO
  - 4.3.1 Prueba de Intradermorreacción
  - 4.3.2 Prueba de interferón gamma
  - 4.3.3 Enzimoimmunoanálisis
- 4.4. PRUEBAS POST MORTEM
  - 4.4.1 Diagnóstico anatomopatológico
  - 4.4.2 Aislamiento bacteriológico
  - 4.4.3 Detección de ácido nucleico (ADN)

## 1. TUBERCULOSIS.

La enfermedad conocida como Tuberculosis (TB), y antiguamente como tisis, ha acompañado al ser humano y a los bovinos a través de siglos de historia, existiendo desde mucho antes que la antigua civilización egipcia, habiendo sido documentada en el Papiro de Ebers. Remontando hacia atrás, se ha hallado ADN de la bacteria en fósiles procedentes de animales de hace 17.000 años.

Con la revolución industrial en el S.XVIII se produce el éxodo del campo con el consiguiente hacinamiento en las ciudades. Esto, unido a la limitación de acceso a la medicina, hace aumentar los casos de TB en la sociedad del momento, preparando el caldo de cultivo perfecto para la globalización de la enfermedad.

El mayor hito de la microbiología médica fue el aislamiento del agente causal por Robert Koch el 24 de marzo de 1882 (día mundial de la TB). Desde entonces, los avances en el conocimiento de la enfermedad no paran de aumentar pues ha sido objeto de estudio por numerosos grupos de investigación de todo el mundo.

### 1.1. ETIOLOGÍA

La tuberculosis es la infección por cualquiera de las especies de micobacterias del *complejo Mycobacterium tuberculosis* (CMTB), en el cual se engloba:

- *Mycobacterium tuberculosis*
- *Mycobacterium bovis*
- *Mycobacterium caprae*
- *Mycobacterium africanum*
- *Mycobacterium microtti*
- *Mycobacterium pinnipedii*
- *Mycobacterium canetti*

Las micobacterias son bacilos aerobios, inmóviles y con un tamaño de 0,2 a 0,6 × 1 a 10 µm. Tienen ácido-alcohol resistencia, no producen endosporas ni cápsulas y suelen considerarse grampositivas, aunque no encajan en esta categoría al no retener el cristal violeta de la tinción. Las micobacterias poseen una pared celular característica, más gruesa que en otros géneros y rica en ácidos micólicos. Esta naturaleza lipídica de la pared se traduce en una superficie hidrófoba que confiere a las micobacterias resistencia frente a muchos desinfectantes y tinciones de laboratorio.

A nivel molecular, las especies del MTBC poseen un genoma compuesto por 4,4 millones de pares de bases, aprox., con una gran homología entre especies y cepas. A pesar de ello, existen elementos genéticos, surgidos a través de la evolución y adaptación de estos patógenos a sus distintos hospedadores y ambientes que permiten la diferenciación de

genotipos. Estos elementos genéticos consisten en variación en el número de secuencias repetitivas, polimorfismos de único nucleótido (SNP's), pérdida de regiones de diferenciación, presencia de secuencias específicas, etc.

## 1.2. CLÍNICA Y PATOGENIA

La TB suele cursar como enfermedad crónica debilitante. La tuberculosis bovina en ocasiones puede presentar un curso más progresivo. La infección suele ser subclínica y, en todo caso, los signos clínicos que aparecen no pueden diferenciarse específicamente de otras patologías. Pueden consistir en debilidad, anorexia, emaciación, disnea, aumento de tamaño de los ganglios linfáticos y tos, en concreto en los casos de tuberculosis avanzada. Se puede observar un descenso productivo de los animales.

Esta enfermedad se caracteriza por la formación de granulomas nodulares denominados tubérculos. Puede resultar afectado cualquier tejido del organismo, pero las lesiones que se observan con mayor frecuencia se presentan en los ganglios linfáticos (en concreto en la cabeza y el tórax), los pulmones, el intestino, el hígado, el bazo, la pleura y el peritoneo.

Dentro de la patogenia de la tuberculosis, hay que distinguir si se trata de una primoinfección, en la que la micobacteria toma contacto por primera vez con un organismo, o bien de un fenómeno postprimario, en la cual ha existido un contacto previo y por tanto el animal presenta inmunidad.

En el **proceso primario**, la penetración se realiza de forma prioritaria por vía aérea, vehiculada por micropartículas o aerosoles. La vía oral también puede darse. Las micobacterias son fagocitadas por los macrófagos que se encuentran en la superficie de las mucosas respiratorias o digestivas, siendo incapaces de lisarlas en la mayoría de las ocasiones. En la zona de penetración de las micobacterias se producirá una lesión consistente en una zona de necrosis, que alberga bacilos vivos y muertos, rodeada de una capa de macrófagos. A partir de esta localización primaria, las micobacterias son drenadas hasta los ganglios linfáticos regionales donde desarrollarán lesiones análogas, quedando de esta forma constituido el complejo primario de Ranke. Posteriormente, se desarrollará un fenómeno de inmunidad mediada por células que desencadenará importantes transformaciones tanto morfológicas como funcionales en los macrófagos.

Si se detiene la evolución del complejo primario, éste se encapsula, y los focos caseificados se calcifican por la precipitación de sales cálcicas, quedando la infección en estado latente. Sin embargo, si las defensas inmunitarias del animal son insuficientes, la infección se puede extender a partir del foco primario, vía linfohematógena, en lo que se conoce como generalización precoz. Esto puede desembocar en una tuberculosis miliar, en la que se presentan pequeños granulomas del mismo tamaño (tuberculosis perlada) en uno o varios órganos, principalmente en pulmones, riñón, hígado y bazo. También puede producirse una difusión intracanalicular cuando penetra en los bronquios, en el intestino, en las vías biliares, etc.

En el **proceso postprimario**, el animal que ya posee inmunidad, adquirida durante la primera infección, responde a un nuevo contagio de forma diferente. El nuevo contagio puede deberse a bacterias que penetran desde el exterior o a focos primarios hasta entonces inactivos. En este proceso, sólo hay difusión intracanalicular (no linfohematógena), por lo que se puede originar tuberculosis crónica en un órgano concreto (sin caseificación) y sin que aparezcan lesiones tuberculosas en los nódulos linfáticos.

### 1.3. EPIDEMIOLOGÍA

#### 1.3.1. Distribución

La TB animal es un problema global que no se puede circunscribir a un entorno geográfico concreto ya se encuentra presente a nivel mundial. La prevalencia más elevada se registra en buena parte del territorio de África y ciertas áreas de Asia y América, siendo la información sobre la distribución en estas zonas muy limitada debido a la ausencia de programas de vigilancia y control.

En los países económicamente más desarrollados se describen valores de prevalencia en general bajos. Sin embargo, se observa una persistencia de la enfermedad en algunas especies silvestres que está complicando en gran medida los objetivos de erradicación. Este es el caso del tejón en el Reino Unido, el ciervo de cola blanca en algunas áreas de EEUU, el jabalí en algunos países de Europa o la zarigüeya en Nueva Zelanda.

En la UE, la situación es heterogénea, con 17 Estados Miembros en estatus de “Oficialmente Libres” de TB bovina. Además, algunos estados de la unión presentan algún territorio declarado como oficialmente libre (EU One Health Zoonoses Report, 2018).

En España, en el año 2015, la situación empeoró considerablemente, pasando la prevalencia de un 1,72% de rebaños positivos en 2014 a un 2,81% en 2015. Esto dio lugar a modificaciones en la implementación del programa nacional que han logrado revertir la situación. Los últimos datos extraídos del Informe Final Técnico-Financiero sobre el Programa Nacional de la Tuberculosis Bovina, cifran la prevalencia de los rebaños en 1,61% en 2020. Por el momento, la Comisión Europea ha declarado oficialmente libres de TB bovina a Galicia, Asturias, País Vasco y Canarias.

#### 1.3.2. Transmisión

Se sabe que diversos taxones de mamíferos son susceptibles a la infección. La infección en el ser humano se da con mayor frecuencia por *M.tuberculosis*. Además, el ser humano puede verse afectado por *M. bovis* ya que se considera un microorganismo zoonótico. De ahí que la incidencia de tuberculosis pulmonar causada por *M. bovis* sea mayor en trabajadores de explotaciones ganaderas y de mataderos que en habitantes urbanos. El riesgo de transmisión de *M. bovis* al ser humano a través de la leche y sus productos se elimina mediante el proceso de la pasteurización.

En el mundo animal son numerosas y muy diferentes las especies de animales, tanto domésticos como silvestres que son sensibles al CMTB. Según la OIE, se han aislado cepas de

búfalos, bisontes, ovejas, cabras, equinos, camellos, cerdos, cerdos salvajes, ciervos, antílopes, perros, gatos, zorros, visones, tejones, hurones, ratas, primates, camélidos de Sudamérica, kudus, elandos, tapires, alces, elefantes, sitatungas, orixes, adaxes, rinocerontes, opósomes, ardillas de tierra, nutrias, focas, liebres, topos, mapaches y varios felinos depredadores, como leones, tigres, leopardos y lince. Esta gran variabilidad en los reservorios de la bacteria es uno de los factores más importantes que dificultan la erradicación de la enfermedad en los diferentes territorios.

La exposición a aerosoles contaminados se considera la vía más frecuente de infección del ganado bovino, pero la infección por ingesta de material contaminado también es posible. Durante mucho tiempo se pensó que la transmisión de micobacterias del MTBC se producía exclusivamente por vía aerógena y de forma directa, pero recientemente se ha observado que la vía digestiva también juega un papel importante en su transmisión, sobre todo indirecta, por la capacidad de permanencia de la micobacteria viable en pastos, alimentos, agua o barro, entre otros. Este es el mecanismo más probable para la transmisión bidireccional de la infección entre el ganado doméstico y la fauna silvestre. La transmisión oral directa es menos importante, quedando limitada casi exclusivamente a terneros lactantes que ingieren leche contaminada de sus madres.

#### 1.4. PROFILAXIS

Las nuevas vías enfocadas en el control de la TB recaen en los sistemas de gestión de la ganadería y de la fauna silvestre con el objeto de fortalecer la bioseguridad y disminuir los contactos directos e indirectos entre especies, reduciendo así la transmisión interespecífica del MTBC. La bioseguridad se puede definir como un conjunto de medidas físicas y de manejo diseñadas para reducir el riesgo de introducción, establecimiento y propagación de enfermedades en la población animal y es, por lo tanto, una parte fundamental de los programas de prevención y control de enfermedades. Las posibles actuaciones para la mejora de la bioseguridad afectan a la gestión de la fauna; a la gestión del agua, del alimento y de la suplementación mineral; a la gestión del pastoreo y del rebaño; a actuaciones sobre otras especies domésticas; así como a la gestión de residuos.

Otra medida preventiva es el control sanitario en especies cinegéticas, que debe atender al control en los traslados, la gestión de los residuos de caza, el control poblacional, la regulación del manejo del agua o del alimento, etc.

Actualmente, se prohíbe la vacunación a nivel europeo en ganado bovino, principalmente porque cuando se utiliza BCG la vacunación interfiere con las pruebas de diagnóstico oficiales y porque no existen a día de hoy técnicas de diagnóstico que permitan diferenciar los animales vacunados de los infectados (técnicas DIVA). Sin embargo, no se descarta que, en un futuro, la vacunación de animales domésticos y silvestres sea una herramienta dentro del sistema integrado de medidas de control frente a la TB.

No hay que olvidar que la TB es una enfermedad compleja, que no se resolverá con el empleo de una única medida de control sobre una única especie.

## 2. MARCO LEGAL

La legislación aplicable es compleja y abarca diferentes niveles administrativos: internacional, europeo nacional y autonómico.

### 2.1. NORMAS INTERNACIONALES

A nivel internacional, las normas se recogen en el Capítulo 8.11. “Infección por el complejo *Mycobacterium tuberculosis*” del Código Sanitario para los Animales Terrestres de la OIE.

A efectos del Código Terrestre, el MTBC comprende *M. bovis*, *M. caprae* y *M. tuberculosis*, pero excluye las cepas vacunales. El capítulo define el mecanismo por el cual un país o una zona se pueden considerar libres de infección por miembros del MTBC en bovinos y cérvidos, así como la forma de obtención del estatus en los rebaños.

Este Código también incluye el mecanismo de mantenimiento del estatus alcanzado tanto a nivel de país y/o territorio como a nivel de rebaño, así como las recomendaciones para las importaciones de bovinos, cérvidos y cabras, material genético, leche y productos lácteos de bovinos.

### 2.2. NORMAS COMUNITARIAS (UE)

Durante muchos años, el marco reglamentario básico ha sido la Directiva 64/432/CEE, de 26 de junio de 1964, y sus modificaciones, relativa a problemas de policía sanitaria en materia de intercambios intracomunitarios de animales de la especie bovina y porcina, que establecía las pautas generales de actuación en los intercambios intracomunitarios de los animales de reproducción, producción o abasto de las especies bovina y porcina.

Con la entrada en vigor del Reglamento (UE) 2016/429, conocido como “Ley de sanidad animal europea”, ha quedado derogada gran parte de la normativa en materia de sanidad animal, entre la que se encuentra la Directiva anterior y todas sus modificaciones.

En este nuevo marco jurídico la TB animal se ha categorizado como una enfermedad de “categoría B” (Reglamento de Ejecución (UE) 2018/1882 de la Comisión). Esto implica que debe controlarse en todos los Estados Miembros con el objetivo de erradicarla en toda la Unión. Es importante destacar que la clasificación de la TB en la categoría B incluye la infección causada por miembros del MTBC (*M. bovis*, *M. caprae* y *M. tuberculosis*) en *Bison spp.*, *Bos spp.* y *Bubalus spp.*

Además, el Reglamento de Ejecución (UE) 2018/1882, categoriza como de tipo “D” la infección causada por el complejo en los artiodáctilos distintos de *Bison spp.*, *Bos spp.* y *Bubalus spp.*, además de en éstos. Esto implica la adopción de medidas para evitar su propagación en relación con su introducción en la Unión o con desplazamientos entre Estados miembros.

Por último, el Reglamento de Ejecución (UE) 2018/1882, categoriza como de tipo “E” la infección causada por el complejo en todos los mamíferos terrestres, por lo que la UE deberá establecer medidas de vigilancia.

Infección por el complejo <i>Mycobacterium tuberculosis</i> ( <i>M. bovis</i> , <i>M. caprae</i> y <i>M. tuberculosis</i> )	B+D+E	<i>Bison ssp.</i> , <i>Bos ssp.</i> y <i>Bubalus ssp.</i>
	D+E	<i>Artiodactyla</i> distintos de <i>Bison ssp.</i> , <i>Bos ssp.</i> y <i>Bubalus ssp.</i>
	E	Mamíferos (terrestres)

Por otro lado, los nuevos Reglamentos Delegados que desarrollan los aspectos concretos para el diagnóstico, la obtención del estatus sanitario de oficialmente libre (tanto de países y/o regiones como de rebaños), las posibilidades de diagnóstico etc., son el Reglamento Delegado (UE) 2020/689 de la Comisión, de 17 de diciembre de 2019, por el que se completa el Reglamento (UE) 2016/429 del Parlamento Europeo y del Consejo en lo referente a las normas de vigilancia, los programas de erradicación y el estatus de libre de enfermedad con respecto a determinadas enfermedades de la lista y enfermedades emergentes y el Reglamento Delegado (UE) 2020/688 de la Comisión, de 17 de diciembre de 2019, por el que se completa el Reglamento (UE) 2016/429 del Parlamento Europeo y del Consejo en lo referente a los requisitos zoonosarios para los desplazamientos dentro de la Unión de animales terrestres y de huevos para incubar.

Asimismo, es aplicable a nivel UE el denominado “paquete de higiene”, compuesto por los Reglamentos (CE) 852/2004, 853/2004 y 882/2004, y sus modificaciones, relativos a, respectivamente, la higiene de los productos alimenticios; la higiene de los alimentos de origen animal; y los controles oficiales para garantizar la verificación del cumplimiento de la legislación en materia de piensos y alimentos y la normativa sobre salud animal y bienestar de los animales.

### 2.3. NORMAS NACIONALES

A escala nacional, en el año 2003 se publicó la Ley 8/2003, de 24 de abril de sanidad animal en la que se desarrollan legalmente en España todos los mecanismos para vigilar y controlar las enfermedades de los animales, y para garantizar la salud pública y la seguridad alimentaria.

El Real Decreto 2611/1996, de 20 de diciembre, y sus modificaciones, por el que se regulan los Programas nacionales de erradicación de enfermedades de los animales, tiene por objeto establecer las normas para la elaboración, planificación, coordinación, seguimiento y evaluación de los programas nacionales de erradicación de enfermedades de los animales que serán de obligado cumplimiento en todo el territorio del Estado.

El Real Decreto 1440/2001, de 21 de diciembre, por el que se establece el sistema de alerta sanitaria veterinaria, crea el Comité Nacional del Sistema de Alerta Sanitaria Veterinaria, con la participación de todas las Comunidades Autónomas, siendo sus funciones estudiar las medidas para la erradicación y control de las enfermedades objeto de los programas nacionales de erradicación.

Además, también existe una normativa estatal que recoge el baremo de indemnización aplicable en cada caso cuando se ordena el sacrificio obligatorio de los animales considerados positivos (Real Decreto 389/2011, de 18 de marzo, por el que se establecen los baremos de indemnización de animales en el marco de los programas nacionales de lucha, control o erradicación de algunas enfermedades entre las que se encuentra la TB bovina).

Finalmente, es importante mencionar que en España existe una normativa específica para regular determinados aspectos en ganaderías de lidia (Real Decreto 186/2011, de 18 de febrero, por el que se regula la calificación sanitaria de las ganaderías y explotaciones de reses de lidia y el movimiento de los animales pertenecientes a las mismas).

En lo que respecta a la notificación, la tuberculosis es una enfermedad de declaración obligatoria en España, según el Real Decreto 526/2014, por el que se establece la lista de las enfermedades de los animales de declaración obligatoria y se regula su notificación.

### **3. PROGRAMA NACIONAL DE ERRADICACIÓN**

El Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación ha publicado el Programa Nacional de Erradicación de la Tuberculosis Bovina 2022. Este programa de erradicación es de aplicación en todo el territorio nacional, excepto las Ciudades Autónomas de Ceuta y Melilla y en las CCAA o provincias declaradas como oficialmente libres de la infección por CMT, en las cuales se aplicará un programa de vigilancia y actuaciones para el mantenimiento de dicho estatuto.

Este programa es de aplicación en todos los establecimientos que mantengan animales de la especie bovina (incluidos bisontes y búfalos), con algunas excepciones, siendo objetivo el que en el año 2030 al menos el 99,8% de todos los establecimientos del país hayan obtenido el estatuto T3.

El programa también se desarrolla para todos los establecimientos de ganado caprino que conviven o mantienen una relación epidemiológica con rebaños de bovino, pudiendo las autoridades competentes de las comunidades autónomas incluir todos los establecimientos de ganado caprino de su ámbito territorial, como población objetivo adicional, si afectan al estatuto sanitario de la población objetivo de bovinos.

No se incluyen en el programa los establecimientos que contengan animales cuyo único fin sea la mera exhibición o participación en actos culturales o deportivos, como los núcleos zoológicos que tengan dichos fines y los circos. Estos establecimientos tendrán los programas de vigilancia activa y/o pasiva y de control que determine la autoridad competente en aplicación del Reglamento Delegado (UE) 2020/689.

Las actuaciones en animales domésticos se complementan con un programa de vigilancia y control en fauna silvestre a través del Plan de Actuación sobre Tuberculosis en Especies Silvestres (PATUBES), que fue publicado en 2017, y que comprende propuestas de medidas concretas a aplicar en función de la clasificación de las distintas regiones de acuerdo a su situación epidemiológica de riesgo (retirada de subproductos de la caza, limitación de

densidades por distintos métodos, asesoramiento en materia de bioseguridad en establecimientos ganaderos, formación...). La normativa desarrollada para su aplicación se centra en la gestión de los subproductos no destinados a consumo humano en actividades cinegéticas y en actuaciones sanitarias en especies cinegéticas que actúan como reservorio del CMT.

Este programa de erradicación es un programa plurianual iniciado en 2021 y que finaliza en 2030, en el cual se ha marcado como objetivo final la erradicación de la enfermedad a través de unos objetivos intermedios con los que se pretende alcanzar una reducción anual desde 2022 hasta 2030 de la prevalencia de rebaño de al menos el 20% y de la incidencia de rebaño de al menos el 20% respecto a las obtenidas dos años antes.

Entre las medidas que incluye el programa se encuentran:

Realización de pruebas diagnósticas: como técnica de rutina para la obtención y mantenimiento de la calificación se utiliza la intradermotuberculinización (IDTB) simple y excepcionalmente, a criterio de la autoridad competente, la IDTB comparada. La metodología de realización y lectura, aparentemente sencilla, requiere de personal entrenado y con experiencia, razón por la cual actualmente se contemplan cursos de formación de asistencia obligatoria para los profesionales involucrados en las campañas de saneamiento. Se podrá utilizar, siempre a criterio de la autoridad competente, la prueba de gamma-interferón como prueba de rutina en los animales que por su edad puedan ser sometidos a esta prueba. En el resto de animales se realizará la prueba de IDTB que corresponda. Las frecuencias de las pruebas de mantenimiento se establecen según la prevalencia de las distintas zonas.

Sacrificio obligatorio de los animales positivos y de los considerados como tales por la autoridad competente. En función de la prevalencia de la comunidad autónoma u otras razones de índole sanitaria se podrá o deberá ampliar el sacrificio mediante la realización del vaciado sanitario del establecimiento.

Medidas profilácticas sobre los establecimientos donde se han detectado bovinos reaccionantes positivos, implicando tanto a las instalaciones como a los pastos y un control exhaustivo de los movimientos y reposición de estos establecimientos, así como la intensificación de las pruebas diagnósticas para elevar con la mayor brevedad posible su calificación sanitaria.

Cheques previos a los movimientos de animales, con algunas excepciones, con el objetivo de proteger a los rebaños libres de enfermedad.

Medidas de control sobre posibles reservorios silvestres de acuerdo con el Plan de Actuación sobre Tuberculosis en Especies Silvestres PATUBES y con su normativa de implementación desarrollada.

Formación de los nuevos veterinarios que comiencen a realizar las pruebas de diagnóstico y cursos de actualización para los veterinarios que realizaron el curso de validación hace más de 3 o 5 años, según corresponda.

Plan Reforzado de Control Oficial sobre los Veterinarios de Campo.

Protocolo de actuación del componente de vigilancia en mataderos de la tuberculosis bovina.

#### **4. DIAGNÓSTICO DE LABORATORIO**

##### **4.1. DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL**

Hay que tener en cuenta que la TB en animales cursa como una enfermedad crónica en la que la mayoría de los casos lo hace de manera subclínica, sin una sintomatología aparente.

Es por esto que resulta más interesante abordar el diagnóstico diferencial, no desde un punto de vista clínico, sino desde las reacciones cruzadas que pueden surgir durante el diagnóstico de la enfermedad en el animal vivo o en la distinción de lesiones morfológicas asociadas a TB de otras lesiones similares que se pueden encontrar en el animal muerto.

##### **4.1.1. Interferencias en el diagnóstico antemortem**

La similitud antigénica entre los agentes etiológicos de la TB y la paratuberculosis (PTB) puede originar respuestas inmunes en el animal que afecten al resultado de las pruebas de diagnósticas (IDTB y IFN- $\gamma$ ), limitando el diagnóstico certero de una o ambas enfermedades a nivel individual y de rebaño. La interferencia diagnóstica entre TB y PTB no afecta únicamente al diagnóstico de TB, sino que también puede afectar al resultado en las pruebas para la detección de PTB. En el caso de rebaños en los que se confirma la ausencia de TB, la frecuencia de aparición de estas reacciones inespecíficas debidas a la PTB puede limitarse en gran medida mediante el uso de la prueba de IDTB comparada, en la que se comparan las reacciones inmunes generadas localmente tras la inoculación de PPD bovina y PPD aviar en el animal y que puede, por tanto, identificar animales con una gran respuesta a micobacterias del MAC.

Del mismo modo y debido a su similitud antigénica, la infección (o exposición) a otras especies bacterianas del género *Mycobacterium* puede dar lugar a un fenómeno similar. Este género engloba un gran número de especies existiendo muchas otras especies saprofitas (que pueden sobrevivir en el medio ambiente nutriéndose de materia orgánica muerta sin infectar otros organismos) o patógenos oportunistas (que normalmente son considerados no patógenos y solo dan lugar a infecciones cuando un hospedador está inmunodeprimido y/o concurren otras circunstancias favorecedoras).

Esta interferencia diagnóstica se da por el hecho de que algunas de las proteínas existentes en la PPD bovina se encuentran también presentes en estas otras micobacterias.

Otra alternativa para aumentar la especificidad en rebaños libres de TB desarrollada más recientemente es el uso de antígenos más específicos (ausentes en micobacterias no asociadas a TB), como el ESAT-6 y CFP-10, y cuyo uso se ha explorado más en el caso de la prueba de IFN- $\gamma$ , si bien, puede ir asociado a un cierto descenso en la sensibilidad.

#### **4.1.2. Interferencias en el diagnóstico postmortem**

Existen otros agentes infecciosos que producen lesiones también de tipo granulomatoso, que pueden tener un aspecto macroscópico compatible con TB, o incluso lesiones de otra naturaleza (como por ejemplo algunas neoplasias pulmonares), que se podrían confundir con algunas formas de TB. Los agentes infecciosos más comunes confundibles con TB son hongos y algunas bacterias que provocan lesiones piogranulomatosas, como *Rhodococcus*, *Nocardia*, *Corynebacterium pseudotuberculosis*, etc. Es por ello necesario realizar un análisis laboratorial de todas aquellas lesiones que morfológicamente pueden ser compatibles con un granuloma tuberculoso. Este análisis debe incluir un estudio histopatológico y, en paralelo, microbiológico para la identificación de la causa de la lesión (aislamiento microbiológico, y cultivo específico de micobacterias). Ello se puede complementar con estudios de biología molecular, es decir, identificar mediante PCR la presencia de material genético de la micobacterias. De ser positivo, este resultado fiable se obtiene mucho más rápidamente que el del cultivo de micobacterias, que requiere bastante más tiempo.

#### **4.2. REQUISITOS PARA LA TOMA Y ENVÍO DE MUESTRAS AL LABORATORIO**

Las **muestras de tejidos recogidas para aislamiento microbiológico o PCR directa de tejidos** 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. 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.

Las **muestras de tejidos recogidas para estudios histopatológicos** deberán fijarse en la solución fijadora lo antes posible para frenar los procesos de autólisis y putrefacción. El proceso de fijado permite enviar las muestras al laboratorio a temperatura ambiente, liberándolas de su potencial infeccioso. Esto es complicado de llevar a cabo en el momento de la recogida de muestras en matadero, ya que no se recomienda la manipulación de las mismas con el fin de evitar contaminaciones que puedan interferir en el estudio microbiológico, por lo que, a menudo, la fijación de los tejidos se realizará a la llegada al laboratorio.

Las **muestras de sangre para realización de IFN- $\gamma$**  deben recogerse en tubos con heparina de litio. Entre la extracción de sangre y el procesamiento no deben transcurrir más de 8 horas. Para el estudio normal se debe recoger un volumen mínimo de 5 ml de sangre, por lo que es recomendable realizar la extracción en sangre en tubos de 10 ml. Es necesario mezclar la sangre suavemente por inversión del tubo varias veces para disolver la heparina. La utilización de un anticoagulante distinto a la heparina o la refrigeración de las muestras reducen drásticamente la viabilidad de los linfocitos y pueden ser criterios para el rechazo de la muestra.

En cualquier caso, al transportar materiales biológicos, el remitente debe determinar si el material debe clasificarse como mercancía peligrosa o no. En el caso de transporte de muestras clínicas sospechosas de contener micobacterias viables pertenecientes al CMTB, deberían clasificarse como Sustancia biológica perteneciente a la categoría B (UN3373) y seguir la instrucción de embalaje P650, de acuerdo con la Reglamentación sobre Materiales Peligrosos (DGR) de la Asociación Internacional de Transporte Aéreo (IATA). No obstante, para aquellas muestras para las cuales existe una probabilidad muy baja de que contengan agentes patógenos se pueden transportar clasificadas como muestras exentas. Para ello, se requiere una opinión profesional sólida para determinar si un espécimen puede ser eximido bajo esta definición. En este caso, no estarían sujetas a la normativa relativa a las mercancías peligrosas y la muestra se transporta en un sistema de embalaje triple que evite toda posible fuga y que esté identificado con la frase “muestras de origen animal exentas”, según corresponda. En el caso de que el material transportado sean cultivos (excluida la cepa vacunal BCG), el transporte debería realizarse como Sustancia infecciosa que afecta al ser humano perteneciente a la categoría A (UN2814) y seguir la instrucción de embalaje P620.

### 4.3. PRUEBAS EN EL ANIMAL VIVO

#### 4.3.1 Prueba de Intradermorreacción

La prueba de intradermorreacción, prueba de intradermotuberculinización (IDTB) o prueba de la tuberculina es la técnica oficial por antonomasia empleada para el diagnóstico de la TB bovina empleándose también en otras especies de rumiantes domésticos como el ganado ovino y caprino, e incluso en fauna silvestre.

Actualmente se aplican dos variantes de la técnica, la IDTB simple (IDTBs) y la comparada o de comparación (IDTBc). Ambas se basan en la producción local de una reacción de hipersensibilidad retardada o de tipo IV (delayed type hypersensitivity, DTH) en los animales infectados frente a un antígeno específico. En el caso de la IDTB, si el animal que recibe la estimulación antigénica estaba infectado previamente, se produce una reacción inflamatoria local. En función de la rapidez en la respuesta y el número de células extravasadas se puede observar edema, exudado, necrosis (escara), dolor, enfisema subcutáneo, y hasta linfadenopatía regional.

El antígeno que se emplea para la realización de la IDTB es un derivado proteico purificado (Protein Purified Derivative, PPD) obtenido a partir del cultivo de *M. bovis*, en el caso de la PPD bovina, y de de la cepa D4ER de *M. avium* subsp. *avium*, en el caso de la PPD aviar.

La IDTBs consiste en la inoculación intradérmica en el tercio anterior del cuello del animal de **PPD bovina** (0,1 ml). Previamente a la inoculación se ha de realizar un rasurado de unos 5 cm<sup>2</sup>, evitando realizar rasurados demasiado extensos para que el punto de inoculación sea localizado correctamente, evitando errores de medición el día de la lectura. Es preciso comprobar que la piel esté limpia e íntegra en el lugar donde se va a realizar la inoculación. Antes de inocular la PPD, se debe realizar una medición (en mm) del pliegue cutáneo empleando un cutímetro homologado. De igual modo, el pliegue se mide 72 h (± 4 h)

después por el mismo veterinario y con el mismo cutímetro, para minimizar una posible variabilidad debida al criterio del veterinario o al aparato de medición.

A pesar de ciertas limitaciones, es una prueba que posee, en general, una sensibilidad elevada a nivel de rebaño, aunque algo más limitada a nivel individual. En cuanto a su especificidad, también es elevada, aunque puede verse mermada en determinadas situaciones epidemiológicas, principalmente en infecciones por otras micobacterias.

La otra variante de la prueba es la IDTB<sub>C</sub>, en la que se inocula **PPD aviar** además de la **PPD bovina**. La PPD aviar se inocula en el mismo lado del cuello que la PPD bovina (con una separación mínima de 15 cm para evitar posibles interferencias en la interpretación de la prueba) o en el opuesto. Esta prueba posee una mayor especificidad en detrimento de la sensibilidad y, por ello, se recomienda su uso en situaciones de ausencia de TB, para reducir los falsos reactores positivos resultantes de una exposición a otras micobacterias no tuberculosas, siendo las más comunes las incluidas en el complejo *M. avium* (MAC), como *M. avium* subsp. *paratuberculosis*, causante de la enfermedad de Johne o Paratuberculosis.

La potencia de las tuberculinas debe estimarse mediante métodos biológicos, en base a la comparación con tuberculinas estándar, y la potencia se expresa en Unidades Internacionales (UI). Las PPDs que se emplean en las campañas de erradicación de la TB bovina están contrastadas por los laboratorios nacionales de referencia (en España el Laboratorio Nacional de Referencia de Santa Fe, Granada).

#### 4.3.2 Prueba de gamma-interferón (IFN- $\gamma$ )

Esta prueba es un ensayo ex vivo e in vitro que consta de dos fases:

(1) toma de muestra de sangre completa heparinizada que se envía de forma inmediata al laboratorio para su estimulación con antígenos de las micobacterias (en la prueba oficial del programa de erradicación de TB bovina serán PPD bovina y aviar) y posterior incubación a 37°C durante 18-24 h.

(2) detección y cuantificación de IFN- $\gamma$  liberado en el plasma sobrenadante a través de una técnica inmunoenzimática ELISA (ELISA de captura comercial).

De este modo, si un animal está infectado por TB y ha activado la respuesta inmunitaria frente a la infección, habrá células del sistema inmune (células T) circulando en sangre periférica capaces de reconocer de forma específica a los antígenos de las micobacterias causantes de TB. Así, cuando en el laboratorio se añaden antígenos de las micobacterias (por ejemplo PPD bovina), las células presentadoras de antígeno que también están presentes en la sangre (por ejemplo, macrófagos o células dendríticas) presentarán estos antígenos a las células T y éstas, como ya están activadas frente al patógeno, reconocerán los antígenos y como respuesta producirán una cantidad significativa de IFN- $\gamma$  en un breve periodo de tiempo (16-24h), que podrá ser detectada y cuantificada por ELISA y comparada con los niveles de IFN- $\gamma$  basales (sangre sin estimular) o de sangre estimulada con PPD aviar.

Actualmente, existen dos kits ELISA para detección y cuantificación de IFN- $\gamma$ : el kit Bovigam<sup>®</sup> (Thermofisher Scientific) y el kit ID Screen<sup>®</sup> Ruminant IFN-g (IDvet). En ambos casos, se han desarrollado y evaluado principalmente teniendo en cuenta el uso de tuberculinas (PPD bovina y PPD aviar) como reactivos de estimulación de la sangre total de los animales. Ambos kits, aunque desarrollados para su uso en programas de erradicación de TB bovina, permiten también el diagnóstico de TB en otros bovinos (como búfalos o bisontes), así como en caprinos y ovinos, debido a que la alta homología entre las secuencias aminoacídicas del IFN- $\gamma$  entre estas especies posibilita que los anticuerpos de los kits los reconozcan.

En relación a la fauna silvestre, los requisitos del método (toma de muestras de sangre y cultivo ex vivo inmediato de la misma) no los hacen especialmente indicados para fines diagnósticos, más allá de estudios concretos de inmunidad en condiciones controladas, o para animales de centros zoológicos con más posibilidades de manejo.

Actualmente, se conocen diversos factores que afectan al rendimiento de esta prueba para el diagnóstico de la TB bovina y, por tanto, que condicionan su uso. Se describen a continuación algunos de los más importantes:

- Realización de la última IDTB: una IDTB reciente puede modificar sustancialmente la especificidad de la prueba. De acuerdo con el protocolo vigente en España, el test de detección de IFN- $\gamma$  debe realizarse en muestras procedentes de animales en los que no se haya aplicado la IDTB en un periodo mínimo de 60 días, asegurando así la ausencia de dicho efecto.
- Anticoagulante utilizado: necesario el empleo de tubos con heparina de litio, ya que el uso de otro anticoagulante puede interferir en la prueba.
- Tiempo que transcurre desde que se recoge la sangre en la explotación hasta que se realiza la estimulación de la misma en el laboratorio: actualmente en España se recomienda que la estimulación de la sangre se realice en las 8 primeras horas tras su recogida.

Cualquier daño y/o alteración en el proceso puede disminuir sustancialmente la población de linfocitos y, por tanto, alterar la producción de IFN- $\gamma$ . Por esta razón, se recomienda el transporte de la sangre a temperatura ambiente (18-22 °C), nunca refrigerada o congelada.

Respecto al ELISA empleado en la segunda fase de la prueba para la detección de IFN- $\gamma$  liberado por los linfocitos, existen diferentes pruebas comerciales para ganado bovino, siendo muy parecidas en cuanto al protocolo, pero dejando algunos aspectos del mismo a criterio del laboratorio/país donde se realiza el ensayo, lo que dificulta la estandarización y puede provocar diferencias en los resultados. Entre las tareas del Laboratorio de Referencia Europeo (EU-RL) de TB bovina figura la de la armonización de las técnicas empleadas para el diagnóstico de la TB bovina.

#### **4.3.3 Enzimoimmunoanálisis**

Se ha intentado varias veces, desarrollar pruebas serodiagnósticas clínicamente útiles para la detección de la tuberculosis. El ELISA parece ser la prueba más adecuada de detección de

anticuerpos y puede constituir un complemento, más que una alternativa, a las pruebas basadas en la inmunidad celular (IDTB y IFN- $\gamma$ ). El ELISA indirecto es la técnica serodiagnóstica más ampliamente utilizada para detectar anticuerpos circulantes frente al MTBC. El uso de cócteles de antígenos (MPB83, MPB70, P22), el extracto etanólico de antígeno de *M. bovis* (EVELISA) y la preabsorción de anticuerpos frente a MAP o frente a otras micobacterias ambientales como *M. phlei* han mostrado resultados prometedores.

#### **4.4. PRUEBAS POST MORTEM**

##### **4.4.1. Diagnóstico anatomopatológico**

Según el Programa Nacional de Erradicación, aquellos animales con resultados positivos a las pruebas de IDTB deberán ser sacrificados. La vigilancia de la TB en el matadero consiste en identificar la presencia de lesiones compatibles con esta enfermedad en las canales y/o vísceras de animales sacrificados para el consumo humano. Además, es a partir de estas lesiones de donde se obtiene la mejor muestra para realizar con éxito un cultivo microbiológico y poder identificar que se trata de una micobacteria del MTBC. Con este resultado se confirma el resultado positivo a las pruebas diagnósticas en el animal vivo.

La presencia de lesiones compatibles con TB en animales sacrificados de rutina para el consumo debe ser siempre investigada ya que podría tratarse de infecciones que no han sido detectadas mediante las pruebas in vivo. De hecho, en regiones oficialmente libres de TB, donde ya no se realizan las pruebas cutáneas en las explotaciones de ganado bovino, o se realizan en intervalos más largos de un año, la vigilancia pasiva en matadero pasa a ser la principal o única herramienta de control oficial para la detección de nuevos brotes.

Para ambas situaciones (confirmación de sospechas, vigilancia pasiva) son determinantes los protocolos de inspección post mortem y muestreo.

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. Cuando el animal no presente lesiones patológicas se debe recoger para su examen dieferentes linfocentros, incluyendo de la cabeza, cavidad torácica y cavidad abdominal.

El diagnóstico anatomopatológico de la TB se lleva a cabo en tres etapas sucesivas:

1) identificación macroscópica de lesiones compatibles: Esta etapa se lleva a cabo en los mataderos. El espectro lesional que puede presentar la TB es muy amplio, abarcando desde lesiones milimétricas en un solo nódulo linfático hasta grandes lesiones diseminadas por todo el organismo. Macroscópicamente, un granuloma tuberculoso suele ser de blanquecino a amarillento y de consistencia caseosa, caseosa-calcárea o calcificada, recordando al queso (del latín caseum formatigus o queso). En ocasiones, puede tener aspecto purulento. El

centro caseoso suele ser seco y duro, estar cubierto por una cápsula de tejido conjuntivo fibroso de espesor variable. Sin embargo, hoy día la probabilidad de que un animal llegue al matadero presentando lesiones visibles es baja. Otros factores, como la formación de los inspectores y la velocidad de la cadena de sacrificio también influyen en este grado de detección de lesiones.

2) estudio histopatológico al microscopio: Una vez en el laboratorio, se realizan cortes seriados de los órganos y tejidos para detectar lesiones pequeñas que se encuentren en el interior del tejido. Una vez preparados los cortes histológicos, se tiñen con la tinción Hematoxilina-Eosina, que es la más ampliamente usada. Supone la aplicación de hematoxilina que, por su naturaleza básica, tiñe estructuras ácidas en tonos azul y púrpura, y el uso de eosina que, por su carácter ácido, tiñe componentes básicos en tonos de color rosa. El estudio histopatológico trata de localizar lesiones granulomatosas (aquellas en las que el infiltrado inflamatorio está compuesto por macrófagos principalmente), necrotizantes y con mineralización del tejido necrótico. Histológicamente las lesiones tuberculosas, es decir, los granulomas, se clasifican normalmente en cuatro tipos (I, II, III y IV), en base a su extensión, infiltrado celular, grado de mineralización y calcificación y, grado de encapsulamiento.

3) identificación de la presencia de micobacterias, mediante tinciones especiales como la tinción de Ziehl-Neelsen, o de sus antígenos, mediante técnicas de inmunohistoquímica. Las lesiones causadas por *M. bovis* a menudo son paucibacilares (presentan pocos microorganismos) y la ausencia de microorganismos ácido resistentes no excluye la tuberculosis. El diagnóstico etiológico será efectivo cuando se demuestre la presencia de bacilos ZN+ en zonas caseificadas o en el interior de células epitelioides y/o gigantes. En el caso de la técnica inmunohistoquímica, para la detección de antígenos micobacterianos se utilizará un anticuerpo primario policlonal (fabricado en conejo) frente a una micobacteria del complejo *Mycobacterium tuberculosis*. La inmunorreacción positiva se caracteriza por la presencia de un precipitado insoluble de tipo granular de color pardo-marrón, que puede tener localización intracelular (células histiocitarias como macrófagos, células epitelioides y células gigantes) y/o extracelular (presencia de precipitado en las zonas de necrosis).

#### **4.4.2. Aislamiento bacteriológico**

El cultivo microbiológico de las micobacterias es una de las pruebas oficiales de diagnóstico de la TB recogida en la legislación europea y nacional. El principal objetivo es el aislamiento de las especies del MTBC en las muestras clínicas de elección.

Las especies del MTBC tienen un crecimiento extremadamente lento y la obtención de resultados en el laboratorio puede prolongarse incluso hasta tres meses, hecho que retrasa, la recuperación de la calificación sanitaria de la explotación. Además, habrá que tener en cuenta que la obtención de un cultivo positivo a MTBC confirma la presencia del agente causal de la infección. Sin embargo, un resultado de cultivo negativo a MTBC en animales reaccionantes a las pruebas de campo oficiales, indica únicamente que no se ha podido aislar el agente causal por este método.

A nivel laboratorio, el cultivo microbiológico de las principales especies del MTBC en animales, *M. bovis*/*M. caprae*, requiere controlar tres etapas críticas que determinan el éxito de este método:

1) selección, toma y conservación de las muestras: las muestras a tomar serán las mismas que para el estudio histopatológico. El envío al laboratorio debe realizarse lo antes posible en condiciones de refrigeración, aunque se deberán congelar las muestras si no se prevé su llegada al laboratorio en las siguientes 24-36 horas.

2) descontaminación de las muestras para eliminar otros microorganismos contaminantes: existen diversos agentes descontaminantes que pueden emplearse, como el cloruro de hexadecilpiridinio (HPC), el hidróxido de sodio (NaOH) o el ácido oxálico, entre otros. La robusta pared celular de las micobacterias les permite resistir, en cierta medida, la agresividad de estos compuestos químicos, aunque se conoce que la descontaminación siempre viene asociada a una pérdida de viabilidad directamente relacionada con la concentración de descontaminante y el tiempo empleado. Tras la descontaminación de la muestra y la neutralización del agente químico (si se requiere), se concentran y recuperan las micobacterias mediante un proceso de centrifugación, y se prepara el sedimento para su siembra en medios de cultivo específicos.

3) siembra en medios de cultivo: los medios de cultivo pueden dividirse en dos grupos principales: los medios sólidos y los medios líquidos. Los medios sólidos pueden subdividirse a su vez en medios basados en agar, como el Middlebrook, o con base de yema de huevo como el Löwenstein-Jensen con piruvato de sodio, Coletsos o Stonebrink. En el caso de los medios líquidos no existe una variedad tan elevada de medios de cultivo, siendo el más empleado el medio MGIT™ (del inglés Mycobacteria Growth Indicator Tubes) para la plataforma automatizada BACTEC™ MGIT™ 960.

El crecimiento óptimo de *M. bovis*/*M. caprae* se produce a 37 °C. En el caso de los medios sólidos el crecimiento se hace visible a través de la formación de colonias blanquecinas más o menos abundantes y separadas, o a través de la aparición de una capa homogénea de bacterias (crecimiento confluyente). La detección del crecimiento en un medio líquido se observa como turbidez o pequeñas agrupaciones de bacterias en el medio. En general, si se usa un sistema de lectura automatizado, el equipo informa sobre el crecimiento en el medio de forma indirecta al detectar fluorescencia en los tubos, que es empleada como indicador del consumo de oxígeno y, por lo tanto, del crecimiento microbiano. El tiempo requerido para considerar un cultivo microbiológico como negativo varía, pero para garantizar el mayor número de aislamientos se recomienda un tiempo máximo de 42 días para el sistema líquido automatizado MGIT (Becton-Dickinson, Estados Unidos) y de hasta 90 días para el cultivo sólido.

Una vez se detecte el crecimiento en los medios de cultivo es necesario aplicar otras técnicas que identifiquen si la bacteria que ha crecido pertenece al MTBC, por ejemplo, mediante la PCR.

#### 4.4.3. Detección de ácido nucleico (ADN)

La detección del ADN de un microorganismo en una muestra indica que éste se encuentra presente en la misma, ya sea vivo o muerto. La técnica más popular para su detección es la PCR, que permite amplificar y convertir así en detectables, pequeñas cantidades de ADN diana. Las PCRs pueden emplearse en todo tipo de matrices, ya sean aislados bacterianos, muestras clínicas (ejemplo, tejidos) o muestras ambientales (ejemplo, agua), la cantidad de bacterias o de impurezas puede variar considerablemente de una a otra.

Actualmente, el uso de la PCR directamente sobre tejidos en el diagnóstico de la TB se utiliza como complemento a la microbiología y solo se contempla su uso exclusivo en situaciones muy concretas dentro del Programa de erradicación nacional de TB bovina. Los principales factores que afectan a la detección de estos patógenos directamente en la muestra están asociados con la PCR empleada y la extracción del ADN de la muestra. La selección de la diana genética para la PCR es un elemento clave para la técnica. La diana genética más popular usada en la detección del MTBC es la secuencia de inserción o transposón IS6110. Esto se debe a que se trata de un elemento presente en múltiples copias (1->25) en el genoma de los miembros del complejo, lo que incrementa la sensibilidad de la prueba.

Por otro lado, los aislamientos obtenidos del cultivo microbiológico se pueden identificar mediante PCR. La diferenciación del CMTB se lleva a cabo mediante la amplificación de secuencias específicas, como son aquellas que codifican la proteína MPB70 y el antígeno b de 38 kDa o las secuencias de inserción IS6110, IS1081, entre otras. La identificación de las especies dentro del CMTB se puede realizar en base a los polimorfismos existentes en regiones específicas del genoma, como son el gen *gyrB*, ARNr 16S-23S o las RD (Regiones de Diferencia).

En cuanto a epidemiología molecular de la TB, actualmente se fundamenta en tres metodologías diferenciadas: el espoligotipado, el análisis del número variable de repeticiones en tándem o VNTR, y la secuenciación masiva de genomas (WGS):

- **Espoligotipado:** Todas las especies del MTBC presentan el locus DR (en inglés Direct Repeat). Éste se caracteriza por incluir una serie de secuencias repetidas de 36 nucleótidos de longitud, conocidas como repeticiones directas, que están intercaladas entre unas secuencias o espaciadores de una longitud variable de entre 34 y 41 nucleótidos. El espoligotipado utiliza los espaciadores para caracterizar los aislados según la presencia/ausencia de 43 de estos espaciadores.
- **VNTR:** En los genomas de las especies del MTBC existen multitud de secuencias repetidas en tándem, denominadas secuencias satélite. Muchas de estas secuencias presentan variabilidad relacionada con el número de repeticiones (Variable Number Tandem Repeat, VNTR). La mayoría de los VNTRs encontrados en el MTBC se corresponden con las llamadas unidades de repetición intercaladas en el genoma de las micobacterias (MIRUs). Se trata de secuencias repetidas en tándem de unas 40-100 pb que se encuentran dispersas en el genoma de las micobacterias, generalmente en zonas intergénicas. Aunque se considera que estas secuencias son bastante estables dentro del genoma de una misma cepa, con el tiempo pueden ocurrir pequeñas variaciones, ya sea

una ganancia o pérdida de la secuencia repetida, a través de un fenómeno conocido como microevolución. La técnica que se emplea para analizar las distintas localizaciones cromosómicas (loci) de los VNTRs se conoce como análisis de VNTRs en múltiples loci o MLVA.

- **WGS:** De todas las metodologías disponibles para caracterizar a los microorganismos y, concretamente, a las especies del MTBC, la secuenciación masiva de genomas (del inglés, Whole Genome Sequencing, WGS) es indudablemente la que más posibilidades ofrece. La WGS se refiere a un conjunto de técnicas laboratoriales que permiten conocer la composición genética completa (por ejemplo, genómica) de un individuo. Mediante equipos altamente especializados y automatizados se llevan a cabo millones de reacciones de secuenciación en paralelo, generándose así grandes cantidades de datos en muy poco tiempo.

MATERIAL NO OFICIAL

## BIBLIOGRAFÍA

Tuberculosis animal. Una aproximación desde la perspectiva de la ciencia y la administración. Balseiro A. Gortázar C. Sáez JL. (2020). Catálogo de publicaciones de la Administración General del Estado.

Capítulo 3.4.6 Tuberculosis bovina. Manual de las Pruebas de Diagnóstico y de las Vacunas para los Animales Terrestres 2021.

Tuberculosis bovina. Patogenia. Joaquín Rey Pérez, Javier Hermoso de Mendoza Salcedo, J. A. Cardenal Galván Localización: Bovis, ISSN 1130-4804, Nº. 47 (AGO), 1992, págs. 35-42

Informe final técnico financiero, Programa Nacional de Erradicación de la Tuberculosis Bovina, año 2020. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación.

Programa Nacional de Erradicación de la Tuberculosis Bovina 2022. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación.

Manual para la 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. Visavet-Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación.

Manual para la realización de estudios histopatológicos, inmunohistoquímicos y de PCR directa de tejidos para el diagnóstico rápido de la Tuberculosis bovina por el Complejo *Mycobacterium tuberculosis*. Programa Nacional de Erradicación de la Tuberculosis Bovina (Infección por el Complejo *Mycobacterium tuberculosis*) 2021. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación.

Manual de procedimiento para la realización de las pruebas de intradermotuberculinización y gamma-interferón. Visavet-Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación.

Capítulo 1.1.3 Transporte de material biológico. Manual de las Pruebas de Diagnóstico y de las Vacunas para los Animales Terrestres 2021.

**MATERIAL PARA LA PREPARACIÓN DEL TEMA 50**

**SALMONELOSIS. MARCO LEGAL. PROGRAMAS NACIONALES DE VIGILANCIA Y CONTROL. DIAGNÓSTICO DE LABORATORIO.**

*Este material no tiene carácter oficial, por lo que en ningún caso vinculará al Tribunal Calificador. Constituye, únicamente, un instrumento complementario que servirá de apoyo al opositor para enfocar cada uno de los epígrafes, pero nunca de forma exclusiva ni excluyente. El Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación no se hace responsable del contenido del mismo.*

*Los materiales no serán objeto de actualización constante.*

## **ÍNDICE**

### **1. SALMONELOSIS**

- 1.1. ETIOLOGÍA
- 1.2. CLÍNICA Y PATOGENIA
- 1.3. EPIDEMIOLOGÍA
  - 1.3.1. Distribución
  - 1.3.2. Transmisión
- 1.4. PROFILAXIS

### **2. MARCO LEGAL**

- 2.1. NORMAS INTERNACIONALES
- 2.2. NORMAS COMUNITARIAS (UE)
- 2.3. NORMAS NACIONALES

### **3. PROGRAMAS NACIONALES DE VIGILANCIA Y CONTROL**

### **4. DIAGNÓSTICO LABORATORIAL**

- 4.1. DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL
- 4.2. REQUISITOS PARA ENVÍO DE MUESTRAS AL LABORATORIO
- 4.3. TÉCNICAS DE LABORATORIO
  - 4.3.1. Diagnóstico Microbiológico
  - 4.3.2. Métodos alternativos para detección de salmonella
  - 4.3.3. Diagnóstico serológico

## 1. SALMONELOSIS

El primer estudio de *Salmonella* fue desarrollado por Eberth a principios del S. XIX, siendo el primero en reconocer este microorganismo. Fue después cuando Gaffky aisló el bacilo responsable de las fiebres tifoideas en humanos. Posteriormente, en 1885, Theobald Smith junto con Daniel Elmer Salmón aislaron *Salmonella* de los intestinos de cerdos infectados con peste porcina clásica, pensando que era la bacteria la responsable del cuadro clínico. El nombre de *Salmonella* es en honor al Dr. Daniel Elmer Salmon, un Patólogo estadounidense.

Se ha estimado que *E. coli* y *Salmonella* divergieron a partir de un antecesor común hace alrededor de 100 millones de años, coincidiendo con el origen de los mamíferos. Por tanto, es probable que alguna de las características únicas de los mamíferos, como la homeotermia, el ambiente intestinal mamífero, e incluso la disponibilidad del azúcar de la leche (lactosa), proporcionaron un nuevo nicho ecológico que permitió la divergencia entre ambos microorganismos.

### 1.1 ETIOLOGÍA

El género *Salmonella* incluye solo dos especies: *S. enterica* y *S. bongori*. Esta segunda, no es patógena para el ser humano. La más importante es *Salmonella entérica*, que se divide en 6 subespecies. Estas 6 subespecies, en su nomenclatura, se indican con números romanos:

- *Entérica* (I)
- *Salamae* (II)
- *Arizonae* (IIIa)
- *Diarizonae* (IIIb)
- *Houtenae* (IV)
- *Indica* (VI)

El símbolo V se reserva para las serovariedades de *S. bongori* para evitar confusión, ya que en el pasado estuvo encuadrada como la subespecie V. Posteriormente, estudios de hibridación de ADN constataron que era una especie distinta.

La subespecie Enterica (subgrupo I) se divide en cinco serogrupos: A, B, C, D y E. Cada serogrupo comprende múltiples componentes o serotipos (serovariedades).

La notación de *Salmonella* tiene una particularidad ya que normalmente no se indica el género y especie como en otras bacterias. Solo tienen nombre las serovariedades de la subespecie entérica (o subgrupo I) y únicamente se expresa el género en cursiva, seguido del serovar en letra normal; por ejemplo, *Salmonella* Typhimurium (o *S. Typhimurium*) es la denominación que se utiliza normalmente para indicar *Salmonella entérica* subsp. *entérica* serovar Typhimurium. El resto de las serovariedades, se denominan por su fórmula antigénica (por ejemplo, *Salmonella* IV 48:g.z51).

En los últimos años, el tema de la nomenclatura del género *Salmonella* ha sido complejo, controvertido y sigue siendo objeto de debate.

En la actualidad, la mayoría de los centros de referencia de *Salmonella* en el mundo, incluidos los Centros para el Control de Enfermedades (CDC), adoptan el sistema de nomenclatura de *Salmonella* como recomienda la Organización Mundial de la Salud (OMS). Este sistema de nomenclatura clasifica el género *Salmonella* en dos especies en función de las diferencias en su análisis de secuencia de ARNr 16S. Estas dos especies son *S. entérica* y *S. bongori*. Además, las cepas de *Salmonella* se clasifican de acuerdo con la clasificación del esquema de White-Kauffmann–Le Minor en serovariedades según la gran diversidad de antígenos somáticos (O), capsular (K) y de los flagelos (H). En la actualidad se reconocen más de 2.600 serotipos dentro de la especie *S. entérica*. De estos, la subespecie *entérica* es responsable de aproximadamente 1.500 serotipos, de los cuales el 99% pueden causar infecciones en animales y humanos.

El género *Salmonella*, perteneciente a la familia *Enterobacteriaceae*, lo conforman bacilos anaerobios facultativos, gramnegativos, no esporulados, móviles ya que presenta flagelos peritricos (excepto *S. Gallinarum* y *S. Pullorum* causantes de Pullorosis y Tifosis Aviar, que son inmóviles). Su tamaño oscila entre 0,2-1,5 x 2-5  $\mu\text{m}$ .

## 1.2 CLÍNICA Y PATOGENIA

El curso de la infección, los signos clínicos, los hallazgos postmórtem y los modelos epidemiológicos varían según el serotipo y la especie animal implicada.

La mayoría de las serovariedades puede causar enfermedad en gran variedad de especies animales, mientras que algunas son específicas de hospedador, como *S. Typhi* en el ser humano o *S. Abortusovis* en las ovejas. Otras serovariedades están adaptadas al hospedador, como *S. Choleraesuis* en los cerdos o *S. Dublin*, en el ganado bovino.

Las serovariedades específicas de hospedador o adaptadas al hospedador a menudo causan una enfermedad septicémica, es decir, cuando esos serotipos particulares provocan la enfermedad en las personas suelen ser invasivos y pueden ser mortales.

Sin embargo, la mayoría de los serotipos se encuentran en una gran diversidad de huéspedes. Por lo general, esos serotipos causan gastroenteritis, que suele ser un trastorno sin complicaciones y no requiere tratamiento, aunque puede ser grave en los niños, los ancianos y los pacientes inmunodeprimidos. A ese grupo pertenecen *Salmonella enterica* serotipo Enteritidis y *Salmonella entérica* serotipo Typhimurium, los dos serotipos más importantes de *Salmonella* transmitida de animales a seres humanos en la mayor parte del mundo.

En las aves de corral, la pullorosis y la tifosis aviar son las infecciones causadas por *S. Pullorum* y *S. Gallinarum*, respectivamente.

La enfermedad puede afectar a todas las especies de animales domésticos, siendo los animales de corta edad y las hembras gestantes los más susceptibles. Puede observarse gran variedad de signos clínicos, como septicemia aguda, diarrea aguda o crónica, enfermedad respiratoria, aborto o artritis.

Los pollitos y pavipollos de menos de 1 semana de edad son muy susceptibles a la infección por *Salmonella* y en ocasiones puede presentar signos como anorexia, adipsia, abatimiento, erizado de plumas, apiñamiento, somnolencia, deshidratación, diarrea blanca y excremento pastoso que dan lugar a una considerable tasa de mortalidad, aunque incluso en las aves de corral de corta edad, lo más probable es el curso subclínico.

En los terneros, tiene lugar una infección septicémica por la serovariedad S. Dublin adaptada al hospedador, principalmente a las 2-6 semanas de edad. Los terneros quedan apagados, febriles, anoréxicos, presentan diarrea con sangre y moco en las heces, pueden sufrir neumonía y a menudo se deshidratan con rapidez y mueren si no se les administra el tratamiento adecuado y a tiempo. En las vacas gestantes, la infección por S. Dublin es una causa frecuente de aborto.

Los cerdos infectados por la serovariedad S. Cholerasuis adaptada al hospedador pueden presentar enfermedad clínica, anorexia, fiebre alta, letargo y cianosis en las extremidades.

Muchos animales, sobre todo las aves de corral y los cerdos, pueden resultar infectados, pero no presentar enfermedad clínica. Estos animales pueden ser importantes en cuanto a la transmisión de la infección entre parvadas o rebaños. La salmonelosis está reconocida en todos los países, pero la infección no tifoidea parece ser más prevalente en las zonas en las que se practica la producción intensiva, sobre todo la avicultura y la porcicultura.

Se ha demostrado que son muchos los factores de virulencia que intervienen en la patogénesis de las infecciones por *Salmonella*. Estos factores incluyen flagelos, cápsula, plásmidos, sistemas de adhesión, exotoxinas, endotoxinas o un sistema de secreción tipo 3. Estos factores, solos o en combinación con otros, permiten a *Salmonella* colonizar a su huésped a través de la unión, la invasión y la supervivencia, eludiendo los mecanismos de defensa del huésped como la acidez gástrica, las proteasas gastrointestinales y las defensas proporcionadas por el microbioma intestinal.

### **1.3 EPIDEMIOLOGÍA**

#### **1.3.1. Distribución**

La salmonelosis está presente a nivel mundial, aunque es más frecuente en aquellas zonas donde se practica la ganadería intensiva. Gracias a los programas nacionales de vigilancia y control implantados en algunos países, la infección en los animales domésticos y el hombre ha disminuido de manera muy significativa. Sin embargo, sigue estando presente en la fauna silvestre.

La salmonelosis es la segunda infección gastrointestinal notificada con mayor frecuencia en humanos después de la campilobacteriosis, y una causa importante de brotes de origen alimentario en la UE. La tendencia de la salmonelosis en humanos ha sido estable durante los últimos 5 años después de un largo período de tendencia decreciente.

### 1.3.2. Transmisión

*Salmonella* se ha aislado prácticamente en todas las especies de mamíferos, aves, reptiles y anfibios analizadas. Sin embargo, las especies más afectadas son las aves de corral, los porcinos y los reptiles. Hay algunos serotipos que presentan un rango estrecho de hospedadores, pero en general, la mayoría puede infectar a una gran variedad de hospedadores.

De todas las subespecies de *Salmonella*, la *S. entérica* subsp. *entérica* (subgrupo I) es la más común y se encuentra predominantemente asociada a mamíferos, siendo la causante de alrededor del 99% de infecciones por *Salmonella* en humanos y animales de sangre caliente. En el ser humano, la *Salmonella* da lugar a dos cuadros clínicos. La fiebre tifoidea y paratifoidea, originadas por bacterias pertenecientes a los serotipos *S. Typhi* y *S. Paratyphi*, se caracterizan por infectar únicamente a las personas. El otro cuadro clínico es la salmonelosis que está originada por diferentes serotipos, siendo los más comunes *S. Enteritidis* y *S. Typhimurium*. A diferencia de los otros dos, estos dos serotipos son zoonóticos y afectan al ser humano y a un gran número de animales domésticos y silvestres.

Por otro lado, las otras cinco subespecies de *S. entérica* y *S. bongori* son raras en humanos, encontrándose principalmente en animales de sangre fría y en el medio ambiente.

El contagio se produce de forma horizontal, vía fecal-oral, ya que las bacterias son eliminadas por los animales infectados de manera continua, a través de las heces. El contagio suele darse de forma indirecta, a través de fómites contaminados. *Salmonella* es ubicua y extremadamente persistente, tanto en medios desecados como en presencia de agua, durante periodos de tiempo que pueden ir desde días a varios meses. Ésto unido a la presencia de portadores inaparentes, principalmente aves y ganado porcino, favorecen el mantenimiento de la enfermedad en el medio.

Otro medio de transmisión incluye la transmisión vertical, especialmente en aves de corral afectadas por *S. Enteritidis*, ya que tiene una especial afinidad por el sistema reproductivo. En este caso, la transmisión a la progenie ocurre por infección transovárica. Otra vía de acceso del serovar *Enteritidis* a los huevos es por migración desde la cloaca a los órganos reproductivos. También se ha descrito la transmisión vertical en ganado bovino.

La presencia de vectores, tales como roedores o insectos, juega un papel muy importante en la transmisión entre diferentes instalaciones y en el mantenimiento de la enfermedad. Los roedores son importantes vectores y reservorios de *Salmonella* al transportar la bacteria en su tracto intestinal de forma asintomática, contaminando el alimento y el agua. Los insectos actúan como vectores mecánicos y los animales pueden adquirir la enfermedad al ingerir insectos contaminados con la bacteria.

### 1.4. PROFILAXIS

La infección por *Salmonella* en las explotaciones se puede controlar adoptando Buenas Prácticas Agrícolas y un sistema de Análisis de Peligros y Puntos Críticos de Control (APPCC), además de otras medidas generales de bioseguridad.

Ninguna medida aislada permitirá un control eficaz de las infecciones por Salmonella.

Las medidas a tener en cuenta provienen del control de los movimientos de animales entre explotaciones y del control de los alimentos destinados a consumo animal, ya que pueden ser una fuente de infección por Salmonella.

Como medidas complementarias de prevención y control destacan la exclusión competitiva, el uso de ácidos orgánicos como tratamientos bactericidas o bacteriostáticos en alimentos, la eliminación selectiva y el desvío del producto para su transformación.

Además se contempla el uso de vacunas como una medida suplementaria para aumentar la resistencia de las aves a la exposición a la Salmonella y para reducir su excreción. Para la vacunación de las manadas únicamente podrán utilizarse vacunas que dispongan de la previa autorización de comercialización. Para poder utilizarse con seguridad, los métodos de detección deben ser capaces de diferenciar las cepas vacunales de las cepas de campo.

No deberían utilizarse agentes antimicrobianos para controlar las infecciones de aves de corral por Salmonella, porque es un tratamiento poco eficaz que puede ocultar la infección durante el muestreo, dejar residuos en la carne y los huevos y contribuir al desarrollo de resistencia a los agentes antimicrobianos. Los agentes antimicrobianos también pueden reducir la flora intestinal normal y aumentar la probabilidad de colonización por Salmonella. En determinadas circunstancias se podrán utilizar agentes antimicrobianos para salvar aves de alto valor genético.

## **2. MARCO LEGAL**

### **2.1 NORMAS INTERNACIONALES**

A nivel internacional, el Código Sanitario para los Animales Terrestres de la OIE presenta 3 capítulos dedicados a Salmonella (Capítulo 6.6. “Prevención, detección y control de las infecciones de aves de corral por Salmonella”; Capítulo 6.13 “Prevención y control de Salmonella en los sistemas comerciales de producción de bovinos”; Capítulo 6.14 “Prevención y control de Salmonella en los sistemas comerciales de producción de cerdos”). Estos capítulos contienen recomendaciones para la prevención, la detección y el control de las infecciones por Salmonella con el fin de reducir la prevalencia en las explotaciones y el riesgo de prevalencia en el hombre.

Las recomendaciones de estos capítulos son pertinentes para el control de todos los serotipos de Salmonella, especialmente de S. Enteritidis y S. Typhimurium, que son comunes en muchos países.

### **2.2 NORMAS COMUNITARIAS (UE)**

Una de las prioridades de la UE, es la necesidad de garantizar un alto grado de seguridad alimentaria, para ello, en diciembre del 2000 se publicó el Libro blanco sobre seguridad alimentaria, que fue la base de una serie de mejoras legislativas organizativas y de

coordinación entre EEMM. Fruto de estas reflexiones se adoptaron dos propuestas principales cuyo objetivo era reducir la incidencia de enfermedades de transmisión alimentaria:

Se publicó la Directiva 2003/99/CE sobre la vigilancia de las zoonosis y los agentes zoonóticos, cuyos objetivos son aumentar el conocimiento sobre un conjunto de zoonosis y sobre la resistencia a los antimicrobianos, mediante la comparación de datos y la evaluación de tendencias.

El Reglamento 2160/2003 sobre el control de la salmonella y otros agentes zoonóticos transmitidos por alimentos establece la obligatoriedad para todos los estados de la UE, de aplicar programas de control de los serotipos de Salmonella de importancia en salud pública en granjas de gallinas reproductoras, gallinas de puesta, pollos de engorde, pavos reproductores y engorde y en granjas de porcino. Con el fin de disminuir la prevalencia de la Salmonella en la cadena alimentaria, y el riesgo que supone para la salud, este Reglamento establece objetivos y medidas para la detección y el control de la bacteria en todas las fases de producción, transformación y distribución, especialmente en el sector de las aves de corral y en particular a nivel de producción primaria.

Además, el Reglamento 1177/2006 establece los requisitos de uso de métodos específicos de control en el marco de los programas nacionales de control de la salmonella en las aves de corral.

Por su parte, el Reglamento 2073/2005 relativo a los criterios microbiológicos que son aplicables a los productos alimenticios, (modificado por el Reglamento (CE) 1441/2007) establece criterios de seguridad alimentaria para Salmonella en diversas categorías de productos alimenticios comercializados durante su vida útil.

El Reglamento 1086/2011 establece modificaciones del anexo II del Reglamento 2160/2003 y del anexo I del Reglamento 2073/2005 en lo que concierne a la salmonella en aves de corral.

Al Reglamento 2160/2003 se suman cuatro más, los Reglamentos 200/2010, 517/2011, 200/2012 y 1190/2012, que establecen los requisitos de muestreo y ensayo necesarios para garantizar un control armonizado en la UE de los logros alcanzados respecto a los mencionados objetivos de reducción de Salmonella en las poblaciones de aves de corral.

Dado que el Comité Europeo de Normalización y la Organización Internacional de Normalización han revisado recientemente el protocolo normalizado de referencia EN ISO 16140-2 (protocolo para la validación de métodos alternativos) y el método de referencia para la detección de Salmonella (EN ISO 6579-1), estos cuatro Reglamentos anteriores deben actualizarse. Para ello, se publica el Reglamento 268/2019.

Por otro lado, cabe señalar que el Reglamento de Ejecución (UE) 2018/1882 de la Comisión, de 3 de diciembre de 2018, relativo a la aplicación de determinadas normas de prevención y control a categorías de enfermedades enumeradas en la lista y por el que se establece una lista de especies y grupos de especies que suponen un riesgo considerable para la propagación de dichas enfermedades de la lista, establece la Infección por Salmonella

Pullorum y S. Gallinarum como enfermedad de categoría D+E para las especies Gallus gallus, Meleagris gallopavo, Numida meleagris, Coturnix coturnix, Phasianus colchicus, Perdix perdix y Anas spp., en las que deben adoptarse medidas para evitar su propagación en relación con su introducción en la UE o con desplazamientos entre EEMM y en las que se debe realizar una vigilancia.

### 2.3 NORMAS NACIONALES

La salmonelosis en humanos es una enfermedad de notificación obligatoria de acuerdo al Real Decreto 2210/1995. Con el fin de analizar y difundir la información el Ministerio de Sanidad y Consumo, a través del Instituto de Salud Carlos III realiza un análisis conjunto que difunde a través del informe epidemiológico anual de la Red nacional de vigilancia epidemiológica.

En sanidad animal, a escala nacional, en el año 2003 se publicó la Ley 8/2003, de 24 de abril de sanidad animal en la que se desarrollan legalmente en España todos los mecanismos para vigilar y controlar las enfermedades de los animales, y para garantizar la salud pública y la seguridad alimentaria.

El Real Decreto 1940/2004 sobre la vigilancia de las zoonosis y los agentes zoonóticos supone la trasposición de la Directiva 2003/99/CE a nuestro ordenamiento jurídico.

### 3. PROGRAMAS NACIONALES DE VIGILANCIA Y CONTROL

El Reglamento 2160/2003 establece la obligatoriedad de adoptar medidas apropiadas y eficaces para detectar y controlar la presencia de Salmonella en todas las etapas de la producción (desde “el establo a la mesa”) con objeto de disminuir su prevalencia y el riesgo que supone para la salud pública.

Mediante la aplicación de Programas Nacionales de Control (PNC) los EEMM deben conseguir este fin, para ello la Comisión Europea establece el marco de aplicación. Estos PNC deben ser flexibles con objeto de adaptarse a las circunstancias de cada país y alcanzar el mismo objetivo.

Aquellas especies animales que presenten un potencial riesgo de transmisión de Salmonella y otros agentes zoonóticos a las personas deben ser objeto de estos programas.

En general los objetivos de estos Programas Nacionales de Control de determinados serotipos de Salmonella son los siguientes:

- Disminuir la prevalencia de salmonellas de interés zoonótico de acuerdo con los objetivos de reducción que establece la norma comunitaria para cada uno de los tipos de producción.
- Mejorar las medidas de bioseguridad de las explotaciones.
- Protección de la salud pública y de la seguridad alimentaria frente a las salmonellas consideradas de importancia para la salud pública.

Los Programas Nacionales de Control abarcarán como mínimo los aspectos relacionados con la producción de alimentos para animales, la producción primaria y la transformación y preparación de alimentos de origen animal. Esto conlleva:

- La definición de las responsabilidades de las autoridades competentes y la aprobación de los laboratorios autorizados para llevar a cabo el análisis de las muestras.
- El desarrollo de las medidas de control a aplicar en el caso de que se detecte una zoonosis, principalmente para preservar la salud pública.
- La aplicación de mecanismos de evaluación de resultados de los análisis.
- El mantenimiento de registros en las explotaciones para asegurar la trazabilidad.

Son esenciales los controles sanitarios e higiénicos en los mataderos, y se deben tomar precauciones especiales durante el sacrificio de rebaños animales potencialmente infectados.

Para dar cumplimiento al Reglamento 2160/2003, el MAPA ha establecido para el año 2022

#### **4 Programas Nacionales de Control de determinados serotipos de Salmonella en:**

- **Gallinas reproductoras de la especie *Gallus gallus*:** control de 5 serotipos (S. Enteritidis, S. Typhimurium, S. Infantis, S. Virchow, S. Hadar)
- **Gallinas ponedoras de la especie *Gallus gallus*:** control de S. Enteritidis y S. Typhimurium.
- **Pollos de carne de la especie *Gallus gallus*:** control de S. Enteritidis y S. Typhimurium.
- **Pavos de engorde y reproducción:** control de S. Enteritidis y S. Typhimurium.

Estos programas son de aplicación en todo el territorio nacional y en ellos se recogen, entre otros puntos:

A) Medidas de bioseguridad a aplicar por los productores. Con el objeto de poder verificar y valorar las medidas de bioseguridad en las explotaciones se dispone de un protocolo de verificación a modo de check-list sobre los puntos más significativos a tener en cuenta.

B) Requerimientos mínimos en los autocontroles, siendo el titular de la explotación el responsable de que se efectúen dichos autocontroles, incluida la toma de muestras. En los ensayos de autocontrol se pueden utilizar métodos alternativos al oficial establecido por la norma EN/ISO 6579-1 aunque han de estar validados frente al método de referencia de acuerdo a la norma internacional EN/ISO 16140 y estar registrados en el MAPA como producto zosanitario, según el Real Decreto 867/2020.

C) Controles oficiales en la explotación, en la manada, en la incubadora o en los piensos. Estos serán llevados a cabo por los SVO según se dispone en cada uno de los 4 PNC. Además, se verificará que los titulares de explotaciones tengan implantados códigos de buenas prácticas de higiene a fin de cumplir los objetivos de estos PNC de Salmonella, y garantizar el mantenimiento de la información sanitaria. A estos efectos, deben mantener actualizados registros sobre la naturaleza y el origen de los alimentos suministrados a los animales, sobre la aparición de enfermedades, registro de visitas, de tratamientos con medicamentos, de los

resultados de los análisis y controles efectuados, registro de entradas y salidas de manadas de aves, de la realización de las tareas de limpieza y el protocolo seguido.

D) Requisitos mínimos del protocolo de toma de muestras, tanto en autocontrol como en control oficial.

E) Requerimientos específicos para manadas positivas, entre los que se encuentran la investigación epidemiológica, la restricción de movimientos de animales, requerimientos de sacrificio de manadas y destrucción de huevos en su caso, control de las medidas de bioseguridad, medidas a adoptar para la repoblación tras el sacrificio, protocolos de limpieza y desinfección, desinsectación y desratización antes de la repoblación, estudio de portadores entre los trabajadores (si se estima necesario), etc.

F) Laboratorios autorizados para analizar muestras. Los laboratorios participantes en el programa para la realización de controles oficiales deberán ser establecidos, reconocidos o designados por los órganos competentes de las Comunidades Autónomas. Estos laboratorios oficiales deben funcionar y disponer de ensayos acreditados para detección de *Salmonella* en todas las matrices objeto de control de los PNCS, y estar acreditados de acuerdo con la norma EN/ISO 17025 de Requisitos Generales relativos a la competencia de los laboratorios de ensayo y calibración, así como aplicar sistemas de aseguramiento de la calidad acordes con la misma. Además, deben participar en las pruebas de detección colectivas organizadas o coordinadas por el Laboratorio Nacional de referencia (LCV de Algete, Madrid).

H) Métodos analíticos, tanto para la detección de *Salmonella* como para el serotipado. El aislamiento de *Salmonella* se llevará a cabo de conformidad con la norma EN/ISO 6579-1, método horizontal para la detección de *Salmonella spp* en heces de animales y en muestras ambientales en la etapa de producción primaria, en el que se utiliza un medio de cultivo semisólido (medio semisólido Rappaport-Vassiladis modificado, MSRV) como único medio de enriquecimiento selectivo. Se procederá al serotipado, como mínimo, de una cepa de cada muestra positiva, de conformidad con el esquema de Kaufmann-White–Le Minor.

I) Requisitos para la vacunación. La vacunación sólo es obligatoria para el caso de gallinas ponedoras durante la fase de cría. En el resto de las producciones no es obligatoria la vacunación. Únicamente podrán utilizarse vacunas que dispongan de autorización de comercialización por parte de la Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios o por la Comisión Europea. Las vacunas atenuadas para las cuales no exista un adecuado método para diferenciar bacteriológicamente las cepas vacunales de las cepas de campo, no podrán ser utilizadas en el marco de estos programas. A este respecto, el MAPA mantiene actualizada la relación de vacunas autorizadas.

J) Procedimiento oficial para verificar el protocolo de limpieza y desinfección después del vaciado sanitario de una manada positiva. Tras el vaciado de la nave, se realizará una eficiente y completa limpieza (incluida la retirada completa de la yacija y excrementos) y posterior desinfección, desinsectación y desratización. Se utilizarán en todas estas labores productos debidamente autorizados y registrados para ese uso. Transcurrido un tiempo adecuado desde la finalización de la desinfección se procederá a la toma de muestras

ambientales con el objeto de verificar la eficacia de las labores de limpieza y desinfección y la ausencia de *Salmonella spp.* en el ambiente.

K) Sistema de indemnización de los propietarios. En los casos en los que se lleve a cabo un sacrificio obligatorio de las aves, los propietarios de las mismas tendrán derecho a una indemnización, siempre y cuando hayan cumplido con la normativa vigente en materia de sanidad animal.

#### 4. DIAGNÓSTICO LABORATORIAL

##### 4.1. DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL

Los signos clínicos en las aves de corta edad con salmonelosis generalizada se parecen mucho a los de la pullorosis y a los de la tifosis aviar, así como a los de otras enfermedades septicémicas agudas causadas por gran variedad de bacterias, como *Escherichia coli*.

En todas las especies aviares, la artritis causada por la infección debida a *Salmonella* puede confundirse con una sinovitis o una bursitis causada por otras infecciones.

La salmonelosis septicémica de los cerdos causada por *S. Cholerasuis* puede confundirse con la peste porcina clásica.

La salmonelosis septicémica de los terneros puede confundirse con una colibacilosis, aunque esta última suele tener lugar a edades más tempranas. La forma entérica aguda de la salmonelosis de los terneros puede parecerse a la coccidiosis.

Los abortos ovinos pueden derivar no solo de *S. Abortusovis* sino también de *Coxiella burnetii*, *Chlamyphila abortus*, *Brucella melitensis* u otros agentes patógenos.

##### 4.2. REQUISITOS PARA LA TOMA Y ENVÍO DE MUESTRAS AL LABORATORIO

Las **muestras para pruebas bacteriológicas y los métodos alternativos de detección de *Salmonella*** se deben tomar tan asépticamente como sea posible y, en caso de enfermedad clínica o de control rutinario, deben tomarse antes de comenzar cualquier tratamiento antibiótico. Las muestras clínicas se obtienen preferiblemente durante la fase aguda de la enfermedad o lo antes posible después de la muerte.

Las muestras ambientales como las heces, desechos, polvo del suelo, o hisopos de diferentes superficies, calzas de operarios y piensos, pueden ser el modo de identificar explotaciones infectadas. En el caso de especies animales más pequeñas, es preferible enviar al laboratorio un número representativo de animales enfermos o recién muertos.

Normalmente, las serovariedades adaptadas al hospedador son más difíciles de aislar de las heces, de modo que, si se sospecha esta situación, se deben cultivar tejidos infectados siempre que sea posible.

Se debe prestar una atención particular al aislamiento de Salmonella en animales con infecciones subclínicas, ya que es posible que estos liberen la bacteria solo de modo intermitente y en cantidades bajas. Se puede lograr aumentar la sensibilidad diagnóstica incrementando el tamaño de las muestras y el número de las muestras.

Los Programas Nacionales de Control de Salmonella indican que las muestras se enviarán en las 24 horas posteriores a la recogida. Si no se envían en ese plazo de 24 horas, deberán almacenarse refrigeradas. El transporte puede realizarse a temperatura ambiente siempre que se eviten el calor excesivo (más de 25 °C) y la exposición a la luz del sol. En el laboratorio, las muestras se mantendrán refrigeradas hasta su examen, que comenzará, si es posible, en las 48 horas posteriores a su recepción y siempre dentro de las 96 horas posteriores al muestreo.

Las **muestras para pruebas serológicas** podrán ser sangre con anticoagulante (sangre entera) o sin anticoagulante para la obtención del suero, leche o yema de huevo. La utilización de discos de papel de filtro para obtener muestras de suero permite la conservación a largo plazo y reducen los costes de transporte al laboratorio, aunque la sensibilidad de la prueba puede resultar levemente menor que en las pruebas realizadas con suero fresco.

En cualquier caso, al transportar materiales biológicos, el remitente debe determinar si el material debe clasificarse como mercancía peligrosa o no. En el caso de transporte de muestras clínicas sospechosas de contener salmonelas viables, deberían clasificarse como Sustancia biológica perteneciente a la categoría B (UN3373) y seguir la instrucción de embalaje P650, de acuerdo con la Reglamentación sobre Materiales Peligrosos (DGR) de la Asociación Internacional de Transporte Aéreo (IATA). No obstante, para aquellas muestras para las cuales existe una probabilidad muy baja de que contengan agentes patógenos se pueden transportar clasificadas como muestras exentas. Para ello, se requiere una opinión profesional sólida para determinar si un espécimen puede ser eximido bajo esta definición. En este caso, no estarían sujetas a la normativa relativa a las mercancías peligrosas y la muestra se transporta en un sistema de embalaje triple que evite toda posible fuga y que esté identificado con la frase “muestras de origen animal exentas”.

### **4.3. TÉCNICAS DE LABORATORIO**

#### **4.3.1. Diagnóstico microbiológico**

##### **4.3.1.1. Aislamiento bacteriológico**

El cultivo microbiológico de Salmonella es el método de elección para demostrar ausencia de infección en la población y a nivel individual, así como para la confirmación de casos clínicos. También está recomendado para determinar la prevalencia de la infección en los estudios de vigilancia, contribuyendo a las políticas de erradicación.

Existen muchos métodos para aislar y detectar Salmonella que se utilizan a nivel internacional. Las técnicas y medios de cultivo que pueden funcionar mejor en una

situación diagnóstica concreta dependen de varios factores, como la serovariedad de Salmonella, el origen y tipo de muestra, la especie de origen, la experiencia del microbiólogo y la disponibilidad de medios de enriquecimiento selectivo y de medios selectivos para el cultivo en placas.

Por ejemplo, los agentes Salmonella pullorum y S. gallinarum no crecen inmediatamente en el caldo MSR/V (medio Rappaport Vassiliadis semisólido modificado) que se emplea en la UE para el control del agente zoonótico Salmonella spp., sino que es preferible utilizar otros medios como agar MacConkey, Verde Brillante, agar Salmonella-Shigella, agar XLD o agar Rambach.

Todos los medios de cultivo preparados deben someterse a controles de calidad y permitir el crecimiento del microorganismo sospechoso a partir de un inóculo pequeño en presencia de una matriz de muestra significativa. El uso sistemático de una cepa de referencia paralelamente con muestras rutinarias puede dar lugar a contaminación cruzada de las muestras si las técnicas no se utilizan con cuidado, así que debe utilizarse una serovariedad infrecuente con características de crecimiento típicas que sean semejantes a las de la cepa problema más prioritaria. También se pueden utilizar cepas con resistencia a antimicrobianos u otros marcadores, como la fluorescencia.

La creciente aplicación de programas para la garantía externa de la calidad ha impulsado que cada vez se utilicen más métodos estándar internacionales. El método de referencia viene especificado en la Norma UNE-EN ISO 6579-1:2017. Método horizontal para la detección, enumeración y serotipado de Salmonella. Parte 1: Detección de Salmonella spp.

El Manual de las Pruebas de Diagnóstico y de las Vacunas para los Animales Terrestres, en su capítulo reservado para la Salmonelosis, hace referencia a los siguientes medios de cultivo:

- Medios de pre-enriquecimiento: el agua de peptona tamponada se utiliza para facilitar el aislamiento. Esto puede permitir que incluso cantidades muy bajas de salmonelas terminen multiplicándose y no muriendo por los efectos tóxicos de los medios de enriquecimiento, y puede ayudar a la recuperación de las que presentan daños subletales, como los debidos a la congelación, el calentamiento, la desecación o la exposición a ácidos biocidas u orgánicos.
- Medios de enriquecimiento selectivos: algunos ejemplos de medios de enriquecimiento selectivos son el tetratonato, el caldo de Müller-Kauffmann, el selenito-cistina, el caldo verde brillante, el caldo Rappaport-Vassiliadis, el agar Rappaport-Vassiliadis semisólido modificado (MRSV) o medio semisólido para el diagnóstico de Salmonella (DIASALM). No obstante, algunos aditivos también son relativamente tóxicos para ciertas serovariedades. La temperatura de incubación variará entre 37°C y 41°C, dependiendo de la serovariedad. El medio semisólido Rappaport-Vassiliadis modificado, (MSRV) es el único medio de enriquecimiento selectivo de conformidad con la Norma UNE/EN/ISO 6579-1:2017.

- **Medios selectivos en placa:** estos son medios selectivos sólidos con agar que permiten un crecimiento diferencial en varios grados. Inhiben el crecimiento de bacterias distintas a *Salmonella* y proporcionan información sobre algunas de las principales características bioquímicas diferenciales (normalmente la incapacidad de fermentar la lactosa y la producción de sulfuro de hidrógeno). En dichos medios *Salmonella* forma colonias características que se suelen poder diferenciar de las producidas por otras bacterias en la placa, con la posible excepción de *Proteus*, *Pseudomonas*, *Citrobacter* y *Hafnia*. En ocasiones, se pueden aislar salmonelas fermentadoras de la lactosa y la producción de H<sub>2</sub>S puede ser variable. Se pueden detectar de modo más eficaz tales cepas atípicas cuando se utilizan medios de motilidad semi-sólidos. Algunos ejemplos son el MSR/V semisólido modificado y el DIASALM. Asimismo, pueden utilizarse placas como el agar xilosa-lisina-dexosicolato (XLD), el agar desoxicolato/citrato (DCA), el agar verde brillante (BGA) o el agar sulfito de bismuto (BS), pero estos dan con mayor frecuencia colonias que son falsos positivos. Actualmente se dispone de una gran variedad de medios cromógenos, como el agar Rambach y el SMID (agar para detección e identificación de *Salmonella*). Muchos de estos pueden servir de ayuda para la diferenciación entre colonias sospechosas, pero deben ser validados para las matrices de muestra, los sistemas de cultivo y la gama de serovariedades que se pretenda detectar, ya que, en ciertas condiciones, la sensibilidad puede ser baja. No obstante, ciertos medios de agar cromogénicos, como el Brilliance o el Rapid, pueden ser más eficientes para la detección de salmonelas bioquímicamente atípicas.

#### 4.3.1.2. Identificación de colonias sospechosas

Las colonias sospechosas se subcultivan en medios sólidos selectivos y no selectivos para asegurar la ausencia de posibles contaminantes, como *Proteus* spp. Si hay un crecimiento abundante en cultivo puro, pueden analizarse colonias sospechosas mediante aglutinación en porta con anti-sueros polivalentes para la tipificación de *Salmonella*. En algunos casos, la colonia sospechosa puede no aglutinar o autoaglutinar, en cuyo caso es necesario utilizar pruebas bioquímicas para confirmar la identificación. Estas pruebas se pueden realizar con azúcares en agua de peptona o con sistemas comerciales o en medios compuestos (tales como el agar triple azúcar-hierro [TSI]). Es especialmente importante garantizar que los cultivos de *Salmonella* para la determinación de resistencia a antimicrobianos no se mezclen con otros microorganismos, como *Pseudomonas*, que es más probable que sean multirresistentes. El método MALDI-TOF también resulta aceptable para la identificación de *Salmonella*.

La identificación del/los factor/es O y del/los antígeno/s H, y en circunstancias especiales, del antígeno Vi (presente en *S. Typhi*, *S. Paratyphi C* y *S. Dublin*), se realiza mediante aglutinación directa en porta o por aglutinación en tubo utilizando antisueros específicos, utilizando las fórmulas antigénicas del esquema de White-Kauffmann-LeMinor. En el caso de microorganismos bifásicos, es necesario identificar ambas fases mediante el uso de la inversión de fase, lo que implica el pase por medio semisólido que contenga antisuero contra la fase conocida. La detección se facilita si se dispone de antisueros dirigidos

contra varios factores, lo cual se puede continuar con el uso de sueros monovalentes de tipificación. Aunque muchos de los laboratorios pueden identificar las serovariedades más comunes, para confirmar la identidad de una cepa, incluida la fagotipificación en el caso de que se disponga de fagos específicos para la tipificación de serovariedad, y para llevar a cabo la caracterización genética normalmente se precisan los servicios de un Laboratorio de Referencia. Se pueden necesitar otras pruebas bioquímicas para identificar algunas variantes serotípicas.

Tras identificar los aislamientos se debe comprobar la sensibilidad de las cepas a un conjunto de agentes antimicrobianos, ya que existe una preocupación creciente por la emergencia de múltiples cepas nuevas resistentes que albergan genes transferibles de resistencia a las cefalosporinas y las fluoroquinolonas.

Las cepas vacunales vivas también se identifican con frecuencia mediante marcadores de resistencia a antimicrobianos y por cambios bioquímicos como el auxotropismo o la rugosidad.

#### **4.3.2. Métodos alternativos para detección de salmonella**

Se usan numerosos métodos alternativos de detección de Salmonella y algunos de ellos se comercializan. Estos incluyen la separación inmunomagnética (IMS), PCR en tiempo real y cuantitativa, los enzimoanálisis (ELISA), la PCR con sondas génicas o el análisis por microchip. Estos métodos pueden emplearse para identificar serovariedades de Salmonella específicas o para distinguir entre cepas vacunales vivas y serovariedades de Salmonella que hayan infectado a la parvada o al rebaño. Muchos de estos métodos no han sido totalmente validados para muestras fecales y ambientales. Aunque se han producido avances, estos métodos resultan más adecuados para el análisis de alimentos humanos, en los cuales los inhibidores de las reacciones de la PCR no son tan problemáticos como en las heces. Los métodos rápidos suelen ser más costosos que los cultivos convencionales, pero pueden resultar económicamente viables para analizar inicialmente materiales en los que se espere una prevalencia baja de contaminación o en caso de materiales, como los piensos, que se retengan a la espera de que den un resultado negativo. Los métodos rápidos para detección de Salmonella han experimentado grandes avances, pero ninguno parece reemplazar satisfactoriamente al cultivo en todas las circunstancias. Por el contrario, los métodos moleculares para la serotipificación o la subtipificación de cepas de Salmonella se utilizan cada vez.

Es importante que los kits que se utilicen hayan sido totalmente validados y deben escogerse preferiblemente de entre los que figuran en la lista del Registro de la OIE. En este sentido, el MAPA ha establecido una relación de métodos alternativos validados frente al método de referencia de acuerdo con la norma internacional EN/ISO 16140 y que se encuentran registrados como productos zoonosanitarios según el Real Decreto 867/2020. Estos métodos alternativos son:

- Vidas Up Salmonella (bioMerieux): solución automatizada para la detección de Salmonella en alimentos mediante tecnología de captura con fagos.
- QFast Salmonella (iMicroQ): es un kit rápido que permite la determinación de la presencia o ausencia de Salmonella spp. en menos de 24 horas en muestras de alimentos, veterinarias, ambientales (incluida producción primaria: heces, polvo) y de alimentación animal.
- iQ-Check Salmonella II (Bio-Rad): se basa en la tecnología de la PCR en tiempo real y está destinado a la detección de Salmonella spp. en alimentos para animales y muestras ambientales, así como en muestras de alimentos como aves, huevos y carnes crudas.
- MicroSEQ Salmonella (OXOID): se basa en la tecnología de la PCR en tiempo real con sondas Taqman para detectar la presencia de Salmonella spp. en muestras de alimentos.
- Vetproof® Salmonella spp (BIOTECON Diagnostics GmbH): se basa en la tecnología de la PCR en tiempo real. Se suministra bajo dos formatos. Uno de ellos permite la detección cuantitativa de Salmonella mientras que el otro formato permite una detección cualitativa.
- Salmofast (Microbial): se basa en la tecnología de la PCR en tiempo real para la detección de Salmonella spp.

#### **4.3.3. Diagnóstico serológico**

Los métodos serológicos deben utilizarse para identificar poblaciones infectadas más que para identificar animales específicos infectados, aunque se pueden repetir pruebas en la explotación como una ayuda al desvieje selectivo de animales portadores crónicos.

Con las pruebas serológicas se pueden dar diferentes situaciones que dificultan el diagnóstico a nivel individual. Por un lado, se pueden observar problemas de especificidad con resultados falsos positivos, sobre todo cuando la prevalencia es baja. Por otro lado, puede haber animales que excretan activamente Salmonella y ser serológicamente negativos, sobre todo en las primeras fases de la enfermedad, e incluso algunos animales infectados nunca seroconvierten. También puede detectarse animales serológicamente positivos que hayan cesado de excretar Salmonella.

Normalmente, las pruebas serológicas se diseñan para detectar una pequeña variedad de serovariedades o serogrupos de Salmonella. Existen aproximadamente 2.600 serovariedades diferentes de Salmonella. Dependiendo del antígeno y de la prueba utilizada, pueden producirse reacciones serológicas cruzadas entre diferentes serovariedades, por ejemplo, entre S. Typhimurium, S. Pullorum y S. Enteritidis. En algunos casos pueden producirse reacciones cruzadas como resultado de la exposición a microorganismos distintos de Salmonella.

##### **4.3.3.1. Prueba en sangre total**

Es una prueba rápida para la tifosis aviar y la pullorosis aviar que utiliza un antígeno teñido y puede utilizarse en la explotación. La sensibilidad de esta prueba es baja y, sin

experiencia, se pueden obtener muchos falsos positivos y falsos negativos. Esta prueba puede utilizarse en el diagnóstico de la infección por *S. Enteritidis* (*S. Enteritidis* posee el mismo antígeno somático del grupo D que *S. Pullorum/Gallinarum*), pero la sensibilidad es baja.

#### **4.3.3.2. Prueba rápida de aglutinación en porta**

Se mezcla a partes iguales suero y antígeno polivalente teñido con cristal violeta en un porta donde, al cabo de 2 minutos, se observará el resultado. Los sueros problema deben estar libres de contaminantes y de hemólisis. Si se sospecha la existencia de reacciones falsas positivas inespecíficas, los sueros positivos/sospechosos deben analizarse de nuevo después de su inactivación térmica.

#### **4.3.3.3. Prueba de Aglutinación sérica (SAT)**

La SAT es relativamente poco sensible, y muchos animales viejos tienen niveles bajos de aglutininas en sus sueros derivados de enterobacterias distintas a *Salmonella*. Las muestras aisladas carecen de valor diagnóstico excepto como muestras para el cribado inicial a nivel de rebaño. Se necesitan muestras pareadas como requisito mínimo para confirmar una infección activa. La prueba es relativamente barata, los antígenos se pueden preparar con facilidad y no se requiere un equipo costoso. La SAT se puede adaptar a formato de microtitulación y se puede utilizar para determinar títulos somáticos o flagelares.

Este método se ha utilizado para la identificación de la exposición a distintos serotipos de *Salmonella*, como *S. Typhimurium*, *S. Enteritidis*, *S. Dublin*, *S. diarizonae* en pavos y *S. Abortusequi*.

#### **4.3.3.4. Enzimoimmunoanálisis**

En los últimos años se han desarrollado otras pruebas, como las de tipo ELISA, para el diagnóstico de las infecciones por *S. Enteritidis* y *S. Typhimurium* en aves de corral y para otras serovariedades de animales de producción.

Los ELISA se han utilizado con eficacia para identificar serológicamente ganado bovino portador de *S. Dublin* y se pueden aplicar a la leche sin envasar para detectar la enfermedad en ganado lechero estabulado. En Dinamarca, Alemania, Holanda, el Reino Unido y algunos otros países se utiliza un ELISA que incluye antígenos somáticos de una mezcla de serovariedades ("ELISA mixto") para muestras de suero (en explotaciones) o líquido tisular liberado por congelación y descongelación de muestras de músculo (en matadero) para detectar infecciones por *Salmonella* en cerdos. Este ELISA contiene los antígenos "O" del LPS de *S. Typhimurium* y *S. Cholerasuis*, lo que capacita a la prueba para detectar serológicamente el 95% de los serogrupos de *Salmonella* hallados en cerdos

en la mayoría de los países europeos. Se puede utilizar una prueba similar para detectar anticuerpos contra *S. Enteritidis* y *S. Typhimurium* en la yema de huevo de parvadas de ponedoras comerciales no vacunadas.

Se han desarrollado dos sistemas ELISA para la detección de IgG (IgY) específica contra *S. Enteritidis*: el ELISA indirecto y el ELISA de competición “tipo sándwich”.

Ambos sistemas presentan ventajas y desventajas. La prueba indirecta es más simple y hay reactivos disponibles para todos los serotipos de *Salmonella* de pollos, pavos, patos y mamíferos. El ELISA de competición se puede aplicar a todas las especies animales y, en general, ofrece mayor especificidad. Sin embargo, no hay reactivos comercializados para todos los serotipos. También hay algunos problemas de afinidad y puede ser menos sensible que las técnicas indirectas. En condiciones de campo, ambos sistemas han producido falsos positivos y en algunos casos el análisis con un ELISA indirecto para LPS puede confirmarse después con un ELISA de competición para flagelos. Esta combinación se ha utilizado para diferenciar la infección natural por *S. Enteritidis* de una respuesta a la vacuna *S. Gallinarum* 9R, que carece de antígenos flagelares.

Ambos tipos de prueba pueden utilizarse con suero, yema de huevo o sangre seca eluída de discos de papel de filtro.

Los ELISA ya están adaptados a la automatización y, por tanto, a programas de muestreo a gran escala. En cualquier caso, cualquier ELISA debe validarse mediante pruebas internacionales coordinadas antes de adoptarse a efectos de vigilancia.

## **BIBLIOGRAFÍA**

Capítulo 6.6 “Prevención, detección y control de las infecciones de aves de corral por Salmonella” del Código Sanitario para los Animales Terrestres de la OIE.

Capítulo 6.13 “Prevención y control de Salmonella en los sistemas comerciales de producción de bovinos” del Código Sanitario para los Animales Terrestres de la OIE.

Capítulo 6.14 “Prevención y control de Salmonella en los sistemas comerciales de producción de cerdos” del Código Sanitario para los Animales Terrestres de la OIE.

Capítulo 3.10.7 Salmonelosis. Manual de las Pruebas de Diagnóstico y de las Vacunas para los Animales Terrestres 2018.

Programa Nacional de Control de determinados serotipos de Salmonella en gallinas reproductoras de la especie Gallus gallus. 2022. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación.

Programa Nacional de Control de determinados serotipos de Salmonella en gallinas ponedoras de la especie Gallus gallus. 2022. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación.

Programa Nacional de Control de determinados serotipos de Salmonella en pollos de engorde de la especie Gallus gallus. 2022. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación.

Programa Nacional de Control de determinados serotipos de Salmonella en pavos de engorde y reproducción. 2022. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación.

El Programa de Vigilancia y Control de Salmonella Pullorum y S. Gallinarum en establecimientos que tienen aves de corral. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación.

Jajere SM (2019) A review of Salmonella enterica with particular focus on the pathogenicity and virulence factors, host specificity and antimicrobial resistance including multidrug resistance, Veterinary World, 12(4):504-521.

Capítulo 1.1.3 Transporte de material biológico. Manual de las Pruebas de Diagnóstico y de las Vacunas para los Animales Terrestres 2021.

**MATERIAL PARA LA PREPARACIÓN DEL TEMA 51**

**PERINEUMONÍA CONTAGIOSA BOVINA Y OTRAS ENFERMEDADES POR MYCOPLASMA SPP. DE IMPORTANCIA EN SANIDAD ANIMAL. MARCO LEGAL. DIAGNÓSTICO DE LABORATORIO.**

*Este material no tiene carácter oficial, por lo que en ningún caso vinculará al Tribunal Calificador. Constituye, únicamente, un instrumento complementario que servirá de apoyo al opositor para enfocar cada uno de los epígrafes, pero nunca de forma exclusiva ni excluyente. El Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación no se hace responsable del contenido del mismo.*

*Los materiales no serán objeto de actualización constante.*

## **ÍNDICE**

### **1. PERINEUMONÍA CONTAGIOSA BOVINA**

- 1.1. ETIOLOGÍA
- 1.2. CLÍNICA Y PATOGENIA
- 1.3. EPIDEMIOLOGÍA
  - 1.3.1. Distribución
  - 1.3.2. Transmisión
- 1.4. PROFILAXIS

### **2. MARCO LEGAL**

- 2.1. NORMAS INTERNACIONALES
- 2.2. NORMAS COMUNITARIAS (UE)
- 2.3. NORMAS NACIONALES

### **3. DIAGNÓSTICO LABORATORIAL**

- 3.1. DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL
- 3.2. REQUISITOS PARA ENVÍO DE MUESTRAS AL LABORATORIO
- 3.3. TÉCNICAS DE DIAGNÓSTICO
  - 3.3.1. Diagnóstico serológico
  - 3.3.2. Diagnóstico microbiológico
  - 3.3.3. Diagnóstico molecular

### **4. OTRAS ENFERMEDADES POR MYCOPLASMA SPP. DE IMPORTANCIA EN SANIDAD ANIMAL**

- 4.1. PLEURONEUMONÍA CONTAGIOSA CAPRINA
- 4.2. MICOPLASMOSIS AVIAR

## 1. PERINEUMONÍA CONTAGIOSA BOVINA.

La Perineumonía Contagiosa Bovina (PCB) es una enfermedad infectocontagiosa de los rumiantes (géneros *Bos* y *Bubalus*) conocida en Europa desde el siglo XVI. Se considera una enfermedad “antigua”, aunque se sabe poco sobre su origen exacto. Estudios de datación molecular sugieren su aparición alrededor del año 1700. Este origen resultó de la adaptación de una cepa que se encuentra con frecuencia en las cabras, a un nuevo huésped, el ganado bovino. Durante mucho tiempo, la enfermedad permaneció confinada en los Alpes centro-orientales, que representan la cuna de la PCB. Sin embargo, en la segunda mitad del siglo XIX alcanzó una distribución mundial atribuida al aumento en el mercado internacional de ganado vivo. En 1898 Nocard y Roux, fueron los primeros en aislar el agente causal. A comienzos del siglo XX se erradicó en muchos países mediante políticas de segregación y sacrificio, sin embargo, actualmente persiste en el África subsahariana. En Europa, los últimos casos de PCB se observaron en Portugal en 1999.

### 1.1 ETIOLOGÍA

La PCB es una enfermedad causada por *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* SC (MmmSC)<sup>1</sup>. *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* SC pertenece al grupo o cluster *Mycoplasma mycoides*, que comprende cinco especies de micoplasmas de origen bovino y caprino estrechamente relacionadas:

- ***Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* SC: causante de Perineumonía Contagiosa Bovina.**
- *Mycoplasma mycoides* subsp. *capri*: una de las especies causantes de Agalaxia Contagiosa. Se considera equivalente al antiguamente denominado *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* LC<sup>2</sup>
- *Mycoplasma capricolum* subsp. *capricolum*: otra de las especies causantes de Agalaxia Contagiosa.
- *Mycoplasma capricolum* subsp. *capripneumoniae*: causante de la Pleuroneumonía Contagiosa Caprina.
- *Mycoplasma leachii*: productor de neumonitis, mastitis, artritis y abortos en vacas lecheras. Antiguamente *Mycoplasma* sp. bovine group 7 of Leach.

Estas cinco especies de micoplasmas comparten características serológicas y genéticas que provocan problemas taxonómicos y de diagnóstico con las técnicas convencionales. El micoplasma más estrechamente relacionado con MmmSC es *M. mycoides* subsp. *capri* (Mmc), a partir del cual evolucionó por adaptación a una nueva especie hospedadora.

El género *Mycoplasma* está colocado taxonómicamente en la Clase Mollicutes, una clase de procariontes muy pequeños (0,2 a 0,3 µm de diámetro) que carecen de pared celular. Debido a esto presentan pleomorfismo, pudiendo aparecer como cuerpos cocoides, filamentos y

<sup>1</sup> SC= Small Colonies o colonias pequeñas

<sup>2</sup> LC= Large Colonies o colonias grandes

estructuras en forma de botella. Las células sólo están rodeadas por una membrana rica en esteroides. Esta característica las diferencia de otras bacterias. Además, estos esteroides son adquiridos por el microorganismo a partir del medio en el que se desarrolla, siendo incapaz de sintetizarlos por sí mismo. Los micoplasmas, no se tiñen con las tinciones habituales debido a la carencia de pared celular. Presentan un genoma pequeño, caracterizado por un único cromosoma circular de ADN de doble cadena de 0,6 a 1,4 millones de pares de bases (MmmSC: 1,2 millones de pares de bases aprox.) en el que faltan los genes que codifican para una pared celular compleja y abundan las secuencias de inserción.

Casi todas las especies de micoplasmas son anaerobias facultativas. Su velocidad de crecimiento en medio de cultivo líquido y en agar específico para *Mycoplasma* es variable dependiendo de la especie. Los micoplasmas producen colonias características en las que el centro de la colonia crece hacia el interior del agar y parece más denso, lo que da el aspecto de un "huevo frito" invertido.

Dentro de este género se incluyen más de 100 especies, entre las que se encuentran especies patógenas y especies saprofitas que en condiciones normales no generan enfermedad, pero en algunas especies, en determinadas circunstancias, se pueden convertir en patógenos oportunistas.

## 1.2. CLÍNICA Y PATOGENIA

La PCB puede cursar desde formas hiperagudas hasta formas subclínicas, en las que la infección no presenta sintomatología. En todo caso, los signos clínicos que aparecen no pueden diferenciarse específicamente de otras patologías.

El periodo de incubación es variable, desde 3 semanas a 6 meses. Los periodos de incubación largos junto con los cuadros subclínicos en los que no se aprecia sintomatología propician el asentamiento de la enfermedad en el rebaño.

Los signos clínicos dependen en gran medida de la virulencia de la cepa y de la susceptibilidad del hospedador. De hecho, se ha descrito mayor virulencia en las variantes africanas que en las europeas.

En la forma **hiperaguda**, típica de brotes epidémicos, los animales mueren repentinamente debido al derrame pleural y pericárdico sin más signos clínicos que la fiebre. La forma **aguda** de la enfermedad puede cursar con anorexia, fiebre y signos de distrés respiratorio severo que se ven acentuados con el ejercicio. Los animales muestran taquipnea, dolor al respirar, tos, edema subcutáneo, descargas nasales y ptialismo. En este momento el agente causal se puede transmitir rápidamente. Debido a la dificultad respiratoria, el animal afectado suele mantenerse con la boca abierta, la cabeza baja y en extensión, el lomo levemente arqueado y los miembros hacia afuera. En los casos en que la enfermedad progresa rápidamente, el estado del animal se deteriora y la respiración es más difícil, con un gruñido al espirar. Los animales yacen tumbados y en los casos severos mueren entre 1 y 3 semanas después.

En las formas **subaguda a crónica**, típica de zonas endémicas, los animales afectados se recuperan parcialmente tras un periodo de tres o cuatro semanas, pudiendo ser capaces de propagar la enfermedad al actuar como portadores inaparentes. En la forma crónica, el agente puede persistir a largo plazo. Los signos clínicos menguan y los animales infectados son más difíciles de detectar. Se puede observar emaciación y tos, especialmente cuando el animal se alza o realiza ejercicio. Estos animales pueden actuar como portadores, presentando una aparente mejoría o curación, aunque el agente no se elimina por completo.

Dentro de la patogenia de la PCB, la penetración del agente se realiza a través de las mucosas respiratorias por inhalación de aerosoles contaminados. MmmSC presenta tropismo por las células no ciliadas que recubren los bronquiolos y los alveolos utilizando el epitelio respiratorio para su multiplicación. Durante mucho tiempo, los micoplasmas se han considerado parásitos extracelulares que se adhieren a la membrana de la célula huésped para adquirir nutrientes. Sin embargo, esta teoría ha sido ampliamente desmentida. El desarrollo de modelos de estudio in vitro y el uso de las tecnologías microscópicas más sofisticadas han podido desvelar una creciente lista de micoplasmas, incluyendo MmmSC, capaces de internarse en células no fagocíticas como estrategia defensiva, para escapar de la respuesta inmune y de algunos fármacos antimicrobianos.

Tras la colonización de bronquiolos y alveolos, pasa a invadir los vasos sanguíneos y linfáticos, demostrando un claro tropismo por las células endoteliales y estimulando la producción de trombos. A partir de aquí puede difundir al tejido intersticial, pleura, mediastino y ganglios linfáticos regionales. El micoplasma, vehiculado en los macrófagos, es susceptible de diseminación sistémica, especialmente en animales jóvenes. Aunque presenta un marcado tropismo por el tejido intersticial, parénquima pulmonar y serosa pleural, en las formas sistémicas puede asentarse en otras localizaciones como articulaciones y riñón. La eliminación se produce a través de los exudados respiratorios y a veces de la orina.

Las lesiones características que se observan son principalmente a nivel de la cavidad torácica, con bronconeumonía fibrinosa, que se extiende a la pleura. En cuadros agudos se puede observar abundante derrame pleural (litros) con depósitos de fibrina en ambas capas de la pleura, la cual se encuentra muy engrosada y de color amarillento. En los cuadros crónicos la pleuritis da lugar a adherencias entre el pulmón y la pared torácica. La neumonía provocada por MmmSC suele ser unilateral, afectando a uno o varios lóbulos del pulmón y con tendencia a la afectación del lóbulo caudal. Durante las fases tempranas, el pulmón tiene aspecto "marmoleado" debido al tejido sano entremezclado con tejido hepatizado. Se puede observar congestión y edema pulmonar y un engrosamiento de los septos interlobulillares debido a la proliferación de tejido fibroso. A medida que avanza el cuadro patológico, se presentan las características lesiones denominadas secuestros que consisten en focos de necrosis rodeados por una cápsula fibrosa. Estos secuestros pueden contener el agente viable pudiendo ser liberado bajo determinadas circunstancias.

## **1.3 EPIDEMIOLOGÍA**

### **1.3.1. Distribución**

La PCB es una enfermedad que en el pasado ha conseguido llegar a extenderse por todo el mundo (Europa, EE. UU., Australia, África, Asia) con la únicas excepciones de América del Sur y Madagascar. Durante el siglo XX, la implementación de la vacunación masiva y Las estrategias de sacrificio sanitario permitieron la erradicación de la PCB de La mayoría de los países.

En Europa, la enfermedad reapareció en la Península Ibérica alrededor de 1950, aunque la fecha exacta se desconoce. A partir de 1984, se produjeron brotes de PCB en algunos países mediterráneos (Portugal, Francia, Italia y España). En concreto, en España se produjeron dos focos importantes en las provincias de Segovia y Madrid en el año 1989. Finalmente, España es declarada libre de PCB por la Comisión cinco años después, en 1994. La PCB es erradicada en Europa en 1999, registrándose el último brote en Portugal.

En la actualidad, la PCB es endémica en muchos países del África subsahariana, donde se reduce considerablemente la rentabilidad de la ganadería. Poco se sabe de su presencia en Asia. Actualmente, India y China están oficialmente libres de PCB, mientras que la enfermedad no ha sido reportada en muchos otros países asiáticos. Junto con la fiebre aftosa, la PCB se considera actualmente la amenaza transfronteriza más grave para la ganadería, estando excluidos del comercio internacional de animales vivos los países infectados por esta enfermedad. Se estima que el costo de la PCB, atribuido a la mortalidad, la reducción de la producción ganadera y los esfuerzos de control de enfermedades alcanza los 44,8 millones de euros/año (3,7 millones de euros por país) en países africanos endémicos.

### **1.3.2. Transmisión**

Una amplia gama de rumiantes domésticos y salvajes pueden ser susceptibles a la infección por MmmSC, pero solo los bovinos (*Bos taurus*) y el ganado cebuino (*Bos indicus*) juegan un papel relevante en la epidemiología de la PCB, considerándose huéspedes naturales y reservorios principales. Los búfalos (*Bubalus bubalis*) y el yak (*Bos grunniens*) también son susceptibles a la infección, aunque en menor medida. La PCB no es considerado agente zoonótico, por lo que el ser humano no es susceptible a esta enfermedad.

En condiciones de campo, la transmisión eficiente de MmmSC depende del contacto prolongado y directo entre animales susceptibles y animales infectados (individuos clínicamente afectados o portadores subclínicos), que excretan activamente el patógeno a través de gotitas infectadas en aerosol. La transmisión PCB a largas distancias (algunos cientos de metros) es excepcional. En cambio, la infección se fomenta cuando la concentración de animales aumenta, tanto en la explotación o establo como en los camiones durante el transporte. Aunque MmmSC puede sobrevivir en los secuestros pulmonares durante meses, el papel epidemiológico que juegan los bovinos con estas lesiones no se ha demostrado claramente y podría ser cuestionable.

Experimentalmente, puede ocurrir la transmisión vertical (infección transplacentaria), y el agente puede detectarse en orina o semen. Sin embargo, la importancia real de estas rutas de transmisión es despreciable.

Asimismo, la transmisión indirecta a través de pastos, agua, forrajes y fómites contaminados es irrelevante por la baja resistencia de MmmSC en el medio.

Por lo tanto, el mayor riesgo de la introducción de la infección MmmSC en una región libre de PCB se basa principalmente en el comercio y el movimiento de animales infectados.

#### 1.4. PROFILAXIS

Como se indicó anteriormente, MmmSC es poco resistente en el medio ambiente y por tanto, su supervivencia depende estrictamente de la infección de animales susceptibles. Considerando eso, el control de la enfermedad en áreas libres de PCB se basa en los siguientes puntos:

- Prohibición de importar ganado de países infectados.
- Controlar medidas en las fronteras.
- Establecer periodos de cuarentena ante sospechas.

La Vigilancia para la detección de la enfermedad en animales afectados puede ser muy eficaz con la inspección de lesiones en los mataderos. El objetivo debe ser la detección temprana de focos con aplicación de políticas estrictas de sacrificio sanitario de todos los animales clínicamente afectados y aquellos susceptible que hayan estado en contacto.

En la mayoría de las áreas endémicas de PCB, el manejo de la enfermedad es realmente un reto, principalmente debido a la ausencia de identificación animal y a la dificultad de restringir y controlar el movimiento de los animales.

En estas áreas, la OIE recomienda 2 vacunas atenuadas, ambos derivados de la cepa T1 de Tanzania: T1sr y T1/44. La segunda ha demostrado ser más eficaz, aunque proporciona una protección inmunológica a corto plazo (<1 año) y puede producir reacciones adversas. Por otro lado, la cepa atenuada Ben-1 ha resultado ser útil para erradicar la PCB en China.

Se han realizado numerosos esfuerzos para tratar de desarrollar nuevas vacunas. Sin embargo, se necesitan una mejor comprensión de la inmunología de la PCB unido a estudios adicionales sobre formulaciones de la vacuna para lograr una mayor eficacia, seguridad y vacunas más baratas que posiblemente podrían permitir la discriminación de animales infectados y vacunados (vacunas DIVA).

El uso de antimicrobianos está prohibido cuando existen programas oficiales de erradicación, pero es una práctica común para tratar los casos de PCB en el África subsahariana. Varios estudios han demostrado la eficacia terapéutica de tetraciclinas, macrólidos y fluoroquinolonas. Sin embargo, la creciente preocupación por la resistencia a los antimicrobianos y la posibilidad de aumentar el número de bovinos con secuestros persistentemente infectados hacen cuestionable esta estrategia de control.

## 2. MARCO LEGAL

### 2.1. NORMAS INTERNACIONALES

A nivel internacional, las normas se recogen en el Capítulo 11.5 “Infección por *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* SC (Perineumonía Contagiosa Bovina)” del Código Sanitario para los Animales Terrestres de la OIE.

A efectos del Código Terrestre, un caso de perineumonía contagiosa bovina designa un animal infectado por *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* SC (MmmSC) y la ausencia de perineumonía contagiosa bovina designa la ausencia de infección por MmmSC, considerando como animales susceptibles a los bovinos (*Bos indicus*, *B. Taurus* y *B. grunniens*) y los búfalos (*Bubalus bubalis*).

El capítulo define el mecanismo por el cual un país o una zona se pueden considerar libres de infección por miembros MmmSC, la forma obtención de ese estatus, el mecanismo de mantenimiento y de restitución del estatus en caso de un aparecer un brote de PCB.

También incluye las recomendaciones para las importaciones, tanto de países libres de PCB como de países que no lo son, de bovinos, búfalos y semen, ovocitos o embriones procedentes de los mismos.

Además, se incluyen medidas referentes a la Vigilancia, en cuanto a condiciones, métodos y estrategias y consideraciones acerca de un Programa oficial de control de la PCB validado por la OIE.

### 2.2. NORMAS COMUNITARIAS (UE)

Durante muchos años, el marco reglamentario básico ha sido la Directiva 64/432/CEE, de 26 de junio de 1964, y sus modificaciones, relativa a problemas de policía sanitaria en materia de intercambios intracomunitarios de animales de la especie bovina y porcina, que establecía las pautas generales de actuación en los intercambios intracomunitarios de los animales de reproducción, producción o abasto de las especies bovina y porcina.

Con la entrada en vigor del Reglamento (UE) 2016/429, conocido como “Ley de sanidad animal europea”, ha quedado derogada gran parte de la normativa en materia de sanidad animal, entre la que se encuentra la Directiva anterior y todas sus modificaciones.

En este nuevo marco jurídico la PCB se ha categorizado como una enfermedad de “categoría A” (Reglamento de Ejecución (UE) 2018/1882 de la Comisión). Esta incluye a enfermedades que no están presentes normalmente en la UE y para las que deben tomarse medidas de erradicación inmediatas tan pronto como se detecte su existencia.

Además, el Reglamento de Ejecución (UE) 2018/1882, categoriza la PCB como de tipo “D”, lo que implica la adopción de medidas para evitar su propagación en relación con su introducción en la Unión o con desplazamientos entre Estados miembros.

Por último, el Reglamento de Ejecución (UE) 2018/1882, categoriza la PCB como de tipo “E”, por lo que la UE deberá establecer medidas de vigilancia.

Es importante destacar que la clasificación de la PCB en la categorías A, D y E incluye la infección causada por miembros del MmmSC en *Bison ssp.*, *Bos ssp.*, *Bubalus ssp.* y *Syncerus cafer*.

Infección por <i>Mycoplasma mycoides</i> subespecie <i>mycoides</i> SC (perineumonía contagiosa bovina)	A+D+E	<i>Bison ssp.</i> , <i>Bos ssp.</i> , <i>Bubalus ssp.</i> y <i>Syncerus cafer</i>
---	-------	---

Por otro lado, los nuevos Reglamentos Delegados que desarrollan los aspectos concretos para el diagnóstico, la obtención del estatus sanitario de oficialmente libre (tanto de países y/o regiones como de rebaños), las posibilidades de diagnóstico etc., son el Reglamento Delegado (UE) 2020/689 de la Comisión, de 17 de diciembre de 2019, por el que se completa el Reglamento (UE) 2016/429 del Parlamento Europeo y del Consejo en lo referente a las normas de vigilancia, los programas de erradicación y el estatus de libre de enfermedad con respecto a determinadas enfermedades de la lista y enfermedades emergentes y el Reglamento Delegado (UE) 2020/688 de la Comisión, de 17 de diciembre de 2019, por el que se completa el Reglamento (UE) 2016/429 del Parlamento Europeo y del Consejo en lo referente a los requisitos zoonosarios para los desplazamientos dentro de la Unión de animales terrestres y de huevos para incubar.

Además, debido a su clasificación como Categoría A, el Reglamento Delegado (UE) 2020/687 de la Comisión, por el que se completa el Reglamento (UE) 2016/429 del Parlamento Europeo y del Consejo en lo referente a las normas relativas a la prevención y el control de determinadas enfermedades de la lista, establece normas complementarias para el control de estas enfermedades animales.

### 2.3 NORMAS NACIONALES

A escala nacional, en el año 2003 se publicó la Ley 8/2003, de 24 de abril de sanidad animal en la que se desarrollan legalmente en España todos los mecanismos para vigilar y controlar las enfermedades de los animales, y para garantizar la salud pública y la seguridad alimentaria. El Real Decreto 2611/1996, de 20 de diciembre, y sus modificaciones, por el que se regulan los Programas nacionales de erradicación de enfermedades de los animales, tiene por objeto establecer las normas para la elaboración, planificación, coordinación, seguimiento y evaluación de los programas nacionales de erradicación de enfermedades de los animales que serán de obligado cumplimiento en todo el territorio del Estado.

El Real Decreto 1440/2001, de 21 de diciembre, por el que se establece el sistema de alerta sanitaria veterinaria, crea el Comité Nacional del Sistema de Alerta Sanitaria Veterinaria, con la participación de todas las Comunidades Autónomas, siendo sus funciones estudiar las medidas para la erradicación y control de las enfermedades objeto de los programas nacionales de erradicación.

En este sentido, el MAPA ha elaborado:

- **Plan Coordinado Estatal de Alerta Sanitaria Veterinaria** que incluye diversas enfermedades, entre las que se encuentra la PCB, con el objetivo de tener establecidos los protocolos de organización y actuación de forma previa a la aparición de un brote de estas enfermedades.
- Este Plan debe ser utilizado junto al **Plan de Contingencia y Manual Práctico de Operaciones en la lucha contra la PCB**, que ofrece una guía de trabajo a los Servicios Veterinarios Oficiales (SVO) en caso de sospecha y confirmación de un foco de PCB.

En lo que respecta a la notificación, la PCB es una enfermedad de declaración obligatoria en España, según el Real Decreto 526/2014, por el que se establece la lista de las enfermedades de los animales de declaración obligatoria y se regula su notificación.

Por otra parte, España es libre de PCB en el seno de la UE desde el año 1994. Con el fin de mantener este estatus sanitario, se realizan medidas de vigilancia y prevención, que se contemplan en el **Programa Nacional de Vigilancia de la PCB 2021-2025**, acorde con las directrices marcadas por la OIE. Entre las medidas contempladas están:

- Vigilancia específica, basada en la mayor probabilidad de presencia de la infección en determinados lugares o determinadas especies, en los resultados de las inspecciones consecutivas al sacrificio y en una vigilancia clínica activa. La vigilancia consistirá en someter a las pruebas de detección de la enfermedad a una muestra de la población diana. El programa prevé la obtención de falsas reacciones positivas, por lo que dispone de un procedimiento de seguimiento de los resultados positivos basado en pruebas suplementarias, investigaciones clínicas y exámenes post mortem.
- Vigilancia clínica en la explotación, que junto a las pruebas de laboratorio resolverán los casos sospechosos de PCB.
- Vigilancia sistemática en matadero, de las lesiones patológicas asociadas a PCB, que deberán ser confirmadas en el laboratorio.
- Realización de pruebas diagnósticas: el Programa define la realización del diagnóstico serológico mediante la técnica de Fijación de Complemento, con el antígeno de Campbell y Turner y los sueros controles elaborados y suministrados por el LNR de Santa Fe. El diagnóstico microbiológico (aislamiento e identificación del agente etiológico) se deberá realizar en caso de sospecha pudiendo recurrir a la PCR (diagnóstico molecular) para la identificación a partir de cultivo, por ser una prueba rápida, específica y sensible.

### 3. DIAGNÓSTICO LABORATORIAL

#### 3.1. DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL

Otras enfermedades que pueden confundirse clínicamente con la PCB son la tripanosomiasis, infestaciones por vermes, pasteurelisis, neumonía por aspiración, equinocosis, actinobacilosis, tuberculosis y otras micoplasmosis (por ejemplo, *M. bovis*, *M. californicum*, *M.*

*bovigenitalium, M. bovirhinis, M. bovoculi, M. leachii, M. dispar, M. canadense, M. alkalescens, M. arginini, and M. wenyonii).*

Además, habrá que tener en cuenta el hecho de las reacciones cruzadas con otros micoplasmas que pueden ocurrir en el diagnóstico serológico de la PCB.

### 3.2. REQUISITOS PARA LA TOMA Y ENVÍO DE MUESTRAS AL LABORATORIO

Las **muestras de tejidos recogidas para aislamiento microbiológico** deben recogerse de forma aséptica en botes con cierre de rosca resistente al escape de fluidos (tipo duquesa) y enviarse al laboratorio sin seccionar para minimizar el riesgo de contaminaciones. 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, aunque la viabilidad de los micoplasmas se puede ver reducida.

Las **muestras de sangre para realización pruebas serológicas** deben recogerse en tubos sin anticoagulante y mantenerse a temperatura ambiente hasta la formación del coágulo, realizando el envío al laboratorio en condiciones de refrigeración (4°C).

Al transportar materiales biológicos, el remitente debe determinar si el material debe clasificarse como mercancía peligrosa o no. En caso de transportar muestras sospechosas de contener MmmSC viables, se deberían clasificar como Sustancia biológica perteneciente a la categoría B (UN3373) y seguir la instrucción de embalaje P650, de acuerdo con la Reglamentación sobre Materiales Peligrosos (DGR) de la Asociación Internacional de Transporte Aéreo (IATA). No obstante, para aquellas muestras para las cuales existe una probabilidad muy baja de que contengan agentes patógenos se pueden transportar clasificadas como muestras exentas, bajo la opinión de un profesional. En este caso, la muestra se transporta en un sistema de embalaje triple que evite toda posible fuga y que esté identificado con la frase “muestras de origen animal exentas”. En el caso de que el material transportado sean cultivos, dada la situación epidemiológica de la PCB en nuestro territorio y en el resto de la UE, podría valorarse el catalogar el transporte como Sustancia infecciosa que afecta a animales perteneciente a la categoría A (UN2900) y seguir la instrucción de embalaje P620.

### 3.3. TÉCNICAS DE DIAGNÓSTICO

#### 3.3.1. Diagnóstico serológico

Las pruebas serológicas tienen su utilidad en el diagnóstico a nivel de rebaño. A nivel individual pueden resultar engañosas, porque el animal se encuentre en las primeras fases de la enfermedad, que pueden durar varios meses, antes de que se produzcan los anticuerpos específicos, o porque esté en la fase crónica de la enfermedad, cuando muy pocos animales son seropositivos. Por otro lado, pueden tener lugar falsos positivos, principalmente por las reacciones serológicas cruzadas con otros micoplasmas, en particular otros miembros del grupo *M. mycoides*. La validez de los resultados debe confirmarse mediante un examen post-mortem

y bacteriológico, y repetición de pruebas serológicas con sangre obtenida en el momento del sacrificio.

La prueba de la fijación del complemento (FC) y los enzimoimmunoanálisis (ELISA) se recomiendan para los programas de cribado y de erradicación. La inmunotransferencia, altamente específica, es útil como prueba confirmativa, pero no es adecuada para el cribado masivo.

### 3.3.1.1. Prueba de Fijación de Complemento (FC) de Campbell y Turner

Esta técnica cuenta con varias fases, que resumidamente son las siguientes:

1. Inactivación de las proteínas del complemento del suero problema y los sueros control (positivo y negativo), para evitar interferencias. Distribución de los sueros inactivados: problema (1/10), control positivo (diluciones seriadas) y control negativo, en los pocillos correspondientes de la placa de microtitulación.
2. Exposición del suero problema y sueros control al antígeno previamente estandarizado.
3. Adición de una cantidad conocida de complemento, obtenido a partir de suero normal de cobaya.
4. Adición del sistema hemolítico, que consiste en una preparación de hemolisina (glóbulos rojos de oveja o SRBC, unidos previamente a anticuerpos anti-SRBC). Este sistema se usa como sistema revelador para evidenciar si ha quedado o no complemento libre en la fase anterior.

Tras la centrifugación de las placas, el análisis se lleva a cabo en base al porcentaje de fijación del complemento observado, teniendo en cuenta los puntos de corte establecidos.

En el caso de **una reacción positiva**, el complemento se fijará al complejo antígeno-anticuerpo generado en el paso 2, de forma que al añadir el sistema hemolítico no quede complemento libre para fijarse a él. Al centrifugar la placa se observará un botón rojo en el fondo, correspondiente a los glóbulos rojos sin lisar.

En el caso de **una reacción negativa**, el complemento no se fijará en el paso 2, sino que queda libre para fijarse a los eritrocitos del sistema hemolítico añadido en el paso 3, produciendo la lisis de los mismos. Al centrifugar la placa no se observa botón.

Para la realización de la técnica, se deben incluir **controles del complemento, del sistema hemolítico y del antígeno**. Estos controles, junto con **el suero control positivo y el suero control negativo**, deben utilizarse siempre en todas las placas de microtitulación o series de placas de microtitulación en que se utilicen los mismos lotes de reactivos.

Los factores más importantes en la realización de la prueba de FC son el control de todos los reactivos que intervienen y que se lleve a cabo por parte de personal formado y cualificado, ya que no es una prueba sencilla. La temperatura y los tiempos de incubación también deben controlarse cuidadosamente. Todo el procedimiento debe realizarse en una sala con control de la temperatura, a  $21^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$ . No pueden analizarse sueros contaminados ni hemolizados, puesto que ello interferiría con la reacción.

El Laboratorio Nacional de Referencia de Santa Fe (Granada) elabora y estandariza el Antígeno de Campbell y Turner para la FC a partir de la cepa PG1 de *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* SC y lo distribuye a todos los laboratorios oficiales de las CCAA junto con los sueros control necesarios para la técnica. El resto de los reactivos son adquiridos de forma comercial.

### **3.3.1.2. Enzimoimmunoanálisis de competición (C-ELISA)**

Actualmente, existe un C-ELISA validado a nivel internacional, de acuerdo con las normas de la OIE. Comparada con la prueba de FC, la prueba C-ELISA tiene una sensibilidad semejante pero una especificidad mayor.

Las pruebas de validación llevadas a cabo en varios países europeos y africanos indicaron:

- i. la comprobación de que la verdadera especificidad del C-ELISA es de al menos un 99,9%,
- ii. que la sensibilidad del C-ELISA y la de la fijación del complemento son semejantes,
- iii. que mediante el C-ELISA los anticuerpos se detectan muy poco tiempo después de que se puedan detectar mediante la prueba FC, y que los anticuerpos detectados mediante el C-ELISA persisten durante más tiempo.

Esta prueba de C-ELISA está disponible como kit comercial listo para ser utilizado, con todos los reactivos necesarios, incluidas las placas tapizadas. El punto de corte se ha fijado en el 50% y debe ser válido en cualquier país. No obstante, cada laboratorio debe establecer su propia incertidumbre de la medición de acuerdo con los requisitos de la norma ISO 17025.

### **3.3.1.3. Prueba de la Inmunotransferencia (IBT)**

La prueba de Inmunotransferencia o Inmunoblotting es una prueba inmunoenzimática en la que se utilizan tiras de nitrocelulosa a las que se han transferido 5 proteínas específicas de una cepa de MmmSC, separadas previamente mediante electroforesis en gel de poliacrilamida con gradiente del 5-15%. Las cinco bandas antigénicas específicas son las de 110, 98, 95, 62/60 y 48 kDa.

Los sueros problema y los sueros control (positivo y negativo) se ponen en contacto con las tiras de antígenos y tras la incubación la interacción antígeno-anticuerpo se hace visible mediante una reacción inmunoenzimática, debiendo comprobar si presentan el perfil básico de inmunotransferencia de IgG con las cinco bandas antigénicas que deben observarse en el suero control positivo. Las muestras que presenten un perfil de inmunotransferencia similar se consideran positivas para la PCB.

La IBT se ha desarrollado para confirmar resultados de FC o de C-ELISA dudosos ya que presenta una especificidad más alta que la prueba de FC, de tal modo que permite detectar falsos positivos de la FC. Sin embargo, esta técnica es bastante difícil de estandarizar porque existen muchos factores que pueden influir en el patrón de bandas final. Es importantísimo el estadio del cultivo de Mmm y la cepa que se haya escogido. Las cepas recientes de Mmm de origen europeo carecen de la banda de 98 kDa. Ello podría comportar resultados dudosos en animales

infectados por estas cepas. El Laboratorio de Referencia de la OIE de Portugal para la PCB puede suministrar tiras de antígeno, así como los sueros control positivo y negativo, previa petición.

### **3.3.2. Diagnóstico microbiológico**

El diagnóstico microbiológico deberá realizarse en todo caso para confirmar casos clínicos, ante sospechas por reacciones positivas en las pruebas serológicas y ante hallazgos de lesiones anatomopatológicas sospechosas en el matadero.

#### **3.3.2.1. Aislamiento bacteriológico**

El cultivo microbiológico tiene como principal objetivo el aislamiento del agente etiológico (MmmSC) a partir de las muestras clínicas de elección. Sin embargo, habrá que tener en cuenta que la obtención de un cultivo positivo confirma la presencia del agente causal de la infección, pero un resultado de cultivo negativo no es concluyente y sólo indica que no se ha podido conseguir el aislamiento.

Las muestras de elección en animales vivos son hisopos o secreciones nasales, lavados broncoalveolares o traqueales y líquido pleural tomado asépticamente por punción en la parte baja de la cavidad torácica, entre la séptima y octava costillas. Las muestras de una necropsia son los pulmones con lesiones, el líquido pleural, los ganglios linfáticos del tracto broncopulmonar y el líquido sinovial de los animales con artritis. Las muestras de pulmón deben tomarse de las lesiones situadas en la interfase entre el tejido enfermo y el normal.

Las muestras se cultivan en medios específicos para micoplasmas. Estos medios pueden utilizarse para el cultivo de casi cualquier especie de micoplasma. Existen medios deshidratados comerciales, como el caldo/agar infusión corazón y el caldo/agar PPLO (Pleuropneumonia-like organisms), que se deben suplementar con suero de caballo, extracto de levadura y ADN. Para evitar el crecimiento de otras bacterias, los medios también pueden contener inhibidores como el acetato de talio y antibióticos de la familia de las penicilinas, ya que los micoplasmas son resistentes al carecer de pared celular.

Los tubos y las placas son incubados a 37°C en una atmósfera que contenga un 5% de CO<sub>2</sub>, y se inspeccionan a diario durante un máximo de 10 días. Transcurrido este tiempo, si no hay crecimiento, la muestra se considera negativa. Las muestras positivas en medio líquido presentan una ligera turbidez homogénea, normalmente en un plazo de 2–4 días. Durante los siguientes días aparece una opacidad uniforme que forma remolinos cuando se agita. En medio sólido, las colonias se observan con lupa binocular de x25 o x40, y luz incidiendo en ángulo de 30-45º, o bien al microscopio óptico a x100. Son pequeñas (1 mm de diámetro) y presentan la forma clásica de “huevo frito” con un núcleo central más opaco que sobresale y se incrusta en el agar y una periferia regular más translúcida. En esta fase, pueden aplicarse las pruebas adicionales para identificar las colonias.

Tras el cultivo inicial se debe realizar una diferenciación con formas L (pleomórficas) de bacterias que han podido perder la pared celular debido a la presencia de inhibidores. Para ello se debe realizar un subcultivo en los medios de cultivo anteriores pero eliminando la presencia de inhibidores de los mismos.

Además, se debe establecer la diferencia con otro grupo de microorganismos muy relacionados que dan lugar a un crecimiento similar. Se trata del género *Acholeplasma spp.* Esta diferenciación se realiza en base a la sensibilidad a la digitonina, ya que *Mycoplasma spp.* presenta sensibilidad y por tanto inhibe su crecimiento en presencia de la misma, a diferencia de *Acholeplasma spp.* que es capaz de crecer.

El fenómeno de los cristales es una característica del cultivo que presentan algunas especies de micoplasmas. Consiste en la presencia de formaciones cristalinas dispuestas en películas o en manchas (en inglés, *film and spots*) que resultan de una lipasa excretada por el micoplasma, que hidroliza los lípidos del medio para formar jabones de calcio y magnesio en las proximidades de la colonia. Para evaluar su aparición, se realiza el cultivo del micoplasma problema en medio sólido y después de 3-4 días se revisan las placas para evidenciar los cristales con lupa hasta 2 semanas. Si después de estas semanas no se observan cristales, podemos descartar la formación de los mismos. MmmSC no tiene la capacidad de formar cristales.

Con frecuencia, las muestras clínicas contienen más de una especie de micoplasma, por lo que se considera necesario purificar las colonias por clonación antes de realizar la identificación bioquímica o inmunológica. Sin embargo, la clonación es un proceso largo que puede durar al menos 2 semanas.

### 3.3.2.2 Identificación bioquímica e inmunológica

Las **pruebas bioquímicas** tienen un valor limitado para la identificación de *Mycoplasma*, debido al solapamiento de los pocos rasgos fenotípicos que se pueden evaluar. Es por esto que se recomienda confirmar mediante métodos moleculares, como la PCR.

Las pruebas bioquímicas se llevan a cabo en 3 tubos con medios especiales que contienen los mismos ingredientes del caldo de cultivo básico, a los que se añade una solución de glucosa para comprobar la hidrólisis de glucosa, una solución de arginina-HCl para comprobar la hidrólisis de arginina, y una solución de cloruro de dimetil tetrazolio para comprobar la reducción del tetrazolio. A cada tubo se añadirá además un indicador de pH (por ejemplo, rojo fenol), que evidenciará las 3 reacciones bioquímicas. Para el estudio de la actividad fosfatasa, se elabora medio sólido al que se añade difosfato sódico y fenolftaleína. Tras realizar el cultivo, se evidenciará la actividad fosfatasa al añadir una solución de NaOH en la zona del crecimiento ya que la aparición de una coloración rosada pasados 30 segundos, indica positividad. Para la demostración de proteólisis, se realiza el cultivo en agar caseína y/o agar con suero coagulado.

MmmSC fermenta la glucosa, reduce las sales de tetrazolio (aeróbica y anaeróbicamente), no hidroliza la arginina, carece de actividad fosfatasa y no tiene actividad proteolítica, o esta es muy débil.

Una vez comprobadas las características bioquímicas, se debe realizar una de las siguientes **pruebas inmunológicas** para confirmar la identificación. Estas pruebas se fundamentan en la reacción antígeno-anticuerpo y en ellas el cultivo se enfrenta a un suero hiperinmune frente a la especie de micoplasmas de la que se sospecha.

- Prueba de inhibición del crecimiento en disco: la reacción se hará evidente por la presencia de un halo de inhibición alrededor de un disco impregnado en el suero complementario.
- Inmunofluorescencia indirecta: se aplican antisueros específicos a colonias en medio sólido. El antisuero homólogo permanece unido después de los lavados y se pone de manifiesto añadiendo una antiglobulina conjugada con fluoresceína, lavando a continuación, y observando las colonias con un microscopio de fluorescencia.
- Prueba de inmunodifusión en gel de agar: la reacción se hará visible como una línea de precipitación en aquella zona del agar donde se haya producido la reacción antígeno-anticuerpo, tras difundir cada uno estos desde diferentes pocillos horadados en el agar en los que se han depositado inicialmente.

### **3.3.3. Diagnóstico molecular**

La PCR se ha convertido en el método de elección para la identificación rápida y específica de MmmSC cuando el microorganismo se aísla de una muestra clínica. De momento no se han desarrollado métodos fiables para la detección del ADN de MmmSC directamente sobre las muestras clínicas.

Distintos autores han diseñado cebadores complementarios a las regiones de ADN CAP-21, el gen *lppA* y el gen de ARN de la región 16S del genoma de Mmm. Estos se han utilizado en sistemas de PCR, seguidos de un análisis del producto amplificado (amplicón) mediante endonucleasas de restricción (PCR-REA) o mediante una segunda amplificación (PCR anidada). Los métodos basados en la PCR no requieren la clonación de los cultivos, ya que estas pruebas pueden detectar los micoplasmas patógenos en cultivos mixtos, con el consiguiente ahorro de tiempo.

En cuanto a epidemiología molecular de la PCB, se destaca la utilización de MLST, que permite la identificación de cepas, análisis filogenético y datación molecular y la secuenciación masiva de genomas (WGS), que es indudablemente el método que más información ofrece para la caracterización de microorganismos.

## **4. OTRAS ENFERMEDADES POR MYCOPLASMA DE IMPORTANCIA EN SANIDAD ANIMAL**

El género *Mycoplasma* incluye una gran variedad de especies y subespecies, algunas de las cuales dan lugar a síndromes patógenos en animales. A continuación se muestran las enfermedades causadas por *Mycoplasma* spp. más destacadas en veterinaria:

<b>MYCOPLASMA</b>	<b>SÍNDROME PATÓGENO</b>	<b>ESPECIES RECEPTIVAS</b>	<b>CATEGORÍA</b> Reglamento de Ejecución (UE) 2018/1882
<i>M. agalactie</i>	Agalaxia contagiosa histórica	Ovinos, caprinos, cérvidos	
<i>M. capricolum subsp. capricolum</i>	Agalaxia contagiosa grave. Septicemia y poliartrosis en jóvenes	Caprinos, ovinos	
<i>M. putrefaciens</i>	Agalaxia contagiosa: mamitis, artritis, neumonía	Caprinos	
<i>M. mycoides subsp capri</i>	Agalaxia contagiosa: Neumonía, artritis, mamitis, etc.	Caprinos y ovinos (vestigialmente)	
<i>M. capricolum subsp capripneumoniae</i>	Pleuroneumonía contagiosa caprina	Caprinos	A+D+E (Ovis ssp., Capra ssp. y Gazella ssp.)
<i>M. mycoides subsp mycoides SC</i>	Perieumonía Contagiosa Bovina	Bovinos	A+D+E (Bison ssp., Bos ssp., Bubalus ssp. y Syncerus cafer)
<i>M. bovis</i>	Neumonía, mamitis	Bovinos	
<i>M. bovis genitalium</i>	Cervicitis, salpingitis, vaginitis, abortos	Bovinos	
<i>M. hyopneumoniae</i>	Neumonía enzootica porcina (tropismo respiratorio)	Porcino	
<i>M. hyosynoviae</i>	Artritis	Porcino	
<i>M. gallisepticum</i>	Micoplasmosis Aviar: Enfermedad crónica respiratoria en aves. Sinusitis infecciosa del pavo	Aves de corral y de canto	D+E (Gallus gallus y Meleagris gallopavo)
<i>M. meleagridis</i>	Micoplasmosis Aviar: Aerosaculitis del pavo	Pavo	D+E (Gallus gallus y Meleagris gallopavo)
<i>M. synoviae</i>	Micoplasmosis Aviar: Artritis, sinovitis, bursitis y procesos respiratorios	Aves de corral: pavos y gallinas	
<i>M. iowae</i>	Micoplasmosis aviar: Mortalidad embrionaria, condrodistrofia.	Pavos	
<i>M. subdolum</i>	Esterilidad	Equinos	
<i>M. equigenitalium</i>	Esterilidad	Equinos	

De todas ellas cabe hacer mención especial de la Pleuropneumonía Contagiosa Caprina y la Micoplasmosis Aviar.

#### 4.1. PLEURONEUMONÍA CONTAGIOSA CAPRINA (PCC)

Se trata de una enfermedad infecciosa muy contagiosa ocasionada por *Mycoplasma capricolum* subsp. *capripneumoniae* (Mccp), que afecta a los pequeños rumiantes produciendo un cuadro respiratorio grave y frecuentemente fatal. No se considera una enfermedad zoonótica.

Se distribuye principalmente en África y Asia, donde causa importantes pérdidas económicas y se encuentra recogida en la lista única de enfermedades de declaración obligatoria de la OIE. El ganado caprino se ha considerado el principal hospedador de la PCC. No obstante, se ha propuesto que tanto el ganado ovino como otros rumiantes silvestres podrían participar en la epidemiología de la enfermedad.

La sospecha clínica de PCC se basará en la presentación de una enfermedad muy contagiosa en ganado caprino con un cuadro febril (41°C o superior), dificultad respiratoria grave, alta morbilidad y mortalidad. Es una enfermedad estrictamente respiratoria que se presenta con una forma hiperaguda, aguda o crónica, esta última en las zonas endémicas. Las formas clínicas más severas se manifiestan en poblaciones sin contacto previo con Mccp o que no hayan sido inmunizadas.

La PCC presenta lesiones exclusivamente en el tracto respiratorio, caracterizadas por pleuroneumonía fibrinosa con hepatización unilateral, adherencias, pleuritis y acumulación de líquido pleural.

El Manual de las Pruebas de Diagnóstico y de las Vacunas para los Animales Terrestres 2019 de la OIE, indica que el diagnóstico de la PCC es complejo, y debe diferenciarse de una serie de patologías que clínicamente ocasionan cuadros muy similares como pueden ser la peste de los pequeños rumiantes (no presente en España) o la agalaxia contagiosa, endémica en España, y que cuenta actualmente con un programa nacional voluntario de vigilancia, control y erradicación en desarrollo.

En este sentido, el cultivo in vitro del agente y la utilización del diagnóstico molecular (PCR) son consideradas por la OIE como las técnicas ideales y recomendadas, para la identificación del agente de la PCC. La identificación serológica también es posible a partir de diversas técnicas, pero las reacciones cruzadas con otras especies de micoplasmas presentes en los animales infectados son frecuentes.

La PCC no se ha confirmado en territorio europeo, con la única excepción de la región turca de Tracia en donde se describió en 2003 y se presenta de forma endémica. Esta región, conocida como la Turquía europea, supone la puerta de entrada al continente y representa un riesgo de propagación de la PCC en Europa a partir de los países limítrofes como Grecia y Bulgaria. Además, la presencia de la PCC en las regiones orientales de Turquía amplía el riesgo de transmisión a Georgia y sur de Rusia.

El Reglamento de Ejecución (UE) 2018/1882 categoriza a la PCC como una de las enfermedades de *Ovis ssp.*, *Capra ssp.* y *Gazella ssp.* **con categorías A+D+E**, sobre la que es pertinente establecer medidas de vigilancia, prevención y control, así como medidas en las importaciones de animales desde terceros países y en los intercambios comerciales a escala de la UE para

evitar su propagación a regiones oficialmente libres. Es una enfermedad de declaración obligatoria, según el Real Decreto 526/2014.

En este sentido, el Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación ha publicado un Programa Nacional de Vigilancia de la PCB basado en **la vigilancia sindrómica**<sup>3</sup> de manera que, debido a la ausencia de la PCC en España y a las características clínicas de la enfermedad, deberán notificarse **todos los episodios clínicos con sintomatología respiratoria aguda** que afecte a diferentes grupos de edad en un colectivo caprino y/o ovino (o gacelas) con una morbilidad superior al 20%.

Además, se realizará **una vigilancia pasiva mediante la vigilancia sistemática en matadero** de la presencia de lesiones patológicas asociadas a la PCC y la identificación de todos los microorganismos pertenecientes al género *Mycoplasma spp.* que se aislen de rebaños de pequeños rumiantes participantes en el Programa nacional voluntario de vigilancia, control y erradicación de la agalaxia contagiosa ovina y caprina y en los que se presente sintomatología respiratoria.

#### 4.2. MICOPLASMOSIS AVIAR

La Micoplasmosis Aviar es reconocida mundialmente como una de las enfermedades de mayor impacto económico en la producción avícola intensiva, afectando a la fertilidad, a la viabilidad embrionaria, a la producción de huevos y a pérdidas de ganancia diaria de peso. No se considera una enfermedad zoonótica.

Las especies patógenas asociadas a esta enfermedad son *M. gallisepticum* (MG), agente causal de la Enfermedad Respiratoria Crónica (ERC) y *M. synoviae* (MS), involucrado también en afecciones respiratorias y responsable de la Sinovitis Infecciosa. Existen diversas cepas de *M. gallisepticum*, que afectan a diversos grupos de aves. Por otro lado, la especie *M. meleagridis* afecta exclusivamente al pavo.

Tanto las características propias de estos agentes como las del actual sistema avícola de producción intensiva dificultan el control, erradicación y mantenimiento de lotes de aves libres de micoplasmas.

Las lesiones generalmente incluyen sinusitis, traqueítis y aerosaculitis, aunque en casos complicados puede observarse engrosamiento y turbidez de los alvéolos, acumulaciones exudativas, pericarditis fibrinopurulenta y perihepatitis. En los pavos puede observarse sinusitis mucopurulenta grave con traqueítis y aerosaculitis.

Para la realización del diagnóstico, el cultivo in vitro del agente y la utilización del diagnóstico molecular (PCR), tanto a partir de cultivo como directamente de la muestra son consideradas por la OIE como las técnicas recomendadas. La serología tiene utilidad para demostrar la ausencia de infección en un colectivo, o para evaluar su prevalencia en el caso de que dicha

---

<sup>3</sup> El Sistema de Vigilancia Sindrómica es una importante herramienta para la vigilancia de brotes epidémicos en áreas de elevado riesgo de ocurrencia de brotes de enfermedades que cursan con signos y síntomas similares, complementando el Sistema de Vigilancia Epidemiológica basada en notificaciones de casos.

infección esté presente. Pero tiene un valor mucho más limitado a la hora de confirmar infecciones en individuos. Las pruebas de elección son **el ELISA y la prueba rápida de aglutinación sérica (RSA)**.

El Reglamento de Ejecución (UE) 2018/1882 clasifica a la micoplasmosis aviar en la lista de enfermedades **con categoría D+E** en *Gallus gallus* y *Meleagris gallopavo*, en las que deben adoptarse medidas para evitar su propagación en relación con su introducción en la UE o con desplazamientos entre EEMM y en las que se debe realizar una vigilancia. Además, se trata de una enfermedad de declaración obligatoria, según el Real Decreto 526/2014.

Según lo anterior, el Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación ha publicado un Programa de Vigilancia y Control de *Mycoplasma gallisepticum* y *Mycoplasma meleagridis* en establecimientos que tienen aves de corral, basado en medidas de bioseguridad (vacío sanitario entre lotes, cuarentenas, extremar medidas higiénicas, evitar contacto con animales silvestres), vacunación<sup>4</sup>.

---

<sup>4</sup> En España están aprobadas para su uso en pollos y pavos vacunas atenuadas en forma liofilizada (vía oral) tanto para *M. gallisepticum* (MG) como para *M. synoviae* (MS) y tratamiento con antibióticos como último recurso

## BIBLIOGRAFÍA

Capítulo 11.5 “Infección por *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* SC (Perineumonía Contagiosa Bovina)” del Código Sanitario para los Animales Terrestres de la OIE.

Capítulo 3.4.8 Perineumonía Contagiosa Bovina (Infección por *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides*). Manual de las Pruebas de Diagnóstico y de las Vacunas para los Animales Terrestres 2021.

Plan Coordinado Estatal de Alerta Sanitaria Veterinaria (2020). Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación.

Plan de Contingencia y Manual Práctico de Operaciones en la lucha contra la PCB (2020). Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación.

Programa Nacional de Vigilancia de la PCB 2021-2025. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación.

Westberg J, Persson A, Holmberg A, et al. The genome sequence of *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* SC type strain PG1T, the causative agent of contagious bovine pleuropneumonia (CBPP). *Genome Res.* 2004;14(2):221-227. doi:10.1101/gr.1673304.

Manso-Silván L, Vilei EM, Sachse K, Djordjevic SP, Thiaucourt F, Frey J. *Mycoplasma leachii* sp. nov. as a new species designation for *Mycoplasma* sp. bovine group 7 of Leach, and reclassification of *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* LC as a serovar of *Mycoplasma mycoides* subsp. *capri*. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2009 Jun;59(Pt 6):1353-8. doi: 10.1099/ijs.0.005546-0. PMID: 19502315.

Di Teodoro G, Marruchella G, Di Provvido A, D'Angelo AR, Orsini G, Di Giuseppe P, Sacchini F, Scacchia M. Contagious Bovine Pleuropneumonia: A Comprehensive Overview. *Vet Pathol.* 2020 Jul;57(4):476-489. doi: 10.1177/0300985820921818. Epub 2020 May 11. PMID: 32390522.

Capítulo 1.1.3 Transporte de material biológico. Manual de las Pruebas de Diagnóstico y de las Vacunas para los Animales Terrestres 2021.

Capítulo 3.7.4 Pleuroneumonía Contagiosa Caprina. Manual de las Pruebas de Diagnóstico y de las Vacunas para los Animales Terrestres 2018.

Programa nacional de vigilancia de la pleuroneumonía contagiosa caprina 2021-2025. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación.

Capítulo 3.3.5 Micoplasmosis Aviar (*Mycoplasma gallisepticum*, *M.synoviae*). Manual de las Pruebas de Diagnóstico y de las Vacunas para los Animales Terrestres 2021.

Programa de Vigilancia y Control de *Mycoplasma gallisepticum* y *Mycoplasma meleagridis* en establecimientos que tienen aves de corral. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación.

**MATERIAL PARA LA PREPARACIÓN DEL TEMA 52**

**AGALAXIA CONTAGIOSA OVINA Y CAPRINA. MARCO LEGAL. PROGRAMA NACIONAL VOLUNTARIO DE VIGILANCIA, CONTROL Y ERRADICACIÓN. DIAGNÓSTICO DE LABORATORIO.**

*Este material no tiene carácter oficial, por lo que en ningún caso vinculará al Tribunal Calificador. Constituye, únicamente, un instrumento complementario que servirá de apoyo al opositor para enfocar cada uno de los epígrafes, pero nunca de forma exclusiva ni excluyente. El Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación no se hace responsable del contenido del mismo.*

*Los materiales no serán objeto de actualización constante.*

## **ÍNDICE**

### **1. AGALAXIA CONTAGIOSA**

- 1.1. ETIOLOGÍA
- 1.2. CLÍNICA Y PATOGENIA
- 1.3. EPIDEMIOLOGÍA
  - 1.3.1. Distribución
  - 1.3.2. Transmisión
- 1.4. PROFILAXIS

### **2. MARCO LEGAL**

- 2.1. NORMAS INTERNACIONALES
- 2.2. NORMAS COMUNITARIAS (UE)
- 2.3. NORMAS NACIONALES

### **3. PROGRAMA NACIONAL VOLUNTARIO DE VIGILANCIA, CONTROL Y ERRADICACIÓN**

### **4. DIAGNÓSTICO LABORATORIAL**

- 4.1. DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL
- 4.2. REQUISITOS PARA ENVÍO DE MUESTRAS AL LABORATORIO
- 4.3. TÉCNICAS DE LABORATORIO
  - 4.3.1. DIAGNÓSTICO SEROLÓGICO
  - 4.3.2. DIAGNÓSTICO MICROBIOLÓGICO
  - 4.3.3. DIAGNÓSTICO MOLECULAR

## 1. AGALAXIA CONTAGIOSA

La Agalaxia Contagiosa (AC) es una enfermedad infectocontagiosa de los pequeños rumiantes (ovejas y cabras) conocida desde hace más de 200 años, siendo reportada en 1816 en Italia como “mal di sito”, debido a su capacidad para persistir en un medio y contaminar los nuevos rebaños introducidos en él. En 1923 se aisló por primera vez el agente etiológico “histórico” de la enfermedad (*Mycoplasma agalactiae*), que fue catalogado como un agente similar al de la Perineumonía Contagiosa Bovina, aunque el género *Mycoplasma* aún no estuviera establecido. Posteriormente, se conoció la naturaleza multi-etiológica de esta enfermedad tan compleja, que no solamente cursa con un descenso de la producción de leche, como se verá en epígrafes posteriores.

### 1.1 ETIOLOGÍA

La AC es una enfermedad en la que pueden estar involucrados 4 tipos diferentes (pero muy relacionados) de micoplasmas: *Mycoplasma agalactiae* (Ma) afecta tanto a ganado ovino como a caprino, mientras que *Mycoplasma mycoides* subsp. *capri* (Mmc), *Mycoplasma capricolum* subsp. *capricolum* (Mcc) y *Mycoplasma putrefaciens* (Mp) se consideran, patógenos del ganado caprino. Las infecciones mixtas en las que participan varias especies de micoplasmas han sido descritas, especialmente en entornos en los que se da la cría mixta de ambos tipos de hospedadores. La AC está muy relacionada con la Perineumonía Contagiosa Bovina (PCB) ya que dos de los cuatro agentes involucrados (Mmc y Mcc) pertenecen al mismo clúster que el agente causal de la PCB, el denominado clúster *Mycoplasma mycoides*, que comprende cinco especies de micoplasmas de origen bovino y caprino serológica y genéticamente relacionadas:

- ***Mycoplasma mycoides* subsp. *capri***: una de las especies causantes de Agalaxia Contagiosa. Se considera equivalente al antiguamente denominado *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* LC (Large Colonies).
- ***Mycoplasma capricolum* subsp. *capricolum***: otra de las especies causantes de Agalaxia Contagiosa.
- *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* SC: causante de Perineumonía Contagiosa Bovina.
- *Mycoplasma capricolum* subsp. *capripneumoniae*: causante de la Pleuroneumonía Contagiosa Caprina.
- *Mycoplasma leachii*: productor de neumonitis, mastitis, artritis y abortos en vacas lecheras. Antiguamente *Mycoplasma* sp. bovine group 7 of Leach.

El género *Mycoplasma* está colocado taxonómicamente en la Clase Mollicutes, una clase de procariotas muy pequeños (0,2 a 0,3  $\mu\text{m}$  de diámetro) que carecen de pared celular. Debido a esto presentan pleomorfismo, pudiendo aparecer como cuerpos cocoides, filamentos y estructuras en forma de botella. Las células sólo están rodeadas por una membrana rica en esteroides. Esta característica las diferencia de otras bacterias. Además, estos esteroides son adquiridos por el microorganismo a partir del medio en el que se desarrolla, siendo incapaz de sintetizarlos por sí mismo. Los micoplasmas, no se tiñen con las tinciones habituales debido a la carencia de pared celular. Presentan un genoma pequeño, caracterizado por un único

cromosoma circular de ADN de doble cadena de 0,6 a 1,4 millones de pares de bases, aprox., en el que faltan los genes que codifican para una pared celular compleja.

Casi todas las especies de micoplasmas son anaerobias facultativas. Su velocidad de crecimiento en medio de cultivo líquido y en agar específico para Mycoplasma es variable dependiendo de la especie. Los micoplasmas producen colonias características en las que el centro de la colonia crece hacia el interior del agar y parece más denso, lo que da el aspecto de un “huevo frito” invertido.

Dentro de este género se incluyen más de 100 especies, entre las que se encuentran especies patógenas y especies saprofitas que en condiciones normales no generan enfermedad pero algunas de ellas, en determinadas circunstancias, se pueden convertir en patógenos oportunistas.

## 1.2 CLÍNICA Y PATOGENIA

La AC se puede presentar bajo dos formas clínicas que se caracterizan por un breve periodo de incubación, entre los 7 días y los dos meses.

La enfermedad puede aparecer con **curso agudo** con fiebre y ocasionalmente la muerte. Aunque suele ser bastante raro, en las zonas libres, la enfermedad presenta una mayor morbilidad y mortalidad en los cabritos.

Lo más frecuente es la aparición de un **cuadro subagudo** caracterizado por mastitis, artritis y queratoconjuntivitis, en el que rara vez están presentes todos los signos a la vez en el mismo animal, o incluso en el mismo rebaño.

La infección da comienzo con una mastitis intersticial que desemboca en una ubre hinchada y dolorosa y en una caída repentina en la cantidad y la calidad de la leche producida. La leche puede aparecer descolorida y granular, separándose las fases acuosa y sólida. También puede adquirir una consistencia espesa y amarilla con coágulos que obstruyen el pezón. Tras varios días se puede producir retracción del tejido mamario, abscesos en la mama y agrandamiento de los nódulos linfáticos retromamarios. En algunos casos, la atrofia y la fibrosis provocan la pérdida permanente de la producción de leche.

La artritis, unilateral o bilateral, se puede observar tanto en adultos como en animales jóvenes, que tienen dificultad para seguir el ritmo del rebaño. A menudo este es el primer hallazgo clínico en rebaños infectados (principalmente en rebaños de carne), llegando a observarse cojeras. Las articulaciones pueden aparecer hinchadas, dolorosas y calientes debido a la inflamación.

La conjuntivitis se presenta como una secreción de exudados de tipo claro, seguida de opacidad corneal, queratitis, exudación purulenta y, en ocasiones, ulceración y panofalmitis. Los casos severos pueden resultar en ceguera irreversible (especialmente en casos asociados con *Moraxella ovis*). También pueden aparecer abortos y sintomatología respiratoria, con neumonía y pleuresía.

La **infección crónica** representa la variante dominante en aquellos países en los que la enfermedad es endémica. Se produce mastitis subclínica con atrofia de la ubre a uno o a ambos lados y artritis esporádica, dando lugar a una pérdida permanente de la producción de leche.

Los mecanismos de patogenicidad de estos microorganismos se basan entre otros en la capacidad de adhesión celular, la alteración de la respuesta inmune, citotoxicidad, secreción de toxinas, activación del complemento y activación de la cascada de coagulación.

Una vez los micoplasmas colonizan el organismo se produce una bacteriemia que es la causante de la fase febril. Ya en sangre, se distribuyen por el organismo, originando una septicemia que puede dar lugar a lesiones en una gran variedad de órganos y alteraciones hematológicas. Esta bacteriemia transitoria llevará a los micoplasmas a colonizar aquellos órganos diana por los que tienen especial preferencia, tales como la glándula mamaria, articulaciones o mucosas conjuntivales.

Las lesiones que se observan a nivel microscópico consisten en la inflamación crónica de la mama con un aumento de la fibrosis y una reducción del número de acinos glandulares. Las cápsulas articulares se observan edematosas y la membrana sinovial puede contener grumos de fibrina. En las primeras etapas de la queratitis, la córnea está edematosa e infiltrada con leucocitos, apareciendo posteriormente un abundante exudado purulento que infiltra la córnea y el cuerpo ciliar.

### **1.3 EPIDEMIOLOGÍA**

#### **1.3.1. Distribución**

La AC está considerada endémica en muchos países y presenta una distribución mundial, aunque debido a la falta de datos concretos del número de individuos y rebaños infectados en las diferentes regiones geográficas, es realmente difícil valorar el impacto de la enfermedad y su repercusión en la sanidad de los rebaños en las áreas endémicas. Se presenta en aquellos lugares en los que se practica el pastoreo y la producción lechera de pequeños rumiantes. Sin embargo, según informes de la OIE, nunca se ha notificado esta enfermedad en la India y Bangladesh, está ausente de Sudán y no existe información en los casos de Turquía y China, a pesar de que estos países conforman los cinco grandes productores de leche de cabra y oveja.

En Europa, la AC se encuentra presente, particularmente en las regiones mediterráneas, así como Oriente Medio, Asia, el norte de África y América del Sur.

Por el contrario, su aparición es más ocasional en otros países con algunos casos esporádicos en Estados Unidos o sin evidencia alguna de la enfermedad en Nueva Zelanda en la última década.

En España, la enfermedad se ha presentado con relativa frecuencia desde la década de los 50, siendo identificadas, a pesar de las limitaciones, hasta 3 especies distintas (Ma, Mmc y Mcc) como responsables de los casos estudiados durante esos años. Así, en 1987, la enfermedad fue considerada endémica en todo el país salvo en los dos archipiélagos, considerándose en ese momento, que Ma era el agente responsable de aproximadamente el 90% de los casos registrados. En Canarias, a principios de la década de los 90 comenzaron a describirse los primeros brotes en el archipiélago, principalmente en la isla de Gran Canaria.

Los estudios desarrollados posteriormente han aportado datos acerca de las especies de micoplasmas más frecuentemente identificadas en los rebaños afectados, siendo la situación diferente en función de la región.

De este modo, Ma es el principal agente etiológico de la AC caprina en el territorio peninsular, seguido de Mmc. Por el contrario, esta última especie de micoplasma, es la más frecuentemente descrita en las Islas Canarias.

Por otro lado, en el ganado ovino, el principal agente causal de la enfermedad es Ma, no habiéndose descrito infecciones de importancia por el resto de agentes etiológicos de la AC en el ganado ovino español.

### **1.3.2. Transmisión**

La AC afecta principalmente a ganado ovino y caprino. En el caso de los rumiantes salvajes, se han detectado brotes clínicos causados por Ma y Mmc en diferentes especies como el íbice ibérico, en la cabra salvaje de los Alpes y el rebeco. Se ha informado también de la existencia de neumonía asociada a Mcc en el marjor. La aparición de estos brotes en rumiantes silvestres se ha relacionado con la interacción que existe con especies domésticas al compartir tierras de pastoreo y abrevaderos, los movimientos de ganado, la alta densidad de rumiantes silvestres, las condiciones climáticas desfavorables y la disponibilidad de fuentes de forraje compartida. A veces, se han informado casos en otros hospedadores no habituales como el ganado bovino. Los micoplasmas causantes de AC no se consideran agentes zoonóticos, aunque en 2015, se registró un caso de Mcc aislada en un hombre fiebre recurrente, septicemia y sospecha de meningitis en ausencia de factores promotores como inmunosupresión o contacto prolongado con animales.

La principal vía de entrada de los micoplasmas responsables de la AC en animales jóvenes es la vía oral, a través de la ingesta de leche y calostros. Mediante esta vía, también se pueden infectar individuos adultos al ingerir alimentos o agua contaminada con secreciones procedentes de individuos infectados. Sin embargo y por lo general, el contagio de los individuos adultos se produce principalmente a través de la vía mamaria, durante el ordeño, cuando las cabras excretoras de micoplasmas en leche contaminan las pezoneras dando lugar a la propagación de las bacterias al resto del rebaño. Otra de las vías de entrada es la respiratoria tanto en adultos como en jóvenes, debido a los aerosoles procedentes de individuos infectados.

La larga persistencia de micoplasmas en órganos clínicamente infectados (ubres, ojos, vías respiratorias) y otros nichos biológicos, como los canales auditivos, hacen de ellos las principales rutas para la transmisión directa dentro del rebaño. Dentro de la epidemiología de la enfermedad, en el ganado caprino cobra especial interés el conocimiento del papel desempeñado por los portadores auriculares asintomáticos. Han podido ser identificadas las cuatro especies de Mycoplasma involucradas en la AC en el canal auditivo externo de cabras, tanto en animales con enfermedad clínica como en animales asintomáticos. Los individuos asintomáticos de la enfermedad suelen ser incluso serológicamente negativos, por lo que pueden suponer una importante fuente de contagio para el resto de individuos de un rebaño.

Es por todo esto que se considera la AC como una enfermedad multifactorial, ya que además de los factores ligados al propio agente etiológico, está condicionada por el manejo, el sistema de explotación, las condiciones ambientales y factores de los propios individuos como condición genética, edad, estado inmunitario, etc.

### **1.4. PROFILAXIS**

Prácticamente no existe una coordinación internacional en las medidas que se deben adoptar en la profilaxis de esta enfermedad, optando cada país por las suyas en función del patrón de propagación, es decir, dependiendo de si se trata de un área enzoótica o si aparecen casos esporádicos.

El control de AC puede estar basado en medidas que van desde el sacrificio de los animales infectados, quimioterapia y/o vacunación, o combinaciones de las tres.

Las buenas prácticas de higiene del rebaño y las medidas de bioseguridad son aspectos clave, ya que una vez que la enfermedad se ha introducido en un rebaño, la propagación puede ser muy rápida. Estas medidas deben incluir medidas de control durante el ordeño (higiene del equipo de ordeño, de las manos de los operarios y de los pezones) y desinfección regular del ambiente (camas, comederos, bebederos, etc.).

En cuanto a las vacunas, las vacunas vivas atenuadas parecen ser más eficientes a largo plazo que las inactivadas. Sin embargo, no están autorizadas en muchos países ya que este tipo de vacunas pueden producir una infección transitoria, con excreción de micoplasmas. Las vacunas vivas no deben utilizarse en animales lactantes y deben formar parte de un plan regional en el que se vacunen simultáneamente todos los rebaños cuyos animales tengan probabilidad de entrar en contacto. En Europa no se permite el uso de vacunas vivas.

Se han llevado a cabo muchos ensayos para la obtención de vacunas seguras y efectivas, principalmente frente a Ma. Sin embargo, ha habido pocos intentos de desarrollar vacunas contra las especies del grupo *M. mycoides*. Las vacunas, monovalentes o polivalentes, pueden desarrollar una protección cruzada frente a diferentes especies del género *Mycoplasma spp.*

El tratamiento de la infección mediante el uso de antimicrobianos debe atender los principios de uso responsable. Las tetraciclinas, los macrólidos y las fluoroquinolonas son los fármacos más efectivos frente a la AC, mientras que otras moléculas como el florfenicol y la tiamulina fueron más populares en el pasado. Puede ocurrir que el uso de antimicrobianos permita una recuperación clínica pero no elimine la bacteria de forma completa. El aumento de las resistencias a los antimicrobianos en los últimos años hace necesario realizar un estudio de estas antibiorresistencias antes de implantar un tratamiento.

## **2. MARCO LEGAL**

### **2.1. NORMAS INTERNACIONALES**

A nivel internacional, las normas se recogen en el Capítulo 14.2 “Agalaxia Contagiosa” del Código Sanitario para los Animales Terrestres de la OIE, el cual define en un único artículo las recomendaciones para la importación de ovinos y caprinos, en el que las autoridades veterinarias de los países importadores deberán exigir un certificado veterinario internacional que acredite que los animales:

1. No manifestaron ningún signo clínico de agalaxia contagiosa el día del embarque;
2. Permanecieron desde su nacimiento, o durante los seis meses anteriores al embarque, en una explotación en la que no se declaró oficialmente ningún caso de agalaxia contagiosa durante ese período;

3. Permanecieron en una estación de cuarentena durante los 21 días anteriores al embarque.

## **2.2. NORMAS COMUNITARIAS (UE)**

El marco reglamentario básico ha sido la Directiva 91/68/CEE del Consejo, de 28 de enero de 1991, relativa a las normas de policía sanitaria que regulan los intercambios intracomunitarios de animales de las especies ovina y caprina. En su artículo 7, establecía las pautas generales de actuación en los intercambios intracomunitarios de los animales de reproducción, producción o abasto de las especies ovina y caprina. Contemplaba la agalaxia contagiosa como enfermedad sujeta a programas de erradicación voluntarios u obligatorios según determinara el estado miembro.

Con la entrada en vigor del Reglamento (UE) 2016/429, conocido como “Ley de sanidad animal europea”, ha quedado derogada gran parte de la normativa en materia de sanidad animal, entre la que se encuentra la Directiva anterior. Por lo que, desde la fecha de aplicación de este reglamento (21 de abril de 2021), se deben tener en cuenta las disposiciones establecidas en él. Hay que destacar que la AC no se incluye en la lista de enfermedades del Reglamento Delegado (UE) 2018/1629 de la Comisión por el que se modifica la lista de enfermedades recogidas en el anexo II de dicho Reglamento (UE) 2016/429.

## **2.3 NORMAS NACIONALES**

La agalaxia contagiosa (AC) es una enfermedad de declaración obligatoria que afecta a los pequeños rumiantes, incluida en la lista de enfermedades de la Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE) y en el Real Decreto 526/2014.

En el año 2003 se publicó la Ley 8/2003, de 24 de abril de sanidad animal en la que se desarrollan legalmente en España todos los mecanismos para vigilar y controlar las enfermedades de los animales, y para garantizar la salud pública y la seguridad alimentaria.

El Real Decreto 2611/1996, de 20 de diciembre, y sus modificaciones, por el que se regulan los Programas nacionales de erradicación de enfermedades de los animales, tiene por objeto establecer las normas para la elaboración, planificación, coordinación, seguimiento y evaluación de los programas nacionales de erradicación de enfermedades de los animales que serán de obligado cumplimiento en todo el territorio del Estado. El artículo 2 del Real Decreto 2611/1996 indica que se podrán establecer programas nacionales de erradicación para cualquier enfermedad infecciosa o parasitaria que determine el Comité RASVE, cuya composición y funciones se regulan mediante el Real Decreto 1440/2001.

El Real Decreto 1440/2001, de 21 de diciembre, por el que se establece el sistema de alerta sanitaria veterinaria, crea el Comité Nacional del Sistema de Alerta Sanitaria Veterinaria, con la participación de todas las Comunidades Autónomas, siendo sus funciones estudiar las medidas para la erradicación y control de las enfermedades objeto de los programas nacionales de erradicación.

Por tanto, ha sido necesaria la aprobación del **Programa nacional de Vigilancia, Control y Erradicación de AC** en el seno de dicho Comité para proporcionarle la base legal necesaria.

### 3. PROGRAMA NACIONAL VOLUNTARIO DE VIGILANCIA, CONTROL Y ERRADICACIÓN

A pesar de la ausencia de datos a nivel general, varios estudios realizados, especialmente en los últimos 20 años, han evidenciado la presencia y difusión de la AC en la cabaña ovina y caprina española.

De este modo, el Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación ha establecido un **Programa Nacional Voluntario de Vigilancia, Control y Erradicación de la AC** con el objetivo de establecer unas medidas de vigilancia y control, unas calificaciones sanitarias y la implantación de medidas de manejo e higiene complementarias. Este programa no contempla la realización de sacrificios obligatorios de animales.

El programa se dirige principalmente a las explotaciones productoras de leche, si bien podrá acogerse al programa cualquier explotación de ovino-caprino que esté calificada frente a brucelosis como M3 o M4 y sin restricciones en materia de EETs por scrapie clásico. Los titulares de explotaciones podrán acogerse a este plan plurianual mediante la firma de un compromiso de aplicación de este programa voluntario durante al menos 3 años (2021-2023).

Las principales medidas que incluye el programa son:

- La realización de una Encuesta Epidemiológica Anual en todas las explotaciones acogidas al programa y conforme a la encuesta facilitada en el anexo I del programa. Esta encuesta será realizada por el veterinario responsable de la explotación que, además, realizará tareas de asesoramiento en cuanto a las medidas de control que se deben adoptar.
- Realización de pruebas diagnósticas basadas en muestreos serológicos para realización de ELISA para detección de anticuerpos frente a Ma en aquellas explotaciones que no tengan implantados programas vacunales. Para aquellas explotaciones que vacunen y no se puedan analizar mediante ELISA, se realizarán muestreos a partir de hisopos (nasales en ovino y auriculares en caprino) y leche de tanque (en explotaciones de leche), que se analizarán mediante PCR para detección de Ma en ovino y Ma, Mp y grupo mycoides en caprino. La PCR a partir de los hisopos mencionados también se propone como prueba para confirmar o descartar a los animales que hayan salido positivos a las pruebas de ELISA. El cultivo microbiológico se contempla en el caso de resultados positivos a PCR en una explotación, con el objetivo de la identificación del agente y el mantenimiento del cepario nacional.
- En las explotaciones en las que se obtengan resultados positivos a PCR o se aísle el agente causal se podrá establecer o continuar con un plan de vacunación, que será propuesto, en su caso, por el veterinario responsable y aprobado por los Servicios Veterinarios Oficiales (SVO). Igualmente, podrán proponerse programas de vacunación de explotaciones negativas que no los tengan implantados, para prevenir la introducción de la enfermedad, en situaciones de riesgo, con la aprobación previa de los SVO. La vacunación se realizará mediante la aplicación de vacunas autorizadas por la AEMPS.

En función de los resultados de las pruebas diagnósticas y la vacunación, se establecen 4 Calificaciones Sanitarias:

- ✓ Explotación sin programa de vigilancia y control (AC1): aquella no incluida en este programa de vigilancia y control.
- ✓ Explotación en vigilancia de agalaxia contagiosa (AC2): aquella incluida en el programa de vigilancia. Si durante un año de aplicación del mismo ha obtenido resultados negativos, la explotación se calificará como Explotación negativa a agalaxia contagiosa (AC2-).
- ✓ Explotación indemne a agalaxia contagiosa (AC3): aquella incluida en el programa, que ha obtenido durante dos años de aplicación del mismo todos los resultados negativos, y existen en el rebaño animales vacunados.
- ✓ Explotación oficialmente indemne a agalaxia contagiosa (AC4): aquella incluida en el programa que ha obtenido durante dos años de aplicación del mismo todos los resultados negativos, que no ha vacunado y que todos los animales incorporados con posterioridad a la realización de la primera prueba proceden de rebaños oficialmente indemnes o negativos AC2- a agalaxia.

Finalmente, debe haber una colaboración entre ganadero, veterinario responsable y los SVO de manera que, tras la evaluación inicial de la situación epidemiológica del rebaño, una vez cumplimentada la encuesta y realizadas las pruebas diagnósticas correspondientes, se establezcan las medidas encaminadas a mejorar el sistema de manejo e higiene de la explotación. El compromiso por parte del titular de la explotación para la aplicación de dichas medidas debe quedar por escrito. Estas medidas incluirán, como mínimo, en el caso de explotaciones positivas:

- a) Un programa de bioseguridad que incluya protocolos de limpieza y desinfección de la explotación, adaptados a cada aptitud productiva. En explotaciones extensivas o semi-extensivas el programa tendrá en cuenta las vías de transmisión indirecta. Así mismo dicho programa incluirá medidas de prevención de la introducción de la enfermedad mediante portadores asintomáticos.
- b) Un programa de desparasitación frente a parásitos externos, especialmente ácaros.
- c) La separación y aislamiento específico y efectivo de los animales positivos y con sintomatología clínica. Aunque los animales positivos podrán permanecer en la explotación hasta su sacrificio, se establecerá un plan de desvieje precoz de los animales con sintomatología clínica.

El presente programa no contempla el sacrificio obligatorio, no obstante, se recomienda el sacrificio de los animales positivos en los rebaños donde exista un porcentaje de animales seropositivos menor al 5% (siempre que el total de los positivos no sea superior a 10 individuos y tras descartar la presencia de falsos positivos) y de portadores (hisopo o leche positiva) menor al 10%.

Los tratamientos antibióticos, cuando sean necesarios por motivos de bienestar animal, seguirán los principios de uso responsable de medicamentos veterinarios. Dichos tratamientos se instaurarán sólo si se ha realizado un antibiograma previo, evitándose el uso de los grupos de antibióticos críticos (fluoroquinolonas, cefalosporinas de 3ª y 4ª generación y colistina), salvo que el antibiograma indique que no existe otra alternativa y siempre con la autorización previa de los SVO.

#### **4. DIAGNÓSTICO LABORATORIAL**

#### 4.1. DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL

Debe distinguirse la agalactia contagiosa de otras causas de neumonía, mastitis y/o artritis, incluso *Manheimia haemolytica*, *Streptococcus* spp., *Staphylococcus* spp., *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, virus de artritis encefalitis caprina, *Erysipelothrix rhusiopathiae* y otros organismos.

#### 4.2. REQUISITOS PARA LA TOMA Y ENVÍO DE MUESTRAS AL LABORATORIO

Las **muestras de tejidos y leche recogidas para aislamiento microbiológico y/o PCR** deben recogerse de forma aséptica en botes con cierre de rosca resistente al escape de fluidos (tipo duquesa) y enviarse al laboratorio sin seccionar (los tejidos) para minimizar el riesgo de contaminaciones. 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, aunque la viabilidad de los micoplasmas se puede ver reducida.

Las **muestras de hisopos para aislamiento microbiológico y/o PCR** se enviarán igualmente refrigeradas (4°C), evitando en lo posible su congelación. Los hisopos recogidos para cultivo deberán llevar un medio de transporte adecuado que asegure la viabilidad de los micoplasmas hasta su llegada al laboratorio.

Las **muestras de sangre para realización pruebas serológicas** deben recogerse en tubos sin anticoagulante y mantenerse a temperatura ambiente hasta la formación del coágulo, realizando el envío al laboratorio en condiciones de refrigeración (4°C).

En cualquier caso, al transportar materiales biológicos, el remitente debe determinar si el material debe clasificarse como mercancía peligrosa o no. En el caso de transporte tanto de cultivos, como de muestras clínicas sospechosas de contener micoplasmas causantes de AC viables, deberían clasificarse como Sustancia biológica perteneciente a la categoría B (UN3373) y seguir la instrucción de embalaje P650, de acuerdo con la Reglamentación sobre Materiales Peligrosos (DGR) de la Asociación Internacional de Transporte Aéreo (IATA). No obstante, para aquellas muestras para las cuales existe una probabilidad muy baja de que contengan agentes patógenos se pueden transportar clasificadas como muestras exentas. Para ello, se requiere una opinión profesional sólida para determinar si un espécimen puede ser eximido bajo esta definición. En este caso, no estarían sujetas a la normativa relativa a las mercancías peligrosas y la muestra se transporta en un sistema de embalaje triple que evite toda posible fuga y que esté identificado con la frase "muestras de origen animal exentas".

#### 4.3. TÉCNICAS DE LABORATORIO

##### 4.3.1. Diagnóstico serológico

Las pruebas serológicas tienen su utilidad en el diagnóstico a nivel de rebaño para determinar la ausencia de la infección en la población, para contribuir a las políticas de erradicación, confirmar casos clínicos y determinar la prevalencia de la infección. Además, pueden utilizarse para determinar el estado inmunitario tras la vacunación en animales o poblaciones. Por otro lado,

pueden tener lugar falsos positivos, principalmente por las reacciones serológicas cruzadas con otros micoplasmas, en particular otros miembros del grupo *M. mycoides*. La validez de los resultados debe confirmarse mediante pruebas adicionales para la identificación del agente.

#### **4.3.1.1. Enzimoanálisis indirecto (I-ELISA)**

Se dispone de dos kits comerciales de I-ELISA validados para Ma, en uno se emplea una proteína de fusión (sensibilidad del 54% y especificidad del 100%), y en el otro se utilizan células enteras como antígenos diana (sensibilidad del 84% y especificidad del 96% en ovejas o del 90% en cabras). Parece que puede haber diferencias en la capacidad de las pruebas de detectar las respuestas a distintas cepas por igual. La elección de la prueba depende de los objetivos del estudio propuesto, es decir, una prueba menos sensible sería suficiente para un estudio de prevalencia en el que la enfermedad fuera endémica, mientras que se requeriría una prueba más sensible para detectar enfermedad en una región libre de la enfermedad.

Se ha observado que los ELISA en los que se emplean antígenos sonicados o tratados con Tween 20 son más sensibles que la fijación de Complemento para la detección de anticuerpos contra Ma en el suero. Los problemas de falta de especificidad se pueden resolver utilizando la conjugación a anticuerpos monoclonales o a la proteína G en el ELISA. El uso de estos conjugados permite analizar sueros de gran variedad de especies de mamíferos, incluidos camélidos.

No se dispone de kits ELISA para los otros tres micoplasmas causantes de la enfermedad.

#### **4.3.1.2. Prueba de Fijación de Complemento (FC)**

Los factores más importantes en la realización de la prueba de FC son el control de todos los reactivos que intervienen y que se lleve a cabo por parte de personal formado y cualificado, ya que no es una prueba sencilla. La temperatura y los tiempos de incubación también deben controlarse cuidadosamente. No pueden analizarse sueros contaminados ni hemolizados, puesto que ello interferiría con la reacción.

Esta prueba, reconocida en el Manual de las pruebas de diagnóstico de la OIE, se ha aplicado para Ma y para otros micoplasmas relacionados con el síndrome de la agalaxia contagiosa. Los antígenos se preparan a partir de microorganismos lavados, estandarizados mediante opacidad, lisados por ultrasonidos o con lauril sulfato sódico y dializados.

Un resultado positivo es la fijación completa a una dilución del suero de 1/40 o superior para los micoplasmas siguientes: Ma, Mcc y Mmc. Al utilizar antígeno de Ma, algunos sueros de rebaños sanos reaccionan en esta prueba hasta una dilución de 1/20 y raramente reaccionan con los otros dos antígenos. Sin embargo, en los rebaños infectados con Ma, los sueros que dan una reacción homóloga a 1/80 pueden presentar una reacción cruzada con los otros dos antígenos hasta 1/40, que es el umbral positivo.

A menudo es difícil realizar la prueba de fijación del complemento si la calidad de los sueros problema es baja; cuando es posible, se prefiere el ELISA.

#### **4.1.1.3. Prueba de la Inmunotransferencia (IBT)**

La prueba de Inmunotransferencia o Inmunoblotting es una prueba inmunoenzimática en la que se utilizan tiras de nitrocelulosa a las que se han transferido proteínas específicas de Ma, separadas previamente mediante electroforesis en gel de poliacrilamida en gradiente de concentración.

Esta prueba se ha utilizado para confirmación de brotes en Italia, donde la confirmación de anticuerpos frente a Ma se establecía en función de la presencia de dos bandas de 80 y 55 kDa. Sin embargo, en Francia la confirmación de brotes por esta técnica exigía la presencia de 4 bandas (80, 48, 40 y 30 kDa). Esto sugiere la posibilidad de la existencia de ciertas diferencias en las respuestas humorales en función de la ubicación geográfica.

#### **4.3.2 Diagnóstico microbiológico**

El diagnóstico microbiológico está indicado para demostrar ausencia de infección en animales individuales, para confirmar casos clínicos, ante sospechas por reacciones positivas en las pruebas serológicas.

##### **4.3.2.1. Aislamiento bacteriológico**

El cultivo microbiológico tiene como principal objetivo el aislamiento del agente etiológico (Ma, Mmc, Mcc, Mp) a partir de las muestras clínicas de elección. Sin embargo, habrá que tener en cuenta que la obtención de un cultivo positivo confirma la presencia del agente causal de la infección, pero un resultado de cultivo negativo no es concluyente y sólo indica que no se ha podido conseguir el aislamiento.

Las muestras de elección en animales vivos son leche de hembras con mastitis o de hembras aparentemente sanas, hisopos nasales y secreciones cuando haya una alta mortalidad o morbilidad en las crías, líquido articular en casos de artritis, hisopos conjuntivales en casos de enfermedad ocular. El muestreo de leche de tanque constituye una forma cómoda de realizar un seguimiento de los micoplasmas causantes de la enfermedad a nivel del rebaño. El canal auricular también es una fuente muy rica de micoplasmas patógenos, aunque, en la práctica, la presencia en esta zona de micoplasmas no patógenos puede hacer difícil la confirmación.

Las muestras de una necropsia son nódulos linfáticos de la ubre y otros nódulos linfáticos asociados, líquido articular, tejido pulmonar (de la zona situada entre el tejido afectado y el sano) y líquido pleural/pericárdico.

Las muestras se cultivan en medios específicos para micoplasmas. Estos medios pueden utilizarse para el cultivo de casi cualquier especie de micoplasma. Existen medios deshidratados comerciales, como el caldo/agar infusión corazón y el caldo/agar PPLO (Pleuropneumonia-like organisms), que se deben suplementar con suero de caballo, extracto de levadura y ADN. Para evitar el crecimiento de otras bacterias, los medios también pueden contener inhibidores como el acetato de talio y antibióticos de la familia de las penicilinas, ya que los micoplasmas son resistentes al carecer de pared celular.

Los tubos y las placas incubadas a 37°C en una atmósfera que contenga un 5% de CO<sub>2</sub>, y se inspeccionan a diario durante un máximo de 10 días. Transcurrido este tiempo, si no hay crecimiento, se realizará un subcultivo del cultivo en medio líquido y se observará durante 21

días para poder descartar las muestras como negativas. Las muestras positivas en medio líquido presentan una ligera turbidez homogénea. Durante los siguientes días aparece una opacidad uniforme que forma remolinos cuando se agita. En medio sólido, las colonias se observan con lupa binocular de x25 o x 40, y luz incidiendo en ángulo de 30-45°, o bien al microscopio óptico a x100 aumentos. El tiempo de incubación varía dependiendo de la especie de micoplasma implicada en el aislamiento. Mmc tiene mayor velocidad de crecimiento que Ma y las colonias son más grandes. Las colonias de micoplasma presentan la forma clásica de “huevo frito” con un núcleo central más opaco que sobresale y se incrusta en el agar y una periferia regular más translúcida. En esta fase, pueden aplicarse las pruebas adicionales para identificar las colonias.

Tras el cultivo inicial se debe realizar una diferenciación con formas L (pleomórficas) de bacterias que han podido perder la pared celular debido a la presencia de inhibidores. Para ello se debe realizar un subcultivo en los medios de cultivo anteriores pero eliminando la presencia de inhibidores de los mismos.

Además, se debe establecer la diferencia con otro grupo de microorganismos muy relacionados que dan lugar a un crecimiento similar. Se trata del género *Acholeplasma spp.* Esta diferenciación se realiza en base a la sensibilidad a la digitonina, ya que *Mycoplasma spp.* presenta sensibilidad y por tanto inhibe su crecimiento en presencia de la misma, a diferencia de *Acholeplasma spp.* que es capaz de crecer.

El fenómeno de los cristales es una característica del cultivo que presentan algunas especies de micoplasmas. Consiste en la presencia de formaciones cristalinas dispuestas en películas o en manchas (en inglés, *film and spots*) que resultan de una lipasa excretada por el micoplasma, que hidroliza los lípidos del medio para formar jabones de calcio y magnesio en las proximidades de la colonia. Para evaluar su aparición, se realiza el cultivo del micoplasma problema en medio sólido y después de 3-4 días se revisan las placas para evidenciar los cristales con lupa hasta 2 semanas. Si después de estas dos semanas no se observan cristales, podemos descartar la formación de los mismos. Entre los micoplasmas causantes de AC, Ma posee la capacidad de formar cristales.

Con frecuencia, las muestras clínicas contienen más de una especie de micoplasma, por lo que se considera necesario purificar las colonias por clonación antes de realizar la identificación bioquímica o inmunológica. Sin embargo, la clonación es un proceso largo que puede durar al menos 2 semanas.

#### 4.3.2.2. Identificación bioquímica e inmunológica

Las **pruebas bioquímicas** tienen un valor limitado para la identificación de *Mycoplasma*, debido al solapamiento de los pocos rasgos fenotípicos que se pueden evaluar. Es por esto que se recomienda confirmar mediante métodos moleculares, como la PCR.

Las pruebas bioquímicas se llevan a cabo en 3 tubos con medios especiales que contienen los mismos ingredientes del caldo de cultivo básico, a los que se añade una solución de glucosa para comprobar la hidrólisis de glucosa, una solución de arginina-HCl para comprobar la hidrólisis de arginina, y una solución de cloruro de dimetil tetrazolio (TTC) para comprobar la reducción del tetrazolio. A cada tubo se añadirá además un indicador de pH (por ejemplo, rojo fenol), que

evidenciará las 3 reacciones bioquímicas. Para el estudio de la actividad fosfatasa, se elabora medio sólido al que se añade difosfato sódico y fenolftaleína. Tras realizar el cultivo, se evidenciará la actividad fosfatasa al añadir una solución de NaOH en la zona del crecimiento ya que la aparición de una coloración rosada pasados 30 segundos, indica positividad. Para la demostración de proteólisis, se realiza el cultivo en agar caseína y/o agar con suero coagulado.

Glucosa	Arginina	Fosfatasa	TTC	Proteólisis	Cristales	ESPECIE/SUBESPECIE
-	-	+	+ / +	-	+	M. agalactiae
+	-	-	+ / +	+	-	M. mycoides subesp. capri
+	+ ó -	+ ó -	+ / +	+	-	M. capricolum subesp. capricolum
+	-	+	+ / +	-	+	M. putrefaciens

La característica bioquímica más destacable que diferencia M. putrefaciens de los otros micoplasmas es el olor a putrefacción que produce en medio líquido.

Una vez comprobadas las características bioquímicas, se debe realizar una de las siguientes **pruebas inmunológicas** para confirmar la identificación. Estas pruebas se fundamentan en la reacción antígeno-anticuerpo y en ellas el cultivo se enfrenta a un suero hiperinmune frente a la especie de micoplasmas de la que se sospecha.

- Prueba de inhibición del crecimiento en disco: la reacción se hará evidente por la presencia de un halo de inhibición alrededor de un disco impregnado en el suero complementario. En el caso de Ma y Mp, lo que se observará es una inhibición de la formación de cristales.
- Inmunofluorescencia indirecta: se aplican antisueros específicos a colonias en medio sólido. El antisuero homólogo permanece unido después de los lavados y se pone de manifiesto añadiendo una antiglobulina conjugada con fluoresceína, lavando a continuación, y observando las colonias con un microscopio de fluorescencia.

#### 4.3.3. Diagnóstico molecular

La PCR se ha convertido en el método de elección para la identificación rápida y específica de micoplasmas causantes de AC directamente de las muestras clínicas (muestras nasales, auriculares, conjuntivales, sinoviales, tisulares o leche). Cuando se utiliza la PCR directa de muestra, puede suponer un sistema rápido de alerta que permite una investigación más completa en el caso de que los resultados sean positivos. No obstante, los resultados negativos no deben considerarse definitivos. La extracción del ácido nucleico de la muestra es un paso crucial para tener éxito en la empresa y la presencia de inhibidores indefinidos puede interferir con la prueba.

Se han desarrollado varias pruebas de tipo PCR que son específicas de las cuatro especies causantes de AC y que muestran unos niveles óptimos de sensibilidad. Sin embargo, un resultado positivo de la PCR, especialmente en las áreas previamente libres de AC, debe confirmarse mediante el aislamiento y la identificación del micoplasma utilizando procedimientos estándar.

El formato más extendido para la detección de micoplasmas directamente sobre las muestras es la PCR en tiempo real, existiendo la metodología de PCR múltiple para detectar los cuatro micoplasmas simultáneamente.

La PCR también se puede utilizar, con total fiabilidad, sobre micoplasmas ya aislados en un medio de cultivo, bien sea mediante PCR simple frente a cada uno de los cuatro micoplasmas o mediante PCR múltiple.

Mediante un método basado en la PCR en el que se emplea cebadores específicos de micoplasma y la electroforesis en gel con gradiente desnaturizante (DGGE), se puede identificar por su patrón migratorio la mayoría de los micoplasmas de los pequeños rumiantes, incluyendo todos los agentes causales de la agalaxia contagiosa.

También se ha descrito una PCR para la diferenciación entre Mmc y Mcc basada en el gen *lpdA* en la que producto amplificado (amplicón) se digiere con endonucleasas de restricción (PCR-REA).

## BIBLIOGRAFÍA

Capítulo 14.2 “Agalaxia Contagiosa” del Código Sanitario para los Animales Terrestres de la OIE.

Capítulo 3.7.3 Agalaxia Contagiosa. Manual de las Pruebas de Diagnóstico y de las Vacunas para los Animales Terrestres 2021.

Programa Nacional Voluntario de Vigilancia, Control y Erradicación de Agalaxia Contagiosa Ovina y Caprina. 2021-2023. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación.

Manso-Silván L, Vilei EM, Sachse K, Djordjevic SP, Thiaucourt F, Frey J. *Mycoplasma leachii* sp. nov. as a new species designation for *Mycoplasma* sp. bovine group 7 of Leach, and reclassification of *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* LC as a serovar of *Mycoplasma mycoides* subsp. *capri*. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2009 Jun;59(Pt 6):1353-8. doi: 10.1099/ijs.0.005546-0. PMID: 19502315.

Jaÿ M, Tardy F. Contagious Agalactia In Sheep And Goats: Current Perspectives. *Vet Med (Auckl)*. 2019 Dec 27; 10:229-247. doi: 10.2147/VMRR.S201847. PMID: 31921613; PMCID: PMC6938181.

Agalaxia Contagiosa y Calidad de la Leche en la Raza Caprina Majorera. Tesis doctoral. Aldo Román Gutiérrez Llanos. Murcia, 2015.

Capítulo 1.1.3 Transporte de material biológico. Manual de las Pruebas de Diagnóstico y de las Vacunas para los Animales Terrestres 2021.

**MATERIAL PARA LA PREPARACIÓN DEL TEMA 53**

**OTRAS ZONOSIS BACTERIANAS OBJETO DE CONTROL EN LA UNIÓN EUROPEA. MARCO LEGAL. DIAGNÓSTICO DE LABORATORIO.**

*Este material no tiene carácter oficial, por lo que en ningún caso vinculará al Tribunal Calificador. Constituye, únicamente, un instrumento complementario que servirá de apoyo al opositor para enfocar cada uno de los epígrafes, pero nunca de forma exclusiva ni excluyente. El Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación no se hace responsable del contenido del mismo.*

*Los materiales no serán objeto de actualización constante.*

## **ÍNDICE**

### **1. OTRAS ZONOSIS BACTERIANAS OBJETO DE CONTROL EN LA UNIÓN EUROPEA.**

1.1. INTRODUCCIÓN

1.2. ZONOSIS BACTERIANAS OBJETO DE ESTUDIO

### **2. MARCO LEGAL.**

2.1. NORMATIVA NACIONAL

2.2. NORMATIVA COMUNITARIA

### **3. DIAGNÓSTICO DE LABORATORIO.**

3.1. CAMPILOBACTERIOSIS.

3.2. LISTERIOSIS

3.3. YERSINIOSIS

3.4. ESCHERICHIA COLI VEROTOXIGÉNICA

3.5. FIEBRE Q

3.6. BORRELIOSIS

3.7. BOTULISMO

3.8. LEPTOSPIROSIS

3.9. PSITACOSIS

3.10. VIBRIOSIS

## 1. OTRAS ZONOSIS BACTERIANAS OBJETO DE CONTROL EN LA UNIÓN EUROPEA.

### 1.1 INTRODUCCIÓN

Las **zoonosis** son aquellas enfermedades que se transmiten de forma natural entre los animales vertebrados y las personas causadas por virus, por bacterias o por parásitos. Se pueden transmitir por diferentes métodos (por contacto con animales vivos o con sus productos, a través de los alimentos, por insectos, etc.) y presentan una distribución, frecuencia y gravedad variables.

Una de las prioridades de la Unión Europea, es la necesidad de garantizar un alto grado de seguridad alimentaria, para ello, en diciembre del 2000 publicó el **Libro blanco** sobre seguridad alimentaria, que fue la base de una serie de mejoras legislativas organizativas y de coordinación entre Estados Miembros. Fruto de estas reflexiones se adoptaron dos propuestas principales cuyo objetivo era reducir la incidencia de enfermedades de transmisión alimentaria:

- La **Directiva 2003/99/CE** de 17 de noviembre de 2003 sobre la vigilancia de las zoonosis y los agentes zoonóticos
- El **Reglamento (CE) 2160/2003** también de 17 de noviembre de 2003 sobre el control de la salmonella y otros agentes zoonóticos transmitidos por alimentos.

Los principales objetivos de la directiva son aumentar el conocimiento sobre un conjunto de zoonosis y sobre la resistencia a los antimicrobianos y comparar datos y evaluar tendencias. Esta Directiva se incorporó al ordenamiento jurídico español mediante el **Real Decreto 1940/2004**, de 27 de septiembre, sobre vigilancia de las zoonosis y los agentes zoonóticos.

En este contexto, en el que se investiga sobre infecciones compartidas por los animales y las personas y el ambiente en que se producen, la colaboración entre las instituciones médicas y veterinarias y de ciencias ambientales resulta más que obvia.

Por ello se ha puesto en marcha a nivel internacional la **“Iniciativa por Una Sola Salud”** (One Health Initiative) para tratar los riesgos sanitarios en la interfaz entre el animal, el ser humano y el ecosistema (Resolución nº 27 de la OIE de 24 de mayo de 2012).

Esta iniciativa reconoce que la salud humana, la salud animal y la salud del ecosistema están ligadas, por lo que busca promover, mejorar y defender la salud y el bienestar de todas las especies mediante la mejora de la cooperación y la colaboración entre médicos, veterinarios y otros profesionales de la salud y del medio ambiente. Ese objetivo se debe conseguir a través de la integración de la medicina humana, la medicina veterinaria y las ciencias ambientales, proponiendo una serie de líneas de actuación.

La Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) y el Centro Europeo para el Control de Enfermedades (ECDC), por encargo de la Comisión Europea, recopilan y analizan cada año la información de todos los Estados Miembros en relación con las zoonosis en el **Informe de Zoonosis “One Health”** en la Unión Europea (antes llamado Informe comunitario sobre tendencias y fuentes de zoonosis, agentes zoonóticos y brotes de enfermedades producidos por alimentos).

Por otro lado, la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA), de acuerdo con la información recibida por los Estados Miembros, también elabora un informe con todos los datos de zoonosis, agentes zoonóticos, resistencia a antimicrobianos y brotes de enfermedades de origen alimentario a nivel nacional. Este informe nacional es proporcionado por la EFSA a cada Estado Miembro. El objetivo de este informe es resumir y presentar la información más relevante relativa a las zoonosis en España de una manera clara y concisa.

## 1.2 ZONOSIS BACTERIANAS OBJETO DE ESTUDIO

En el ANEXO I de la **Directiva 2003/99/CE** y del **Real Decreto 1940/2004**, en el que se transpone dicha directiva, se recogen las zoonosis y agentes zoonóticos objeto de vigilancia:

### A. Zoonosis y agentes zoonóticos que deben ser objeto de vigilancia:

- Brucelosis y sus agentes causales
- Campilobacteriosis y sus agentes causales
- Equinococosis y sus agentes causales
- Listeriosis y sus agentes causales
- Salmonelosis y sus agentes causales
- Triquinosis y sus agentes causales
- Tuberculosis por *Mycobacterium bovis*
- *Escherichia coli* verotoxigénica.

### B. Lista de zoonosis y agentes zoonóticos que deben ser objeto de vigilancia en función de la situación epidemiológica:

#### 1. Zoonosis víricas

- Calicivirus
- Virus de la hepatitis A
- Virus de la gripe
- Rabia
- Virus transmitidos por artrópodos.

#### 2. Zoonosis bacterianas

- Borreliosis y sus agentes causales
- Botulismo y sus agentes causales
- Leptospirosis y sus agentes causales
- Psitacosis y sus agentes causales
- Tuberculosis distintas de la indicada en la parte A
- Vibriosis y sus agentes causales
- Yersiniosis y sus agentes causales.

#### 3. Zoonosis parasitarias

- Anisakiasis y sus agentes causales

- Criptosporidiosis y sus agentes causales
- Cisticercosis y sus agentes causales
- Toxoplasmosis y sus agentes causales

#### 4. Otras zoonosis y agentes zoonóticos

En el presente tema se abordará aquellas Las zoonosis bacterianas de importancia sanitaria y económica en el ámbito de la Sanidad Animal que no han sido tratados en temas anteriores

## 2. MARCO LEGAL.

### 2.1. NORMATIVA NACIONAL

- **Ley 8/2003, de sanidad animal**, establece medidas de control para determinadas enfermedades.
- **Real Decreto 1940/2004**, de 27 de septiembre, sobre la vigilancia de las zoonosis y los agentes zoonóticos. Transposición de la Directiva 2003/99/CE.
- Enfermedad de declaración obligatoria según **el Real Decreto 526/2014**, de 20 de junio, por el que se establece la lista de las enfermedades de los animales de declaración obligatoria y se regula su notificación.

### 2.2. NORMATIVA COMUNITARIA

- **Directiva 2003/99/CE** sobre la vigilancia de las zoonosis y los agentes zoonóticos y por la que se modifica la Decisión 90/424/CEE del Consejo y se deroga la Directiva 92/117/CEE del Consejo: La cual, establece una clasificación de las zoonosis en relación con las medidas de vigilancia que se le deben de aplicar. La Salmonella debe de ser objeto de vigilancia epidemiológica siempre.
- **Reglamento (CE) Nº 2160/2003** del Parlamento Europeo y del Consejo sobre el control de la salmonela y otros agentes zoonóticos específicos transmitidos por los alimentos.
- **Reglamento (UE) 2016/429** del Parlamento Europeo y del Consejo, de 9 de marzo de 2016, relativo a las enfermedades transmisibles de los animales y por el que se modifican o derogan algunos actos en materia de sanidad animal («Legislación sobre sanidad animal»).
- **Reglamento de Ejecución (UE) 2018/1882 de la Comisión**, de 3 de diciembre de 2018 relativo a la aplicación de determinadas normas de prevención y control a categorías de enfermedades enumeradas en la lista y por el que se establece una lista de especies y grupos de especies que suponen un riesgo considerable para la propagación de dicha enfermedad de la lista.
- **Reglamento Delegado (UE) 2020/688 de la Comisión**, de 17 de diciembre de 2019, por el que se completa el Reglamento (UE) 2016/429 del Parlamento Europeo y del Consejo en lo referente a los requisitos zoonosarios para los desplazamientos dentro de la Unión de animales terrestres y de huevos para incubar.
- **Reglamento Delegado (UE) 2020/689 de la Comisión**, de 17 de diciembre de 2019, por el que se completa el Reglamento (UE) 2016/429 del Parlamento Europeo y del Consejo en lo

referente a las normas de vigilancia, los programas de erradicación y el estatus de libre de enfermedad con respecto a determinadas enfermedades de la lista y enfermedades emergentes.

### 3. DIAGNÓSTICO DE LABORATORIO.

Las enfermedades a tratar se pueden agrupar de varias formas para facilitar su estudio y exposición:

- Según sean zoonosis transmitidas por alimentos, zoonosis transmitidas por artrópodos.
- Según el diagnóstico de laboratorio, si solo se basa en un diagnóstico bacteriológico (aislamiento e identificación del agente), o si también se realiza un diagnóstico serológico.
- Enfermedades listadas y categorizadas o no en el Reglamento de Ejecución (UE) 2018/1882.
- Enfermedades recogidas en el Manual terrestre de la OIE o no.

Todas tienen en común, que las manipulaciones en el laboratorio deben llevarse a cabo a un nivel apropiado de bioseguridad y contención, que vendrá determinado por la evaluación del riesgo biológico que se realice en cada caso en función del agente biológico y la técnica a realizar.

A continuación, el tema se ha desarrollado tratando cada enfermedad de forma independiente. En primer lugar, se describe la enfermedad y en segundo lugar se describe el diagnóstico de laboratorio.

#### 3.1. CAMPILOBACTERIOSIS.

Enfermedad producida por una bacteria del género *Campylobacter*. Existen varias especies de interés para la salud pública y animal: ***Campylobacter jejuni*** y ***Campylobacter coli***. Pueden colonizar el tracto intestinal de la mayoría de los mamíferos y aves, y son las especies de *Campylobacter* aisladas con mayor frecuencia en humanos con gastroenteritis.

##### Etiología:

Actualmente, existen 34 especies de *Campylobacter* reconocidas, pero con la mejora de las técnicas de diagnóstico y de análisis genómico, se espera que esta cifra aumente con el tiempo.

Los miembros del género *Campylobacter* son típicamente bacterias gramnegativas, que no forman esporas, con forma de S o espiral (0,2–0,8 µm de ancho y 0,5–5 µl de largo), con flagelos polares aislados a uno o a ambos extremos, lo que le confiere una movilidad característica, como la de un sacacorchos.

Estas bacterias requieren condiciones de microaerobiosis, pero algunas cepas pueden crecer también en aerobiosis y anaerobiosis. No fermentan ni oxidan los carbohidratos. Algunas especies, particularmente *C. jejuni*, *C. coli* y *C. lari*, son termófilas, y crecen óptimamente a 42°C. Pueden colonizar superficies mucosas, generalmente del tracto intestinal, en la mayoría de las especies de mamíferos y de aves probadas. La especie *C. jejuni* comprende dos

subespecies (*C. jejuni* subespecie *jejuni* y *C. jejuni* subespecie *doylei*) que pueden diferenciarse sobre la base de varias pruebas fenotípicas (la reducción del nitrato, la reducción de la selenita, el fluoruro sódico y la safranina y el crecimiento a 42°C)

#### Epidemiología y transmisión:

Más del 80% de los casos están causados por *C. jejuni* y en torno al 10%, por *C. coli*. Los estudios realizados para determinar el origen de la enfermedad indican que las aves de corral son el principal reservorio de *Campylobacter* y las responsables de un 50% a 80% de las infecciones humanas. En la Unión Europea, se estima que un 30% de las infecciones humanas se asocian a la manipulación y consumo de carne de aves de corral; pero una proporción considerable de las cepas derivadas de aves de corral se transmite por una vía distinta de la carne de aves de corral como, por ejemplo, la contaminación ambiental (EFSA, 2010b).

La transmisión es por ingestión de los microorganismos en alimentos crudos o mal cocinados, incluida la leche no higienizada y el agua contaminada, contacto con mascotas infectadas o animales de granja. La contaminación de la leche se produce con las heces del ganado vacuno portador. A partir del contenido intestinal, los alimentos se pueden contaminar si se manipulan en superficies o con utensilios contaminados.

#### Síntomas y lesiones:

En los humanos, la infección por *C. jejuni*/*C. coli* se asocia a enteritis aguda diarrea (a menudo con heces sanguinolentas), dolor abdominal, malestar, fiebre, náusea y vómito. La sintomatología suele durar 1 semana y, en general, no más de 10 días.

#### Diagnóstico de laboratorio:

El diagnóstico de laboratorio se basa en el **aislamiento e identificación del agente**.

##### 1. Diagnóstico bacteriológico: Aislamiento e Identificación del agente

Existen dos procedimientos ISO (Organización Internacional de Estandarización) para la detección de *Campylobacter*:

- un método horizontal de detección y enumeración de *Campylobacter* spp. Termotolerantes (ISO 10272) en alimentos y piensos animales, formado por dos partes: la parte 1 corresponde al método de detección y la parte 2, a la técnica de recuento de colonias. Se está revisando la norma para incluir el aislamiento a partir de muestras de animales vivos.
- procedimiento ISO 17995 que hace referencia a la calidad del agua, para la detección y enumeración de *Campylobacter* spp. termotolerantes en el agua.

Los pasos a seguir al realizar el aislamiento e identificación de *Campylobacter* son los siguientes:

##### **a) Toma de muestras:**

- En aves: Para la detección fiable de *Campylobacter* mediante cultivo, se deberían recoger heces recién evacuadas (preferiblemente sin trazas de orina). Se debe impedir que tales muestras se sequen antes del cultivo. Cuando se utilizan frotis, se debe utilizar un medio de transporte (como los de Amies, Cary Blair o Stuart).

- En bovino, ovino y porcino: Los microorganismos del género *Campylobacter* son colonizadores frecuentes del intestino del ganado bovino, ovejas y cerdos. En mamíferos jóvenes, la proporción es más alta que en animales más viejos. En estos últimos, los microorganismos se pueden detectar intermitentemente en las heces, probablemente debido al bajo número o a emisiones intermitentes del agente. Han de tomarse muestras recientes (muestras rectales si es posible) y se debe impedir que se sequen. Cuando se utilizan frotis, se debe utilizar un medio de transporte (como los de Amies, Cary Blair o Stuart).
- En matadero: En las aves de corral, generalmente se utilizan los ciegos para la detección de *Campylobacter*. Las muestras de ganado bovino, ovejas y cerdos se pueden recoger de los intestinos mediante apertura aséptica de la pared del intestino o tomando frotis rectales con precaución.

#### **b) Transporte y tratamiento de las muestras:**

Los microorganismos del género *Campylobacter* son sensibles a las condiciones ambientales, incluyendo deshidratación, oxígeno atmosférico, luz solar y temperatura elevada. Por tanto, el transporte al laboratorio y posterior procesado deben hacerse tan rápido como sea posible (preferiblemente el mismo día, y si no dentro de los 2-3 días siguientes). Cuando el tiempo transcurrido entre la toma de la muestra y el procesado sea superior a las 48 horas, se aconseja una conservación a  $4 \pm 2$  °C. Cuando las muestras se envían o se mantienen en el laboratorio a 4°C, debe dejarse que se equilibren a temperatura ambiente antes de su procesado, para evitar choques térmicos.

La utilización de tubos con medio de transporte en la toma de muestras, como el de Amies o el de Cary Blair, ayudan a protegerlas de la sequedad y los efectos tóxicos del oxígeno.

#### **c) Aislamiento de *Campylobacter*:**

Particularidades:

- No se suele realizar de rutina un enriquecimiento previo de muestras fecales porque facilitaría el crecimiento de bacterias competidoras. Sólo se recomienda el enriquecimiento para aumentar la sensibilidad del cultivo de microorganismos potencialmente estresados por las condiciones ambientales o en caso de bajos niveles de microorganismos en las heces de, por ejemplo, ganado bovino, ovejas y cerdos.
- Utilización de medios selectivos para el aislamiento. Se dividen en dos grupos fundamentales: medios basados en sangre y medios basados en carbón. Los componentes de la sangre y del carbón sirven para eliminar los derivados tóxicos del oxígeno. La mayor parte de los medios están disponibles comercialmente. La selectividad de los medios viene determinada por los antibióticos utilizados, que a su vez va a influir en el grado de inhibición de la flora contaminante.
- Ejemplos de medios sólidos selectivos con sangre: Agar Preston, Agar Skirrow, Agar Butzler, Campy-cefex.
- Ejemplos de medios sólidos con base de carbón: mCCDA (agar modificado con deoxicolato, cefoperazona y carbón), versión ligeramente modificada de la CCDA descrita

originalmente, Agar Karmali o CSM (medio de carbón selectivo), Agar CAT (cefoperazona, anfotericina y teicoplanina).

- Filtración pasiva, evita la utilización de medios selectivos. Es útil para el aislamiento de especies sensibles a los antimicrobianos. Las heces se mezclan con PBS (aproximadamente a una dilución de 1/10) para producir una suspensión. Aproximadamente 100 µl de esta suspensión se depositan cuidadosamente sobre un filtro de 0,45 o 0,65 µm, que se ha colocado previamente sobre una placa de agar sangre no selectiva. Ha de tenerse cuidado de no dejar que el inóculo se derrame sobre el borde del filtro. Se deja que las bacterias se muevan a través del filtro durante 30–45 minutos a 37°C o a temperatura ambiente. Después se quita el filtro. La placa se incuba microaeróbicamente a 42°C.
- Las condiciones de incubación de los medios serán:
- atmósferas microaerobias de 5–10% de oxígeno, 5–10% de dióxido de carbono para un crecimiento óptimo.
- incubar a 37°C o 42°C, pero es una práctica común incubar a 42°C para minimizar el crecimiento de contaminantes y para seleccionar el crecimiento óptimo de *C. jejuni*/*C. coli*.
- generalmente *C. jejuni* y *C. coli* manifiestan un crecimiento sobre medios sólidos en 24–48 horas a 42°C.

**d) Confirmación: se necesita un cultivo puro para realizarla.**

- Identificación en medio sólido: En agares con sangre, las colonias típicas de *Campylobacter* son de color rosa pálido, redondas, convexas, lisas y brillantes, con un borde regular. En los medios basados en carbón vegetal, como mCCDA, las colonias típicas son grisáceas, planas y húmedas, con tendencia a extenderse, y muchas tienen un brillo metálico.
- Examen microscópico de la morfología y movilidad: mediante un microscopio de contraste de fases, para observar bacilos finos en espiral o curvados que se mueven en forma de sacacorchos.
- Detección mediante oxidasa: oxidasa positiva.
- Crecimiento aeróbico a 25°C: crecimiento negativo
- Prueba aglutinación en látex.

**e) Identificación:** Se identifican las siguientes especies, según el capítulo del Manual Terrestre de la OIE, versión online, para esta enfermedad:

**Tabla 2.** Características fenotípicas básicas de especies termófilas seleccionadas de *Campylobacter*

Características	<i>C. jejuni</i>	<i>C. coli</i>	<i>C. lari</i>
Hidrólisis de hipurato	+	–	–
Hidrólisis de acetato de indoxil	+	+	–

Clave: + = positivo; – = negativo; \*no todas las cepas.

- Detección de hidrólisis de hipurato: Reacción positiva: azul/violeta oscuro. Reacción negativa: clara o gris.

- Detección de hidrólisis de acetato de indoxil: Si el acetato de indoxil se hidroliza se produce un cambio de color a azul oscuro en 5–10 minutos. Si no hay cambio de color significa que no se ha producido la hidrólisis.
  - Métodos moleculares. Se realizan a partir de muestras de heces y de carne. Un método rápido para diferenciar entre cepas de *C. jejuni* y de *C. coli* es una PCR en tiempo real doble. Otro método molecular para diferenciación a nivel de especie es una secuenciación del gen ARNr 16S.
  - Espectrometría de masas por MALDI-TOF. La MALDI-TOF se puede utilizar para identificar cepas de *Campylobacter* y de forma eficiente a nivel de género y de especie.
- f) Captura de antígeno:** Se utiliza en muestras de heces.

## 2. Diagnóstico serológico:

No existen pruebas serológicas de uso rutinario para la detección de la infección del ganado por *C. jejuni*/*C. coli*.

## 3.2. LISTERIOSIS

Es una de las enfermedades más graves transmitidas por los alimentos.

### Etiología:

Está producida por la *Listeria monocytogenes* que es un bacilo anaerobio facultativo, Gram positivo y está dentro de la familia Listeriaceae. Dentro del género *Listeria*, se han descrito taxonómicamente 20 especies.

### Epidemiología y transmisión:

La *Listeria monocytogenes* puede infectar a una amplia gama de especies animales, entre las que se encuentran mamíferos, aves, peces y crustáceos, aunque la mayoría de los casos de listeriosis clínica tienen lugar en rumiantes; los cerdos casi nunca desarrollan la enfermedad y, generalmente, las aves son portadoras subclínicas del microorganismo.

En lo animales, la mayor parte de las infecciones son subclínicas, pero puede producirse una enfermedad invasiva esporádicamente o en forma de brote.

Las pruebas indican que la listeriosis animal a menudo se asocia al almacenamiento de forraje y al entorno como fuente principal de contaminación. En el entorno, este microorganismo saprófito puede vivir en el suelo, el agua y materia vegetal en descomposición, desde donde podría contaminar el alimento de los animales. El ensilado (en silos o bodegas) es el origen más frecuente. Se debe hacer todo lo posible para producir un ensilado de buena calidad, con corte temprano de pasto, contaminación mínima con suelo o heces y asegurando una fermentación anaeróbica óptima, lo que asegurará que el pH caiga por debajo de 5,0; a ese nivel, el crecimiento de *Listeria* spp. está inhibido.

Síntomas y lesiones:

Los signos clínicos de la listeriosis en los animales son rombencefalitis (o, en algunos casos, alteraciones encefalíticas más diseminadas), septicemia y aborto, especialmente en ovejas, cabras y vacas.

Diagnóstico de laboratorio:

En la actualidad existen varios métodos convencionales y rápidos disponibles para la detección e identificación de *L. monocytogenes* en muestras de la cadena alimentaria (muestras de producción primaria, de alimento para animales, de alimento destinado al consumo humano, y del entorno) y en muestras de listeriosis animal.

1. Diagnóstico bacteriológico (detección e Identificación del agente):

El aislamiento e identificación de *L. monocytogenes* a partir de muestras de la cadena alimentaria y muestras de listeriosis animal requiere el uso de agentes selectivos y procedimientos de enriquecimiento que mantengan los niveles de microorganismos competitivos en valores razonables y permitan la multiplicación de *L. monocytogenes* hasta niveles que sean suficientes para poder detectar este microorganismo.

**a) Métodos de aislamiento bacteriano.**

Diferenciamos:

- Muestras procedentes de la cadena alimentaria y medioambientales: Utiliza métodos regulados internacionalmente como son el método del Comité Europeo para la Normalización (CEN, EN), de la Organización Internacional de Normalización (ISO), del Comité Nórdico de Metodología para el Análisis de Alimentos (NMKL); el método de la Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos (FDA) y el método del Servicio de Inocuidad e Inspección de los Alimentos (FSIS) del Departamento de Agricultura de EE.UU. (USDA). En general estos métodos comienzan con pases en medios de enriquecimiento líquido y a continuación se realizan pases en medios sólidos selectivos específicos para Listerias que llevan cromógenos.
- Muestras a partir de tejidos animales: las muestras deben escogerse de acuerdo con la presentación clínica de la enfermedad: material procedente de lesiones del hígado, riñones y/o bazo, en el caso de la forma septicémica; líquido cefalorraquídeo, puente y bulbo raquídeo, en el caso de la forma rombencefálica; y placenta (cotiledones), contenido del abomaso fetal y/o secreciones uterinas, en el caso del aborto. Se deben emplear temperaturas de refrigeración (4 °C) para la manipulación, conservación y transporte de muestras. Si la muestra ya está congelada, se debe mantener congelada hasta su análisis. Para el aislamiento la muestra se inocula en medio de enriquecimiento para *Listeria* con agentes selectivos y tras la incubación del caldo a 30 °C durante 48 horas, el cultivo se inocula sobre placas con agar de Oxford. Se incuban las placas a 37 °C. Se observa el crecimiento de bacterias transcurridas 24 y 48 horas.

## **b) Métodos de identificación basados en cultivos.**

Las colonias típicas de *Listeria sp.*, una vez obtenidas en el medio selectivo/diferencial o preferiblemente tras el subcultivo en un medio no selectivo, se seleccionan para la posterior identificación a nivel de especie, empleando una batería de pruebas. Sobre cinco colonias (o todas si se dispone de pocas) con el aspecto característico de *L. monocytogenes* se comprueban las siguientes características: la forma celular, la reacción de Gram, la actividad hemolítica en agar sangre (sangre de caballo desfibrinada), la movilidad en agitación a 20°C, la fermentación de la glucosa (+), la ramnosa (+) y la xilosa (-), la hidrólisis de la esculina y la producción de catalasa.

## **c) Métodos rápidos de identificación.**

Algunos de ellos son:

- La reacción en cadena de la polimerasa (PCR), dirigida al gen *hly*, es sensible y rápida para confirmar la identificación de *L. monocytogenes* sospechoso aislado en placas de agar selectivo-diferencial.
- La identificación puede realizarse mediante secuenciación del ADNr de la subunidad 16S o de los genes *iap*.
- La identificación también se puede realizar mediante la secuenciación del genoma completo de la cepa y la determinación de la especie de esta cepa mediante la comparación de su secuencia genómica con otras secuencias genómicas de referencia de cada tipo de cepas de especies de *Listeria* mediante el uso de la identidad de nucleótidos promedio basada en BLAST (Basic Local Assignment Search Tool).
- Un método alternativo para la identificación rápida de especies de *Listeria* es la espectrometría de masas con analizador de tiempo de vuelo y desorción mediante láser asistida por matriz (MALDI-TOF MS). Los sistemas de identificación MALDI-TOF MS se basan en la comparación del espectro de masas de la cepa analizada para proteínas, y también para lípidos, con bases de datos de referencia.

## **d) Antibiogramas.**

**e) Subtipificación:** Pueden ser de utilidad en los estudios de brotes, en el seguimiento medioambiental, en el control del clon(es) recurrentes o persistentes en una planta y en los estudios relativos a la salud pública.

Se recomienda que la tipificación de las cepas de *L. monocytogenes* se remita a los laboratorios de referencia.

Las cepas de *L. monocytogenes* pueden asignarse a 14 serotipos diferentes (1/2a, 1/2b, 1/2c, 3a, 3b, 3c, 4a, 4b, 4ab, 4c, 4d, 4e, 4h y 7), en función de su combinación de antígenos somático (O) y flagelar (H).

- Serotipificación. Dado que la serotipificación no es rentable, exige habilidad técnica y hace necesarios los antisueros, actualmente a menudo se sustituye por una PCR rápida y reproducible, que detecta los cinco fragmentos de ADN: *prs*, ORF2110, ORF2819, *lmo1118*, *lmo0737*.

- linaje. Tras la serotipificación, *L. monocytogenes* se puede clasificar en tres posibles linajes, de los cuales: el linaje I engloba los serotipos 1/2b, 3b, 4b, 4d y 4e; el linaje II engloba los serotipos 1/2a, 1/2c, 3a, 3c y 4h; y el linaje III engloba los serotipos 4a, 4c y el atípico 4b.
- Análisis del ADN cromosómico mediante endonucleasas de restricción (REA).
- Tipificación basada en la secuencia de los ácidos nucleicos y en la secuenciación del genoma completo.

## 2. Diagnóstico serológico:

Tradicionalmente, para diagnosticar la listeriosis no se han utilizado pruebas serológicas de detección de anticuerpos. Han sido muy poco fiables, y carentes de sensibilidad y de especificidad.

### 3.3. YERSINIOSIS

Esta enfermedad fue, en 2018, la 4ª zoonosis alimentaria más detectada en Europa. Está originada por microorganismos del género *Yersinia*.

#### Etiología:

El género *Yersinia* está compuesto por cocobacilos Gram negativos no esporulados, aerobios y anaerobios facultativos, móviles y pertenece a la familia Enterobacteriaceae. Incluye 16 especies con 3 subespecies. De entre ellas, destacan tres especies invasivas capaces de resistir la respuesta inmune y producir patología humana: *Yersinia pestis*, *Yersinia pseudotuberculosis* y *Yersinia enterocolitica*. Únicamente las dos últimas son productoras de gastroenteritis en humana.

*Y. enterocolitica* es la especie relacionada con mayor frecuencia en infecciones humanas y es la tercera causa más frecuente de gastroenteritis de origen alimentario en Europa. Hasta el momento se han descrito más de **50 serogrupos** de acuerdo con la diversidad del antígeno "O" somático y **seis biotipos** definidos según diferentes pruebas bioquímicas (1A, 1B, 2, 3, 4 y 5). Los **bioserogrupos** 4/O:3, 3/O:3, 2/O:9, 2/O:5,27 y 1B/O:8 se asocian habitualmente con infecciones en seres humanos y su distribución relativa varía de acuerdo con la región analizada. Las cepas de los serogrupos O:3 y O:8 son frecuentes en Estados Unidos, mientras que en Europa y Japón predominan los serogrupos O:3, O:9 y O:5,27.

*Y. pseudotuberculosis* puede dividirse en **15 serogrupos** atendiendo a su antígeno somático O (I-XV) con **diez subtipos** (IA, IB, IC, IIA, IIB, IIC, III, IVA, IVB, VA, VB, VI, VII y VIII) y 5 antígenos flagelares H termolábiles (del "a" al "e") siendo el 90% de las infecciones en seres humanos producidas por cepas del serogrupo OI.

Es importante citar los **factores de patogenicidad** de las *Yersinias*:

- 1) El plásmido de 70 Kb, **plásmido de virulencia** (muy conservado, que contiene genes que codifican factores de patogenicidad) está presente en las tres especies de *Yersinia*, aunque

recibe nombres distintos en cada una de ellas: pCD1 en *Yersinia pestis* (Calcium Dependence); pIB1 en *Yersinia pseudotuberculosis*; pYVe en *Yersinia enterocolítica* (*Yersinia* Virulence).

2) **Genes cromosómicos** que también codifican **factores de patogenicidad**. Uno de los genes cromosómicos es: **gen ail** (attachment invasión locus; locus de fijación para la invasión), que codifica una proteína de membrana externa necesaria para la adhesión a las células de la mucosa.

3) **La estructura y metabolismo** de esta bacteria también influye en su patogenicidad: por una parte posee lipopolisacáridos (LPS), en la membrana externa de su pared celular, lo cual puede desencadenar los fenómenos inflamatorios propios de las endotoxinas de bacterias gramnegativas; posee una superóxido dismutasa (SodA) que al degradar el peróxido de hidrógeno evita la muerte por mecanismos de defensa oxígeno dependientes, y posee una potente ureasa, que le permite alcalinizar el ambiente a su alrededor y evitar así el efecto adverso del pH ácido gástrico a su paso por el estómago.

#### Epidemiología y transmisión:

*Yersinia enterocolítica* se encuentra dentro de los patógenos entéricos, capaces de crecer a temperaturas desde los 4°C a 37°C+ 2 y hasta 41°C, sujeta a variación en tiempo y requerimientos nutricionales. Esta característica constituye una gran desventaja para la industria de alimentos, ya que el microorganismo puede proliferar libremente a temperaturas de refrigeración.

*Yersinia* es un género de bacterias que se encuentran de forma natural en el medio ambiente y en los animales. La bacteria *Yersinia* puede transmitirse por la falta de higiene al manipular los alimentos a lo largo de la cadena alimentaria.

La mayoría de los casos de infección por *Y. enterocolítica* biotipo 4 se relacionan con la ingesta de carne de cerdo cruda o mal cocida y sus derivados. Otros alimentos que pueden causar la infección son las verduras y frutas crudas y la leche sin higienizar.

La *Y. pseudotuberculosis* se aísla raramente en alimentos, y casi siempre provienen de riego con aguas contaminadas. Esta bacteria ha sido aislada en animales de abasto como el ganado vacuno, caprino y ovino, en animales silvestres como jabalís, ciervos, ratas, conejos, ardillas y en muchas especies de aves.

La transmisión es fecal-oral, por el consumo de alimentos y agua contaminados o por contacto con personas o animales infectados.

#### Síntomas y lesiones:

El periodo de incubación es de 3 a 7 días, por lo común menos de 10 días.

La mayor parte de los casos de enfermedad por *Y. enterocolítica* se observa en lactantes y niños, siendo la enterocolitis su principal manifestación clínica mientras que *Y. pseudotuberculosis* se presenta principalmente en personas de 5 a 20 años y su manifestación clínica más frecuente es la linfadenitis mesentérica aguda, que puede simular una apendicitis.

Diagnóstico de laboratorio:

El diagnóstico está basado en la **detección e identificación del agente**.

1. Diagnóstico bacteriológico (Detección e Identificación del agente):

Pruebas diagnósticas recomendadas son:

**a) Aislamiento en cultivo.** Se realizará a partir de muestras clínicas de infecciones humanas, en particular heces en casos de gastroenteritis, o sangre en las infecciones sistémicas, o a partir de muestras de productos de origen animal para descartar la presencia de *Y. enterocolítica* en ellos, y alimentos como carne mal cocinada, fruta, verdura, leche sin higienizar .

Previo al aislamiento las muestras se enriquecen de dos posibles maneras, con medio de enriquecimiento no selectivo o con medio de enriquecimiento selectivo, ejemplos de ello son:

Enriquecimiento no selectivo:

- Buffer fosfatos salino (PBS 0.067 M), 4° C, 21 días.
- PBS adicionado con sorbitol y sales biliares (PSB), 25° C, 1-3 días.
- Caldo tripticase soja (TSC), 25° C, 18 h.
- Caldo extracto de levadura-rosa de bengala (YER), 4° C, 9 días.

1. Enriquecimiento selectivo:

- Caldo modificado de Rappaport (CMR), 22° C, 4 días.
- Caldo Irgasan-ticarcilina-carbenicilina (ITC), 25° C, 2 días
- Caldo bilis-oxalato-sorbosa (BOS), 22° C, 5 días.

A continuación, se realizará el aislamiento y algunos de los medios utilizados son los siguientes:

- Agar Mac Conkey (MC), 22° a 25°C, 48 h.
- Agar Cefsulodin Irgasan Novobiocina (CIN), 37°C, 24 h.
- Agar SSDC: Agar Salmonella Shigella adicionado con otros nutrientes.

**b) Diferenciación de cepas patógenas**, mediante detección de los genes plasmídicos de patogenicidad o preferiblemente del gen cromosómico ail, por la facilidad con la que se pierde en cultivo el plásmido de 70 Kb.

La presencia de plásmidos de virulencia se puede estudiar utilizando las técnicas de:

- Expresión fenotípica de afinidad tintorial por cristal violeta: Se emplean medios de agar tripticasa de soja (TSA), 24 h, 37°C.
- Dependencia del calcio para el crecimiento.

**c) Determinación de los serotipos más frecuentes** (O:3, O:5, O:8, O:9, O:5, 27), de interés en estudios epidemiológicos para conocer la distribución de los serotipos. Es posible que el antígeno O se pierda durante el cultivo, en cuyo caso la cepa es “no tipable”.

### 3.4. ESCHERICHIA COLI VEROTOXIGÉNICA

*Escherichia coli* es una bacteria habitual en el tracto gastrointestinal de los animales y de los humanos. Algunas cepas se han adaptado muy bien para producir diarreas y diversas enfermedades intestinales. Desde 1977, se sabe que algunas cepas que ocasionan diarreas de *E. coli* producen toxinas que tienen un efecto citopático irreversible sobre células Verocultivadas (VTEC).

#### Etiología:

*Escherichia coli* es un bacilo Gramnegativo de la familia *Enterobacteriaceae*. Se caracteriza rutinariamente por la identificación serológica de los antígenos O somáticos, H flagelares y K capsulares.

Las cepas verocitotoxigénicas de *E. coli* (VTEC) pertenecen a más de 100 serotipos diferentes. *Escherichia coli* 0157:H7 es el serotipo predominante y más virulento en un subtipo patógeno de VTEC, llamado *E. coli* enterohemorrágico (EHEC). Esta designación se basa en su capacidad para producir colitis hemorrágica y el síndrome de la uremia hemolítica en humanos, su habilidad para producir verocitotoxinas, para unirse y producir lesiones de eliminación de células epiteliales y en que poseen un plásmido grande característico.

En las dos últimas décadas ha aumentado la importancia a escala mundial de la VTEC 0157:H7.

#### Epidemiología, transmisión y síntomas:

Se considera que el ganado vacuno es el reservorio principal de *E. coli* 0157:H7 para la infección en el hombre. A pesar de su patogenicidad para los humanos, la infección de animales con *E. coli* 0157:H7 es invariablemente asintomática. Como contraste, los serogrupos EHEC 026, 0111 y 0103 pueden ser patógenos tanto para los humanos como para los animales. La presencia de VTEC en heces de animales proporciona el potencial para que estos microorganismos entren en la cadena alimentaria por la contaminación fecal de productos lácteos, contaminación de la carne con contenidos intestinales durante el proceso del sacrificio o contaminación de la fruta y los vegetales por contacto con abono infectado. Las VTEC se transmiten también a través del agua contaminada y por contacto directo con personas o con animales infectados.

La VTEC también se ha aislado de cerdos, gatos, perros, pollos y aves salvajes

#### Diagnóstico de laboratorio:

El diagnóstico de laboratorio se basa en la **detección e identificación del agente**.

##### 1. Diagnóstico bacteriológico (Detección e Identificación del agente):

En la mayoría de los casos, las muestras tomadas de animales para el aislamiento de VTEC son las heces recogidas con fines de inspección o como parte de una encuesta epidemiológica después de un brote de enfermedad en humanos. Las muestras se pueden tomar del recto o de heces recién evacuadas en la granja o de contenidos intestinales después del sacrificio.

Se deben tomar precauciones para evitar la contaminación cruzada de las muestras manejadas y en el laboratorio. Las muestras deben mantenerse frías y cultivarse lo antes posible después de la recogida.

**a) Aislamiento:**

1. *Enriquecimiento en medios líquidos*: el número de microorganismos en las heces de portadores sanos es generalmente bajo y el enriquecimiento de medios líquidos mejora la recuperación. Los medios enriquecidos utilizados son el agua tamponada con peptona sin suplementar o suplementada con vancomicina, cefsulodina y cefixima (BPW-VCC).

2. *Separación inmunomagnética (MS)*: Técnica de concentración selectiva para mejorar el aislamiento de *E. coli* O157:H7 donde la cantidad de microorganismos es baja.

3. *Cultivo selectivo de E.coli O157*: No hay características bioquímicas que distingan la mayoría de las VTEC de otras *E. coli*. Sin embargo, la incapacidad de la mayor parte de las cepas de *E. coli* O157:H7 para fermentar D-sorbitol rápidamente y su falta de actividad beta-glucuronidasa se puede utilizar durante el aislamiento e identificación de estos microorganismos.

El agar MacConkey que contiene 1% de D-sorbitol en lugar de lactosa (SMAC) es un medio útil y barato sobre el que crece el *E. coli* que no fermenta el sorbitol en pequeñas colonias redondas blanco-grisáceas.

4. *Aislamiento de otras VTEC*. La incapacidad de las cepas O26 para fermentar rhamnosa ha conducido al desarrollo reciente de medios que pueden ser útiles para diferenciar *E. coli* O26 de otros microorganismos entéricos. El primero es el agar rhamnosa-MacConkey (RMAC) en el cual la lactosa del medio MacConkey es reemplazada por rhamnosa.

**b) Identificación y caracterización de colonias sospechosas.** Se debe confirmar bioquímicamente o genotípicamente (p. ej. por *GadA* PCR) que las colonias que crecen sobre medios sólidos, sospechosas de VTEC, son de *E. coli*. Los antígenos "O" somáticos y los "H" flagelares se identifican serológicamente. También debe realizarse la demostración de los factores de virulencia conocidos en los aislamientos.

1. *Pruebas bioquímicas*. Las VTEC son bioquímicamente similares a otras *E. coli*. Las cepas de VTEC O157:H2 difieren en que no fermentan el sorbitol, no producen beta-glucuronidasa y fermentan la rafinosa y el dulcitol.

2. *Pruebas serológicas*. Hay disponibles kits comerciales de látex.

- *Producción de verocitotoxina en ensayos de células Vero*. El ensayo de células Vero permanece como un método normalizado para la confirmación de la producción de VT. Las células Vero poseen una alta concentración de globotriaosilceramida (Gb3) y globotetraosilceramida (Gb4) como receptores de la unión de la toxina en su membrana plasmática y normalmente detectan todas las variantes de VT. La prueba se puede utilizar con suspensiones fecales, filtrados de cultivo o cultivos vivos.
- *Subtipificación de E.coli O157 para estudios epidemiológicos*. Las técnicas incluyen tipificación por fagos, pruebas de biotipificación y sensibilidad antimicrobiana, perfil de

plásmidos, análisis del polimorfismo de la longitud de fragmentos de restricción, ribotipificación, electroforesis en gel de campo pulsante (EGCP) y varios análisis basados en la PCR. De estos, solamente la tipificación del fago y la EGCP se usan ampliamente

c) **Técnicas sin cultivo para la detección de VTEC.** Aunque el diagnóstico definitivo de la VTEC depende del aislamiento y caracterización de cultivos puros, los métodos de cultivo para la VTEC son laboriosos y llevan mucho tiempo. Esto ha llevado al desarrollo de *pruebas inmunológicas* y de *hibridación de ácido nucleico* para la identificación rápida de antígenos de O y H, y de VT o genes asociados con la producción de VT en la muestra.

d) **Análisis de heces para la detección de E.coli O157:H7.** Escherichia coli O157:H7 es la VTEC más preocupante para la salud pública en la mayoría de los países. El hecho de que se aloje en el tracto intestinal de animales sanos, particularmente del ganado vacuno, representa una fuente de infección directa e indirecta para los humanos. El análisis se basa en las técnicas de cultivo diseñadas para superar los problemas del aislamiento de un número reducido de microorganismos. Estos métodos aún están en desarrollo:

- Pre-enriquecimiento
- Separación inmunomagnética
- Identificación de las colonias
- Confirmación de E.coli
- Determinación somática
- Ensayo en células Vero
- PCR multiplex para VT1, VT2, eae

## 2. Diagnóstico serológico:

En los humanos, el serodiagnóstico de la VTEC puede ser útil, particularmente en fase tardía del curso de la enfermedad cuando se hace cada vez más difícil aislar de las heces el microorganismo causante. El LPS ha resultado ser el antígeno preferido, y se ha demostrado la producción de anticuerpos de suero contra el LPS de un amplio espectro de serotipos prevalentes de la VTEC.

Las pruebas serológicas no se utilizan para el diagnóstico de la infección animal con VTEC. Sin embargo, se ha demostrado que la exposición del ganado a la infección por E. coli O157:H7 da como resultado la producción de anticuerpos contra el LPS O157, que persiste durante meses, demostrables por ELISA indirecto.

### 3.5. FIEBRE Q

La fiebre Q aparece categorizada como E (necesita vigilancia) en el listado de enfermedades del Reglamento de Ejecución (UE) 2018/1882.

### Etiología:

El agente causal es la *Coxiella burnetii*, bacteria Gram negativa intracelular estricta, adaptada para desarrollarse en el interior del fagolisosoma del fagocito. Los estudios filogenéticos basados principalmente en el análisis de la secuencia de ARN de la subunidad ribosómica 16S indican que el género *Coxiella* está lejos del género *Rickettsia* en la subdivisión alfa de las Proteobacterias. *Coxiella burnetii* se clasifica ahora en la familia *Coxiellaceae*, en el orden *Legionellales* de la subdivisión gamma de las Proteobacterias.

Características de *C. burnetii*:

- Entre los genomas de las cepas existe un considerable polimorfismo.
- Tiene dos formas antigénicas: la fase I patógena, cuando se aísla de animales o humanos infectados, y la fase II atenuada, que se obtiene mediante repetidos pases in ovo o in vitro.

### Epidemiología y transmisión:

La fiebre Q (o Coxielosis) tiene una amplia distribución por todo el mundo, excepto en Nueva Zelanda, y aunque está prácticamente presente en todo el reino animal, incluyendo los artrópodos, la enfermedad afecta sobre todo al hombre, al ganado bovino, al ovino y al caprino.

Existen claros indicios epidemiológicos y experimentales de que esta infección se transmite principalmente por inhalación de partículas de aerosol desecadas y mediante la exposición cercana a animales infectados, a sus tejidos reproductivos (secreciones vaginales) o a otros productos de origen animal, como la lana. También, es posible que ciertos artrópodos, principalmente garrapatas, intervengan en la transmisión de la fiebre Q. El riesgo de transmisión parece estar vinculado a animales salvajes.

Los rumiantes domésticos son principalmente portadores subclínicos, pero pueden diseminar la bacteria en distintas secreciones y en los excrementos. En el ambiente, *C. burnetii* puede sobrevivir durante periodos variables y diseminarse.

### Síntomas y lesiones:

En las vacas, las ovejas y las cabras, la fiebre Q se ha asociado fundamentalmente a trastornos reproductivos, como partos prematuros, nacidos muertos o débiles. Además, en ganado bovino *C. burnetii* podría asociarse a metritis e infertilidad.

### Diagnóstico de laboratorio:

Los métodos de diagnóstico de la fiebre Q solo permiten una interpretación a nivel de la población, y no a nivel individual. Además, los resultados de las pruebas de laboratorio deben interpretarse en el contexto de los antecedentes del rebaño o manada (abortos, vacunaciones, desplazamientos e introducciones, etc.)

#### 1. Diagnóstico bacteriológico (Detección e Identificación del agente):

- a) **Aislamiento.** Se realiza por inoculación de huevos de gallina embrionados o de cultivos celulares (fibroblastos de pulmón de embrión humano (células HEL)).

- b) **Tinción.** Cuando se producen abortos, se preparan frotis de cotiledones placentarios sobre portas de microscopio. Igualmente puede usarse el contenido del bazo, pulmón, hígado o rumen de los fetos abortados o las secreciones vaginales. Estas muestras se tiñen siguiendo varios métodos: Tinción de Stamp, Giménez, acchiavello, Giemsa y Koster modificada. Con las tres primeras técnicas se obtienen los mejores resultados.
- c) **Métodos específicos de detección.** Detección de *C. burnetii* en muestras mediante la inmunodetección específica (ELISA de captura, inmunohistoquímica), hibridación in-situ o amplificación del ADN (PCR y PCR a tiempo real).
- d) **Métodos de genotipificación.** Herramientas son muy útiles para la investigación epidemiológica.  
El MLVA (análisis multilocus de repeticiones en tándem de número variable) y la tipificación de la secuencia multiespacio (MST), que permiten la tipificación de *C. burnetii* sin necesidad de aislar el microorganismo, se consideran los métodos más discriminantes para *C. burnetii*, que permiten la identificación de hasta 36 genotipos bien diferenciados.

## 2. Diagnóstico serológico:

a) **Enzimoimmunoanálisis (ELISA).** Esta técnica presenta una gran sensibilidad y una buena especificidad. Es preferible a la IFA y la FC.

b) **Prueba de inmunofluorescencia indirecta (IFA).** Se utiliza en medicina humana.

c) **Prueba de fijación de complemento (FC).** Se considera menos sensible que el EISA o la IFA y en veterinaria se utiliza cada vez menos.

## 3.6. BORRELIOSIS

**La Borreliosis**, también llamada enfermedad de Lyme, una enfermedad zoonótica transmitida por garrapatas duras del género Ixodes. El nombre de Lyme procede de una pequeña población de Connecticut donde en 1975 se advirtió por primera vez la relación entre las enfermedades artríticas en niños y las picaduras de garrapata.

### Etiología:

Causada por la bacteria *Borrelia burgdorferi*, una especie de bacteria de la clase Spirochaetes y del género Borrelia. Las espiroquetas son organismos filamentosos, extraordinariamente largos y flexibles y con una forma característica en espiral.

El genoma está compuesto por un cromosoma lineal, inusual en las bacterias, de aproximadamente 1 Mb y varios plásmidos tanto lineales como circulares. En la actualidad, se conocen 11 genoespecies de *B. burgdorferi*.

### Epidemiología y transmisión:

La enfermedad de Lyme está extendida en gran parte de Europa y Norteamérica. Está condicionada a la presencia de su vector principal de transmisión. En los meses de marzo a noviembre, y sobre todo desde junio hasta septiembre, las garrapatas son especialmente activas. Los casos humanos se manifiestan a mediados o finales de verano.

En las áreas endémicas y zonas cercanas, varias especies de animales domésticos (perros, caballos y bovinos) están infectados por *B.burgdorferi*.

Síntomas y lesiones:

Es una enfermedad multisistémica con manifestaciones dermatológicas, reumáticas, neurológicas y cardíacas. Su característica principal es una lesión cutánea denominada **eritema migratorio**.

Profilaxis:

Profilaxis con antimicrobianos después de una picadura de garrapata, en zonas endémicas.

Diagnóstico de laboratorio:

1. Diagnóstico bacteriológico (Detección e Identificación del agente):

a) **Aislamiento** en medio BSK (Barbour-Stoenner-Kelly) a partir de lesiones cutáneas (tomadas preferentemente de la periferia de la lesión del eritema). En términos generales, el cultivo presenta una sensibilidad muy baja (alrededor del 30%) debido, entre otros factores, al bajo número de organismos presentes en las muestras, por lo que no se considera un método de diagnóstico eficaz.

b) **Técnicas de amplificación del del ADN mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR)**, si bien tiene una eficacia probada en el diagnóstico de otras enfermedades, no la tiene en la borreliosis de Lyme. Varias han sido las dianas elegidas para su amplificación, como los genes plasmídicos ospA y ospB, el gen cromosómico que codifica la proteína flagelar, o los genes que codifican el 16S ARNr y el espacio intergénico 5S-23S ARNr. En el caso de líquido sinovial en pacientes con artritis, la PCR tiene una buena sensibilidad<sup>31</sup> (hasta el 70%). Las muestras de orina o sangre no se consideran recomendables en el diagnóstico por PCR de la borreliosis de Lyme.

2. Diagnóstico serológico: A nivel serológico se dan reacciones cruzadas con otras especies bacterianas y virales, por este motivo es imprescindible el uso de un esquema diagnóstico de dos tests, uno de alta sensibilidad para screening (ELISA o inmunofluorescencia), donde obtendremos resultados positivos con una especificidad baja, y otro de confirmación (Inmunoblot -IB), que nos permitirá alcanzar un nivel de especificidad mayor de un 98% si se confirman todos los resultados positivos o equívocos obtenidos en el muestreo inicial.

a) **Enzimoanálisis (ELISA)**. La variedad de métodos de ELISA disponibles actualmente en el mercado hace muy difícil su estandarización.

El ELISA indirecto es más sensible y específico que el IFA.

b) **Prueba de inmunofluorescencia indirecta (IFA)**. Se utiliza en medicina humana.

c) **Técnica de inmunoblotting (IB)**. Se utilizará como técnica de confirmación.

Los resultados serológicos positivos para esta enfermedad deben siempre interpretarse a la luz de los datos clínicos y epidemiológicos y teniendo en cuenta la respuesta del paciente al tratamiento.

### 3.7. BOTULISMO

El **Botulismo** es una enfermedad producida por el *Clostridium botulinum*. Esta bacteria en entornos pobres en oxígeno produce toxinas peligrosas (toxinas botulínicas), que son de las sustancias más mortales que se conocen, bloquean las funciones nerviosas produciendo parálisis respiratoria y muscular.

#### Etiología:

El *Clostridium botulinum* es un bacilo anaerobio Gram positivo, que produce **esporas** termorresistentes ampliamente difundidas en el medio ambiente, que en ausencia de oxígeno germinan, crecen y excretan **toxinas**. Se conocen **siete tipos** antigenicos diferentes de toxinas botulínicas (A-G), de acuerdo con su especificidad serológica. Cuatro de ellas (tipos A, B, E y ocasionalmente F) pueden causar botulismo humano. Los tipos C, D y E provocan enfermedades en otros mamíferos, aves y peces.

La especie *C. botulinum* es muy heterogénea. Los diferentes grupos (I a IV) se diferencian por su capacidad para digerir o no proteínas y descomponer azúcares. A pesar de que hay diferencias metabólicas y de ADN entre ellos, estos grupos de clostridios están clasificados hasta ahora en una sola especie debido a que todos elaboran una neurotoxina botulínica de acción similar sobre los huéspedes animales.

#### Epidemiología y transmisión:

La toxina botulínica se ingiere con alimentos elaborados inapropiadamente, en los que la bacteria o sus esporas sobreviven y producen las toxinas. Aunque es principalmente una intoxicación de transmisión alimentaria, el botulismo puede deberse a infección intestinal en los lactantes, heridas infectadas e inhalación.

El reservorio de *C. botulinum* es el suelo, el sedimento de ríos y mares, los vegetales y el intestino de animales mamíferos y aves. Las esporas que forma la bacteria son muy resistentes al calor y a la desecación. El agente etiológico se encuentra distribuido en todos los continentes, aunque de modo irregular.

Cualquier alimento de origen vegetal o animal puede dar origen a la intoxicación botulínica, si las condiciones son favorables a la multiplicación de *C. botulinum* y, en consecuencia, a la producción de toxinas. La anaerobiosis y un pH por encima de 4,5 son los principales requerimientos para la multiplicación de *C. botulinum*, pero una vez formada la toxina, el medio ácido le puede ser favorable. En general las conservas caseras son las que causan la enfermedad, aunque a veces también pueden originarla productos comerciales esterilizados incorrectamente o mal preservados.

#### Síntomas y lesiones:

Los síntomas no son provocados por la bacteria, sino por la toxina que ella produce. El período de incubación suele durar de 18 a 36 horas, pero la enfermedad puede manifestarse a las pocas horas de la ingestión del alimento o a veces tardíamente, hasta ocho días después. Los

signos clínicos varían poco con los diferentes tipos, aunque la mortalidad parece ser mayor para el tipo A. La enfermedad es afebril y los síntomas gastrointestinales, tales como náuseas, vómitos, dolores abdominales, preceden a los síntomas nerviosos. Las manifestaciones neurológicas son siempre simétricas, con una debilidad o parálisis descendente. La diplopía, disartria y disfagia son comunes. La conciencia y la sensibilidad permanecen intactas hasta la muerte. La causa inmediata de la muerte es generalmente un paro respiratorio.

#### *Diagnóstico de laboratorio:*

El diagnóstico laboratorial se basa en demostrar la presencia de la toxina botulínica en el suero, las heces o los alimentos, o en el aislamiento en cultivo de *Clostridium botulinum* a partir de heces, heridas o alimentos.

Las pruebas de laboratorio disponibles son las siguientes:

#### **a) Detección de la toxina botulínica en las muestras/productos.**

Puede detectarse en muestras de suero y también puede detectarse en un alimento tras la obtención de un extracto filtrado a partir de él.

Para detectar la toxina se lleva a cabo la inoculación de animales de experimentación (ratones) que desarrollarán sintomatología compatible con la enfermedad, caracterizada por lordosis, rigidez de cola, abdomen en avispa por la dificultad respiratoria y pelo hirsuto.

#### **b) Detección de la toxina en las muestras/productos tras cultivo.**

También puede investigarse la toxina después de haber cultivado la muestra del paciente (heces de un paciente, vómitos, aspirado gástrico), los restos de un alimento ingerido, un alimento sospechoso, un alimento sometido a control, o de otras muestras como lodos acuáticos o marinos, etc. donde pudiese encontrarse la bacteria viable (*Clostridium botulinum*). Durante el cultivo, en medios de cultivo adecuados (Caldo Tarozzi), se produce la toxina en caso de que exista la bacteria y al preparar un filtrado del cultivo se puede investigar su presencia, lo que indicará la presencia de la bacteria en la muestra/producto cultivado.

Las cepas no proteolíticas de los tipos B (algunas cepas), C, D, E y F (algunas cepas) pueden producir toxina a temperaturas de refrigeración (3 a 4°C). Las toxinas de las cepas no proteolíticas no manifiestan su máxima toxicidad hasta que se ha activado la toxina con tripsina. Las toxinas de las cepas proteolíticas (cepas A, y algunas de B y de F), generalmente se producen completamente en su forma activada.

#### **c) Identificación y tipado de la toxina.**

Para confirmar que realmente un animal inoculado muere como consecuencia de la presencia de toxina botulínica en el inóculo, es necesario realizar la prueba de neutralización de la toxina con sueros específicos frente a cada uno de los tipos de toxina. Como paso previo a la prueba de neutralización es necesario calcular la dosis mínima mortal (d.m.m). De esta forma calcularemos la dilución máxima (la más elevada) que provoca la muerte de los animales inoculados, y el volumen inoculado que ha provocado la muerte de los animales contendrá una dosis mínima mortal. Para identificar el tipo de toxina, una vez titulada y conocida la “dosis

mínima mortal”, se realizará el enfrentamiento de una dosis mínima mortal con los distintos tipos de sueros antibotulínicos.

Estas mezclas serán inoculadas en igual volumen a los animales de experimentación y aquellos que sobrevivan, habrán sido inoculados con la mezcla de “dosis mínima mortal” más un suero frente a un tipo que ha sido capaz de producir la neutralización.

#### **d) Aislamiento de C.botulinum.**

Con las muestras de materia fecal, vómito y alimentos se realizan dos estudios:

- Se hace una extensión para realizar una tinción de Gram. Tras ellas se observa y registra el color, morfología y cantidad de bacterias presentes, también se registra el tamaño de los bacilos y la ubicación de las esporas en las bacterias esporuladas.
- Se cultivan las muestras en un medio enriquecido, caldo Tarozzi.

A partir del cultivo en medio enriquecido se realiza una siembra en agar yema de huevo para obtener colonias aisladas. Incubar las placas en anaerobiosis por 48 hs a 35°C. A partir de las colonias que crezcan lipasa positivas se realizarán los ensayos de identificación, de toxicidad y neutralización en los cultivos puros.

#### **e) Detección de anticuerpos antitoxina botulínica.**

La detección de anticuerpos antitoxina botulínica tiene interés en los siguientes casos:

- Pacientes en tratamiento con toxina botulínica diluida, como los que reciben botox para tratamientos estéticos o médicos (ej. dolor facial por neuralgia del trigémino), para detectar la presencia de anticuerpos que puedan impedir su acción.
- Pacientes con sospecha de botulismo infantil o botulismo del adulto en los que no se haya podido encontrar la bacteria Clostridium botulinum o su toxina en heces, ni la toxina en suero.
- Individuos vacunados en los que interese comprobar el estado de protección.

**El método de referencia aceptado** para detectar y cuantificar los anticuerpos frente a la toxina botulínica es la prueba de **neutralización en ratón** (Mouse Neutralization Assay), en el que una solución de la toxina botulínica, cuantificada en Dosis Letal 50% para el ratón (DL), se mezcla con varias diluciones en base 2 ó en base 4 del suero/plasma problema, y tras una incubación se inocula por vía intraperitoneal a unos lotes de ratones.

La dilución más elevada del suero problema que reduzca la toxicidad es el título de anticuerpos frente a la correspondiente toxina botulínica del suero. Esta dilución comparada con un standard internacional permite obtener los resultados en unidades internacionales (UI/mL) (1 U.I. se define como la cantidad de anticuerpos que neutraliza 10.000 DL de toxinas A o B, o 1.000 DL del tipo E). Esta prueba es laboriosa, costosa y de larga duración de realización, por lo que se han buscado alternativas basadas en métodos de enzimoinmunoanálisis (ELISA) utilizando microplacas recubiertas de toxina botulínica. Sin embargo, los valores obtenidos por ELISA, a veces, no se correlacionan completamente con la prueba de neutralización en ratón.

### 3.8. LEPTOSPIROSIS

La **leptospirosis** es una enfermedad transmisible de los animales y del hombre producida por la infección por la espiroqueta *Leptospira*.

#### Etiología:

El género *Leptospira* ha sido reorganizado y se considera que consiste en 66 especies que se pueden clasificar en cuatro subclados. Las espiroquetas patógenas del género *Leptospira* pertenecen principalmente al subclado P1 de la nueva clasificación (Casanovas-Massana et al., 2020; Vincent et al., 2019). Serológicamente, hay más de 300 serovares leptospirales distintos reconocidos y estos están organizados en 30 serogrupos.

#### Epidemiología y transmisión:

Teóricamente, cualquier *Leptospira* puede infectar a cualquier especie animal, pero afortunadamente, solo una pequeña cantidad de serotipos serán endémicos en cualquier zona o país. Además, la leptospirosis es una enfermedad que presenta una nidalidad natural, y cada serotipo tiende a mantenerse en hospedadores de mantenimiento específicos.

#### Síntomas y lesiones:

Debe sospecharse de leptospirosis aguda en los siguientes casos: aparición repentina de agalactia (en el ganado lechero adulto y ovino); ictericia y hemoglobinuria, especialmente en los animales jóvenes; meningitis; y fallo renal agudo (en perros). La leptospirosis crónica debe considerarse en los siguientes casos: aborto, mortinatos, nacimiento de animales débiles (pueden ser prematuros); infertilidad; fallo renal crónico (en perros); y casos de oftalmía periódica en los caballos.

#### Diagnóstico de laboratorio:

Comprende:

##### 1. Diagnóstico bacteriológico (Detección e Identificación del agente):

###### **a) Aislamiento.**

El cultivo debe realizarse en un medio líquido o semisólido, incubado a una temperatura de  $30 \pm 2^\circ\text{C}$  al menos durante 16 semanas y, preferiblemente, durante 26 semanas. El tiempo que se requiere para la detección de un cultivo positivo varía con el serotipo de *Leptospira* y el número de microorganismos presentes en la muestra. Los cultivos deben examinarse con un microscopio de campo oscuro cada 1–2 semanas.

###### **b) Técnicas de tinción inmunoquímica.**

Estas técnicas son útiles para diagnosticar la infección en material patológico que es inadecuado para la realización de cultivos o donde se requiere un diagnóstico rápido.

### **c) Métodos de detección del ácido nucleico.**

La PCR en tiempo real es más rápida que la PCR clásica y es menos sensible a la contaminación. Las pruebas se clasifican en dos posibles grupos en función de si se detectan los genes que están siempre presentes en las bacterias,

Estas pruebas no identifican el serotipo infectante, aunque algunos grupos de cebadores pueden permitir un mayor grado de identificación, a nivel de especie o de cepa si se secuencian los amplicones de la PCR. Este segundo análisis no es un método de diagnóstico de rutina.

La validación sigue siendo uno de los problemas por resolver en cuanto al uso de la PCR en el diagnóstico de la leptospirosis animal.

### **d) Identificación de cepas de leptospira.**

La identificación de las cepas de leptospiras es un cometido de los laboratorios de referencia especializados. Para realizar una identificación completa, debe utilizarse una combinación de procedimientos que determinen: 1) si la cepa es un patógeno o un saprofito; 2) la especie de *Leptospira* a la que pertenece la cepa y 3) el serogrupo y el serotipo de la cepa. Un cultivo puro de leptospiras puede identificarse como perteneciente a una especie patógena o saprófita mediante pruebas diferentes como la capacidad de infectar animales, la resistencia relativa a la 8-azaguanina, la actividad lipasa, la tolerancia a la sal y a la temperatura, y el contenido de G+C del ADN.

La determinación de la especie se basa cada vez más en técnicas moleculares rápidas, entre las que está la tipificación de la secuencia multilocus (MLST) y la secuenciación del gen *ppk*.

## **2. Diagnóstico serológico:**

Las pruebas serológicas constituyen el procedimiento de laboratorio utilizado con más frecuencia para confirmar el diagnóstico clínico, para determinar la prevalencia en el rebaño y para realizar los estudios epidemiológicos. Los anticuerpos de las leptospiras aparecen a los pocos días del comienzo de la enfermedad y persisten durante semanas o meses y, en algunos casos, años. Desafortunadamente, los títulos de anticuerpos puede que desciendan hasta niveles indetectables mientras los animales permanecen infectados crónicamente.

### **a) Prueba de aglutinación microscópica (MAT).**

La prueba MAT en la que se emplean antígenos vivos es la prueba serológica más ampliamente utilizada. Constituye la prueba de referencia frente a la que se evalúan todas las otras pruebas serológicas y se utiliza en las comprobaciones para la importación/exportación. Para obtener una sensibilidad óptima deben emplearse antígenos representativos de todos los serogrupos conocidos que existen en la región en la que se han encontrado los animales y, preferiblemente, cepas que representen a todos los serogrupos conocidos.

La especificidad de la MAT es buena.

## **b) Enzimoimmunoanálisis (ELISA).**

Se han elaborado empleando una serie de preparaciones antigénicas diferentes, protocolos de ensayo y programas de ensayo que incluyen pruebas en placa y pruebas con tiras reactivas. Las preparaciones de antígeno han sido principalmente o bien preparaciones de células enteras o bien preparaciones de la proteína de la membrana externa (OMP), y hace poco se ha incidido especialmente en el desarrollo de pruebas en las que se utilizan OMP recombinantes. El agente utilizado es el que determina la especificidad del ELISA. Los ELISA basados en OMP recombinantes son ampliamente reactivos frente a anticuerpos contra todas las leptospiras patógenas y por lo tanto no tienen valor en los estudios epidemiológicos. Por el contrario, los ELISA basados en antígenos lipopolisacáridos son específicos de serogrupo y sí tienen utilidad en los estudios epidemiológicos y los planes de control.

## **3.9. PSITACOSIS**

**La Psitacosis**, también llamada Clamidiasis aviar (CA), ornitosis está causada por la bacteria *Chlamydochloa psittaci*. Las infecciones son particularmente comunes entre las aves psitácidas y las palomas, aunque probablemente sean susceptibles la mayoría o todas las especies de aves.

La Clamidiasis aviar aparece categorizada como D+E en el listado de enfermedades del Reglamento de Ejecución (UE) 2018/1882.

### Etiología:

Está causada por una especie de *Chlamydia* en las aves. La taxonomía de la familia Chlamydiaceae ha sido revisada recientemente. El género *Chlamydia* actualmente incluye 11 especies reconocidas, y entre ellas se han aislado *C.psittaci*, *C. avium* y *C. gallinacea* de las aves.

Se han diferenciado claramente dentro de las cepas *C. psittaci* nueve genotipos distintos en base al gen ompA que codifica la principal proteína de la membrana externa (MOMP). Siete de estos genotipos se considera que tienen lugar principalmente en un orden o clase específicos de aves y dos en hospedadores no aviares.

### Epidemiología y transmisión:

La infección de las aves por *C. psittaci* es frecuente en todo el mundo y se ha hallado en unas 465 especies de aves.

La mayoría de las infecciones tienen lugar por inhalación de aerosoles infecciosos.

### Síntomas y lesiones:

En las aves domésticas, los signos clínicos más frecuentes son conjuntivitis, anorexia y pérdida de peso, diarrea, deposiciones amarillentas, sinusitis, biliverdinuria, rinorrea, estornudo, lagrimeo y dificultad respiratoria. En muchas aves, especialmente en las psitácidas y aves de

corral viejas, se puede presentar sin signos clínicos; sin embargo, liberan el agente durante períodos largos de tiempo.

Diagnóstico de laboratorio:

1. Diagnóstico bacteriológico (Detección e Identificación del agente):

El método de elección para la identificación de la *Clamidiosis aviar* ya no es el aislamiento del microorganismo. A menudo se utilizan otras técnicas debido al tiempo requerido, la necesidad de muestras de alta calidad, el hecho de que ciertas cepas nunca crecerán in vitro y el peligro que supone para el personal de laboratorio, para un diagnóstico rápido, sensible y específico, actualmente se recomiendan las pruebas de amplificación de ácido nucleico (NAAT). Estas técnicas incluyen:

**a) Métodos moleculares para la detección del ácido nucleico.**

*C. psittaci* puede identificarse y subtipificarse utilizando: (1) PCR convencional específica de la especie; (2) PCR en tiempo real; (3) secuenciación de ompA; (4) tipificación de secuencia de múltiples locus (MLST)); y (5) microchips de ADN.

**b) Visualización directa.**

Las clamidias se pueden detectar en frotis de hisopos cloacales o conjuntivales y en frotis de impresión de tejidos (pulmón, hígado, bazo, riñón y sacos aéreos si hay suficiente material disponible) mediante tinción citológica como la de Giemsa, Giménez, Giménez modificada, Ziehl-Neelsen y Macchiavello. La técnica de Giménez modificada es la que se usa con mayor frecuencia.

**c) Aislamiento en cultivo celular.**

Son el método más cómodo para el aislamiento de *C. psittaci*. Las líneas celulares más comunes son las células de riñón de mono Búfalo verde (BGM), McCoy, HeLa y mono verde africano (Vero), y las células L.

**d) Aislamiento en huevo embrionado.** Para el aislamiento primario.

**e) Técnicas para detección de Antígeno:** Tinción inmunohistoquímica, ELISA de antígeno.

2. Diagnóstico serológico: En la mayoría de las especies de aves, hay una alta tasa de anticuerpos anti-clamidia. Por lo tanto, para determinar si un ave concreta está infectada, la serología debe usarse siempre junto con la detección de genes o antígenos, o se deben examinar muestras pareadas del suero. Una prueba positiva es evidencia de que el ave ha sido infectada por la bacteria, pero no necesariamente indica una infección activa. Pueden producirse falsos negativos en aves con infecciones agudas que se analicen antes de la seroconversión. El tratamiento con antibióticos también puede retrasar o disminuir la respuesta de anticuerpos.

Los principales métodos serológicos que se utilizan para detectar anticuerpos contra clamidias son: (1) varios métodos de aglutinación de corpúsculos elementales (EBA), (2) Técnica de Fijación del complemento (CF) y (3) ELISA.

### 3.10. VIBRIOSIS

#### Etiología:

La familia *Vibrionaceae* está constituida por bacilos Gram negativos móviles o inmóviles y clásicamente se incluyen en ella tres géneros de interés clínico: *Vibrio*, *Aeromonas* y *Plesiomonas*.

Gran parte de las bacterias que componen esta familia son exigentes en cloruro sódico y, desde un punto de vista práctico, se pueden diferenciar dos grupos: especies halotolerantes capaces de crecer en agua de peptona sin adición de NaCl y especies halófilas incapaces de crecer en ausencia de sal marina.

La infección con especies patógenas de esta familia puede causar dos categorías de infección: el cólera y la vibriosis.

El género *Vibrio* está compuesto por microorganismos cuyo hábitat natural son los ecosistemas marinos y fluviales. Son bacterias móviles, crecen en agar nutritivo incubadas a 35°C en atmósfera aerobia y anaerobia y fermentan la glucosa. Pueden presentar una morfología curvada característica.

El género *Vibrio* contiene más de 34 especies, 12 son patógenas para el hombre o han sido aisladas en muestras clínicas y, de éstas, 10 se consideran halófilas. Las especies halófilas requieren para su crecimiento óptimo una concentración de NaCl no inferior al 1%, aunque una concentración de 0,5% permite el aislamiento de las mismas.

Las principales especies designadas como agentes etiológicos de gastroenteritis son *V. parahaemolyticus*, *V. hollisae* y *V. fluvialis*. El período de incubación y las manifestaciones clínicas pueden ser similares e indistinguibles de las ocasionadas por otros enteropatógenos, por lo que estos microorganismos deben ser incluidos en el diagnóstico diferencial de la diarrea aguda asociada al consumo de alimentos y de la diarrea del viajero.

*V. vulnificus* es la especie que causa bacteriemia con mayor frecuencia, especialmente en pacientes con enfermedades hepáticas y en inmunodeprimidos, también causa infecciones moderadas o graves de heridas. Es un vibrión “no colérico” halófilo, marino. Las infecciones de oído debidas a *V. alginolyticus* ocurren preferentemente en pacientes con factores predisponentes.

#### Epidemiología y transmisión:

Se aíslan con frecuencia de aguas costeras templadas y tropicales, especialmente en meses cálidos, cuando la temperatura del agua es superior a 17°C. El reservorio de estos microorganismos lo constituyen las aguas donde habitan y los alimentos de origen marino o contaminados con agua de mar.

#### Síntomas y lesiones:

La mayor parte de los vibrios halófilos se asocian a infecciones del tracto gastrointestinal, aunque también se ha descrito su implicación en patología extraintestinal, causando bacteriemia, otitis, conjuntivitis e infecciones de tejidos blandos entre otras.

Diagnóstico de laboratorio:

El diagnóstico está basado en el aislamiento e identificación de las especies halófilas del género *Vibrio*:

1. Diagnóstico bacteriológico (Detección e Identificación del agente):

**a) Aislamiento:**

Las especies halófilas del género *Vibrio* crecen en agar sangre, agar McConkey, caldo cerebro-corazón (BHI) y en medio de triptosa soja, pero su comportamiento en los medios utilizados habitualmente para el aislamiento de patógenos entéricos es imprevisible. Su aislamiento se facilita en *medios selectivos* que inhiben o retardan el crecimiento de otros microorganismos. El más empleado es el agar tiosulfato-citrato-sacarosa con sales biliares (TCBS), el cual permite diferenciar la especie que fermenta la sacarosa (amarilla) de la que no posee esta capacidad (verde).

Respecto a los *medios de enriquecimiento*, el más asequible es el agua de peptona alcalina (pH 8,5) con adición de 1% de NaCl, pudiendo ser utilizada igualmente como medio de transporte.

La temperatura óptima de crecimiento es de 35°C (25°C para *V. damsela*) incubadas durante 18-24 h.

**b) Identificación.** Se basa en tres estudios:

- Estudio de las condiciones de crecimiento: Un dato que puede hacer sospechar la presencia de una bacteria halófila, es la ausencia de crecimiento en los medios de identificación utilizados de rutina. En la práctica, la identificación presuntiva de los vibrios halófilos puede efectuarse con los medios convencionales empleados para la identificación de los miembros de la familia Enterobacteriaceae, previa adición de 1% de NaCl en todos los que carecen de sal en su composición.
  - Estudio de las características bioquímicas: Para ello se realizarán las siguientes pruebas:
    - Reacción de la oxidasa. Son positivas todas excepto *V. metschnikovii*.
    - Reducción de nitratos. Son positivas todas excepto *V. metschnikovii*.
    - Sensibilidad al agente vibriostático O/129. Utilizada para separar el género *Vibrio* de *Aeromonas* spp y diferenciar las distintas especies de vibrios entre sí.
- Reacciones bioquímicas diversas. Prueba de Voges-Proskauer, producción de gas en la fermentación de la glucosa y el metabolismo de distintos azúcares.
- Pruebas moleculares: PCR y la Hibridación in situ.

## BIBLIOGRAFÍA

Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. Enfermedades de los animales.

<https://www.mapa.gob.es/es/ganaderia/temas/sanidad-animal-higiene-ganadera/sanidad-animal/enfermedades/default.aspx>

Organización Mundial de Sanidad Animal. Manual Terrestre.

[Acceso en línea al Manual Terrestre - OMSA - Organisation Mondiale de la Santé Animale \(woah.org\)](https://www.woah.org/es/publicaciones/manuales-terrestres/)

Informe de análisis de datos de zoonosis. AESAN

[https://www.aesan.gob.es/AECOSAN/docs/documentos/seguridad\\_alimentaria/control\\_oficial/2019\\_Informe\\_AESAN\\_Analisis\\_Datos\\_Zoonosis.pdf](https://www.aesan.gob.es/AECOSAN/docs/documentos/seguridad_alimentaria/control_oficial/2019_Informe_AESAN_Analisis_Datos_Zoonosis.pdf)

Informe anual del Plan Nacional de Control Oficial de la Cadena Alimentaria en España. AESAN.

[https://www.aesan.gob.es/AECOSAN/web/seguridad\\_alimentaria/seccion/informe\\_anual\\_pncoca.htm](https://www.aesan.gob.es/AECOSAN/web/seguridad_alimentaria/seccion/informe_anual_pncoca.htm)

The European Union One Health 2019 Zoonoses Report. EFSA.

<https://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/pub/6406>

**MATERIAL PARA LA PREPARACIÓN DEL TEMA 54**

**RESISTENCIAS ANTIMICROBIANAS. MARCO LEGAL. PROGRAMA DE VIGILANCIA DE RESISTENCIA A LOS ANTIBIÓTICOS DE BACTERIAS ZONÓTICAS Y COMENSALES. TÉCNICAS DE LABORATORIO.**

*Este material no tiene carácter oficial, por lo que en ningún caso vinculará al Tribunal Calificador. Constituye, únicamente, un instrumento complementario que servirá de apoyo al opositor para enfocar cada uno de los epígrafes, pero nunca de forma exclusiva ni excluyente. El Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación no se hace responsable del contenido del mismo.*

*Los materiales no serán objeto de actualización constante.*

## **ÍNDICE**

### **1. RESISTENCIAS ANTIMICROBIANAS:**

#### 1.1. INTRODUCCIÓN

#### 1.2. CONCEPTO DE RESISTENCIAS ANTIMICROBIANAS

##### 1.2.1. Mecanismos de resistencias

#### 1.3. SITUACIÓN EN LA UE Y EN ESPAÑA

### **2. MARCO LEGAL**

#### 2.1. EN LA UNIÓN EUROPEA: PLAN DE ACCIÓN

#### 2.2. EN ESPAÑA

##### 2.2.1. Plan Nacional frente a las resistencias de los antibióticos (PRAN)

##### 2.2.2. Programa Nacional de Control Oficial de distribución, prescripción y dispensación de medicamentos veterinarios

##### 2.2.3. Otras iniciativas

#### 2.3. A NIVEL INTERNACIONAL: OIE/FAO/OMS

### **3. TÉCNICAS DE LABORATORIO**

#### 3.1. TÉCNICAS MICROBIOLÓGICAS

##### 3.1.1. Técnicas colorimétricas

#### 3.2. TÉCNICAS INMUNOLÓGICAS

##### 3.2.1. Técnicas inmunocromatográficas

#### 3.3. TÉCNICAS MOLECULARES

##### 3.3.1. PCR

##### 3.3.2. Microarrays

#### 3.4. OTROS

##### 3.4.1. Espectrometría de masas MALDI-TOF

##### 3.4.2. Citometría de flujo

##### 3.4.3. Nefelometría

##### 3.4.4. Métodos de lisis bacteriana

## 1. RESISTENCIAS ANTIMICROBIANAS

### 1.1. INTRODUCCIÓN

Históricamente, las enfermedades infecciosas han provocado graves estragos sobre la humanidad. Así, toda la Edad Media estuvo marcada por procesos patológicos como la peste que hacían que la esperanza de vida fuera realmente baja. Sin embargo, hitos como el descubrimiento de los microorganismos, la concienciación sobre la importancia de la higiene y, sobre todo, el descubrimiento de la penicilina, de la mano de Alexander Fleming en 1928, proporcionó una vía de tratamiento efectiva frente a un gran número de procesos infeccioso y, además, dio pie a la aparición de otras sustancias con actividad antimicrobiana.

Por ello, hoy en día, el número de decesos que se producen en países desarrollados de origen infeccioso es muy reducido, haciendo que otro tipo de procesos degenerativos, cardiovasculares u oncológicos se lleven la palma en datos de mortalidad. No obstante, el uso indiscriminado e incontrolado de este tipo de compuestos farmacéuticos ha propiciado y acelerado la aparición de resistencias a los antimicrobianos, haciendo que, de nuevo, las enfermedades infecciosas tengan, en ocasiones, muy difícil solución y constituyendo, por tanto, un serio problema de salud pública.

### 1.2. CONCEPTO DE RESISTENCIAS ANTIMICROBIANAS

Entendemos por **fármaco** como toda sustancia química utilizada para el tratamiento, curación, prevención o diagnóstico de una enfermedad o para evitar un efecto fisiológico no deseado y, por extensión, la farmacología es la ciencia biológica que estudia las acciones y propiedades de los fármacos. Según su función, existen diversos tipos de fármacos tales como los antiinflamatorios, analgésicos, anestésicos o los **antimicrobianos**, siendo estos últimos los destinados a luchar frente a todo tipo de microorganismos, incluyendo bacterias, hongos, virus o protozoos.

Los principales grupos de antimicrobianos son:

- **$\beta$ -lactámicos** (penicilinas y cefalosporinas), que actúan mediante la inhibición de la síntesis de la pared celular.
- **Aminoglucósidos, macrólidos, tetraciclinas, fenicoles y lincosamidas**, cuya actividad antimicrobiana se basa en la inhibición de la síntesis de proteínas.
- **Quinolonas**, que interfieren en la síntesis de ADN.
- **Sulfamidas**, que impiden el crecimiento de las bacterias mediante la inhibición del ácido fólico.

No obstante, los microorganismos son capaces de volverse insensibles a la acción de estos antimicrobianos, lo cual es conocido como resistencias a los antimicrobianos (RAM). En este sentido, cabe mencionar que las **resistencias a los antimicrobianos**, definidas como el desarrollo por parte de los agentes infecciosos de mecanismos que impiden ejercer la acción de los antimicrobianos, no son fruto de un mecanismo novedoso, sino que se trata de un mecanismo natural por el que, tal y como señala la teoría de la evolución, un individuo, ante una presión de selección, es capaz de adaptarse al medio en el que se desarrolla. No obstante, el problema aparece cuando, como consecuencia de una mala práctica por parte

del hombre, por infrautilización o sobreutilización, se acelera el ritmo natural de aparición y difusión de resistencias. Por ello, las resistencias a los antimicrobianos son una de las grandes amenazas de la salud pública de nuestro tiempo y son consideradas como una pandemia de magnitudes globales.

Dentro de las resistencias a los antimicrobianos, resulta de especial interés las que afectan a bacterias zoonóticas, principalmente *Salmonella* y *Campylobacter*, ya que pueden ser fácilmente transmitidas desde los animales a los humanos y viceversa, bien directamente por contacto o bien indirectamente por medio de los alimentos o las aguas residuales, entre otros.

Las consecuencias de esta gran amenaza sobrepasan los meramente sanitarios, en donde se espera que para 2050 sobrepase al cáncer como principal causa de muerte en los países desarrollados y que actualmente se cifran en los 37 000 muertes anuales en la UE. Teniendo en cuenta su relación en la producción de alimentos, los efectos en el plano comercial pueden llegar a ser nefastos; por no hablar de sus consecuencias económicas en la que el coste de la sanidad animal y, especialmente humana, podría dispararse debido a una mayor cronificación de las infecciones, incremento de las tasas de recidivas o infecciones nosocomiales por agentes oportunistas.

### 1.2.1. Mecanismos de resistencias

La aparición de RAM se debe, fundamentalmente, a dos causas: la infrautilización y la sobreutilización de antibióticos. Por una parte, la **infrautilización** de antibióticos favorece la supervivencia de las bacterias más resistentes, que proliferarán causando nuevas infecciones. Por otro lado, la **sobreutilización** de antibióticos provoca la muerte de la gran mayoría de las bacterias, pero con que exista una sola bacteria capaz de sobrevivir ante tal presión de selección provocará la difusión vertical y horizontalmente de un ejemplar muy resistente.

Respecto a los mecanismos que conducen a la aparición de resistencias a los antimicrobianos por parte de los microorganismos, estos se pueden clasificar en cuatro mecanismos bioquímicos:

- **Enzimas hidrolíticas:** ciertas bacterias son capaces de sintetizar enzimas hidrolíticas ( $\beta$ -lactamasas) capaz de partir al antimicrobiano en dos imposibilitando que éste ejerza su acción sobre el agente patógeno.
- **Modificación del sitio activo:** la modificación de un aminoácido dentro del sitio activo en el agente patógeno provoca que el antimicrobiano no sea capaz de reconocerlo y, por tanto, tampoco de ejercer su acción. Dentro de este mecanismo se distinguen:
  - Modificación del PBP: en el que se modifica el complejo del peptidoglicano, presente en bacterias Gram positivas.
  - Modificación ribosomal: donde se modifica el sitio activo del ribosoma mediante metilación, que afecta sobre todo a los macrólidos.

- **Disminución de la permeabilidad de la pared celular** al ingreso del antimicrobiano: un cambio en el número o en el diámetro de las porinas pueden impedir la entrada del antimicrobiano en el agente patógeno y, por lo tanto, su destrucción.
- **Bombas de flujo:** ciertas bacterias desarrollan bombas de flujo que expulsan al antimicrobiano una vez ha ingresado en el interior del agente patógeno impidiendo que desempeñe su función.

Todos estos mecanismos de resistencia se fijan en genes y son **transmitidos verticalmente** a la descendencia y, en ciertos casos y lo que resulta más preocupante, también pueden ser **transmitidos horizontalmente** mediante elementos móviles como plásmidos o transposones por conjugación, transformación o transducción. El hecho de que las resistencias puedan ser transmitidas a nivel horizontal hace que su expansión se produzca exponencialmente y que aparezcan **multirresistencias**, a tres o más familias de antimicrobianos, o **resistencias cruzadas**, por ser de la misma familia de antimicrobiano o por tener un mecanismo de acción semejante.

Para comprender la gravedad de las resistencias a los antimicrobianos es preciso conocer todas las relaciones que existen en el trinomio hombre-animal-ambiente. De esta forma, el hombre mantiene una relación estrecha con los animales de compañía y también con los animales de abasto, sea directamente a nivel profesional, o sea indirectamente a través de los alimentos. A su vez, los animales de abasto están estrechamente ligados con los animales tanto de compañía como los silvestres y todos ellos se relacionan a través del medio, mediante el suelo y las aguas residuales; a lo que hay que añadir la intervención de la producción agrícola y acuícola por las mismas vías. Todas estas conexiones son la clara muestra de que la aparición, fortuita o provocada, de una resistencia puede fácilmente llegar a otros ámbitos y se traducen en relaciones entre la salud pública, la sanidad animal, la seguridad alimentaria y la sanidad medioambiental y se ven agravadas por ciertos factores como la globalización, el crecimiento de la población, la urbanización, la industrialización, el cambio climático o los nuevos estilos de vida.

### 1.3. SITUACIÓN EN LA UE Y EN ESPAÑA

La situación de las RAMs se recoge sistemáticamente en el denominado **Informe de Zoonosis One Health en la Unión Europea. Hasta 2018**, este informe era conocido como el **Informe de Fuentes y Tendencias de zoonosis, agentes zoonóticos y resistencias**. Este informe es elaborado por parte de la EFSA, en colaboración con el ECDC, tal y como prevé la **Directiva 2003/99/CE** gracias a la información que, anualmente, les es enviada por parte de cada Estado Miembro.

Posteriormente, tras la elaboración de diferentes informes y dictámenes científicos, se vio la necesidad de establecer un programa de vigilancia de la prevalencia de las resistencias bacterianas armonizado a nivel de la UE, para garantizar la obtención de datos homogéneos que permitieran comparar la situación de los distintos países. Así, en el año 2013 **se publicó la Decisión 2013/652/UE, de 12 de noviembre**, sobre el seguimiento y la notificación de la resistencia de las bacterias zoonóticas y comensales a los antibióticos.

En ella se establecen las especies bacterianas que deben ser sometidas a las pruebas de resistencia, a partir del 1 de enero de 2014, priorizando aquéllas de importancia en la salud pública. En este informe se registran los niveles de resistencias de las bacterias zoonóticas más importantes que incluyen: *Campylobacter*, *Salmonella* y, voluntariamente, enterobacterias como *E. coli*. Estos datos se recopilan en bovinos, porcinos y aves de corral en años alternos.

Asimismo, en la Decisión se detallan también los siguientes aspectos del programa de control:

- frecuencia, tamaño y diseño del muestreo,
- antibióticos, valores de corte epidemiológicos e intervalos de concentración que se deben utilizar para la realización de los antibiogramas de las cepas,
- sistemática para la notificación de los datos.

Sin embargo, la evolución de las resistencias en personas y alimentos, junto con animales, se analiza en España por medio del **Informe JIACRA**, previsto por el PRAN, y a nivel comunitario por medio de la **Red Europea de Vigilancia frente a Resistencias Antimicrobianas**.

Todos estos informes apuntan a que, desde 2016, se ha reducido el uso de todos los antibióticos tanto en sanidad animal como humana. Desgranado por especies, las resistencias de *Salmonella* en personas para quinolonas eran del 18% y del 35% para tetraciclinas. En animales, *Salmonella* presentaba un 48% de resistencia frente a quinolonas y un 35% para tetraciclinas y la resistencia frente a colistina (Antibiótico crítico) se ha visto reducida. Además, las multirresistencias en *Salmonella*, principalmente Typhimurium, se sitúan en un 45%, que se traduce en un descenso con respecto a informes anteriores.

En *Campylobacter* los niveles de resistencia son mucho mayores, de entorno a un 85% para quinolonas y tetraciclinas en personas y sobre un 90% para esos mismos antibióticos en animales. Frente a macrólidos, las resistencias en *Campylobacter* son del 5% tanto en personas como animales.

En el caso de *E. coli*, en personas las resistencias son del 14% para cefalosporinas, 34% quinolonas y 65% para ampicilina. En animales, los niveles de resistencias son mucho mayores: para cefalosporinas un 13%, 78% para quinolonas, 73% para tetraciclinas y 74% para ampicilinas.

En definitiva, podemos señalar que las resistencias se suelen registrar en niveles más elevados en animales, donde tradicionalmente el uso de antibióticos ha sido más imprudente, y en datos más discretos en personas, sugiriendo que existe una relación en la transmisión de las RAMs por medio de los alimentos. No obstante, desde la puesta en marcha de las diversas actuaciones para la lucha contra las resistencias, el uso de antibióticos se ha visto reducido de manera muy importante en sanidad animal, destacando especialmente el uso de antibióticos críticos.

## 2. MARCO LEGAL

### 2.1. EN LA UNIÓN EUROPEA: PLAN DE ACCIÓN

Teniendo en cuenta el gran riesgo que suponen las RAMs a nivel global ha sido necesario emprender diversas actuaciones para luchar contra la aparición de nuevas resistencias y también para minimizar la expansión de las ya existentes.

A nivel comunitario, se puso en marcha por primera vez en 2013 el **Plan de Acción frente a las resistencias a los antimicrobianos (PRAN)** con el que se instó a los EE.MM a desarrollar sus propios Planes de Acción. En 2017 el Plan de Acción Comunitario fue renovado y en él se hace hincapié a fomentar la investigación y la prevención y con la que se han aprobado iniciativas como la de prohibir los antibióticos críticos en sanidad animal y limita el uso de antimicrobianos en colectividades y a nivel preventivo.

Cabe, también, destacar a nivel comunitario la creación del proyecto *ESVAC (European Surveillance of Veterinary Antimicrobial Consumption)*, con el objeto de monitorizar el consumo de antimicrobianos en medicina veterinaria a través de la recopilación de información y registro de los distribuidores mayoristas y minoristas sobre ventas de antibióticos de uso veterinario.

Por otro lado, en el año 2003 la UE publicó la Directiva 2003/99/CE, de 17 de noviembre, sobre la vigilancia de las zoonosis y los agentes zoonóticos, en la que se establecía que los Estados Miembros debían vigilar determinadas bacterias zoonóticas y comensales y las resistencias asociadas a las mismas en su territorio, para poder evaluar las tendencias y fuentes de las resistencias antimicrobianas de las bacterias.

### 2.2. EN ESPAÑA

#### 2.2.1. Plan Nacional frente a las resistencias de los antibióticos (PRAN)

En España, el Plan de Acción Comunitario se materializó en el **Plan Nacional frente a las Resistencia a los Antibióticos (PRAN)**. Este plan, actualizado para el periodo 2019-2021, ha sido desarrollado por la Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios (AEMPS) y cuenta con seis líneas básicas:

1. Vigilancia, sobre el consumo de antimicrobianos (AM) y desarrollo de resistencias (informe ESVAC)
2. Control en el consumo de AM, a través de guías de prescripción o realización de antibiogramas, entre otros.
3. Prevención de enfermedades infecciosas (medidas de bioseguridad).
4. Investigación (desarrollo de nuevos mecanismos antimicrobianos y creación de una plataforma para la cooperación entre grupos de investigación).
5. Formación e información: a todos los niveles educativos y sobre profesionales sanitarios.
6. Comunicación: puesta en conocimientos de los riesgos y evolución asociados a las RAMs, incluyendo en el plano sanitarios, económico, comercial, alimentario, etc.

Dentro del PRAN, se ha desarrollado el **Plan Reduce** para disminuir el uso de antibióticos críticos en ganadería. Originariamente, este plan se centró en el uso de colistina en porcicultura, que logró reducir su empleo en un 81% en los dos primeros años de aplicación. Hoy en día, este plan se amplía a otros antibióticos críticos (como el ciprofloxacino) además del establecimiento de planes sanitarios para minimizar el uso de AB con fines preventivos. El Plan Reduce está hoy vigente en porcino, cunícola, vacuno y avícola.

Además de esta iniciativa, el PRAN ha desarrollado también programas divulgativos como el Programa bajo el lema "**Antibióticos, tómatalos en serio**", con el que se pretende concienciar al público general de la importancia de no usar antibióticos de forma irresponsable y sin prescripción o bien, medidas legales como el **Real Decreto 191/2018**, por el que se establece la transmisión electrónica de datos de las prescripciones veterinarias de antibióticos destinados a animales productores de alimentos para consumo humano y con el que se obliga comunicar electrónicamente la prescripción de antibióticos para animales de renta con una periodicidad semanal a través de la plataforma online PRESVET. Estas medidas se completan con la creación de un mapa interactivo como base para la **Red de Vigilancia de Resistencias de Bacterias Patógenas en Sanidad Animal**.

### **2.2.2. Programa Nacional de Control Oficial de distribución, prescripción y dispensación de medicamentos veterinarios**

Adicionalmente, los esfuerzos de nuestro país en la lucha contra los efectos de las RAMs se completan con el **Programa Nacional de Control Oficial de distribución, prescripción y dispensación de medicamentos veterinarios**, que se encuadra dentro del **Plan Nacional del Control Oficial de la Cadena Alimentaria**. Este Programa, vigente por el periodo 2021-2025, es dependiente de la Subdirección General de Sanidad, Higiene Animal y Trazabilidad, está coordinado por el Comité RASVE y es ejecutado por los SVO de las CC.AA.

El objetivo de este Programa es establecer las bases para garantizar la trazabilidad de los medicamentos veterinarios a lo largo de la cadena de distribución, prescripción y dispensación. El ámbito de aplicación de este programa excluye el uso de medicamentos en las granjas puesto que queda bajo el Programa de Control Oficial de la Higiene en la Explotación Ganadera.

Dentro de este programa se contempla el control en la venta de medicamentos veterinarios de prescripción obligatoria en almacenes mayoristas, establecimientos comerciales detallistas, entidades o agrupaciones ganaderas, profesionales veterinarios con ejercicio clínico. Además, se incluye el control en la venta por internet de medicamentos veterinarios sin prescripción obligatoria. Para facilitar esta actividad de inspección se crea un **Registro Nacional de Distribuidores de Medicamentos Veterinarios**.

### **2.2.3. Otras iniciativas**

Por otra parte, han ido surgiendo iniciativas privadas para hacer frente a la gran amenaza que suponen las RAMs. Entre ellas, cabe destacar la iniciativa de Vet+i, que ha desarrollado una plataforma de divulgación online – **VETRESPONSABLE**, con la que pretende promover el uso responsable de medicamentos veterinarios utilizados para la prevención y control de las

enfermedades animales y fortalecer el sistema de farmacovigilancia veterinaria. Esta iniciativa aporta un enfoque integral para la prevención de la enfermedad a través de elementos como el manejo, la bioseguridad, la alimentación, las buenas prácticas o los programas sanitarios específicos y hace una mención especial al uso responsable y prudente de antimicrobianos bajo el lema “Tan poco como sea posible, tanto como sea necesario”.

En este sentido, cabe destacar la prescripción de medicamentos veterinarios siguiendo el cauce legal establecido en el **Real Decreto 109/1995, sobre medicamentos veterinarios**. En esta norma se contempla un régimen de prescripción excepcional, conocido como “cascada de prescripción” en el que se especifica qué medicamentos se pueden prescribir cuando no están concebido para una afección o especie animal concreta, siguiendo siempre los pasos necesarios en cuanto a un adecuado diagnóstico se refiere, teniendo en cuenta el espectro del agente antimicrobiano, el mecanismo de acción, la farmacocinética del compuesto, la afección patológica que se trate y las resistencias descritas para el agente causal. Además, deberán realizarse antibiogramas cuando sea preciso.

Asimismo, es importante resaltar la obligatoriedad de respetar los **tiempos de espera** para poder cumplir con los **Límites Máximos de Residuos (LMRs)** de medicamentos veterinarios que, presumiblemente, estarán estrechamente relacionados con el desarrollo y difusión de RAMs. Además, para evitar la aparición de resistencias, deberán implantarse **programas de rotación** de antibióticos, especialmente en colectivos como avicultura o acuicultura donde el uso de estos compuestos tiene lugar de forma sistemática. El objetivo de estos programas es reducir la presión de selección mediante el cambio regular del tipo de agente antimicrobiano que se emplea.

### 2.3. A NIVEL INTERNACIONAL: OIE/FAO/OMS

A nivel internacional, la OIE en colaboración con FAO y OMS en su estrategia conjunta *One Health*, han desarrollado en 2016 un **Plan de Lucha frente a las Resistencias a los Antimicrobianos** en la que se centran en apoyar la concienciación, la asistencia a los gobiernos para una mejor comprensión de las RAMs y enfoque de su lucha, el desarrollo de estándares internacionalmente aceptados y mejorar el conocimiento en general.

### 3. TÉCNICAS DE LABORATORIO

Respecto a las técnicas de laboratorio, la importancia de las resistencias a los antimicrobianos sobre la salud pública hace que sea necesario el desarrollo de técnicas laboratoriales que permitan la detección temprana de microorganismos resistentes con el fin de hallar mecanismos de lucha frente a los mismos.

Tradicionalmente, el método por excelencia ha sido el antibiograma que, de manera sencilla, consistía en detectar la inhibición del crecimiento bacteriano frente a distintos tipo de antibióticos para verificar la sensibilidad de los microorganismos estudiados.

No obstante, hoy en día, existe un considerable número de técnicas instrumentales que permiten llevar a cabo un antibiograma rápido. Entre estas cabe destacar las técnicas moleculares, técnicas inmunocromatográficas, nefelometría, espectrometría de masas MALDI-TOF, citometría de flujo u otros como la quimioluminiscencia y bioluminiscencia, microfluidos y métodos de lisis bacteriana.

### 3.1. TÉCNICAS MICROBIOLÓGICAS

En primer lugar, las técnicas microbiológicas son aquellas que se basan en el crecimiento microbiano o, mejor dicho, en la inhibición del mismo en distintos medios y al exponerlos a antimicrobianos de diferentes tipos. Este tipo de pruebas son conocidas como **antibiogramas o pruebas de sensibilidad**.

Así, las pruebas de sensibilidad determinan la susceptibilidad de un microorganismo frente a los antimicrobianos a partir de la exposición de una concentración estandarizada del microorganismo a estos fármacos. Las pruebas de sensibilidad pueden hacerse para bacterias, hongos o virus.

Las pruebas de sensibilidad se realizan *in vitro*, y no tienen en cuenta numerosos factores que afectan al fármaco *in vivo* (como la farmacodinámica y la farmacocinética, las concentraciones del medicamento en el sitio de acción, el estado inmunitario del huésped, las defensas específicas de sitio) y que influyen en el éxito de un tratamiento. Por ello, las pruebas de sensibilidad no siempre predicen los resultados de la terapia, pero sí que nos ofrecen una idea del éxito de la misma.

Las pruebas de sensibilidad pueden ser cualitativas o semicuantitativas, en función de si proporcionan una cifra indicativa de la concentración del antimicrobiano que ejerza la inhibición en el crecimiento del microorganismo de estudio. En este sentido, cabe definir la **Concentración Mínima Inhibitoria (CMI)** como aquella concentración capaz de inhibir el crecimiento microbiano de manera que pueda ser detectado. En aquellos casos en los que no es posible estimar la CMI, el microorganismo de estudio se califica como susceptible, intermedio o resistente en función del crecimiento observado.

Existen estándares internacionales como la norma UNE-EN ISO 20776-1:2021<sup>1</sup> que establece los métodos de referencia para la determinación *in vitro* de la actividad de agentes antimicrobianos contra bacterias productoras de enfermedades infecciosas.

Entre los tipos de pruebas de sensibilidad descritas se recogen:

- **Técnicas de dilución** que, a su vez, pueden ser en un medio líquido (dilución en caldo) o en un medio sólido (dilución en agar). En este tipo de técnicas se evalúa el crecimiento microbiano al someterlo a una dilución concreta de un antimicrobiano.

---

<sup>1</sup> Ensayo de susceptibilidad de agentes infecciosos y evaluación del funcionamiento de los dispositivos de ensayo de susceptibilidad antimicrobiana. Parte 1: Método de referencia de microdilución en caldo para ensayar la actividad *in vitro* de agentes antimicrobianos frente a bacterias aerobias de crecimiento rápido implicadas en enfermedades infecciosas. (ISO 20776-1:2019, incluyendo Versión corregida 2019-12)

- **Técnicas de difusión** que, a su vez, pueden ser en disco o en tira. En estas técnicas el antimicrobiano se presenta en discos o tiras y la inhibición microbiana se valora en un medio sólido.

**Los métodos de dilución se consideran de referencia para la determinación cuantitativa de la actividad de los antimicrobianos.** La vigilancia de la resistencia de las bacterias zoonóticas y comensales a los antibióticos que se está llevando a cabo a nivel europeo a partir de muestras de alimentos y de determinadas poblaciones animales destinadas a la producción de alimentos, **está basada en métodos de dilución y en puntos de corte epidemiológicos.**

En la actualidad estos métodos son los más empleados y se han popularizado los métodos automatizados comerciales, fácilmente integrables en sistemas (semi)automáticos de lectura e interpretación de resultados, pero con el gran inconveniente del incremento en el coste.

Se comercializan las placas de microdilución con diferentes concentraciones de antimicrobianos deshidratados o liofilizados.

En este método:

- Se parte de un cultivo puro del microorganismo a ensayar a partir del que se prepara una suspensión de una concentración 0,5 McFarland ( $1,5 \times 10^8$  UFC/ml).
- A partir de esta suspensión se inocula un tubo de caldo Mueller-Hinton para conseguir una suspensión de concentración adecuada con la que se inocularán las placas de microtitulación conteniendo los antibióticos en diluciones seriadas a la mitad.
- Tras la incubación de las placas de microtitulación a la temperatura, tiempo y atmósfera adecuadas al microorganismo se llevará a cabo su lectura para la cual:
  - Se define la CMI como la concentración más baja testada (en mg/l) en la que no hay crecimiento visible.
  - Se determina si una determinada cepa tiene ya mecanismos de resistencias si su CMI es mayor que su punto de corte establecido por EUCAST (que es inferior al punto de corte clínico).
  - En caso de que el microorganismo haya crecido en todo el rango de concentraciones testado, podremos concluir que la CMI es mayor a la mayor concentración de antibiótico empleada.
  - Si el microorganismo no ha crecido en ninguna de las concentraciones de antibiótico ensayadas la CMI será menor a la menor concentración ensayada.

### 3.1.1. Métodos colorimétricos

Dentro de los métodos microbianos, se han desarrollado métodos colorimétricos para la detección de carbapemasas. Estos métodos proporcionan resultados en unas dos horas con una sensibilidad y especificidad próxima al 100%. En estos test, la bacteria se incuba en presencia del antibiótico. Si la bacteria posee una carbapenemasa, el antibiótico se hidroliza y se produce un cambio en el pH del medio que se detecta mediante un cambio de color del indicador.

### **3.2. TÉCNICAS INMUNOLÓGICAS**

En segundo lugar, las técnicas inmunológicas se basan en la detección de proteínas de los microorganismos gracias a la especificidad entre antígenos y anticuerpos.

#### **3.2.1. Técnicas inmunocromatográficas**

Dentro de las técnicas inmunológicas, cabe resaltar las técnicas inmunocromatográficas. Estas técnicas tienen un precio económico y no precisan ni de instrumentación ni de personal experto. Se emplean para detectar enzimas bacterianas que hidrolizan el antibiótico,  $\beta$ -lactamasas principalmente. El procedimiento consiste en diluir la bacteria y colocarla en una tira de nitrocelulosa. Por capilaridad, las bacterias se desplazan hacia el otro extremo y, de tener la  $\beta$ -lactamasa, esta quedará fijada por el anticuerpo provocando la aparición de una banda coloreada. Este test muestra una sensibilidad y una especificidad prácticamente del 100%.

### **3.3. TÉCNICAS MOLECULARES**

En tercer lugar, las técnicas moleculares permiten la detección de material genético, tanto ácido desoxirribonucleico (ADN) como ácido ribonucleico (ARN) del cual se conoce que codifica una proteína capaz de generar una resistencia frente a un antimicrobiano concreto.

#### **3.3.1. PCR**

Entre las técnicas moleculares, la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es la que ha adquirido un mayor valor diagnóstico, ya que permite una identificación certera del agente infeccioso, además de ser el método de referencia para caracterizar sus genotipos de resistencia y virulencia. La realización de una PCR convencional requiere aproximadamente 12 horas y consta de 3 etapas. La primera consiste en una extracción del material genético. La segunda etapa, llevada a cabo en un termociclador, se corresponde con la amplificación del ADN que, a su vez, incluye la desnaturalización del ADN que se va a usar como molde, el anillamiento de los cebadores al molde y la extensión catalizada por la ADN polimerasa. La amplificación se repite un número determinado de veces, generalmente de 25 a 35, duplicándose cada vez el número de moléculas de producto (amplicones). De esta forma se sintetiza un elevado número de amplicones lo que permite detectar cantidades iniciales de ADN muy pequeñas. Finalmente, en la tercera etapa de la PCR se lleva a cabo la detección de los amplicones mediante electroforesis en gel de agarosa.

Sin embargo, con el fin de acortar el tiempo, se ha desarrollado una PCR de tiempo real en la que, paralelamente a la amplificación, tiene lugar la detección de los amplicones sintetizados. De este modo, los resultados se obtienen en pocas horas.

En la literatura se ha descrito un considerable número de PCRs, tanto «caseras» como comerciales y automatizadas. Es preciso señalar que estas metodologías no proporcionan la identificación microbiana y que se aplican, en la mayoría de los casos, a partir de colonias crecidas en las placas de aislamiento.

Estos métodos de PCR comerciales presentan un escaso porcentaje de falsos negativos debido a que estos métodos no detectan todas las variantes alélicas de los genes que confieren resistencia a los antibióticos.

### **3.3.2. Microarrays**

Además de las PCRs, dentro de los métodos moleculares también se pueden encuadrar los microarrays. Esta metodología se basa en la detección, mediante un análisis de imágenes, de la hibridación de una molécula diana a una sonda específica inmovilizada en un soporte sólido. Los microarrays detectan un gran número de genes de resistencia en un mismo ensayo dado que estas sondas, que normalmente son oligonucleótidos, están pegadas a una distancia muy corta. Se han comercializado varios microarrays que permiten detectar un gran número de genes que codifican diferentes  $\beta$ -lactamasas a partir de colonias crecidas en placas de aislamiento. Estos microarrays precisan de una PCR como primer paso con una pareja de primers universales marcados con biotina. A continuación, los amplicones son clasificados mediante hibridación con las sondas de oligonucleótidos. Finalmente, el software del fabricante detecta la hibridación utilizando el marcador de biotina y traduce los datos automáticamente expresando los resultados en forma de presencia o ausencia de un gen. Estos microarrays requieren 8 h para la obtención de los resultados y presentan una sensibilidad y una especificidad prácticamente del 100%.

### **3.4. OTROS**

Por otra parte, además de las técnicas microbianas, inmunológicas y moleculares, se han desarrollado otro tipo de técnicas que, igualmente, permiten detectar microorganismos resistentes a los antimicrobianos.

#### **3.4.1. Espectrometría de masas MALDI-TOF**

Dentro de estas otras técnicas, el sistema MALDI-TOF proporciona, mediante un análisis de proteínas, la identificación de bacterias, levaduras y hongos filamentosos en minutos, así como de posibles enzimas que hidrolicen antibióticos ( $\beta$ -lactamasas). Para ello, los microorganismos son incubados durante un tiempo con el antibiótico. Se realiza una centrifugación y el sobrenadante obtenido se analiza mediante MALDI-TOF. Si el microorganismo posee la enzima que degrada el antibiótico se observará la desaparición del pico correspondiente al antibiótico y la aparición de nuevos picos que corresponden a los metabolitos resultantes de la rotura del antibiótico. En caso de que la bacteria no hidrolice el antibiótico únicamente se observará el pico correspondiente al antibiótico. Esta metodología proporciona sensibilidades prácticamente del 100%. Esta técnica resulta muy útil para detectar resistencias específicas por metilaciones como sucede frente al cloranfenicol y la clindamicina u otras tan relevantes como las cepas de *S. aureus* resistentes a meticiclina o cepas de enterococos resistentes a vancomicina.

### **3.4.2. Citometría de flujo**

Por su parte, la citometría de flujo es una técnica basada en la formación de un flujo de partículas (generalmente células) ordenadas en fila. Gracias a este alineamiento, la técnica permite medir simultáneamente múltiples características de una sola célula de tal forma que es posible caracterizar, separar y cuantificar las diferentes subpoblaciones celulares que se engloban en un conjunto. Además, utilizando diversos fluorocromos se pueden estudiar diversos parámetros del crecimiento bacteriano tales como potencial de membrana, tamaño celular, actividad enzimática, integridad de la membrana celular y concentración microbiana, que aportan información acerca de la sensibilidad o resistencia de los microorganismos a los antibióticos.

### **3.4.3. Nefelometría**

La nefelometría es una técnica que mide la intensidad de radiación dispersa que se genera cuando un haz de luz atraviesa una suspensión de partículas. Dado que la dispersión de luz es proporcional a la concentración de partículas, esta técnica instrumental permite la cuantificación de microorganismos. De esta forma, al someter al microorganismo en cuestión a distintos antimicrobianos, podremos determinar su sensibilidad o resistencia.

### **3.4.4. Métodos de lisis bacteriana**

Otra metodología para la determinación de la sensibilidad consiste en la detección de la lisis bacteriana. Para ello, la bacteria es incubada en presencia del antibiótico a la concentración deseada; seguidamente la bacteria se inmoviliza en un microgel de agarosa y es expuesta a una solución de lisis que produce la liberación del ADN. Posteriormente, la preparación es incubada con el fluorocromo SYBR Gold y, mediante observación al microscopio de fluorescencia, es posible estudiar la integridad del ADN. Esta metodología proporciona un antibiograma en menos de 2 horas.

## BIBLIOGRAFÍA

Agencia Española de Seguridad Alimentaria. AESAN. Vigilancia de zoonosis y agentes zoonóticos.

[https://www.aesan.gob.es/AECOSAN/web/seguridad\\_alimentaria/subseccion/vigilancia\\_zoonosis.htm](https://www.aesan.gob.es/AECOSAN/web/seguridad_alimentaria/subseccion/vigilancia_zoonosis.htm)

Agencia Europea de Seguridad Alimentaria. EFSA. Resistencia a los antimicrobianos.

<https://www.efsa.europa.eu/en/news/use-antibiotics-animals-decreasing>

Plan Nacional de Resistencia a los Antibióticos. PRAN.

<https://www.resistenciaantibioticos.es/es>

Programa de control de los medicamentos veterinarios.

[https://www.mapa.gob.es/es/ganaderia/temas/sanidad-animal-higiene-ganadera/Higiene-de-la-produccion-primaria-ganadera/medicamentos-veterinarios/PNC\\_medicamentos\\_veterinarios.aspx](https://www.mapa.gob.es/es/ganaderia/temas/sanidad-animal-higiene-ganadera/Higiene-de-la-produccion-primaria-ganadera/medicamentos-veterinarios/PNC_medicamentos_veterinarios.aspx)

OIE. Resistencia antimicrobiana.

<https://www.woah.org/es/que-hacemos/normas/codigos-y-manuales/acceso-en-linea-al-manual-terrestre/OMS>.

Plan de Acción Mundial sobre la resistencia a los antimicrobianos.

<https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/255204/9789243509761-spa.pdf>

March Rosselló, Gabriel Alberto. (2017). Métodos rápidos para la detección de la resistencia bacteriana a antibióticos. Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. 35. 10.1016/j.eimc.2016.12.005.

**MATERIAL PARA LA PREPARACIÓN DEL TEMA 55**

**VIRUS INFLUENZA EN DISTINTAS ESPECIES ANIMALES. MARCO LEGAL. PROGRAMA NACIONAL DE VIGILANCIA. DIAGNÓSTICO DE LABORATORIO.**

*Este material no tiene carácter oficial, por lo que en ningún caso vinculará al Tribunal Calificador. Constituye, únicamente, un instrumento complementario que servirá de apoyo al opositor para enfocar cada uno de los epígrafes, pero nunca de forma exclusiva ni excluyente. El Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación no se hace responsable del contenido del mismo.*

*Los materiales no serán objeto de actualización constante.*

## **ÍNDICE**

### **1. VIRUS INFLUENZA EN DISTINTAS ESPECIES ANIMALES**

1.1. INTRODUCCIÓN

1.2. CARACTERÍSTICAS

1.3. PROFILAXIS

### **2. MARCO LEGAL**

### **3. PROGRAMA NACIONAL DE VIGILANCIA**

### **4. DIAGNÓSTICO DE LABORATORIO.**

4.1 DIAGNÓSTICO ETIOLÓGICO

4.1.1 Métodos de screening

4.1.2 Aislamiento de virus

4.1.3 Métodos moleculares

4.2 DIAGNÓSTICO SEROLÓGICO

MATERIAL NO OFICIAL

## 1. VIRUS INFLUENZA EN DISTINTAS ESPECIES ANIMALES

### 1.1. INTRODUCCIÓN

Cuando se habla del virus de la Influenza se hace referencia a un grupo de enfermedades que afecta a un amplio número de especies animales y al hombre, con una gran capacidad de transmisión entre ellos. Estos virus poseen una gran capacidad de evolucionar, ya que utilizan los procesos de recombinación de sus genes con otros virus, así como de mutar, a través de pequeños cambios en su ácido nucleico. Esta capacidad de mutación determina la aparición de un amplio número de tipos y subtipos, de tal manera que cada especie animal puede verse afectada por uno o varios subtipos animales o un mismo subtipo viral puede ser capaz de infectar a otra especie animal. He aquí la trascendencia de esta enfermedad altamente contagiosa y de rápida diseminación en poblaciones susceptibles.

### 1.2. CARACTERÍSTICAS

Los virus de Influenza pertenecen a la familia Orthomyxoviridae, género Alphainfluenzavirus (influenzavirus A o influenza A virus). Son virus envueltos (sensibles al éter) y contienen una cadena sencilla de ácido nucleico (ARN) que es segmentada y tiene una polaridad negativa. Tiene dos componentes internos importantes que son la proteína de la matriz (M) y la ribonucleoproteína (RNP) que son proteínas grupo específicas que designan la especificidad del tipo. Según **las características antigénicas de estas dos proteínas existen cuatro tipos de influenza:**

- **Tipo A** es el grupo principal que afecta tanto a humanos como a animales muy diferentes, **aves domésticas y silvestres**, hombre, cerdos, caballos, visones, focas, ballenas, hurones, ratas, ballenas, perros, gatos, tigres, etc. Son los más importantes debido a su potencial pandémico y zoonótico.
- **Tipo B** afectan a humana y está implicado en la gripe estacional.
- **Tipo C** produce una enfermedad respiratoria leve en humanos, perros y cerdos.
- **Tipo D** afectan principalmente al ganado y no se cree que puedan causar infecciones o enfermedad en humana.

En 2011, se descubrió en América del Norte entre cerdos que presentaban signos clínicos similares a los de la gripe y posteriormente se identificó en bovinos con signos de enfermedad respiratoria.

Hay dos glicoproteínas de superficie: la hemaglutinina (HA) y la neuraminidasa (NA) que se proyectan de la membrana lipídica, participan del proceso de infección y definen la especificidad del **subtipo**. Hasta el momento se han descrito 16 antígenos de superficie HA (H1-H16) y 9 NA (N1-N9). Cada virus tiene un antígeno de HA y otro de NA, aparentemente en cualquier combinación. En murciélagos se han descrito las hemoaglutininas H17 y H18 y las neuraminidasas N10 y N11.

Por tanto, dentro de la influenza de tipo A, existen muchos subtipos diferentes. La mayoría de los subtipos afectan solo a determinadas especies animales, como por ejemplo a las aves de corral, pero algunos otros subtipos pueden afectar a más de una especie, como aves, suidos, equinos y seres humanos.

**La influenza aviar**, también conocida como “gripe aviar”, es una enfermedad vírica altamente contagiosa que afecta tanto a las aves domésticas (pollos, pavos, codornices, pintadas, etc.) como a las aves de compañía, silvestres y mamíferos (hombre, cerdo, mamíferos marinos, perros, felinos y caballos). Las aves acuáticas forman un reservorio importante de estos virus, en particular los patos silvestres, gansos, cisnes, gaviotas, aves costeras y golondrinas de mar, que son los hospedadores naturales de todos los tipos conocidos de virus de la influenza aviar. Actúan como portadores afectando fundamentalmente a otras especies aviares de gran repercusión económica como son las gallinas y los pavos. El virus mantiene su preferencia por las aves, aunque se han producido adaptaciones a mamíferos de forma esporádica.

La transmisión del virus subtipo H5 a humanos en Reino Unido, Rusia y Nigeria, a animales salvajes en toda Europa, junto con los casos confirmados en humanos del subtipo H5N6 en China subraya la capacidad zoonótica del virus de la IA y la posible adaptación de estos virus a otros mamíferos.

No obstante, el riesgo de contagio para la población en general se considera bajo. Aunque en el caso de las personas en contacto con aves se considera de bajo a medio.

**Influenza equina**, los subtipos que les afectan son el H7N7 y el H3N8 que son casi exclusivos de esta especie animal, aunque se ha comprobado algún caso de H3N8 en perros y en cerdos. Los virus H7N7 no se han detectado en la población equina desde 1970, mientras que los virus H3N8 han evolucionado y dado lugar a dos linajes, Eurasiático y Americano. Dentro del linaje Americano (predominante) hay tres sublinajes, Sudamericano, Kentucky y Florida; dentro de este último se encuadran los clados 1 y 2 predominantes en la población equina actual en casi todo el mundo.

**Influenza porcina**, la enfermedad es muy contagiosa, cursa con baja mortalidad pero muy alta morbilidad causando tos, estornudos, rinorrea, temperatura rectal alta, letargia, dificultades respiratorias y disminución del apetito que puede producir un importante impacto económico en las pjaras. Los subtipos que se identifican con más frecuencia en los cerdos son los subtipos clásicos y aviares H1N1, humanos (hu) H1N1 y H1N2, recombinantes (r) H3N2 y rH1N2. Los virus H1N1, H1N2 y H3N2 de Europa son antigénica y genéticamente distintos de los que se encuentran en América. En el caso particular de los cerdos, se ha comprobado que poseen receptores en su aparato respiratorio que se unen a los virus de la gripe porcina, humana y aviar por eso se han considerado como “recipiente de mezcla” para el desarrollo de nuevos virus de la gripe cuando en ello se recombinan virus de la gripe porcina, aviar y/o humana.

Por todo lo comentado con anterioridad, de todos los influenzavirus, el de mayor repercusión económica y de mayor importancia sanitaria son aquellos que afectan a las aves. De hecho, de todas ellas la única que sería de declaración obligatoria y que por tanto tiene un marco

legal que desarrolla su vigilancia y control es la **influenza aviar** de tipo A. Los subtipos existentes se pueden diferenciar atendiendo a su patogenicidad en:

1) *Influenza aviar altamente patógena (IAAP)*, para indicar una infección por un virus de la influenza aviar que cumple con la definición de alta patogenicidad. La enfermedad altamente patógena, en aves totalmente susceptibles, puede variar desde una muerte súbita sin signos clínicos evidentes, hasta una enfermedad más patógena con presentaciones clínicas variables que incluyen signos respiratorios, tales como secreciones oculares y nasales, tos, bufidos y disnea, hinchazón de los senos nasales y/o de la cabeza, apatía, reducción de la vocalización, reducción marcada de la ingesta de alimento y agua, cianosis de la piel desprovista de plumas y de las barbas y la cresta, falta de coordinación y signos nerviosos, y diarrea.

2) *Influenza aviar levemente patógena (IABP)*, para indicar una infección por cualquier virus de la influenza aviar H1-H16 que sea no de alta patogenicidad y que causa una enfermedad leve, principalmente respiratoria, a menos que se produzca un agravamiento por coinfecciones u otros factores.

3) *influenza A*, para indicar una infección por cualquier virus IAAP o IABP.

Hasta la fecha, los virus de influenza A de alta patogenicidad de origen natural que producen una enfermedad clínica aguda en pollos, pavos y otras aves de importancia económica se han asociado solo a los subtipos **H5 y H7**. Los subtipos H5 y H7 de baja patogenicidad se presentan mucho en aves de corral y aves silvestres acuáticas, aunque la propagación intercontinental de la influenza aviar altamente patógena ha recibido mayor atención en los últimos años. Existe el riesgo de que un virus H5 o H7 de baja patogenicidad (influenza aviar de baja patogenicidad H5/H7 [IABP]) se vuelva altamente patógeno por mutación en una región del gen HA en la que es codificado el sitio de procesamiento proteolítico de la Hemaglutinina, denominado HA0, potenciando su capacidad de colonizar células de distintos tejidos, haciéndola más virulenta.. Aun así, no todos los subtipos H5 y H7 son de alta patogenicidad de ahí la importancia de detectar estos subtipos y determinar su patogenicidad. En la actualidad todos los aislados de estos dos subtipos deben ser notificados a las autoridades veterinarias competentes.

Algunas cepas del virus de la influenza aviar han causado infecciones zoonóticas esporádicas principalmente de los subtipos H5, H7 y H9 y estos tres subtipos se han destacado como posibles riesgos pandémicos en caso de que se produzcan mutaciones adicionales que favorezcan la transmisión sostenida de persona a persona.

Los virus que causan la influenza A tienen el potencial de propagarse desde el laboratorio si no existen niveles suficientes de bioseguridad y bioprotección. Los virus de la influenza aviar deben manipularse aplicando las medidas apropiadas de Bioseguridad y bioprotección. Las medidas de biocontención deben determinarse mediante un análisis del riesgo y las medidas requeridas pueden variar según los subtipos y patotipos de los virus de la influenza A, de tal forma que se indica un nivel de contención más alto para algunos virus IABP y IAAP, que pueden requerir mejoras adicionales en los procedimientos, el equipo y las instalaciones en ciertas circunstancias, como altas concentraciones del virus, alojamiento de animales

infectados o la ejecución de procedimientos con actividades que generen aerosoles. Los países que no tengan acceso a un laboratorio nacional o regional especializado de este tipo deben enviar las muestras a un Laboratorio de Referencia de la OIE.

### **1.3. PROFILAXIS**

La regulación específica de la vacunación frente a la Influenza aviar se encuentra actualmente en proceso de modificación legislativa.

Como principio general, la vacunación frente a la Influenza Aviar **está prohibida** salvo en dos situaciones:

**VACUNACIÓN PREVENTIVA**, que se llevará a cabo para proteger a una población de aves cuando, por las características de determinadas zonas, tipo de producción o categoría de aves de corral u otras aves cautivas, y basándose en un análisis de riesgo previo, se llegue a la conclusión de que se encuentran especialmente expuestas a un riesgo elevado de contacto con el virus. **Se considera como una medida a largo plazo.**

**VACUNACIÓN DE EMERGENCIA**, que se llevará a cabo como medida a corto plazo para contener un foco cuando una evaluación de riesgo indique que existe riesgo de difusión o de introducción de la influenza aviar en una población de aves a proteger, como resultado de la declaración de un brote en España o en un país cercano.

La legislación comunitaria prevé dos tipos de vacunación de emergencia que se pueden utilizar dentro de la estrategia de vacunación de emergencia a diseñar: **la vacunación supresora (con matanza posterior de los animales vacunados) y la vacunación profiláctica o protectora (no seguida de la matanza de los animales vacunados)**. En este último caso se deberá de forma general establecer una zona de vacunación y una zona de vigilancia alrededor de la misma.

Esta medida se considera complementaria a otras medidas de control destinadas a evitar la difusión del virus (fundamentalmente a la mejora de la bioseguridad y las restricciones a los movimientos) y enmarcadas en el plan de control del brote.

## **2. MARCO LEGAL**

Como hemos visto anteriormente existen varias cepas del virus de influenza aviar, las cuales pueden clasificarse, de forma general, en dos categorías según la gravedad de la enfermedad en las aves de corral:

**Influenza aviar de baja patogenicidad (IABP) e Influenza aviar de alta patogenicidad (IAAP).** Por lo cual, se requieren distintos tipos de medidas de prevención, control y gestión de las mismas. En este sentido, el **Reglamento 2018/1882** de la Comisión, de 3 de diciembre de 2018, relativo a la aplicación de determinadas normas de prevención y control a categorías de enfermedades enumeradas en la lista y por la que se establece una lista de especies y grupos de especies que suponen un riesgo considerable para la propagación de dichas enfermedades de la lista; recoge:

Por un lado, **la gripe aviar altamente patógena, como enfermedad de categoría A+D+E** (enfermedad de la lista que no esté presente normalmente en la Unión y en relación con la cual deben tomarse medidas de erradicación inmediatas tan pronto como se detecte su existencia) y por otro lado, **la gripe aviar de baja patogenicidad, como enfermedad de categoría D+E** (enfermedad de la lista sobre la que deben adoptarse medidas para evitar su propagación en relación con su introducción en la Unión o con desplazamientos entre Estados miembros).

De acuerdo a la actual normativa en vigor, únicamente se establece como de notificación inmediata la IAAP, pasando la IABP a notificarse de forma anual de acuerdo al **Reglamento de Ejecución (UE) 2020/2002** de la Comisión, de 7 de diciembre de 2020, por el que se establecen normas de desarrollo del **Reglamento (UE) 2016/429** del Parlamento Europeo y del Consejo relativas a la notificación a la Unión y al envío de informes a la Unión sobre enfermedades de la lista, al sistema informático de información, así como a los formatos y los procedimientos de presentación y envío de informes relacionados con los programas de vigilancia y erradicación de la Unión y con la solicitud de reconocimiento del estatus de libre de enfermedad.

La estrategia para manejar el riesgo de Influenza aviar integra pues una serie de medidas establecidas tanto a nivel de la Unión Europea como a nivel nacional.

De modo que, desde la **Unión Europea** se ha publicado la siguiente normativa de aplicación ante la Influenza Aviar:

- El **Reglamento (UE) 2016/429** del Parlamento Europeo y del Consejo, de 9 de marzo de 2016, relativo a las enfermedades transmisibles de los animales y por el que se modifican o derogan algunos actos en materia de sanidad animal («Legislación sobre sanidad animal»). Establece la normativa comunitaria en relación con la sanidad animal desde el 21 de abril de 2021.
- El **Reglamento de Ejecución (UE) 2018/1882** de la Comisión, de 3 de diciembre de 2018 relativo a la aplicación de determinadas normas de prevención y control a categorías de enfermedades enumeradas en la lista y por el que se establece una lista de especies y grupos de especies que suponen un riesgo considerable para la propagación de dichas enfermedades de la lista.
- El **Reglamento Delegado (UE) 2020/687** de la Comisión, de 17 de diciembre de 2019, por el que se completa el Reglamento (UE) 2016/429 del Parlamento Europeo y del Consejo en lo referente a las normas relativas a la prevención y el control de determinadas enfermedades de la lista.
- El **Reglamento Delegado (UE) 2020/688** de la Comisión, de 17 de diciembre de 2019, por el que se completa el Reglamento (UE) 2016/429 del Parlamento Europeo y del Consejo en lo referente a los requisitos zoonosanitarios para los desplazamientos dentro de la Unión de animales terrestres y de huevos para incubar.
- El **Reglamento Delegado (UE) 2020/689** de la Comisión, de 17 de diciembre de 2019, por el que se completa el Reglamento (UE) 2016/429 del Parlamento Europeo y del Consejo en lo referente a las normas de vigilancia, los programas de erradicación y el estatus de libre de

enfermedad con respecto a determinadas enfermedades de la lista y enfermedades emergentes<sup>1</sup>.

- El **Reglamento Delegado UE) 2020/692** de la Comisión, de 30 de enero de 2020, que contempla el Reglamento (UE) 2016/429 del Parlamento Europeo y del Consejo en lo referente a las normas para la entrada en la Unión, y para el desplazamiento y la manipulación tras la entrada, de las partidas de determinados animales, productos reproductivos y productos de origen animal.
- El **Reglamento de Ejecución(UE) 2020/2002** de la Comisión, de 7 de diciembre de 2020, por el que se establecen normas de desarrollo del Reglamento (UE) 2016/429 del Parlamento Europeo y del Consejo relativas a la notificación a la Unión y al envío de informes a la Unión sobre enfermedades de la lista, al sistema informático de información, así como a los formatos y los procedimientos de presentación y envío de informes relacionados con los programas de vigilancia y erradicación de la Unión y con la solicitud de reconocimiento del estatus de libre de enfermedad.
- El **Reglamento de ejecución (UE) 2020/690** de la Comisión, de 17 de diciembre de 2019, por el que se establecen disposiciones de aplicación del Reglamento (UE) 2016/429 del Parlamento Europeo y del Consejo en lo que se refiere a las enfermedades de la lista objeto de programas de vigilancia de la Unión, al ámbito geográfico de dichos programas y a las enfermedades de la lista para las que se podrá establecer el estatus de libre de enfermedad de los compartimentos.

Mientras que, a **nivel nacional**, destacamos:

- **La Ley 8/2003 de sanidad animal.**
- **El RD 526/2014** según este RD La influenza aviar es una enfermedad de declaración obligatoria, pero de acuerdo a la actual normativa en vigor, únicamente se establece como de notificación inmediata la IAAP, pasando la IABP a notificarse de forma anual de acuerdo al **Reglamento de Ejecución (UE) 2020/2002** de la Comisión, de 7 de diciembre de 2020, por el que se establecen normas de desarrollo del Reglamento (UE) 2016/429 del Parlamento Europeo y del Consejo relativas a la notificación a la Unión y al envío de informes a la Unión sobre enfermedades de la lista.
- **La Orden APA/2442/2006**, de 27 de julio, por la que se establece medidas específicas de protección en relación con la influenza aviar.

### **3. PROGRAMA NACIONAL DE VIGILANCIA**

Se vienen realizando programas de vigilancia de influenza aviar desde el año 2005. Son programas anuales y cada año se revisan y modifican según la situación epidemiológica de la enfermedad y bajo la supervisión de la Comisión.

---

<sup>1</sup> Si bien esta es la norma en vigor para la elaboración entre otros aspectos de los planes de vigilancia, para la elaboración del último plan de vigilancia de la IA en nuestro país se ha tenido en cuenta la derogada Decisión 2010/367/: de la Comisión, de 25 de junio de 2010, relativa a la aplicación por los Estados miembros de los programas de vigilancia de la influenza aviar en las aves de corral y las aves silvestres

El programa está basado en las recomendaciones establecidas en el Anexo II del Reglamento Delegado (UE) 2020/689 de la Comisión de 17 de diciembre de 2019, por el que se completa el Reglamento (UE) 2016/429 del Parlamento Europeo y del Consejo en lo referente a las normas de vigilancia, los programas de erradicación y el estatus de libre de enfermedad con respecto a determinadas enfermedades de la lista y enfermedades emergentes.

Dentro de las medidas de lucha frente a la influenza aviar está la aplicación de un **programa de vigilancia de influenza aviar (IA) en aves domésticas**. El programa tiene como objetivo principal monitorizar, detectar tempranamente e informar a la autoridad competente sobre la detección de la circulación del virus de la influenza aviar, tanto de alta como de baja patogenicidad, mediante un sistema de vigilancia que incluye un componente **pasivo** y un componente **activo**.

El **componente pasivo** tiene por objeto la detección temprana, comunicación e investigación inmediata por parte de los Servicios Veterinarios Oficiales (SVO) de cualquier signo de enfermedad o mortalidad aves domésticas (aumento de la mortalidad, disminución del consumo de agua y piensos, presencia de signos clínicos evocadores de enfermedad respiratoria o disminución de la puesta, por ejemplo). Debe llevarse a cabo en todo el territorio nacional y en todo momento, y se reforzará en aquellos lugares y momentos en los que el riesgo aumente de acuerdo con los mismos sistemas de categorización de riesgo establecidos para la vigilancia activa.

Por su parte, el **componente activo** se basa en un muestreo enfocado al riesgo y estratificado en dos niveles, comunidades autónomas y explotaciones. En primer lugar se plantea un reparto de las explotaciones totales a muestrear por categorías de ave objetivo entre comunidades autónomas de forma proporcional al censo de explotaciones en cada una de ellas, haciendo así que el muestreo tenga representatividad a escala nacional. En segundo lugar, las explotaciones son seleccionadas dentro de cada comunidad autónoma basando el muestreo en el riesgo mediante tres sistemas de priorización complementarios:

El objetivo es la detección de:

- **Infecciones subclínicas de IABP** de los subtipos H5 y H7 que puedan propagarse con facilidad entre las aves de corral de las categorías de gallinas ponedoras, incluyendo aquellas con sistemas de cría al aire libre, pavos de engorde y reproducción y aves de corral de especies del orden de las Galliformes para suministro de aves de caza que vayan a liberarse en el medio natural, en particular en zonas con una elevada densidad de establecimientos de aves de corral para poder prevenir la posible mutación a cepas de alta patogenicidad.
- **Infecciones de Influenza aviar de alta o baja patogenicidad** en patos, gansos, codornices y aves de corral de especies del orden de las Anseriformes para suministro de aves de caza que vayan a liberarse en el medio natural, en explotaciones dentro de territorio nacional, que normalmente no muestran signos clínicos significativos.

En el programa de vigilancia se establece el muestreo de las siguientes especies de aves de corral y categorías de producción:

- gallinas ponedoras
- gallinas ponedoras criadas al aire libre
- pavos de engorde
- pavos reproductores
- aves de corral de especies del orden de las Galliformes para suministro de aves de caza que vayan a liberarse en el medio natural (excepto codornices)
- codornices
- aves de corral de especies del orden de las Anseriformes para suministro de aves de caza que vayan a liberarse en el medio natural
- patos reproductores - gansos reproductores
- patos de engorde
- gansos de engorde

El número de explotaciones a muestrear (sin incluir explotaciones de patos y gansos) deberá garantizar la detección en caso de una prevalencia estimada del 5% con un intervalo de confianza del 95%. En el caso de explotaciones de aves domésticas de patos, ganso, codornices y aves de corral del orden anseriformes el número de explotaciones a muestrear deberá asegurar una prevalencia estimada del 5 con un intervalo de confianza del 99%.

En líneas generales, para el caso de aves de corral, el **número de muestras** que se deben recoger son el siguiente:

- Hisopos cloacales de 20 animales o de todos los animales presentes en caso de ser menos de 20.
- Hisopos traqueales/bucofaríngeos de 20 animales o de todos los animales presentes en caso de ser menos de 20.
- Un mínimo de cinco aves muertas si hubieran muerto recientemente o sacrificadas en el caso de que estén gravemente enfermas o moribundas.
- Sangre sin anticoagulante, para investigación serológica, de 20 animales o de todos los animales presentes en caso de ser menos de 20.

El periodo de muestreo se adaptará a la estacionalidad de la producción, aunque se puede orientar a las épocas de mayor riesgo se realizará a ser posible en animales adultos, evitando hacerse en animales recién nacidos o recientemente ingresados en la explotación. Se recomienda aprovechar las muestras recogidas para otros fines, para aumentar la eficiencia del esfuerzo económico y humano realizado. El muestreo virológico no se utilizará como alternativa al muestreo serológico, salvo en el caso de aves de caza de cría gallináceas siempre y cuando no puedan tomarse muestras serológicas, y deberá realizarse únicamente en el Programa Vigilancia Influenza Aviar de investigaciones de seguimiento de los resultados positivos de las pruebas serológicas.

Las muestras recogidas en el marco del plan de vigilancia específica de IABP y de la vigilancia complementaria de la IAAP en especies de aves de corral que normalmente no muestran signos clínicos significativos, serán sometidas preferentemente a **pruebas de laboratorio**

mediante **métodos serológicos**. Cuando por motivos técnicos o por otras razones no sea adecuado el muestreo para serología, se podrán realizar pruebas virológicas.

En caso de resultados serológicos positivos (H5, H7) se tomarán nuevas muestras (al menos 20 muestras serológicas y 20 virológicas traqueales y cloacales o 5 aves enfermas o muertas), que se remitirán al Laboratorio Nacional de Referencia (LNR) en el Laboratorio Central de Veterinaria de Algete para **análisis virológico** mediante PCR genérica y específica (H5, H7, N1), secuenciación, inoculación en embrión de pollo, etc. Todo resultado positivo (H5, H7) se investigará mediante la realización de una encuesta epidemiológica siguiéndose las pautas indicadas en el Plan nacional de contingencia para la lucha frente a la IA.

Todos los resultados (serológicos y virológicos) obtenidos por los laboratorios autorizados se remitirán a la Subdirección General de Sanidad e Higiene Animal y Trazabilidad (SGSHAT) de forma semestral, mediante la aplicación RASVE.

El LNR remitirá al Laboratorio Comunitario de Referencia todos los virus influenza aviar de los subtipos H5 o H7 u otros virus influenza que puedan constituir una amenaza importante para la salud, de forma que pueda establecerse un archivo que permita futuros desarrollos de técnicas diagnósticas.

El objetivo del **programa de vigilancia de la influenza aviar en las aves silvestres** es detectar de forma temprana la IAAP en las aves silvestres a fin de proteger a las aves de corral en las explotaciones de aves de corral y salvaguardar la salud pública, y es llevado a cabo en base a las recomendaciones establecidas en el Anexo II del Reglamento Delegado 689/2020.

El programa cubre la totalidad del territorio nacional y se aplica en todos los periodos del año y se basa en una vigilancia pasiva basada en el muestreo laboratorial de todas las aves muertas o moribundas fundamentalmente acuáticas. A aquellas aves silvestre con especial riesgo de transmitir el virus de la IA (VIA) se le denomina "especies Objetivos" prestándoles especial atención (existe un listado en el programa de vigilancia de aquellas especies que presentan un alto riesgo). Se intentará en la medida de lo posible analizar también a aquellas aves en contacto con las aves encontradas enfermas o moribundas. Todas las medidas de vigilancia pasiva se intensificarán siempre que se detecte un aumento de casos de VIA en países cercanos o que la información del personal profesionales del sector (ornitólogos o epidemiólogos) así lo determinen. El análisis de las muestras se realizará por parte de los laboratorios autorizados de las comunidades autónomas correspondientes que trabajarán bajo el control del Laboratorio Nacional de Referencia de Algete.

La vigilancia en **aves silvestres** se realiza principalmente mediante vigilancia virológica, por lo que deberán recogerse hisopos cloacales y traqueales u orofaríngeos, y/o muestras tisulares (encéfalo, corazón, pulmón, tráquea, riñón e intestino).

Se cuidará especialmente el adecuado almacenamiento y transporte de las muestras para evitar su deterioro, que incluye: refrigeración y remisión inmediata al laboratorio. En el caso de que se trate de hisopos, éstos deberán ser completamente sumergidos en un medio tampón fosfato (PBS) con antibióticos o en su defecto suero fisiológico/antibiótico.

En caso de no disponer de PBS o suero fisiológico, se podría utilizar un medio comercial específico para transporte de virus, pero en ningún caso se deben de utilizar medios de transporte para bacterias.

La totalidad de los virus de Influenza aviar aislados procedentes de aves silvestres se remitirán al LNR. En el caso de virus de los subtipos H5 o H7, serán sometidos sin demora a las pruebas generales de caracterización, conforme al manual de diagnóstico. Para las aves silvestres se remitirán muestras para análisis virológico por lo que se recogerán hisopos cloacales y orofaríngeos así como tejidos (encéfalo, corazón, pulmón, tráquea, riñón e intestino)

Todos los resultados se enviarán cada semestre por medio de la aplicación RASVE a la subdirección general de Sanidad Animal e Higiene Animal y Trazabilidad que a su vez lo enviará a la Comisión Europea.

El LNR remitirá al Laboratorio Comunitario de Referencia todos los virus influenza aviar de los subtipos H5 y H7 u otros virus influenza que puedan constituir una amenaza importante para la salud y guardará las muestras de sueros positivos frente a un virus H5 o H7.

La vacunación de forma general como método de lucha y control de la IA está prohibida en aves domésticas, aunque puede existir una vacunación de emergencia, con la previa aprobación de la Comisión Europea, si se cumplen los requisitos recogidos en la directiva.

Una de los factores más importante en el control de enfermedades en Sanidad Animal y en particular de la IA es la realización de un Diagnóstico precoz que permite una toma de decisiones rápida.

#### **4. DIAGNÓSTICO DE LABORATORIO**

Una de los factores más importante en el control de enfermedades en Sanidad Animal y en particular de la IA es la realización de un Diagnóstico precoz que permite una toma de decisiones rápida.

En la infección por virus influenza no existen síntomas patognomónicos que nos permitan diagnosticar la enfermedad a partir de los signos clínicos. Los síntomas son compatibles con otras enfermedades de los animales, en el caso de las aves con la enfermedad de Newcastle, en equino con el herpesvirus equino y en el caso de los cerdos con la enfermedad de Aujeszky o con el Coronavirus respiratorio porcino. Por ello, es indispensable la realización de **un diagnóstico diferencial** en el propio laboratorio mediante la realización de pruebas específicas que nos indiquen la existencia del virus de IA o la presencia de sus Ac.

Para que el diagnóstico de laboratorio sea fiable, lo primero fundamental es una muestra adecuada, bien tomada y bien conservada hasta su llegada al laboratorio. Los hisopos recogidos deben ir en tampón fosfato salino a pH fisiológico con antibióticos para evitar la proliferación bacteriana y en posición vertical para que el algodón siempre esté embebido en el PBS. Existen medios de transportes especiales para virus (no introducirlos nunca en medios para bacterias). Si las muestras son enviadas dentro de las 48 horas después de su

toma, deberán ser enviadas en refrigeración a 4°C. Si fuera a llegar la muestra más tarde de esas 48 horas desde su toma, ésta deberá venir congelada a -70°C y ser transportada sin romper la cadena de frío.

Las muestras enviadas al laboratorio para su diagnósticos deben ser enviadas en un triple embalaje que asegure su envío seguro con las características establecidas por la normativa vigente para el envío de sustancias infecciosas. En el caso de muestras procedentes de la vigilancia pasiva o aquellas enviadas para su confirmación al LNR deberán estar etiquetadas conforme a las sustancias infecciosas de **categoría B con el código UN 3373**.

Aquellas muestras diagnosticadas como positivas por el LNR y que deban ser enviadas al LR-UE serán categorizadas como sustancias infecciosas de tipo A con el código UN 2814 si pudiera producir enfermedad en el humano o 2900 si solo pudiera producir enfermedad en los animales.

El diagnóstico de la enfermedad de la IA se debe basar en:

#### **4.1 DIAGNÓSTICO ETIOLÓGICO**

##### **4.1.1 Métodos de screening y tipificación rápidos**

Existen kits comerciales de ELISA de detección de virus de influenza A, La mayoría de estos kits son enzimoimmunoanálisis o se basan en la inmunocromatografía (dispositivos de flujo lateral) y utilizan un anticuerpo monoclonal frente a la nucleoproteína. La principal ventaja de estas pruebas consiste en que pueden poner de manifiesto la presencia de influenza A en 15 minutos. Las desventajas son que pueden carecer de sensibilidad, que pueden no haber sido validadas para diferentes especies de aves, que no se consigue la identificación del subtipo vírico H o N y que son caros.

##### **4.1.2 Aislamiento del virus**

Es el método clásico de referencia, pero es laborioso y requiere mucho tiempo, se utiliza principalmente para el diagnóstico de un primer caso clínico en un brote y para obtener cepas del virus para analizarlas con mayor detalle en el laboratorio. Se realiza inoculando el sobrenadante de macerados de órganos y heces de aves muertas o hisopos cloacales o traqueales de aves vivas **en huevos embrionados de pollos SPF (libres de patógenos específicos) de 9-11 días de incubación** (o células fibroblásticas de cultivo primario derivadas de embrión de pollo o células MDCK). El extracto es inoculado en la cavidad alantoidea (también se puede utilizar el saco amniótico) y se incuban a 35-37°C durante seis días. Generalmente el virus mata a los embriones entre los dos y cuatro días post inoculación, aunque algún subtipo como el H5N1 altamente patógeno mata al embrión en menos de 20 horas. Se recoge el líquido alantoideo (LA) de todos los embriones muertos y de los que lleguen a término del periodo de incubación para la realización de la prueba de hemaglutinación; ya que, estos virus tienen la capacidad de hemaglutinar los glóbulos rojos de pollo o una inmunodifusión en gel de agar [AGID] o un ELISA de captura de antígeno de

fase sólida, o una prueba molecular para detectar ácido nucleico específico del virus de la influenza A una RT-PCR.

Los LA negativos es necesario darles un 2º pase e incluso un 3º pase en embrión de pollo para considerarlos negativos.

Para caracterizar o identificar por métodos clásicos los virus de influenza aislados hay dos pruebas:

- La prueba de inhibición de la hemoaglutinación (IH) para determinar el subtipo, es decir el tipo de hemoaglutinina (H1 a H16 se realiza con antisueros específicos del virus de la IA.
- La prueba de Inhibición de la Neuraminidasa (IN) para determinar el tipo de Neuraminidasa (N1 a N9).

#### 4.1.3 Técnicas moleculares

**La técnica de rRT-PCR** sobre las muestras originales sin previo aislamiento en embrión de pollo o a partir del propio aislado de líquido alantoideo. La primera prueba que se realiza en el laboratorio es **la RT-PCR genérica dirigida al gen que codifica la proteína de la matriz (proteína M)**.

Hay desarrolladas RT-PCRs específicas para identificar la hemaglutinina como:

- RT-PCR específica de H5
- RT-PCR específica de H7
- RT-PCR específica de H9
- RT-PCR específica de H1pandémico

Y RT-PCRs específicas para identificar la neuraminidasa:

- RT-PCR específica de N1 cepas euroasiáticas
- RT-PCR específica de N5
- RT-PCR específica de N6
- RT-PCR específica de N8

Si las muestras son positivas a H5 o H7 se debe determinar la patogenicidad. Se puede determinar la patogenicidad del virus mediante dos métodos:

- **Por métodos convencionales** como es la “Determinación del índice de patogenicidad intravenoso (IPIV)” en pollitos de seis semanas del líquido alantoideo procedente de huevos embrionados. Un IPIV > 1,2 = **virus IAAP**. La caracterización de las cepas víricas sospechosas de ser altamente patógenas debe realizarse en un laboratorio de contención biológica de tipo 3.
- **Por métodos moleculares:** Dependiendo del tipo de aminoácidos que forman el sitio de corte de la HA, se puede distinguir entre:
  - Sitios con un solo aminoácido básico en la posición 1 de la zona de corte.

Ej. PEKQTR/GLF PENPKGR/GLF R = arginina

Pueden ser escindidos por pocas proteasas, diseminación limitada en el organismo (tracto intestinal y respiratorio). Virus influenza de baja patogenicidad, LPAI.

- Sitios con varios aminoácidos básicos en la posición 1 y anteriores de la zona de corte.

Ej. PQRERRKR/GLF PEIPKKKKR/GLF R = arginina K = lisina

Pueden ser escindidos por mayor número de proteasas, dando lugar a infecciones sistémicas. Virus influenza de alta patogenicidad, HPAI

## 4.2 DIAGNÓSTICO SEROLÓGICO

Determinan la presencia de Ac específicos que se pueden detectar a los 7 días del inicio de la infección. Permiten detectar Ac específicos de grupo o específico de subtipo.

Las pruebas más utilizadas son:

- **AGID** o inmunodifusión doble en gel de agar: se utiliza como Ag el líquido alantoideo de embriones infectados. Sirve para detectar Ac en gallinas y pavos pero no para el resto de especies. .
- **ELISA.** Técnica más sensible que el AGID. Detectan anticuerpos frente a la proteína de la nucleocápsida Se comercializan ELISAs indirectos para sueros de pollos y de competición que permiten la detección de anticuerpos en sueros de pollos y otras especies.

La AGID y el ELISA son pruebas de cribado serológico de bajo coste, útil para detectar infecciones genéricas por virus de influenza A, los sueros positivos se deben analizar por inhibición de la hemoaglutinación (IHA) para subtipificar y determinar si son H5 o H7.

- **IHA** o inhibición de la hemaglutinación se utiliza principalmente para determinar si los anticuerpos que indican infecciones por virus de influenza A son de subtipo H5 o H7. Es la prueba recomendada en el plan de vigilancia de la influenza aviar para confirmar todos los sueros positivos o dudosos a ELISA que han sido analizados en los laboratorios de la CCAA.

Se debe utilizar dos antígenos H5 (H5N3 y H5N1) y dos antígenos H7 (H7N7 y H7N1) para evitar las reacciones cruzadas debido a la neuraminidasa.

- La prueba de inhibición de la neuraminidasa (**INA**) se puede utilizar también como una prueba serológica para detectar anticuerpos específicos anti-N. No es muy habitual, es muy laboriosa y requiere reactivos especializados.

## **BIBLIOGRAFÍA**

Código de animales terrestres y acuáticos (lista EDO OIE). Capítulo 3.3.4. Influenza aviar (incluida la infección por los virus de la influenza aviar altamente patógenos).

[Avian influenza \(oie.int\)](http://oie.int)

Reglamentos de Sanidad Animal de la UE y Reglamentos delegados y de ejecución para el desarrollo del Reglamento base.

EFSA (Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria) dictámenes científicos independientes. Último informe sobre la situación epidemiológica de la IA en la temporada 2021-2022 en la UE (30/03/22).

<https://www.efsa.europa.eu>

Página WEB del Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie (IZSve), laboratorio de referencia europeo (EURL) y de la OIE asignado para IA.

<https://www.izsvenezie.com>

OFFLU red mundial conjunta OIE-FAO de expertos en influenza animal.

Página WEB del MAPA (Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación).

[Influenza Aviar \(mapa.gob.es\)](http://mapa.gob.es)

**MATERIAL PARA LA PREPARACIÓN DEL TEMA 56**

**RABIA. MARCO LEGAL. DIAGNÓSTICO DE LABORATORIO. REQUISITOS  
APLICABLES AL MOVIMIENTO DE ANIMALES DE COMPAÑÍA**

*Este material no tiene carácter oficial, por lo que en ningún caso vinculará al Tribunal Calificador. Constituye, únicamente, un instrumento complementario que servirá de apoyo al opositor para enfocar cada uno de los epígrafes, pero nunca de forma exclusiva ni excluyente. El Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación no se hace responsable del contenido del mismo.*

*Los materiales no serán objeto de actualización constante.*

## **ÍNDICE**

### **1. INTRODUCCIÓN:**

### **2. RABIA**

#### **2.1. ASPECTOS GENERALES**

- 2.1.1. Etiología
- 2.1.2. Epidemiología
- 2.1.3. Sintomatología
- 2.1.4. Profilaxis y control
- 2.1.5. Situación de la enfermedad

#### **2.2. MARCO LEGAL**

- 2.2.1. Normativa comunitaria
- 2.2.2. Normativa nacional

#### **2.3. DIAGNÓSTICO DE LABORATORIO**

- 2.3.1. Diagnóstico en animales sospechosos
- 2.3.2. Diagnóstico para el movimiento de animales de compañía

### **3. REQUISITOS APLICABLES AL MOVIMIENTO DE ANIMALES DE COMPAÑÍA**

#### **3.1. REQUISITOS GENERALES**

#### **3.2. REQUISITOS ESPECÍFICOS PARA PERROS, GATOS Y HURONES**

- 3.2.1. Para el movimiento desde países UE a España
- 3.2.2. Para el movimiento desde España a países UE
- 3.2.3. Para el movimiento desde España a tercer país
- 3.2.4. Para el movimiento desde terceros países a España

#### **3.3. REQUISITOS PARA AVES DE COMPAÑÍA**

#### **3.4. REQUISITOS PARA OTRAS ESPECIES**

## 1. INTRODUCCIÓN:

La historia de la humanidad ha estado siempre ligada a la de los animales, siendo, en primera instancia, una relación del tipo depredador-presa para pasar luego, con la llegada del Neolítico, a una relación más estrecha basada en la domesticación y la ganadería, de donde surgieron los animales de abasto y los de compañía.

Teniendo en cuenta que, además, la distancia filogenética entre animales, especialmente mamíferos, y el hombre no es muy lejana, no es de extrañar que aparecieran coincidencias espacio-temporales en el desarrollo de enfermedades conjuntas entre animales y hombre. Estas coincidencias fueron observadas por Rudolf Virchow quien, en el siglo XIX, acuñó el término de **zoonosis** para referirse a estas enfermedades compartidas entre los animales y el ser humano.

En este contexto, es importante considerar que aproximadamente el 70% de las enfermedades infecciosas humanas son de origen animal y que, incluso, aquellas enfermedades no zoonóticas pueden repercutir en la salud pública al provocar pérdidas en la producción de alimentos tanto cuantitativas como cualitativas. Por consiguiente, parece bastante clara la necesidad de establecer estrategias comunes que permitan abordar de manera conjunta la sanidad humana, animal y medioambiental con la misión de prevenir, controlar y vigilar las enfermedades infecciosas con potencial epidémico o pandémico.

Dentro de las zoonosis, la **rabia** es una de las enfermedades más conocidas por afectar a animales tan cercanos como los perros y, sobre todo, por la gravedad que reviste, pudiendo llegar a ser mortal en ausencia de un tratamiento adecuado.

Por ello, su control en los animales, en especial, en los de compañía es uno de los más regulados y que se extiende al ámbito de los movimientos entre países.

## 2. RABIA

### 2.1. ASPECTOS GENERALES

La rabia es una zoonosis vírica grave transmitida al hombre a través del contacto con animales infectados, tanto domésticos como silvestres.

#### 2.1.1. Etiología

El agente etiológico es un Lyssavirus perteneciente a la familia *Rhabdoviridae*. Es un virus de tipo ARN lineal monocatenario. Son receptivos al virus de la rabia el hombre, todas las especies de mamíferos y en ocasiones también las aves.

#### 2.1.2. Epidemiología

De manera concreta, todos los animales de sangre caliente son hospedadores válidos para el virus de la rabia, aunque existen diversos grados de susceptibilidad, siendo de susceptibilidad muy alta el zorro, el chacal, el lobo o la rata.

En Europa, el principal reservorio de la rabia terrestre es el zorro rojo y los murciélagos si bien, en el ámbito doméstico el perro es la especie que más frecuentemente está implicada en la transmisión hacia el hombre aunque el gato puede verse también implicado. En cuanto a los tipos epidemiológicos de rabia se establecen dos:

- Rabia urbana, de la calle o del perro, que coexiste con el hombre desde que fue domesticado.
- Rabia selvática o silvestre, en la que los principales vectores implicados son los carnívoros silvestres y los quirópteros.

La transmisión de la enfermedad al hombre, en el 99% de los contagios es a partir de la saliva. Se puede realizar por las siguientes vías:

- Mediante mordedura de animales rabiosos o en período de incubación o cuando la saliva del animal infectado entra en contacto con una herida en la piel o en las mucosas.
- En casos excepcionales, se puede producir el contagio por trasplantes desde donantes positivos no diagnosticados (transmisión yatrogénica) o por aerosoles en ambientes con una alta cantidad de virus (cuevas colonizadas por murciélagos).

Por regla general, se calcula un período de incubación de 2 a 8 semanas. No obstante, en ocasiones puede ser de tan sólo 10 días. También se describen casos en los que el período de incubación es de 1 año o más. El período de incubación depende, fundamentalmente, de la localización de la herida, en función de la cantidad de tejido nervioso afectado y su distancia al cerebro.

El período de transmisibilidad de un perro enfermo de rabia comprende desde que empieza a eliminar el virus por la saliva hasta que muere, no siendo este período superior generalmente a 10 días. Por lo tanto, los 14 días que la legislación española determinan como obligatorios para mantener a un perro en observación, contados a partir de haber producido una mordedura, son suficientes para asegurar, si es que el animal sigue con vida, que no ha podido transmitir la rabia mediante esa agresión.

### 2.1.3. Sintomatología

Desde un punto de vista clínico, la rabia se describe como un cuadro neurológico de encefalitis, desarrollado bajo síndromes de hiperactividad (rabia furiosa) o parálisis (rabia muda o silente) que progresan hacia el coma y la muerte por fallo respiratorio a los 7-10 días de la presentación del primer síntoma.

De manera más detallada, podemos establecer tres fases durante la expansión del Lyssavirus por el organismo; se trata de la fase prodrómica, de encefalitis aguda y de encefalitis rábica.

En primer lugar, la fase **prodrómica** dura entre dos y diez días y se caracteriza por síntomas inespecíficos como fiebre, cefalea, malestar general o anorexia.

La siguiente fase es la de **encefalitis aguda**, que dura entre dos y siete días. Esta fase se caracteriza por una encefalitis aguda cuyos síntomas son indistinguibles de otras encefalitis virales, tales como excitación y agitación, confusión mental, alucinaciones o agresividad. Esta fase también incluye otros síntomas como fiebre alta, midriasis irregular, lagrimeo o sialorrea.

En último lugar, la fase de **encefalitis rábica** dura entre uno y diez días y se caracteriza por un trastorno funcional del tronco encefálico, que distingue a la rabia de otras encefalitis. La afectación de los pares craneales produce parálisis facial, neuritis óptica y disfagia. La combinación de la disfagia con la sialorrea produce el cuadro clásico de «echar espuma por la boca». El paciente termina entrando en coma y la muerte ocurre por apnea, por afectación del centro respiratorio del encéfalo.

#### **2.1.4. Profilaxis y control**

Dados estos signos, la rabia es un importante problema de salud pública por ser una enfermedad con un pronóstico desfavorable. En cambio, tiene un pronóstico muy favorable si tras el contacto con el animal enfermo se inicia un tratamiento post-exposición, mediante vacunación y sueroterapia.

En el apartado de profilaxis debemos diferenciar las actuaciones dirigidas a personas de alto riesgo (profilaxis preexposición) o ante personas mordidas (profilaxis postexposición). En ambos supuestos, el tratamiento se realiza con vacunación y sueroterapia.

La prevención de la enfermedad, según las indicaciones establecidas por la OMS se basan en la adopción de medidas en el entorno humano, con investigaciones de los casos sospechosos y de las fuentes de contaminación así como el establecimiento de programas de vacunación masiva en perros y otros reservorios.

Por otra parte, la rabia tanto humana como animal se considera de notificación obligatoria en nuestro país y en todos los países miembros de la UE.

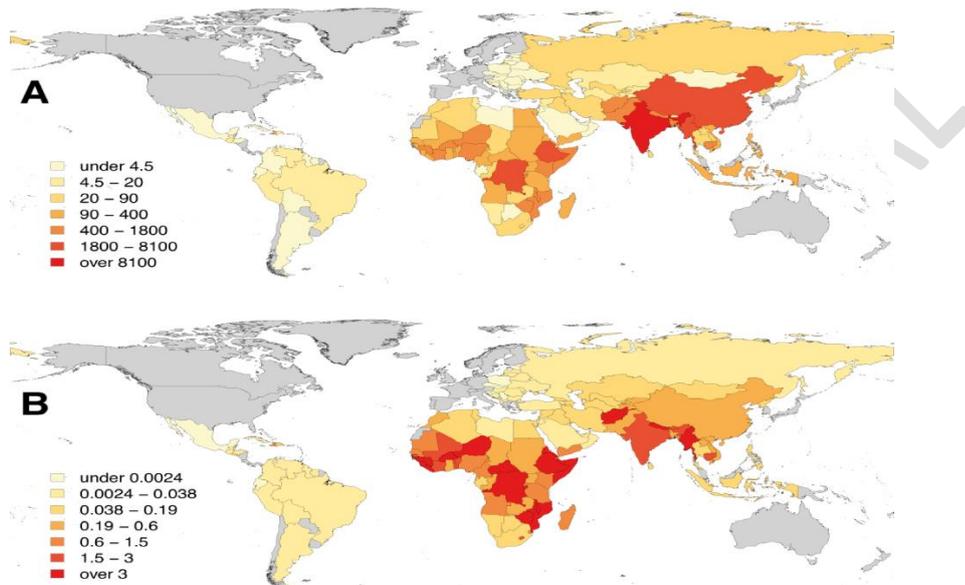
#### **2.1.5. Situación de la enfermedad**

En cuanto a la situación de la enfermedad, la rabia sigue presente en el mundo, con las dos terceras partes de los países todavía infectados. La mitad de la población mundial vive en zonas endémicas, y más del 80% de los fallecimientos se producen en zonas rurales con poco o ningún acceso a las campañas de información sanitaria y a los cuidados tras una mordedura. En este sentido, África y Asia son los continentes con el riesgo más alto de mortalidad humana, con más del 95% de los casos mortales en el mundo. La rabia canina también está menos controlada en estas regiones.

En Europa, los principales reservorios de la rabia terrestre son el zorro rojo, seguido por otros pequeños carnívoros salvajes como el perro mapache en Europa Central y el Báltico; y el murciélago en países como España. La presencia de la rabia en animales salvajes durante los últimos años se ha concentrado en los países bálticos y de Europa del Este, además de en países como Italia y Grecia (donde la rabia ha vuelto a reaparecer). Por tanto, estos países

disponen de Programas Nacionales de erradicación de rabia en sus territorios, responsables, en buena medida, de la reducción de casos positivos de rabia. Además, es en estos países donde también se concentran los casos en los animales domésticos y de compañía.

España ha estado libre de rabia terrestre desde el año 1978, a excepción del caso de rabia importado de Marruecos declarado en junio de 2013 en Toledo. Las campañas de vacunación llevadas a cabo en perros dieron excelente resultado erradicando la enfermedad de todo el territorio nacional. Únicamente en las Ciudades Autónomas de Ceuta y Melilla se dan, de forma esporádica, casos importados de rabia en perros y algún caballo.



A: Muertes humanas por rabia;

B: Tasas de mortalidad por 100 000 habitantes;

Los países sombreados en gris están libres de rabia canina

## 2.2. MARCO LEGAL

### 2.2.1. Normativa comunitaria

En el ámbito comunitario, la normativa legal que afecta a la rabia incluye el **Reglamento (UE) 576/2013** relativo a los desplazamientos sin ánimo comercial de animales de compañía, donde entre otros aspectos relacionados con el movimiento de animales, se establece la obligatoriedad de que el animal objeto de transporte esté correctamente vacunado contra la rabia, y en determinadas situaciones se realizará una analítica para su comprobación.

Junto con esta norma, también afecta a esta enfermedad la **Directiva 2003/99/CE** sobre la vigilancia de las zoonosis y los agentes zoonóticos y el **Reglamento (UE) 2016/429**, relativo a las enfermedades transmisibles de los animales y por el que se modifican o derogan algunos actos en materia de sanidad animal así como distintos Reglamentos Delegados y de Ejecución para dar cumplimiento a la norma anterior. Entre estos se encuentran:

- **El Reglamento de Ejecución (UE) 2018/1882 de la Comisión, de 3 de diciembre de 2018**, relativo a la aplicación de determinadas normas de prevención y control a categorías

de enfermedades enumeradas en la lista y por el que se establece una lista de especies y grupos de especies que suponen un riesgo considerable para la propagación de dichas enfermedades de la lista.

Establece la infección por el virus de la rabia como enfermedad de categoría E (vigilancia) en las siguientes especies o grupos de especies animales: Carnívora, Bovidae, Suidae, Equidae, Cervidae, Camelidae y Chiroptera. Excepto en los quirópteros, la enfermedad se categoriza también como B (erradicación obligatoria) y D (certificación para movimiento).

- **El Reglamento Delegado (UE) 2020/692 de la Comisión, de 30 de enero de 2020**, que completa el Reglamento (UE) 2016/429 del Parlamento Europeo y del Consejo en lo referente a las normas para la entrada en la Unión, y para el desplazamiento y la manipulación tras la entrada de las partidas de determinados animales, productos reproductivos y productos de origen animal.
- **El Reglamento Delegado (UE) 2020/688 de la Comisión**, de 17 de diciembre de 2019, por el que se completa el Reglamento (UE) 2016/429 del Parlamento Europeo y del Consejo en lo referente a los requisitos zoonosarios para los desplazamientos dentro de la Unión de animales terrestres y de huevos para incubar.
- **El Reglamento Delegado (UE) 2020/689 de la Comisión**, de 17 de diciembre de 2019, por el que se completa el Reglamento (UE) 2016/429 del Parlamento Europeo y del Consejo en lo referente a las normas de vigilancia, los programas de erradicación y el estatus de libre de enfermedad con respecto a determinadas enfermedades de la lista y enfermedades emergentes.
- **El Reglamento de Ejecución (UE) 2021/620 de la Comisión de 15 de abril de 2021**, por el que se establecen normas para la aplicación del Reglamento (UE) 2016/429 del Parlamento Europeo y del Consejo relativas a la aprobación del estatus de libre de enfermedad y el estatus de libre de enfermedad sin vacunación de determinados Estados miembros, zonas o compartimentos de estos en lo que respecta a determinadas enfermedades de la lista y a la aprobación de los programas de erradicación de dichas enfermedades de la lista.

### **2.2.2. Normativa nacional**

A nivel nacional, la normativa que se relaciona con la rabia, además de la que acabamos de mencionar de la Unión Europea, incluye:

- **Real Decreto 2210/1995**, por el que se crea la Red Nacional de Vigilancia Epidemiológica (RENAVE).
- **Real Decreto 1940/2004**, sobre la vigilancia de las zoonosis y los agentes zoonóticos.
- **Real Decreto 526/2014**, por el que se establece la lista de las enfermedades de los animales de declaración obligatoria y se regula su notificación.

Asimismo, debido a la cercanía de España con un territorio en el que la rabia puede ser considerada como endémica (norte de África), se ha desarrollado un **Plan de Contingencia para el control de la rabia en animales domésticos en España**, a través del Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación.

De igual modo, encaminada hacia la detección precoz de posibles alertas sanitarias relacionadas con la rabia, se ha desarrollado un **Programa de Vigilancia de la Rabia (animal) en España** en el que se lleva a cabo un análisis del riesgo para valorar la presencia en el principal reservorio de nuestro país (el murciélago) así como para reducir al mínimo el riesgo asociado de introducción mediante el movimiento de animales. Este programa también describe mecanismos de colaboración con el RENAVE<sup>1</sup> y el Ministerio de Sanidad si aparecieran casos de rabia humana además de los mecanismos para la remisión y análisis de muestras en animales sospechosos.

### 2.3. DIAGNÓSTICO DE LABORATORIO

Respecto al diagnóstico de laboratorio, cabe señalar que el **Laboratorio Nacional de Referencia** para la confirmación de casos sospechosos tanto en personas como en animales es el **Centro Nacional de Microbiología del Instituto de Salud Carlos III**, en Majadahonda, que está adscrito al Ministerio de Ciencia e Innovación. No obstante, los análisis dirigidos a determinar el estado inmunitario de los animales de compañía para el movimiento entre países son realizados en el **Laboratorio Central de Sanidad Animal** de Santa Fe (Granada), dependiente del Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación.

#### 2.3.1. Diagnóstico en animales sospechosos

Para el diagnóstico laboratorial de la enfermedad es preciso aportar tejido afectado en el que esté presente el virus, preferiblemente, tejido encefálico aunque también son válidas otras muestras con una sensibilidad variable como las glándulas salivales.

Según el Manual Terrestre de la OIE, las pruebas más indicadas según para qué fin se resumen en la Tabla 1.

De esta forma, para la confirmación de casos clínicos sospechosos las pruebas más apropiadas incluyen la identificación del agente por **inmunofluorescencia directa (FAT)**, la **inmunohistoquímica rápida (dRIT)** o la **PCR** (convencional o en tiempo real). Para la PCR es importante remarcar que dado que el agente es un virus de ARN, deberá llevarse a cabo una RT-PCR (PCR retrotranscriptasa) tanto en su modalidad convencional o en tiempo real por la cual se lleva a cabo una conversión del ARN en ADN previo a su amplificación.

Asimismo, para cualquiera de estas técnicas es necesario el aislamiento previo en **cultivos celulares**, siendo también posible mediante inoculación en ratones, aunque esta forma está desaconsejada por motivos de bienestar animal.

En los casos de resultados inconcluyentes de las técnicas de diagnóstico primarias (FAT, dRIT o PCR para cualquier lyssavirus), se recomienda analizar la misma muestra con otras pruebas de confirmación (pruebas moleculares, o de inoculación en cultivo celular o en ratón), o bien repetir la prueba primaria con otras muestras. Cuando sea posible, el aislamiento del virus en cultivo celular debe reemplazar las pruebas de inoculación en ratones.

---

<sup>1</sup> Red Nacional de Vigilancia Epidemiológica (RENAVE) que gestiona el Centro Nacional de Epidemiología (CNE)

Es preciso recordar que la identificación de corpúsculos de Negri a partir de cortes histológicos sobre tejido nervioso hoy en día no se considera un método recomendable para el diagnóstico de la enfermedad.

Método	Propósito					
	Demostrar ausencia de infección en la población	Demostrar ausencia de infección en animales individuales antes de los desplazamientos	Demostrar ausencia de infección en la población	Confirmar casos clínicos	Demostrar ausencia de infección en la población	Determinar el estado inmunitario en animales o poblaciones tras la vacunación
<b>Identificación del agente</b>						
DFA (detección de antígeno)	+++	n/a	+++	+++	+++	n/a
dRIT (detección de antígeno)	+++	n/a	+++	+++	+++	n/a
ELISA (detección de antígeno)	+	n/a	+	+	+	n/a
Cultivo celular (aislamiento del virus)	+	n/a	+++	+++	+++	n/a
MIT (aislamiento del virus)	n/a	n/a	+++	+++	+++	n/a
RT-PCR convencional (detección de ARN)	+++	n/a	+++	+++	+++	n/a
RT-PCR en tiempo real (detección de ARN)	+++	n/a	+++	+++	+++	n/a
<b>Detección de respuesta inmunitaria</b>						
VN	n/a	+++	+++	n/a	n/a	+++
ELISA	n/a	n/a	+++	n/a	n/a	+++

Clave: +++ = método recomendado para este propósito; ++ = método recomendado pero tiene limitaciones; + = método adecuado en muy pocas situaciones; - = no adecuado para este propósito.  
 DFA = prueba de inmunofluorescencia directa; dRIT = prueba de inmunohistoquímica directa rápida;  
 RT-PCR = reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa; MIT = prueba de inoculación en ratón;  
 VN = neutralización del virus; ELISA = enzimoimmunoanálisis.

Tabla 1: Resumen de las técnicas más indicadas para la rabia según diferentes propósitos. Manual Terrestre de la OIE.

Por otra parte, es posible la caracterización de la cepa del virus implicada en cada caso mediante el uso de anticuerpos monoclonales. Este tipo de pruebas es realizado por centros especializados y permite el rastreo de la enfermedad entre individuos como una excelente herramienta de la epidemiología molecular.

### 2.3.2. Diagnóstico para el movimiento de animales de compañía

Por su parte, las **técnicas serológicas** son las pruebas de elección para demostrar la inmunización de los animales; requisito imprescindible, como se verá en el siguiente apartado, para el movimiento de animales de compañía entre países.

En este sentido, las pruebas serológicas de elección incluyen la **seroneutralización** en cultivo celular con anticuerpos fluorescentes o el **ELISA indirecto**.

### 3. REQUISITOS APLICABLES AL MOVIMIENTO DE ANIMALES DE COMPAÑÍA

#### 3.1. REQUISITOS GENERALES

En relación a los requisitos aplicables para el movimiento de los animales de compañía, los desplazamientos están regulados por normas sanitarias que garantizan su salud y la de las personas. Es importante verificar que el animal cumple todos los requisitos legales ya que su incumplimiento daría lugar a la inmovilización de las mascotas en instalaciones de cuarentena, a su reexpedición al país de origen, o incluso como última opción, a su eutanasia.

En términos generales, se considera desplazamiento de **animales de compañía** siempre que:

- Los animales objeto del traslado sean **5 o menos**. Sin embargo, existen excepciones para concursos, exposiciones o actividades deportivas, debidamente documentados para animales mayores de 6 meses.
- **No** tengan una **finalidad comercial** ni exista una transferencia de propiedad.
- **Viajen acompañando** a su dueño o una persona responsable del animal en su nombre durante el desplazamiento. No obstante, se permite que el movimiento de los animales se haga en un medio de transporte separado al del dueño si ocurre en un plazo no superior a cinco días respecto al movimiento del dueño/responsable.

El movimiento tanto intracomunitario como extracomunitario de animales de compañía está regulado por el **Reglamento (UE) 576/2013 del Parlamento Europeo y del Consejo relativo a los desplazamientos sin ánimo comercial de animales de compañía**. A esta norma base se le añaden las siguientes disposiciones:

- **Reglamento (UE) 577/2013** de la Comisión Europea *relativo a los modelos de documentos de identificación para los desplazamientos sin ánimo comercial de perros, gatos y hurones*.
- **Reglamento Delegado (UE) 2018/772** por el que se completa el Reglamento (UE) 576/2013 del Parlamento Europeo y del Consejo en lo que respecta a las medidas sanitarias preventivas para controlar la infección de los perros por *Echinococcus multilocularis* y se deroga el Reglamento Delegado (UE) 1152/2011.
- **Decisión 2007/25/CE de la Comisión**, relativa a determinadas medidas de protección frente a la gripe aviar altamente patógena y a los desplazamientos de aves de compañía que llegan con sus propietarios a la Comunidad.
- **Reglamento (UE) 206/2010** de la Comisión, de 12 de marzo de 2010, por el que se establecen listas de terceros países, territorios o bien partes de terceros países o territorios autorizados a introducir en la Unión Europea determinados animales o carne fresca y los requisitos de certificación veterinaria.

De manera específica, podemos diferenciar los requisitos definidos para el movimiento de animales de compañía de tres categorías:

- Perros, gatos y hurones
- Aves de compañía
- Otros animales que incluyen reptiles, roedores, conejos y otras especies menos habituales.

A su vez, dentro de estas categorías, se diferencian las condiciones necesarias para su introducción a España desde un país comunitario, para su traslado hacia un país comunitario o bien, para su introducción a España desde un tercer país o su traslado hacia un tercer país.

Por otra parte, los viajeros que quieran introducir un animal de compañía desde un país tercero, deberán hacerlo a través de uno de los **Puntos de Entrada de viajeros (PEV)** designados por el Reglamento 576/2013 y por la Decisión 2007/25/CE.

Estos puntos incluyen aeropuertos, puertos y puntos de entrada por carretera. Son competencia del Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, a través de la SG de Acuerdos Sanitarios y Control en Frontera, sin perjuicio de las competencias tributarias que pueda tener asignadas el Ministerio de Hacienda a través de la Agencia Tributaria.

Los requisitos de estos puntos para ser autorizados incluyen:

- Contar con un servicio de Sanidad Animal con personal veterinario que participe de forma aleatoria en la realización de los controles. Este servicio de sanidad animal deberá definir la periodicidad de estos controles en función del riesgo y del volumen de introducciones de animales de compañía, así como impartir un curso teórico-práctico anual a la Guardia Civil y prestarles asesoramiento técnico.
- Disponer de instalaciones aptas para animales vivos para alojar posibles animales no conformes en una habitación con luz natural o forzada con jaulas o trasportines, así como de los medios necesarios para el cuidado de animales.
- Contar con un convenio con una clínica veterinaria para un eventual tratamiento de animales no conformes.

### **3.2. REQUISITOS ESPECÍFICOS PARA PERROS, GATOS Y HURONES**

Respecto a los requisitos específicos, en primer lugar, la categoría más relevante en cuanto a volumen de mascotas son, sin duda, los **perros, gatos y hurones**, si bien es cierto que estos últimos experimentaron cierto auge hace unos 10 años, ahora no son ni mucho menos tan numerosos como perros o gatos pero por sus características semejantes se les mantienen en esta categoría.

#### **3.2.1. Para el movimiento desde países UE a España**

La introducción en España de perros, gatos y hurones sin ánimo comercial procedentes de otros EE.MM está regulada por la **Instrucción 1/2014** de la Dirección General de la Sanidad de la Producción Agraria.

El desarrollo de esta Instrucción responde a la necesidad de desarrollar las disposiciones recogidas por el Reglamento 576/2013.

Las autoridades competentes encargadas de controlar la entrada de estos animales en nuestro país son Los Cuerpos y Fuerzas de Seguridad del Estado, actuando los servicios veterinarios de Sanidad Animal de las Comunidades Autónomas o la Subdirección General de Sanidad e Higiene animal y Trazabilidad como autoridades de consulta.

Los requisitos estipulados que deben cumplir son:

- El animal irá acompañado por un **pasaporte** para animales de compañía conforme al Reglamento de Ejecución (UE) N° 577/2013 de la Comisión de 28 de junio de 2013 si el pasaporte se ha emitido con posterioridad al 20/12/2014.  
Para el desplazamiento desde otros EE.MM es obligatorio que estén cumplimentados los apartados de: propietario, descripción, marcado, expedición del pasaporte y vacuna antirrábica.
- El animal está **identificado** mediante **tatuaje legible** (válido hasta el 3 de julio de 2011) o **microchip**. Los animales tatuados antes del 3 de julio de 2011 serán admitidos siempre que el tatuaje sea legible y se pueda demostrar que se realizó con anterioridad a esa fecha.
- En el pasaporte debe comprobarse que se realizó la **vacunación contra la rabia** y que está en vigor, según recomendación del laboratorio de fabricación, no pudiendo desplazarse el animal hasta al menos 21 días después de la vacunación en caso de ser la primera vacuna.

### 3.2.2. Para el movimiento desde España a países UE

Para viajar a la UE desde España, los animales de compañía deben cumplir las mismas condiciones (identificación por microchip o tatuaje, vacuna válida para la rabia y pasaporte europeo) y, además, los perros que vayan a **Reino Unido, Irlanda, Malta, Finlandia o Noruega**, deberán estar tratados contra *E. multilocularis* entre 24 y 120 horas antes de llegar al país, conforme al Reglamento Delegado (UE) 2018/772.

### 3.2.3. Para el movimiento desde España a un tercer país

Por otra parte, para viajar a un país tercero, los perros, gatos o hurones deberán cumplir los requisitos que pida dicho país. Para conocer esos requisitos, es necesario informarse en la Embajada o Consulado de ese país, en la página web del Ministerio responsable del país, consultar la información disponible en el apartado de exportación de animales de compañía de **CEXGAN** o bien en el Protocolo de Exportaciones de animales de compañía, elaborado por el MAPA.

En este sentido, el **Protocolo de Exportaciones de animales de compañía** recoge que los requisitos de tipo sanitario han de ser certificados por un veterinario clínico que deberán plasmar en un **certificado zoonitario**, conforme al modelo aprobado por el tercer país en cuestión, la ausencia de síntomas compatibles con enfermedades infectocontagiosas, que son aptos para realizar el viaje, que están vacunados contra la rabia y cualquier otro requisito de este tipo. Este certificado tendrá una validez de 10 días aunque, si un tercer país exige que sea expedido en las 48 horas previas al movimiento, por ejemplo, esta condición también deberá cumplirse.

Una vez expedido el certificado zoosanitario, se procederá a expedir un **Certificado de Exportación** por parte de los SVO de la AGE de las Delegaciones y Subdelegaciones del Gobierno. Este certificado, a su vez, podrá ser genérico, cuando el tercer país no imponga requisitos concretos, o bien específico (certificado específico de exportación, **ASE**). Este certificado deberá estar firmado por la autoridad competente de la AGE aunque algunos países fijan un modelo de certificado de dos firmas en la que también se requiere la firma del veterinario clínico.

Además, hay países para los que el certificado oficial del Reino de España es suficiente, y otros que exigen que el certificado de exportación sea validado mediante una legalización a través del Apostillado de La Haya, o del Reconocimiento consular.

### **3.2.4. Para el movimiento desde terceros países a España**

El último supuesto, después de haber estado en un tercer país, cuando se quiere regresar a España con un animal de compañía, deberá realizarse a través de uno de los **Puntos de Entrada de Viajeros** designados, y declarar al Resguardo Fiscal de la Guardia Civil que viaja con un animal de compañía, presentando la documentación del mismo.

En el caso de que se regrese de un país con riesgo de rabia, debe realizarse un **test serológico frente a la rabia** en un laboratorio autorizado, antes de viajar. El resultado de dicha prueba lo reflejará su veterinario en el pasaporte, y deberá ser igual o superior a 0.5 UI/ml.

En este sentido, al menos 30 días después de la vacunación frente a la rabia, en el caso de la primera vacunación, deberá tomarse una muestra de sangre al animal para verificar que el nivel de anticuerpos post vacunales es suficiente, es decir, igual o superior a 0.5 UI/ml. Por ello, la entrada del animal solo estará autorizada pasados 3 meses desde la fecha de extracción de la muestra de sangre; en otras palabras, la edad mínima de un animal que proceda de un país con riesgo de rabia será de 7 meses.

En caso de que el animal se desplace desde un país de la Unión Europea, a un tercer país para después volver, este plazo de tres meses no se aplicará, si se realiza la valoración con resultado favorable antes de que dicho animal abandone el territorio de la Unión Europea. Esta información se recogerá en el pasaporte del animal. Si se mantiene el protocolo de vacunación, el test serológico será válido durante toda la vida del animal.

### **3.3. REQUISITOS PARA AVES DE COMPAÑÍA**

En segundo lugar, las aves consideradas de compañía, por su carácter volador y, por tanto, por su potencial de difundir agentes patógenos mucho más rápido que un animal terrestre, disponen de una regulación específica para su movimiento transnacional.

Asimismo, cabe indicar que las aves de corral (según la definición de la Directiva 158/2009/CE) nunca se considerarán animales de compañía.

Viajar a España desde un país de la UE

La introducción en España desde otro país de la UE de aves de corral implicará la emisión de un certificado veterinario conforme al **modelo INTRA-2**, redactado al menos en español, y emitido en los últimos 10 días. En este modelo, además de datos del propietario, del animal y del transporte, se recogen aspectos acerca de la realización de un examen clínico previo a la expedición del certificado, la procedencia de zonas libres para agentes patógenos como la influenza aviar y, para el caso particular de las psitácidas, la ausencia de signos compatibles con la psitacosis (producida por *Chlamydophila psittaci*).

#### Viajar desde España a un país de la UE

Por su parte, las normas para el movimiento de aves entre Estados Miembros no se encuentran armonizadas a nivel de la UE, por lo que cada país puede establecer sus normas (requisitos adicionales o certificado sanitario para su introducción). Por ello, estas condiciones deberán consultarse a través de TRACES o **CEXGAN** o directamente con el Estado Miembro de destino.

#### Viajar a un país no miembro de la UE

El viaje de un ave de compañía hacia un país no miembro de la UE deberá cumplir los mismos requisitos expuestos para perros, gatos y hurones, es decir, deberá consultarse con la Embajada o Consulado de ese país, en la página web del Ministerio responsable del país o bien consultar la información disponible en el apartado de exportación de animales de compañía de CEXGAN o en el Protocolo de Exportaciones de animales de compañía, elaborado por el MAPA.

#### Introducir un ave de compañía desde un país no miembro de la UE

Por otra parte, para introducir un ave de compañía desde un país tercero, deberá hacerlo a través de uno de **Puntos de Entrada de Viajeros** designados, y declarar al Resguardo Fiscal de la Guardia Civil que viaja con un animal de compañía, presentando la documentación del mismo.

El animal deberá ir acompañado por un **certificado zoosanitario**, que deberá ir firmado por un veterinario oficial del país tercero, y presentarse al menos en castellano y una declaración conforme a los modelos establecidos por la UE.

Asimismo, a fin de evitar la entrada del virus de la influenza aviar al territorio nacional, el ave de compañía deberá cumplir una de las cuatro opciones recogidas en el certificado veterinario:

- Después de su importación, permanecerá en cuarentena durante un periodo de 30 días en instalaciones autorizadas; aunque esta opción solo será válida si puede acreditar que la instalación de cuarentena acepta al animal.
- En los últimos seis meses y no más tarde de 60 días antes de su expedición, haber sido vacunada y, al menos en una ocasión, vacunada de nuevo contra la gripe aviar.
- O bien, haber permanecido aislada al menos durante diez días antes de su exportación y sometida a una prueba de detección del antígeno o genoma H5N1 de la gripe aviar, efectuada con una muestra recogida no antes del tercer día de aislamiento.

Esta información es de carácter exclusivamente sanitario y no recoge otras disposiciones que pudieran ser de aplicación como la normativa referente a especies potencialmente invasoras o el Convenio CITES.

### **3.4. REQUISITOS PARA OTRAS ESPECIES**

En tercer lugar, existen otras especies animales que, de acuerdo con el Reglamento (UE) 576/2013 del Parlamento europeo y del Consejo, pueden considerarse animales de compañía, incluyendo invertebrados, animales acuáticos ornamentales, anfibios, reptiles, roedores y conejos (distintos de los de producción de acuerdo al Reglamento 853/2004).

#### Viajar a España desde un país de la UE

Para introducir estos animales de compañía en España desde otro país de la UE (a excepción de los peces ornamentales), deberán venir acompañados de un **certificado veterinario** conforme al **modelo INTRA** que corresponda, redactado al menos en español, y emitido en los últimos 10 días.

Existen dos grandes modelos de este tipo de certificados: para reptiles y para otras especies de compañía, aunque en ambos casos se incluyen, además de datos sobre el propietario, el animal y el medio de transporte, la certificación por parte del veterinario competente de no proceder de zonas con restricciones por enfermedades relevantes para la especie en cuestión y haber realizado un examen clínico y no presentar signos compatibles con enfermedades.

#### Viajar desde España a un país de la UE

De nuevo, las normas para el movimiento de otras especies animales entre Estados Miembros no se encuentran armonizadas a nivel de la UE, por lo que cada país puede establecer sus normas. Por ello, es necesario consultar y planificar con suficiente antelación el viaje a fin de evitar posibles problemas con otros EE.MM.

#### Viajar a un país no miembro de la UE

De la misma forma, para viajar a un país tercero con un animal de compañía de otra especie es preciso consultar las condiciones y requisitos del país destino a través de su consulado, embajada o página web del Ministerio responsable o bien en la aplicación CEXGAN también puede encontrarse información de utilidad, así como en el Protocolo de Exportación del MAPA para animales de compañía.

#### Introducir un animal de compañía de otra especie desde un tercer país

En último lugar, para introducir un animal de compañía de otra especie desde un país tercero, deberá hacerlo a través de uno de **Puntos de Entrada de Viajeros** designados, y declarar al Resguardo Fiscal de la Guardia Civil que viaja con un animal de compañía, presentando la documentación del mismo.

El animal deberá venir acompañados por un **certificado zoosanitario**, que deberá ir firmado por un veterinario oficial del país tercero, y presentarse al menos en castellano, de acuerdo con el modelo que corresponda para reptiles, roedores domésticos, conejos u otros.

No obstante, el certificado zoosanitario solo recoge información de tipo sanitario por lo que será preciso consultar otro tipo de información de interés como el convenio CITES y conocer si cumple con los requisitos por él estipulados para la especie en cuestión.

MATERIAL NO OFICIAL

## BIBLIOGRAFÍA

Rabia. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación.

<https://www.mapa.gob.es/es/ganaderia/temas/sanidad-animal-higiene-ganadera/sanidad-animal/enfermedades/rabia/Rabia.aspx>

Programa de Vigilancia de la Rabia (animal) en España.

[https://www.mapa.gob.es/es/ganaderia/temas/sanidad-animal-higiene-ganadera/programadevigilanciadelarabiaversionfinal\\_tcm30-561135.pdf](https://www.mapa.gob.es/es/ganaderia/temas/sanidad-animal-higiene-ganadera/programadevigilanciadelarabiaversionfinal_tcm30-561135.pdf)

Manual Terrestre sobre pruebas diagnósticas y vacunas de la OIE: rabia.

[fmd with viaa test incl. \(woah.org\)](http://www.woah.org)

Viajar con animales de compañía. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación.

<https://www.mapa.gob.es/es/ganaderia/temas/comercio-exterior-ganadero/desplazamiento-animales-compania/default.aspx>

MATERIAL NO OFICIAL

**MATERIAL PARA LA PREPARACIÓN DEL TEMA 57**

OTRAS ZONOSIS VÍRICAS OBJETO DE CONTROL EN LA UNIÓN EUROPEA.  
MARCO LEGAL. DIAGNÓSTICO DE LABORATORIO

*Este material no tiene carácter oficial, por lo que en ningún caso vinculará al Tribunal Calificador. Constituye, únicamente, un instrumento complementario que servirá de apoyo al opositor para enfocar cada uno de los epígrafes, pero nunca de forma exclusiva ni excluyente. El Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación no se hace responsable del contenido del mismo.*

*Los materiales no serán objeto de actualización constante.*

## **ÍNDICE**

### **1. OTRAS ZONOSIS VÍRICAS OBJETO DE CONTROL EN LA UNIÓN EUROPEA. MARCO LEGAL. DIAGNÓSTICO DE LABORATORIO**

1.1. INTRODUCCIÓN

1.2 DATOS

### **2. MARCO LEGAL**

2.1. LEGISLACIÓN

2.1.1. Unión europea

2.1.2 Nacional

2.2 VIGILANCIA

### **3. ZONOSIS VÍRICAS. DIAGNÓSTICO DE LABORATORIO**

3.1 CALICIVIRUS

3.2 HEPATITIS A

3.3 VIRUS TRANSMITIDOS POR ARTRÓPODOS

3.3.1 Fiebre del valle del nilo occidental

3.3.2 Usutu y bagaza

3.3.3 Encefalitis japonesa

3.3.4 Encefalomiелitis equina del este (eee), del oeste (eoo) y venezolana (eev)

3.3.5 Febre hemorrágica Crimea Congo

3.4 ENCEFALITIS TRANSMITIDAS POR GARRAPATAS

3.5 ENFERMEDAD DE NEWCASTLE

## **1. OTRAS ZONOSIS VÍRICAS OBJETO DE CONTROL EN LA UNIÓN EUROPEA. MARCO LEGAL. DIAGNÓSTICO DE LABORATORIO**

### **1.1. INTRODUCCIÓN**

Una zoonosis, según la OMS, es una enfermedad infecciosa que ha pasado de un animal a humanos. Los patógenos zoonóticos pueden ser bacterias, virus, parásitos o agentes no convencionales como las encefalopatías espongiformes transmisibles y propagarse a los humanos por contacto directo o a través de los alimentos, el agua o el medio ambiente. Representan un importante problema de salud pública en todo el mundo debido a nuestra estrecha relación con los animales en el medio agrícola, la vida cotidiana (animales de compañía) y el entorno natural. Las zoonosis también pueden causar alteraciones en la producción y el comercio de productos de origen animal destinados a la alimentación y otros usos.

Son un grupo heterogéneo de enfermedades cuya característica común es la transmisibilidad entre el hombre y los vertebrados causados por virus, bacterias y parásitos con una distribución, frecuencia y gravedad variables. Su transmisión puede ser por contacto, por vectores o través del consumo de alimentos.

### **1.2. DATOS**

Hay más de 200 tipos conocidos de zoonosis e incluyen un gran porcentaje de las enfermedades nuevas y existentes en los humanos.

En los últimos años, se ha asistido a un incremento del número de casos de algunas zoonosis. Entre las posibles causas, debemos señalar en primer lugar la globalización, que conlleva un aumento exponencial del tráfico internacional tanto de mercancías como de personas y por lo tanto, una mayor facilidad de difusión de enfermedades transmisibles y la emergencia de nuevas enfermedades y riesgos desconocidos.

Según la OIE (Organización Mundial de Sanidad Animal):

- El 60% de los agentes patógenos que causan enfermedades en humanas provienen de animales domésticos o silvestres.
- El 75 % de los agentes patógenos humanos emergentes son de origen animal.
- El 80% de los patógenos con riesgo de utilización en bioterrorismo son de origen animal.

La mayoría de las enfermedades emergentes aparecidas en los últimos tiempos es de origen animal y casi todas ellas son potencialmente zoonóticas. Por lo tanto, es preciso que las autoridades de la sanidad animal y de la salud pública las enfrenten de manera coordinada. A ese respecto, los Países Miembros de la OIE (Organización Mundial de Sanidad Animal) se han manifestado claramente en favor del fortalecimiento del papel que desempeña la Organización ante las dificultades que plantean esas zoonosis. En realidad, las enfermedades emergentes y reemergentes zoonóticas se convertirán,

progresivamente, en el motivo importante de las solicitudes de actuación que deberán atender los Servicios Veterinarios y, por lo tanto, tendrán consecuencias en las alianzas profesionales, recursos y programas futuros. Por ello, será necesario que las tres organizaciones más implicadas en estos problemas – la OIE, la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO) y la Organización Mundial de la Salud (OMS) – conduzcan acciones de cooperación y puedan seguir desempeñando su papel de vínculos de alcance internacional, combinando y coordinando los mecanismos de alerta de los tres organismos para ayudar en la alerta temprana, la prevención y el control de las amenazas de enfermedades animales, incluidas las zoonosis, mediante el intercambio de datos y la evaluación de riesgos.

Debemos tener presente que la lucha contra las zoonosis comienza por la eliminación del agente patógeno en su fuente animal de infección. Este hecho confiere un papel destacado, tanto en el plano nacional como en el internacional, a los Servicios Veterinarios, los veterinarios, los criadores, los responsables de la fauna salvaje y la OIE.

A través de su modo de transmisión distinguimos entre:

- ✓ Zoonosis no alimentarias: transmitidas entre el hombre y los animales por contacto directo (rabia, psitacosis o hidatidosis) o mediado por vectores (Leishmaniosis a partir de la picadura de Flebotomos, Arbovirosis (mosquitos) o la Enfermedad de Lyme (garrapatas)).
- ✓ Zoonosis alimentarias: asociadas al consumo de alimentos, por bacterias (salmonelosis, campilobacteriosis o listeriosis) o por parásitos (Triquinosis, Anisakiosis).

## 2. MARCO LEGAL

Las zoonosis, por sus grandes repercusiones, tanto desde el punto de vista sanitario, como económico y social, implica la necesidad de una actuación coordinada de los poderes públicos bajo un enfoque preventivo e integrado que enlaza la Sanidad Animal en la Salud pública y en la Seguridad alimentaria teniendo en cuenta la estructura del sistema productivo europeo. Esta actuación se concreta en dos acciones:

- La creación de un marco normativo que determine la base de las medidas a tomar para prevenir o actuar frente a la aparición de zoonosis y armonice las formas de actuación de los distintos países miembros frente a un problema global.
- La elaboración de planes de control y de erradicación específicas para las zoonosis de mayor repercusión.

### 2.1. LEGISLACIÓN

La estrategia para manejar el riesgo de enfermedades zoonóticas integra una serie de medidas establecidas tanto a nivel de la Unión Europea como a nivel nacional.

### 2.1.1. UNIÓN EUROPEA

Con el fin de armonizar la monitorización de las zoonosis en los Estados Miembros nace la **Directiva 2003/99/CE** sobre la vigilancia de las zoonosis y agentes zoonóticos y el **Reglamento 2160/2003** para el control de Salmonella y otros agentes zoonóticos transmitidos por los alimentos. Estos instrumentos normativos son fruto de las mejoras legislativas planteadas en el LIBRO blanco sobre Seguridad alimentaria cuyo objetivo último y principal es reducir la incidencia de enfermedades de transmisión alimentaria. Estableciéndose así la base de la legislación para el control de las zoonosis y fue también la base de una serie de mejoras legislativas de organización y coordinación entre los EEMM en este ámbito.

Es por ello por lo que se elabora la Directiva 2003/99/CE. Sus objetivos son los siguientes:

- Aumentar el conocimiento sobre el conjunto de las zoonosis y sobre la resistencia a los antimicrobianos.
- Armonizar los sistemas de recogida de datos para hacerlos comparables entre los distintos países miembros.
- Valorar las tendencias de las zoonosis evaluadas.

El Reglamento (UE) 2016/429 , de 9 de marzo de 2016, relativo a las enfermedades transmisibles de los animales y por el que se modifican o derogan algunos actos en materia de sanidad animal («Legislación sobre sanidad animal»).

El Reglamento Delegado (UE) 2020/687 de la Comisión, de 17 de diciembre de 2019, por el que se completa el Reglamento (UE) 2016/429 del Parlamento Europeo y del Consejo en lo referente a las normas relativas a la prevención y el control de determinadas enfermedades de la lista.

El nuevo Reglamento permite un sistema más eficiente para combatir las enfermedades animales transmisibles, asimismo proveerá un marco legislativo más comprensivo que remplazará una serie de normas que se han ido acumulando durante años. Este Reglamento permite unas instrucciones más simples y claras para las autoridades nacionales para enfocarse en temas prioritarios.

### 2.1.2. NACIONAL

La directiva 2003/99/CE se transpone a nuestro ordenamiento jurídico por medio del RD 1940/2004 sobre vigilancia de las zoonosis y de los agentes zoonóticos.

Dentro de la legislación española tenemos, a parte de este R 1940/2004:

- El RD 2210/ 1995 por el que se crea la Red Nacional de Vigilancia Epidemiológica.
- El RD 526/2014 por el que se establece la lista de las enfermedades de los animales de declaración obligatoria y se regula su notificación.

## 2.2. VIGILANCIA

La directiva 2003/99/CE y el RD 1940/2004 establecen una serie de zoonosis de vigilancia obligatoria (lista A del anexo I) y otras de vigilancia optativa dependiendo de la situación epidemiológica en cada momento (lista B del anexo I). Dentro de la **lista B** están las **zoonosis víricas**, que son objeto de vigilancia dependiendo de la situación epidemiológica de la enfermedad:

- Calicivirus
- Virus de la hepatitis A
- Virus de la gripe
- Virus de la Rabia
- Virus transmitidos por artrópodos

Dentro de ellas, el Virus de la Rabia y de la Influenza Aviar dada su especial repercusión, sanitaria, económica y social tiene su propia legislación y sus propios Planes de control y de Vigilancia por lo que no se tratarán en el presente tema.

Este RD 1940/2004 también recoge los laboratorios implicados en la vigilancia y control de las zoonosis que son:

- Los Laboratorios Nacionales De Referencia (LNR)
- Los laboratorios públicos designados por las CCAA.
- Los laboratorios privados designados por las CCAA.

Los LNR son:

- a. LCV de Algete y el LC Sanidad Animal de Santa Fe para zoonosis en productos para la alimentación y en animales vivos, salvo la sospecha de rabia.
- b. Centro Nacional de Alimentación (CNA) de la Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición (AESAN) para zoonosis transmitidas por alimentos.
- c. Centro Nacional de Microbiología del Instituto de Salud Carlos III para las zoonosis en el hombre y en los animales sospechosos de rabia.

Los datos de investigación de agentes zoonóticos se recogen con carácter anual por las CCAA, se transmiten al MAPA, que actúa como entidad coordinadora y se remiten a la Comisión Europea mediante el sistema de comunicación de datos elaborado por EFSA desde 2005, con el objeto de obtener datos uniformes y comparables entre todos los Estados miembros.

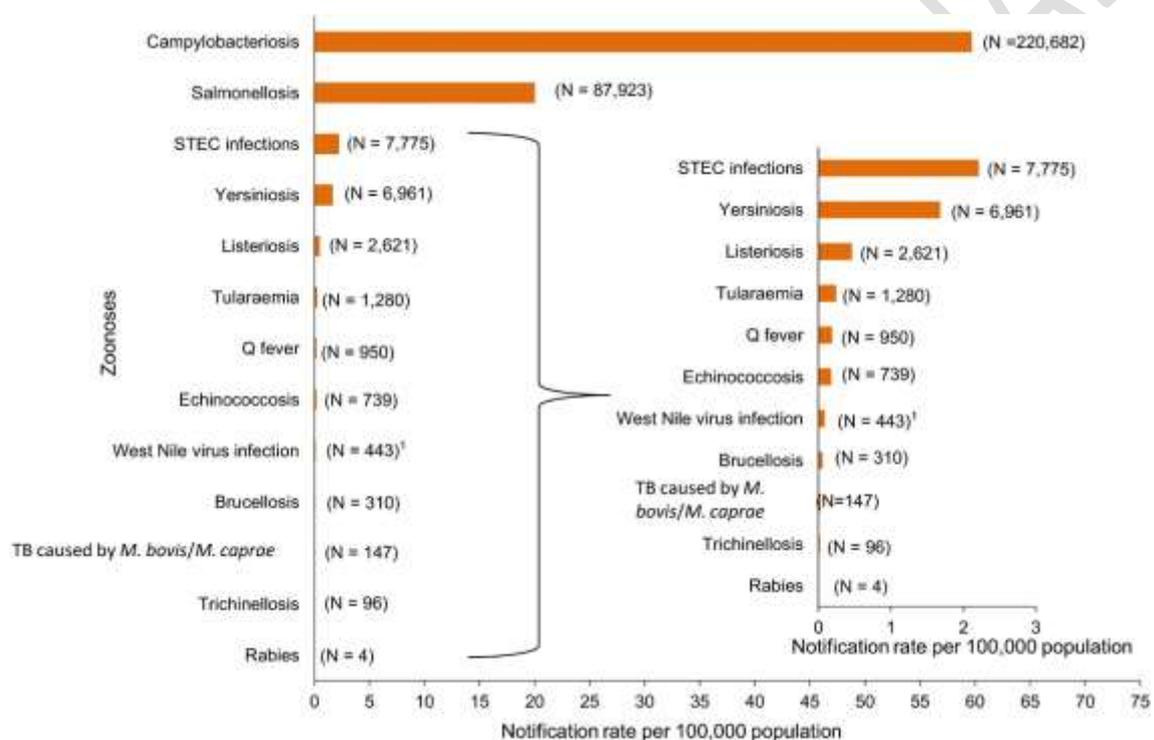
Esta recopilación se integra en los siguientes informes:

Elaboración conjunta con la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) del "Informe de Zoonosis "One Health" en la Unión Europea" (antes llamado Informe comunitario sobre tendencias y fuentes de zoonosis, agentes zoonóticos y brotes de enfermedades producidos

por alimentos). Es un informe de periodicidad anual que incluye información sobre brotes de enfermedades de origen alimentario y resistencia a los antimicrobianos en los agentes zoonóticos.

A nivel de la UE la **EFSA (Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria)** tiene la función de evaluar los riesgos asociados a la cadena alimentaria de la UE, lo que garantiza un alto nivel de protección del consumidor y de la salud animal. Así, una de sus funciones es proporcionar asesoramiento científico independiente sobre los aspectos de seguridad alimentaria y salud animal relacionados con las enfermedades zoonóticas.

En la tabla inferior se pueden ver un resumen de casos humanos confirmados de 13 zoonosis en 2019 (Informe sobre zoonosis de 2019 de One Health de la Unión Europea. Autoridad, Centro Europeo para la Prevención y el Control de Enfermedades).



Cifras notificadas y tasas de notificación de zoonosis humanas confirmadas en la UE, 2019-  
 Nota: El número total de casos confirmados se indica entre paréntesis al final de cada barra.  
 Aparecen dos zoonosis producidas por virus: la Rabia y la fiebre de la fiebre del Nilo

### 3. ZONOSIS VÍRICAS. DIAGNÓSTICO DE LABORATORIO

Para cada enfermedad comentaremos brevemente de cada uno de ellas el agente causal, las características del microorganismo, la o las especies animales que afecta, su modo de transmisión, las muestras a analizar y sus métodos de diagnóstico.

### 3.1. CALICIVIRUS

Son una causa bien establecida de enfermedades respiratorias, vesiculares y hemorrágicas en animales. Además, estos virus producen importantes enfermedades entéricas en humanos. Se ha comprobado por análisis molecular de virus aislados de calicivirus entérico de bovino que son genéticamente similares a los calicivirus entéricos humanos.

Pertenece a la familia *Caliciviridae* y comprende 4 géneros de interés para humanos y animales:

- Género *Vesivirus*; especie tipo: *Virus del Exantema Vesicular Porcino*.
- Género *Lagovirus*; especie tipo: *Virus de la Enfermedad Hemorrágica del Conejo*.
- Género *Norovirus*; especie tipo: *Virus de Norwalk* (gastroenteritis en humanos).
- Género *Sapovirus*; especie tipo: *Virus de Sapporo* (gastroenteritis en humanos).

Es un virus ARN monocatenario de simetría icosaédrica y una cápside de una sola proteína. Pertenece al grupo 2 de riesgo biológico según RD 664/97. Afecta a animales domésticos y salvajes de la especie porcina, bovina, conejos, gallinas y anfibios.

Se transmite al hombre a partir del consumo de muestras de carne, productos lácteos o productos alimentarios procedentes de las granjas de cerdo y bovino.

Diagnóstico: se puede a isla a partir de muestras fecales, muestras medioambientales como el agua y de alimentos.

Se detecta por métodos moleculares como la PCR por transcriptasa inversa.

Mediante el microscopio electrónico es posible observar la morfología de los viriones presentes en muestras clínicas (heces). Es un método de diagnóstico rápido se necesita una alta concentración de virus en la muestra, por eso es una técnica poco utilizada.

Es una zoonosis alimentaria.

### 3.2. HEPATITIS A

Virus de la familia *Picornaviridae*, género *hepatovirus*. Son virus ARN monocatenario sin envoltura y de simetría icosaédrica.

Hay cinco agentes virales: A, B, C, D y E. Las hepatitis de transmisión alimentaria son la del tipo A y E.

Pertenece al grupo 2 de riesgo. Afecta a numerosas especies animales tanto domesticas como salvajes.

Se transmite al hombre por consumo de agua poco salubre, saneamiento deficiente y mal aseo personal.

Es el causante de la infección más grave relacionada con el consumo de moluscos bivalvos, produciendo brotes ocasionales, que afectan a bastantes individuos. Este virus se replica en la mucosa intestinal antes de diseminarse y afectar al hígado, por lo que se elimina por las heces antes de que se haya presentado el cuadro de hepatitis en el paciente.

El **diagnóstico** se realiza en sangre a partir de la detección de anticuerpos IgM e IgG para diferenciarla de otras hepatitis y por métodos moleculares mediante PCR de Transcriptasa inversa.

Es una zoonosis alimentaria.

Vamos a hacer mención al virus de la **hepatitis E** (VHE) es el principal causante de hepatitis aguda de origen vírico en humanos.

Es un virus ARN de sentido positivo de clase IV perteneciente al género *Orthohepevirus*, único miembro de la familia *Hepeviridae*.

En zonas endémicas las epidemias se producen, fundamentalmente, por el consumo de agua contaminada, mientras que en países desarrollados se dan casos ocasionales relacionados, principalmente, con los animales considerándose actualmente la hepatitis E una zoonosis emergente. Además del cerdo, algunas especies de animales salvajes como jabalíes y cérvidos son hospedadoras de este virus. En estas zonas el origen de la infección en humanos parece ser el contacto con animales infectados y el consumo de hígado y carne (principalmente crudos o poco cocinados) de los mismos. Existen 4 genotipos principales, siendo el genotipo 3 el más relevante epidemiológicamente en Europa que es compartido entre el hombre y los animales (principalmente el cerdo).

El **diagnóstico** se realiza mediante técnicas serológicas, principalmente ELISAs con las que es posible detectar tanto IgGs como IgM y técnicas de biología molecular, como PCRs en tiempo real que detectan ARN del VHE en diferentes muestras (heces, sangre, hígado, etc.) y son altamente sensibles y específicas.

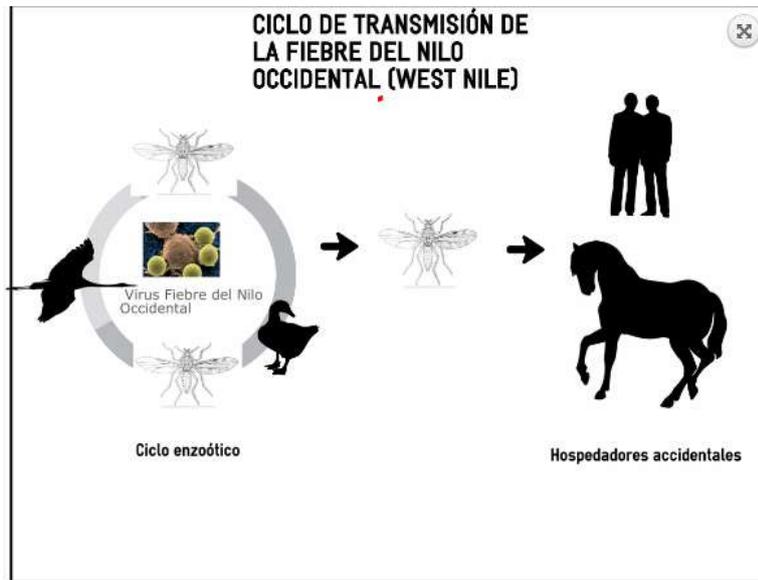
### 3.3 VIRUS TRANSMITIDOS POR ARTRÓPODOS.

Los **arbovirus** (virus transmitidos por artrópodos) son todos los virus que se transmiten al ser humano o a otros vertebrados por ciertas especies de artrópodos hematófagos, especialmente insectos (moscas y mosquitos) y arácnidos (garrapatas).

#### 3.3.1 FIEBRE DEL VALLE DEL NILO OCCIDENTAL (FNO) O WEST NILE FEVER

Es una zoonosis causada por determinadas cepas del virus del Nilo Occidental (VNO) que se transmite por mosquitos (se localiza en las glándulas salivares principalmente del género *Culex*). Dicho virus se mantiene gracias a un ciclo de transmisión mosquito-ave-mosquito.

Los seres humanos y los équidos se consideran huéspedes finales del virus por lo que no transmiten la enfermedad, pero sí que la padecen.



Las aves son consideradas reservorio de la enfermedad, es decir son capaces de mantener el virus sin tener en algunos casos síntoma alguno, jugando un papel muy importante en el mantenimiento y diseminación del virus.

Se trata de una enfermedad infecciosa no contagiosa causada por un arbovirus incluido en la familia *Flaviviridae*, género *Flavivirus* dentro del complejo antigénico de la encefalitis japonesa, que incluye los virus de la encefalitis de Saint Louis (SLE), virus de la encefalitis japonesa o virus del valle de Murray. Por epidemiología molecular se han descrito un total de 7 linajes, si bien existen dos más importantes: el Linaje 1 distribuido a nivel mundial y el Linaje 2 en África Subsahariana.

Es una enfermedad de declaración obligatoria (RD 526/2014).

Los hospedadores son vertebrados. Principalmente mamíferos (équidos y humanos) y aves. Las aves son consideradas reservorio de la enfermedad, jugando un papel muy importante en la diseminación del virus. El mosquito infectado puede transmitir la enfermedad a équidos (especialmente caballos), aunque también es posible la transmisión a personas.

Los mosquitos no se infectan al picar a los caballos, ni se transmite entre caballos y personas.

El Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación elabora un Programa nacional de vigilancia, control y erradicación



Los objetivos de dicho programa (2022) son detectar la presencia de circulación vírica en una zona, de modo que se puedan identificar las áreas de riesgo en las que, y a partir de las cuales, se puede difundir la enfermedad así como disponer de información que permita:

- Valorar el riesgo de aparición de la enfermedad desde el punto de vista de la sanidad animal y de la salud pública, con el fin de dar una respuesta eficaz en tiempo y forma.
- Valorar la necesidad de poner en marcha medidas de lucha específicas, así como programar en el tiempo las mismas.

**Diagnóstico Diferencial.** El diagnóstico inicial está basado en la aparición de sintomatología nerviosa en équidos o en los hallazgos anatomopatológicos en aves. En aves debe distinguirse de Enfermedad de Newcastle, Influenza aviar altamente patógena, intoxicación por inhibidores de acetilcolinesterasas, salmonelosis y ornitosis. En caballos de otras encefalitis víricas.

**Diagnóstico Laboratorial.** El diagnóstico de laboratorio se basará en pruebas de detección directa y pruebas serológicas.

- **Pruebas de detección directa:** las muestras a analizar serán líquido cefalorraquídeo, cerebro, riñones o corazón; y la técnica a utilizar es la amplificación del ácido nucleico del virus mediante la reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR).
- **Pruebas serológicas:** las muestras más adecuadas serán suero y líquido cefalorraquídeo, y se detectarán fundamentalmente inmunoglobulinas de tipo IgM e IgG. En cuanto a las técnicas disponibles, se puede utilizar el ELISA, cuya interpretación puede ser a veces difícil debido a reacciones cruzadas con otros flavivirus. Para evitarlo se empleará la seroneutralización.

El VNO es en la actualidad el Arbovirus más extendido en el mundo, encontrándose presente en todos los continentes excepto en la Antártida. La profilaxis se basa fundamentalmente en la utilización de medidas que minimicen el riesgo de exposición a

posibles vectores en las zonas de alto riesgo, tales como el uso de repelentes y/o desinfectantes y evitar salidas al exterior en las horas de máxima actividad del vector. Por otro lado, existe una vacuna para su uso en équidos que se ha utilizado en Estados Unidos y ha sido recientemente autorizada su comercialización en la Unión Europea. Es una vacuna inactivada y está indicada para la vacunación de los caballos mayores de 6 meses.

### 3.3.2 VIRUS USUTU Y BAGAZA

El **Virus Usutu** (USUV) es un *Arbovirus* transmitido por mosquitos, del género *Flavivirus*, de la Familia *Flaviviridae*, grupo IV.

El **virus Usutu** (USUV) identificado por primera vez en Sudáfrica en 1959, es un arbovirus zoonótico emergente de interés debido a su patogenicidad para los humanos y su similitud en la ecología con otros arbovirus como el Virus del Nilo Occidental. USUV es un flavivirus perteneciente al complejo de la Encefalitis Japonesa.

El rango de hospedaje de USUV incluye principalmente mosquitos *Culex*, aves y humanos. La detección de USUV en especies de mosquitos confirma el papel de *Culex pipiens* como vector. Volvió aparecer en Austria en 2001 en mirlos silvestres y un carabao lapón cautivo y en 2005 se detectó en un mirlo hallado muerto en Hungría, desde entonces ha habido casos en aves en Italia (2009), Suiza (2011), Alemania 2011- 2012 con la posible participación de *Aedes albopictus* en el ciclo del virus. En España detección en mosquitos (2006 y 2009), sin mortalidad aviar asociada. Primera detección en humana en Alemania en un donante de sangre sano (2012). Estudio pormenorizado de secuencias sugieren la cocirculación de 3 cepas de Usutu en Italia (2008-2011).

**Virus Bagaza** es un *Flavivirus*, Grupo Ntaya. Aislado por primera vez en mosquitos *Culex* spp., en 1966, en Bagaza (República Centroafricana). Muy relacionado filogenéticamente con el complejo Encefalitis Japonesa (West Nile Virus). Probablemente sinónimo con el virus de la meningoencefalitis del pavo (ITV). Se han detectado anticuerpos en humanos en India, lo que implica que sea un posible agente zoonótico. Se aisló en España en perdices y faisanes (2011). Primera vez que se detectaba en Europa y en aves. Gran tropismo por el SNC de las aves que infecta.

El diagnóstico se realiza por técnicas moleculares de detección de virus (RT-PCR).

En cuanto al aislamiento del virus de Usutu, es el estándar de oro para la detección del virus, pero generalmente se ve obstaculizado por la corta duración y los bajos niveles de viremia, por lo tanto, no se aplica de manera rutinaria para el diagnóstico de USUV.

El diagnóstico serológico de una infección aguda de USUV se lleva a cabo mediante la determinación de anticuerpos IgM específicos de USUV en suero o LCR. Como prueba confirmatoria, se realiza el PRNT (neutralización por reducción de placas), para la confirmación de anticuerpos específicos de USUV, y la exclusión de anticuerpos por otros flavivirus. Los sueros deben analizarse frente a diferentes virus relacionados.

**3.3.3. EL VIRUS DE LA ENCEFALITIS JAPONESA (VEJ)** forma parte del género *Flavivirus*, en la familia *Flaviviridae*, y causa encefalitis, principalmente en los caballos y en el ser humano. El VEJ también infecta a los cerdos, en los que causa abortos y nacidos muertos. El VEJ se mantiene en la naturaleza entre los mosquitos, los cerdos y las aves acuáticas. El principal vector del VEJ en la mayor parte de Asia es *Culex tritaeniorhynchus*, pero localmente pueden adquirir importancia otras especies. Los cerdos actúan como importantes amplificadores del virus, aunque en la amplificación y diseminación al medio también pueden intervenir aves.

El virus de la encefalitis japonesa es un arbovirus (virus transmitido por artrópodos) del género *Flavivirus* y de la familia *Flaviviridae*. Existe sólo 1 serotipo pero existen 2 subtipos del virus (Nakayama y JaGar-01). Las cepas virales también se pueden agrupar en 4 o tal vez 5 genotipos. El virus de la encefalitis japonesa está estrechamente relacionado con el virus de la encefalitis de San Luis, virus de la encefalitis del Valle Murray y el virus del Nilo occidental; estos virus y algunos otros comprenden el serogrupo de encefalitis japonesa de los flavivirus.

**Diagnóstico Clínico** Se debe sospechar de encefalitis japonesa en caballos con fiebre y signos neurológicos. En las regiones templadas, esta enfermedad es más habitual a fines del verano y principios del otoño. El signo principal en cerdos es el nacimiento de una camada con una gran cantidad de mortinatos o lechones momificados o débiles.

**Diagnóstico de laboratorio** Se puede realizar un diagnóstico definitivo mediante el aislamiento del virus. Este virus se puede aislar en embriones de pollo, células de riñón de cerdos o hámsters, células (Vero) de riñón de mono verde africano, línea celular MDBK o líneas celulares de mosquitos (por ejemplo, C3/36). Las muestras de tejido también se inoculan en ratones de 2 a 4 días de edad. El virus aislado se puede reconocer como un flavivirus mediante la inhibición de hemaglutinación o los ensayos por inmunoabsorción ligados a enzimas (ELISA). Se puede confirmar mediante la neutralización del virus, pruebas de reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa (RT-PCR), o inmunofluorescencia para la detección de antígenos virales. El aislamiento del virus de caballos enfermos o muertos generalmente no es exitoso. Las RT-PCR también pueden detectar ácidos nucleicos virales directamente en tejidos o sangre. Se ha utilizado inmunohistoquímica para la identificación de antígenos virales en el sistema nervioso central (SNC). La histopatología también resulta útil

### **3.3.4. ENCEFALOMIELITIS EQUINA DEL ESTE (EEE), DEL OESTE (EEO) Y VENEZOLANA (EEV)**

Los virus de la encefalomiелitis equina del Este (EEE), del Oeste (EEO) y venezolana (EEV) pertenecen al género *Alphavirus*, en la familia *Togaviridae*. Aunque están estrechamente relacionados, los virus de la EEE, EEO y EEV son genética y antigénicamente distintos.

Los Alphavirus de la EEE, la EEO y la EEV se encuentran en las Américas y pueden causar enfermedad tanto en el ser humano como en los équidos, originando encefalitis en la mayoría de los casos clínicos.

Los virus de la EEE, la EEO y la EEV suelen mantenerse en la naturaleza alternando entre hospedadores vertebrados y mosquitos vectores.. La infección por el virus de la EEE en los caballos es a menudo fatal, mientras que el virus de la EEO puede provocar una enfermedad subclínica o moderada con menos de un 30% de mortalidad.

La ecología natural para el mantenimiento del virus normalmente tiene lugar mediante la infección alterna de aves y mosquitos (EEE y EEO), y mosquitos y roedores (ciclo enzoótico del virus de la EEV) o mosquitos y caballos (ciclo enzoótico del virus de la EEV). El virus de la EEE se ha aislado de serpientes, y estas podrían intervenir como hospedadores reservorio. Puede presentarse la enfermedad clínica en los humanos y en los caballos, los cuales son hospedadores fortuitos definitivos tanto del virus de la EEE como del de la EEO. No obstante, algunos caballos pueden desarrollar una viremia transitoria que se ha sugerido como posiblemente suficiente para transmitir el virus de la EEE a mosquitos si se dan las condiciones adecuadas.

Los signos clínicos de la EEE, la EEO y la EEV pueden ser idénticos. La enfermedad causada por cualquiera de los tres virus también se denomina enfermedad del sueño. Después de un periodo de incubación de entre 1 y 14 días, en función del virus y de la cepa, los signos clínicos son fiebre, anorexia y depresión. Puede realizarse un diagnóstico preliminar de la encefalomiелitis vírica equina en los caballos no vacunados si se observa la somnolencia típica cuando el vector (mosquito) es abundante durante el verano en los climas templados, o durante la estación húmeda en los climas tropicales o subtropicales. Sin embargo, varias enfermedades, como la causada por el virus del Nilo occidental, la rabia y otras enfermedades infecciosas, parasitarias o no infecciosas, pueden ocasionar signos clínicos parecidos.

El virus de la EEE causa una enfermedad grave en los seres humanos con una tasa de mortalidad del 30–70% y una elevada frecuencia de aparición de secuelas permanentes en los supervivientes. Se han notificado casos de enfermedad clínica grave y muerte causada por virus de la EEE y de la EEO en trabajadores de laboratorio. Las manipulaciones de laboratorio deben llevarse a cabo a un nivel apropiado de bioseguridad y bioprotección.

### **Diagnóstico Laboratorial**

El método definitivo para el diagnóstico de la EEE o la EEO consiste en el **aislamiento seguido de la tipificación**. El encéfalo es el tejido preferido para el aislamiento del virus, aunque este ha sido aislado a partir de otros tejidos, como el hígado o el bazo. Los virus de la EEE, la EEO y la EEV pueden aislarse en varios tipos de cultivos celulares. Los que más se utilizan son los fibroblastos de embrión de pollo o pato, las líneas celulares continuas de riñón de mono verde africano (Vero), el riñón de conejo (RK-13), o el riñón de hámster recién nacido (BHK21). También puede inocularse suspensiones de tejido en la yema de huevos de pollo embrionados de 6–8 días.

Las cepas víricas aisladas se pueden identificar mediante la reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa (RT-PCR), mediante la prueba de la inmunofluorescencia indirecta o directa o mediante la prueba de la neutralización por

reducción de placas (PRN) empleando anticuerpos policlonales o monoclonales contra virus específicos.

Para el diagnóstico molecular se han desarrollado PCR convencional y PCR en tiempo Real.

La confirmación serológica de la infección por el virus de la EEE o la EEO implica un aumento o descenso de 4 o más veces en el título de anticuerpos de las muestras de pares de sueros recogidos con 10–14 días de diferencia. Cuando se manifiesta la enfermedad clínica, la mayoría de los caballos infectados por los virus de la EEE o la EEO presentan un título elevado de anticuerpos. Se pueden realizar pruebas como ELISA, fijación de Complemento o la inhibición de la hemaglutinación, neutralización por reducción de placas.

### **3.3.5. FIEBRE HEMORRÁGICA CRIMEA CONGO**

Enfermedad zoonótica en muchos países de Asia, África, Oriente Medio y el sureste de Europa. Es de declaración obligatoria.

Es un virus ARN monocatenario de la familia *Bunyaviridae* del género *Nairovirus*.

Es una enfermedad transmitida por garrapatas duras (*Ixodidae*) principalmente del género *Hyalomma* que produce una enfermedad grave en el hombre. El virus circula en un ciclo de garrapata-vertebrado-garrapata, pero también puede transmitirse horizontal y verticalmente dentro de la población de garrapatas. Los animales no desarrollan sintomatología clínica pero la garrapata pica a animales silvestres como ciervos, liebres y animales domésticos como cabras, ovejas y bovinos.

Hospedadores: Una amplia variedad de animales salvajes y domésticos como vacas, ovejas y cabras. Muchas aves son resistentes a la infección, pero los avestruces son vulnerables y pueden mostrar una alta prevalencia de la infección en las zonas endémicas, donde han sido identificados como el origen de casos humanos.

Contrariamente a lo que ocurre en los animales, las infecciones humanas pueden dar lugar a una enfermedad grave: la fiebre hemorrágica de Crimea–Congo (FHCC).

#### **Diagnóstico de laboratorio**

Se diagnostica a partir de muestras de sangre, suero e hígado.

Puede lograrse un diagnóstico rápido por detección de ácido nucleico vírico en el suero o el plasma empleando una PCR con transcripción inversa (RT) convencional o en tiempo real. Las muestras que deben enviarse al laboratorio para confirmar la FHCC son sangre e hígado. Debido al riesgo de contracción de infecciones en el laboratorio, el trabajo con el VFHCC debe llevarse a cabo en instalaciones de bioseguridad adecuadas.

El virus se puede aislar de suspensiones de suero y de órganos en gran variedad de cultivos celulares, como células Vero, LLC-MK2, SW-13, CER y BHK21, y puede identificarse mediante inmunofluorescencia empleando anticuerpos específicos. El aislamiento y la identificación del virus se logran en 1-5 días, pero los cultivos celulares carecen de

sensibilidad y normalmente solo detectan concentraciones altas del virus en la sangre. Para aislar el virus, la inoculación intracerebral de ratones lactantes es más sensible que los cultivos celulares, pero no se recomienda por motivos de bienestar animal.

También se pueden realizar pruebas serológicas como:

- Seroneutralización, casi nunca se utiliza para diagnosticar el VFHCC; ya que, los miembros del género Nairovirus en general inducen una respuesta de anticuerpos neutralizantes más débil que miembros de otros géneros de la familia Bunyaviridae y por la necesidad de llevar a cabo esta prueba a un nivel alto de biocontención para la bioseguridad, porque se utiliza virus vivo.

- Actualmente, solo existen algunos kits comerciales de detección del VFHCC basados en ELISA de IgM o IgG o en inmunofluorescencia (IFA). Están diseñados para el mercado de diagnóstico en el ser humano, pero es posible adaptar estos ELISA e IFA a la detección serológica en los animales.

Los ELISA para la detección de anticuerpos IgM e IgG específicos del VFHCC son específicos y más sensibles que la IFA. Los anticuerpos IgM del ganado (ovejas, cabras y ganado vacuno) pueden detectarse con un ELISA de captura de IgM. Los anticuerpos IgG se pueden detectar mediante un ELISA de sándwich de IgG o indirecto, y los anticuerpos totales pueden detectarse mediante un ELISA de competición. La ventaja del ELISA de competición es la capacidad de investigar distintas especies animales, porque son independientes de la especie hospedadora.

### 3.4 ENCEFALITIS TRANSMITIDA POR GARRAPATAS

La encefalitis transmitida por garrapatas es una enfermedad aguda del sistema nervioso central, causada por un arbovirus del género *Flavivirus* de la familia *Flaviviridae*. Se han descrito 3 subtipos del virus de la encefalitis transmitida por garrapatas:

- El virus del oeste y centro Europa que incluye el virus Kumlinge de Finlandia.
- El subtipo siberiano, incluido el descrito en el oeste de Finlandia.
- El subtipo del lejano oriente.

El reservorio más frecuente son pequeños roedores aunque muchos otros mamíferos salvajes o domésticos contribuyen a su circulación. La forma de transmisión más frecuente es por la picadura de una garrapata infectada, principalmente del género *Ixodes ricinus*. La transmisión vertical y accidental en el laboratorio o medio sanitario también es posible aunque poco frecuente. Los humanos son huéspedes finales, sin capacidad de actuar como reservorio.

La enfermedad se presenta en dos fases diferenciadas.

La primera fase de viremia dura de 2 a 8 días, a menudo es asintomática o con síntomas pseudogripales.

La segunda fase, 2 a 4 semanas después de la infección, se caracteriza por la afectación del sistema nervioso central. El cuadro clínico puede ser: meningitis, encefalitis, meningoencefalomielitis, o meningoencefalorradiculitis. Un alto porcentaje de estos enfermos (35-58%) sufrirán secuelas, pudiendo producir la muerte en algunos casos (1-3%)

Es endémica en diversos países de Asia y Europa central y del Norte.

España permanece libre de la enfermedad aunque existe el vector principal (garrapatas Ixoides).

No existe tratamiento específico. Para la prevención de la enfermedad, existe vacuna eficaz y segura, recomendada en personas expuestas (residentes o trabajadores) en zonas de riesgo y en algunos casos en viajeros a dichas zonas.

### **Diagnóstico de laboratorio**

Las características clínicas y los resultados de laboratorio de la sangre y del líquido cefalorraquídeo no son específicos. La confirmación rutinaria de laboratorio se basa principalmente en la detección de anticuerpos IgM e IgG específicos en el suero y el líquido cefalorraquídeo.

## **3.5 ENFERMEDAD DE NEWCASTLE**

La enfermedad de Newcastle es una zoonosis muy leve (o sea, una enfermedad animal que puede infectar a los humanos) y puede causar conjuntivitis en el hombre, pero suele ser muy leve y limitada.

La enfermedad de Newcastle es una infección altamente contagiosa y con frecuencia severa que existe en todo el mundo y afecta a las aves, incluidas las aves de corral domésticas. Es causada por un virus de la familia de los paramyxovirus.

La enfermedad aparece en tres formas: lentogénica o leve, mesogénica o moderada, y velogénica o muy virulenta, también llamada enfermedad exótica de Newcastle. Las cepas lentogénicas están muy difundidas, pero causan pocos brotes.

La forma usual es una infección respiratoria, pero los signos clínicos predominantes pueden ser depresión, manifestaciones nerviosas o diarrea.

Es una enfermedad de declaración obligatoria.

### **Diagnóstico de laboratorio**

La enfermedad de Newcastle puede presentar un cuadro clínico muy similar al de la influenza aviar, por lo que se requieren pruebas de laboratorio para confirmar el diagnóstico.

El aislamiento del virus en huevo embrionado de pollo es el método de referencia, pero es laborioso y lento, se utiliza sobre todo para el diagnóstico de un primer caso clínico de un brote y para obtener cepas víricas para posteriores análisis de laboratorio. También se

puede realizar el aislamiento en cultivos celulares, puede replicarse en gran variedad de cultivos celulares de origen aviar y no aviar, entre los cuales los más utilizados son los siguientes: células de hígado de embrión de pollo (CEL), células de riñón de embrión de pollo (CEK), fibroblastos de embrión de pollo (CEF), células de riñón de mono verde africano (Vero), células miógenas aviares (QM5) y células relacionadas con el embrión de pollo (CER). Para identificar el virus aislado se emplea la técnica de Hemoaglutinación (HA) o la técnica de PCR en tiempo Real.

Para determinar la patogenicidad de la cepa se emplean técnicas de secuenciación.

Para el diagnóstico serológico se emplea la prueba Inhibición de la Hemaglutinación (IH) y la técnica ELISA.

\*\*\*

Para finalizar no podemos de dejar de mencionar la aparición en los últimos años de las denominadas enfermedades emergentes y reemergentes muchas de las cuales son zoonosis.

La OMS considera como enfermedad emergente aquella que aparece por primera vez, aquellas otras que incrementa una presencia y aparecen en zonas nuevas o en hospedadores nuevos, las que incrementan su gravedad o las que presentan nuevos tipos de transmisión.

Y considera como enfermedad reemergente aquellas que en el pasado constituyeron un problema en Sanidad, redujo su incidencia, hasta prácticamente eliminarla y por distintas razones vuelven a estar de actualidad.

En este contexto desde el 2010 la OIE forma parte junto con la OMS y la FAO de la Alianza Tripartita para luchar contra las enfermedades de gran impacto económico y sanitario y en especial las zoonosis, aplicando el concepto de una sola salud.

El concepto “Una sola salud” resume una idea conocida desde hace más de un siglo: la salud humana, la sanidad animal y la salud del medio ambiente están intrínsecamente conectadas y son interdependientes. La salud de uno afecta la salud de todos. Consideramos e implementamos “Una sola salud” como un enfoque colaborativo global destinado a comprender y gestionar los riesgos para la salud del planeta y abogar por ecosistemas sostenibles más equilibrados.

#### **4. BIBLIOGRAFÍA**

Informe sobre zoonosis de 2019 de One Health de la Unión Europea

Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria, Centro Europeo para la Prevención y el Control de Enfermedades Publicado 27 febrero 2021  
**<https://doi.org/10.2903/j.efsa.2021.6406> Volumen 19 , número 2 febrero 2021**

Página WEB del MAPA (Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación) [www.mapa.es](http://www.mapa.es)

Manual de pruebas diagnósticas y vacunas para los animales terrestres y acuáticos  
[www.oie.int](http://www.oie.int)

EFSA Panel on Animal Health and Welfare (AHAW); Scientific Opinion on Geographic Distribution of Tickborne Infections and their Vectors in Europe and the other Regions of the Mediterranean Basin. EFSA Journal 2010; 8(9):1723. [280 pp.] doi:10.2903/j.efsa.2010.1723. [www.efsa.europa.eu/efsajournal.htm](http://www.efsa.europa.eu/efsajournal.htm).

EFSA Panel on Animal and Welfare (AHAW); Scientific Opinion on the Role of Tick Vectors in the Epidemiology of Crimean Congo Hemorrhagic Fever and African Swine Fever in Eurasia. EFSA Journal 2010;8 (8):1703. [156 pp.] doi:10.2903/j.efsa.2010.1703. Available online: [www.efsa.europa.eu/efsajournal.htm](http://www.efsa.europa.eu/efsajournal.htm).

MATERIAL IN

**MATERIAL PARA LA PREPARACIÓN DEL TEMA 57**

**OTRAS ZONOSIS VÍRICAS OBJETO DE CONTROL EN LA UNIÓN EUROPEA. MARCO LEGAL. DIAGNÓSTICO DE LABORATORIO**

*Este material no tiene carácter oficial, por lo que en ningún caso vinculará al Tribunal Calificador. Constituye, únicamente, un instrumento complementario que servirá de apoyo al opositor para enfocar cada uno de los epígrafes, pero nunca de forma exclusiva ni excluyente. El Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación no se hace responsable del contenido del mismo.*

*Los materiales no serán objeto de actualización constante.*

## **ÍNDICE**

### **1. OTRAS ZONOSIS VÍRICAS OBJETO DE CONTROL EN LA UNIÓN EUROPEA. MARCO LEGAL. DIAGNÓSTICO DE LABORATORIO**

1.1. INTRODUCCIÓN

1.2. DATOS

### **2. MARCO LEGAL**

2.1. LEGISLACIÓN

2.1.1. Normativa Comunitaria

2.1.2. Normativa Nacional

2.2. VIGILANCIA

### **3. ZONOSIS VÍRICAS. DIAGNÓSTICO DE LABORATORIO**

3.1. CALICIVIRUS

3.2. HEPATITIS A

3.3. VIRUS TRANSMITIDOS POR ARTRÓPODOS

3.3.1. Fiebre del Valle del Nilo Occidental

3.3.2. Usutu

3.3.3. Fiebre Hemorrágica Crimea Congo

3.3.4. Encefalitis Japonesa

3.4. ENCEFALITIS TRANSMITIDAS POR GARRAPATAS

3.5 ENCEFALOMIELITIS EQUINA DEL ESTE (EEE), DEL OESTE (EEO) Y VENEZOLANA (EEV)

3.6. ENFERMEDAD DE NEWCASTLE

## **1. OTRAS ZONOSIS VÍRICAS OBJETO DE CONTROL EN LA UNIÓN EUROPEA. MARCO LEGAL. DIAGNÓSTICO DE LABORATORIO**

### **1.1. INTRODUCCIÓN**

Una zoonosis, según la OMS, es una enfermedad infecciosa que ha pasado de un animal a humanos. Los patógenos zoonóticos pueden ser bacterias, virus, parásitos o agentes no convencionales como las encefalopatías espongiformes transmisibles y propagarse a los humanos por contacto directo o a través de los alimentos, el agua o el medio ambiente. Representan un importante problema de salud pública en todo el mundo debido a nuestra estrecha relación con los animales en el medio agrícola, la vida cotidiana (animales de compañía) y el entorno natural. Las zoonosis también pueden causar alteraciones en la producción y el comercio de productos de origen animal destinados a la alimentación y otros usos.

Son un grupo heterogéneo de enfermedades cuya característica común es la transmisibilidad entre el hombre y los vertebrados causados por virus, bacterias y parásitos con una distribución, frecuencia y gravedad variables. Su transmisión puede ser por contacto, por vectores o través del consumo de alimentos.

### **1.2. DATOS**

Hay más de 200 tipos conocidos de zoonosis e incluyen un gran porcentaje de las enfermedades nuevas y existentes en los humanos.

En los últimos años, se ha asistido a un incremento del número de casos de algunas zoonosis. Entre las posibles causas, debemos señalar fundamentalmente la globalización, que conlleva un aumento exponencial del tráfico internacional tanto de mercancías como de personas y por lo tanto, una mayor facilidad de difusión de enfermedades transmisibles y la emergencia de nuevas enfermedades y riesgos desconocidos.

Según la OIE (Organización Mundial de Sanidad Animal):

- El 60% de los agentes patógenos que causan enfermedades en humanas provienen de animales domésticos o silvestres.
- El 75 % de los agentes patógenos humanos emergentes son de origen animal.
- El 80% de los patógenos con riesgo de utilización en bioterrorismo son de origen animal.

La mayoría de las enfermedades emergentes aparecidas en los últimos tiempos es de origen animal y casi todas ellas son potencialmente zoonóticas. Por lo tanto, es preciso que las autoridades de la sanidad animal y de la salud pública las afronten de manera coordinada. A ese respecto, los Países Miembros de la OIE (Organización Mundial de Sanidad Animal) se han manifestado claramente en favor del fortalecimiento del papel que desempeña la Organización ante las dificultades que plantean esas zoonosis. En realidad, las enfermedades

emergentes y reemergentes zoonóticas se convertirán, progresivamente, en el motivo importante de las solicitudes de actuación que deberán atender los Servicios Veterinarios y, por lo tanto, tendrán consecuencias en las alianzas profesionales, recursos y programas futuros. Por ello, será necesario que las tres organizaciones más implicadas en estos problemas, la OIE, la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO) y la Organización Mundial de la Salud (OMS), conduzcan acciones de cooperación y puedan seguir desempeñando su papel de vínculos de alcance internacional, combinando y coordinando los mecanismos de alerta de los tres organismos para ayudar en la alerta temprana, la prevención y el control de las amenazas de enfermedades animales, incluidas las zoonosis, mediante el intercambio de datos y la evaluación de riesgos.

Debemos tener presente que la lucha contra las zoonosis comienza por la eliminación del agente patógeno en su fuente que es el animal infectado. Este hecho confiere un papel destacado, tanto en el plano nacional como en el internacional, a los Servicios Veterinarios, los veterinarios, los criadores, los responsables de la fauna salvaje y a la OIE.

A través de su modo de transmisión distinguimos entre:

- Zoonosis no alimentarias: transmitidas entre el hombre y los animales por contacto directo (rabia, psitacosis o hidatidosis) o mediado por vectores (Leishmaniosis a partir de la picadura de Flebotomos, Arbovirosis (mosquitos) o la Enfermedad de Lyme (garrapatas)).
- Zoonosis alimentarias: asociadas al consumo de alimentos, por bacterias (salmonelosis, campilobacteriosis o listeriosis) o por parásitos (Triquinosis, Anisakiosis).

## 2. MARCO LEGAL

Las zoonosis, por sus grandes repercusiones, tanto desde el punto de vista sanitario, como económico y social, implica la necesidad de una actuación coordinada de los poderes públicos bajo un enfoque preventivo e integrado que enlaza la Sanidad Animal en la Salud pública y en la Seguridad alimentaria teniendo en cuenta la estructura del sistema productivo europeo. Esta actuación se concreta en dos acciones:

- La creación de un marco normativo que determine la base de las medidas a tomar para prevenir o actuar frente a la aparición de zoonosis y armonice las formas de actuación de los distintos países miembros frente a un problema global.
- La elaboración de planes de control y de erradicación específicas para las zoonosis de mayor repercusión.

### 2.1. LEGISLACIÓN

La estrategia para manejar el riesgo de enfermedades zoonóticas integra una serie de medidas establecidas tanto a nivel de la Unión Europea como a nivel nacional.

### 2.1.1. Normativa Comunitaria

Con el fin de armonizar la monitorización de las zoonosis en los Estados Miembros nace la **Directiva 2003/99/CE** sobre la vigilancia de las zoonosis y agentes zoonóticos y el **Reglamento 2160/2003** para el control de Salmonella y otros agentes zoonóticos transmitidos por los alimentos. Estos instrumentos normativos son fruto de las mejoras legislativas planteadas en el LIBRO blanco sobre Seguridad alimentaria cuyo objetivo último y principal es reducir la incidencia de enfermedades de transmisión alimentaria.

Se estableció así la base de la legislación para el control de las zoonosis y también la base de una serie de mejoras legislativas de organización y coordinación entre los EEMM en este ámbito.

Sus objetivos son los siguientes:

- Aumentar el conocimiento sobre el conjunto de las zoonosis y sobre la resistencia a los antimicrobianos.
- Armonizar los sistemas de recogida de datos para hacerlos comparables entre los distintos países miembros.
- Valorar las tendencias de las zoonosis evaluadas.

El Reglamento (UE) 2016/429, de 9 de marzo de 2016, relativo a las enfermedades transmisibles de los animales y por el que se modifican o derogan algunos actos en materia de sanidad animal («Legislación sobre sanidad animal»).

El Reglamento Delegado (UE) 2020/687 de la Comisión, de 17 de diciembre de 2019, por el que se completa el Reglamento (UE) 2016/429 del Parlamento Europeo y del Consejo en lo referente a las normas relativas a la prevención y el control de determinadas enfermedades de la lista.

El nuevo Reglamento permite un sistema más eficiente para combatir las enfermedades animales transmisibles, asimismo proveerá un marco legislativo más comprensivo que reemplazará una serie de normas que se han ido acumulando durante años. Este Reglamento permite unas instrucciones más simples y claras para las autoridades nacionales que permite focalizar las actividades en temas prioritarios.

### 2.1.2. Normativa Nacional

La directiva 2003/99/CE se transpone a nuestro ordenamiento jurídico por medio del RD 1940/2004 sobre vigilancia de las zoonosis y de los agentes zoonóticos.

Dentro de la legislación española hay que mencionar otros actos normativos:

- El RD 2210/ 1995 por el que se crea la Red Nacional de Vigilancia Epidemiológica.
- El RD 526/2014 por el que se establece la lista de las enfermedades de los animales de declaración obligatoria y se regula su notificación.

## **2.2. VIGILANCIA**

La directiva 2003/99/CE y el RD 1940/2004 establecen una serie de zoonosis de vigilancia obligatoria (lista A del anexo I) y otras de vigilancia optativa dependiendo de la situación epidemiológica en cada momento (lista B del anexo I).

Dentro de esta **lista B** se encuentran las **zoonosis víricas** que son objeto de vigilancia:

- Calicivirus
- Virus de la hepatitis A
- Virus de la gripe
- Virus de la Rabia
- Virus transmitidos por artrópodos:

Dentro de ellas, el Virus de la Rabia y de la Influenza Aviar dada su especial repercusión, sanitaria, económica y social tiene su propia legislación y sus propios Planes de control y de Vigilancia por lo que no se tratarán en el presente tema.

Este RD 1940/2004 también recoge los laboratorios implicados en la vigilancia y control de las zoonosis que son:

- Los Laboratorios Nacionales de Referencia (LNR)
- Los laboratorios públicos designados por las CCAA.
- Los laboratorios privados designados por las CCAA.

Los LNR son:

- a) LCV de Algete y el LC Sanidad Animal de Santa Fe para zoonosis en productos para la alimentación y en animales vivos, salvo la sospecha de rabia.
- b) Centro Nacional de Alimentación (CNA) de la Agencia Nacional de Consumo y Seguridad Alimentaria (AECOSAN) para zoonosis transmitidas por alimentos.
- c) Centro Nacional de Microbiología del Instituto de Salud Carlos III para las zoonosis en el hombre y en los animales sospechosos de rabia.

Los datos de investigación de agentes zoonóticos se recogen con carácter anual por las CCAA, se transmiten al MAPA, que actúa como entidad coordinadora y se remiten a la Comisión Europea mediante el sistema de comunicación de datos elaborado por EFSA desde 2005, con el objeto de obtener datos uniformes y comparables entre todos los Estados miembros.

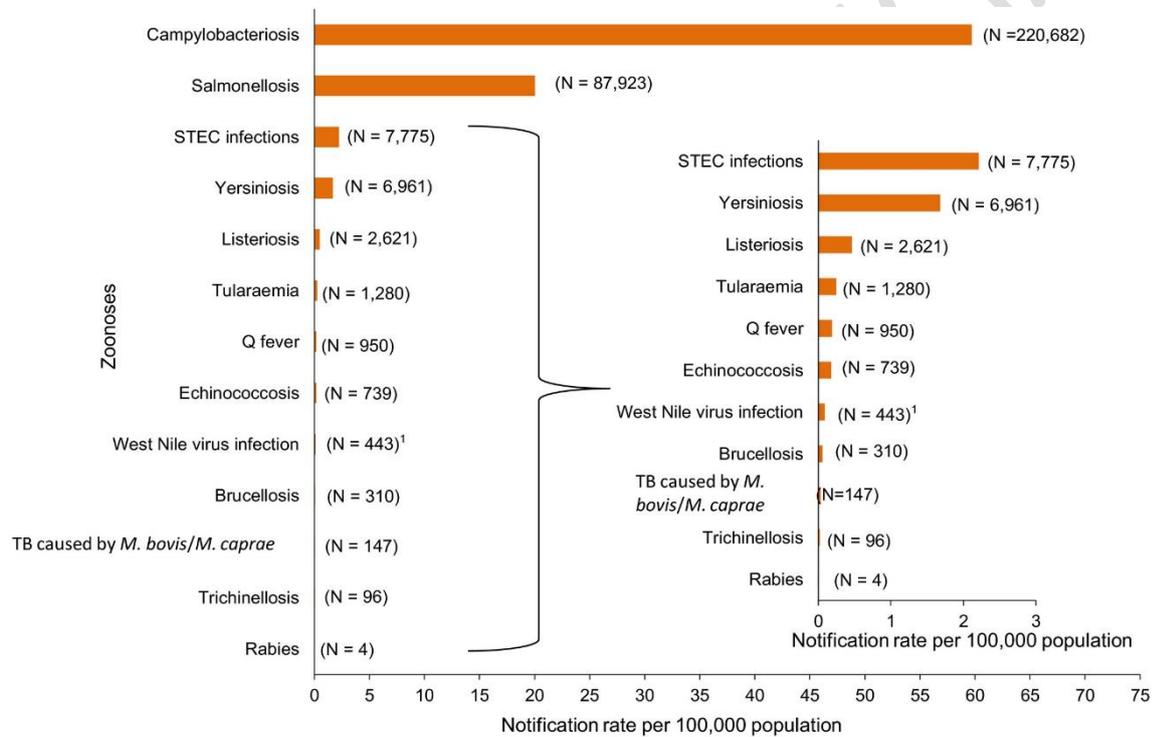
Esta recopilación se integra en los siguientes informes:

- Elaboración conjunta con la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) del **Informe de Zoonosis One Health en la Unión Europea** (antes llamado Informe comunitario sobre tendencias y fuentes de zoonosis, agentes zoonóticos y brotes de enfermedades producidos por alimentos).

- **Fuentes y tendencias de zoonosis y agentes zoonóticos en humanos, alimentos, animales y piensos.** Informe Nacional de periodicidad anual que incluye información sobre brotes de enfermedades de origen alimentario y resistencia a los antimicrobianos en los agentes zoonóticos.

A nivel de la UE, la **EFSA (Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria)** tiene la función de evaluar los riesgos asociados a la cadena alimentaria de la UE, lo que garantiza un alto nivel de protección del consumidor y de la salud animal. Así, una de sus funciones es proporcionar asesoramiento científico independiente sobre los aspectos de seguridad alimentaria y salud animal relacionados con las enfermedades zoonóticas.

En la tabla inferior se pueden ver un resumen de casos humanos confirmados de 13 zoonosis en 2019 (Informe sobre zoonosis de 2019 de One Health de la Unión Europea. Autoridad, Centro Europeo para la Prevención y el Control de Enfermedades).



Cifras notificadas y tasas de notificación de zoonosis humanas confirmadas en la UE, 2019  
 Nota: El número total de casos confirmados se indica entre paréntesis al final de cada barra.

Aparecen dos zoonosis producidas por el virus de la Rabia y el virus de la fiebre del Valle del Nilo Occidental.

### 3. ZONOSIS VÍRICAS. DIAGNÓSTICO DE LABORATORIO

Para cada enfermedad comentaremos brevemente el agente causal, las características del microorganismo, las especies animales que afectan, su modo de transmisión, las muestras a analizar y sus métodos de diagnóstico.

### 3.1. CALICIVIRUS

Son una causa bien establecida de enfermedades respiratorias, vesiculares y hemorrágicas en animales y de importantes enfermedades entéricas en humanos. Se ha comprobado por análisis molecular de virus aislados de calicivirus entérico de bovino que son genéticamente similares a los calicivirus entéricos humanos.

Pertencen a la familia *Caliciviridae* y comprende 4 géneros de interés para humanos y animales:

- Género *Vesivirus*; especie tipo: *Virus del Exantema Vesicular Porcino*.
- Género *Lagovirus*; especie tipo: *Virus de la Enfermedad Hemorrágica del Conejo*.
- Género *Norovirus*; especie tipo: *Virus de Norwalk* (gastroenteritis en humanos).
- Género *Sapovirus*; especie tipo: *Virus de Sapporo* (gastroenteritis en humanos).

Es un virus ARN monocatenario de simetría icosaédrica y una cápside de una sola proteína. Pertenece al grupo 2 de riesgo biológico según RD 664/97. Afecta a animales domésticos y salvajes de la especie porcina, bovina, conejos, gallinas y anfibios.

Se transmite al hombre a partir del consumo de muestras de carne, productos lácteos o productos alimentarios procedentes de las granjas de cerdo y bovino.

**Diagnóstico:** se puede aislar a partir de muestras fecales, muestras medioambientales como el agua y de alimentos.

Se detecta por métodos moleculares como la PCR por transcriptasa inversa.

Mediante el microscopio electrónico es posible observar la morfología de los viriones presentes en muestras clínicas (heces). Es un método de diagnóstico rápido se necesita una alta concentración de virus en la muestra, por eso es una técnica poco utilizada.

Es una zoonosis alimentaria.

### 3.2. HEPATITIS A

Virus de la familia *Picornaviridae*, género *hepatovirus*. Son virus ARN monocatenario sin envoltura y de simetría icosaédrica.

Hay cinco agentes virales: A, B, C, D y E. Las hepatitis de transmisión alimentaria son la del tipo A y E. Pertenece al grupo 2 de riesgo. Afecta a numerosas especies animales tanto domésticas como salvajes. Se transmite al hombre por consumo de agua poco salubre, saneamiento deficiente y mal aseo personal.

Es el causante de la infección más grave relacionada con el consumo de moluscos bivalvos, produciendo brotes ocasionales, que afectan a bastantes individuos. Este virus se replica en la mucosa intestinal antes de diseminarse y afectar al hígado, por lo que se elimina por las heces antes de que se haya presentado el cuadro de hepatitis en el paciente.

El **diagnóstico** se realiza en sangre a partir de la detección de anticuerpos IgM e IgG para diferenciarla de otras hepatitis y por métodos moleculares mediante PCR de Transcriptasa inversa.

Es una zoonosis alimentaria.

Vamos a hacer mención al virus de la **hepatitis E (VHE)** que es el principal causante de hepatitis aguda de origen vírico en humanos.

Es un virus ARN de sentido positivo de clase IV perteneciente al género *Orthohepevirus*, único miembro de la familia *Hepeviridae*.

En zonas endémicas las epidemias se producen, fundamentalmente, por el consumo de agua contaminada, mientras que en países desarrollados se dan casos ocasionales relacionados, principalmente, con los animales considerándose actualmente la hepatitis E una zoonosis emergente.

Además del cerdo, algunas especies de animales salvajes como jabalíes y cérvidos son hospedadoras de este virus. En estas zonas el origen de la infección en humanos parece ser el contacto con animales infectados y el consumo de hígado y carne (principalmente crudos o poco cocinados) de los mismos.

Existen 4 genotipos principales, siendo el genotipo 3 el más relevante epidemiológicamente en Europa que es compartido entre el hombre y los animales (principalmente el cerdo).

El **diagnóstico** se realiza mediante técnicas serológicas, principalmente ELISAs con las que es posible detectar tanto IgG como IgM y técnicas de biología molecular, como la PCR en tiempo real que detectan ARN del VHE en diferentes muestras (heces, sangre, hígado, etc.) y son altamente sensibles y específicas.

### **3.3. VIRUS TRANSMITIDOS POR ARTRÓPODOS.**

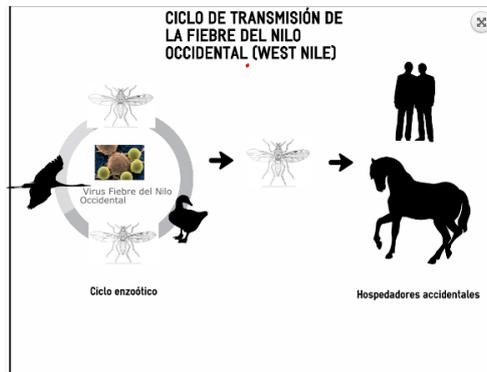
Los **Arbovirus** (virus transmitidos por artrópodos) son todos los virus que se transmiten al ser humano o a otros vertebrados por ciertas especies de artrópodos hematófagos, especialmente insectos (moscas y mosquitos) y arácnidos (garrapatas).

El término fiebre hemorrágica viral (FHV) describe un síndrome caracterizado por la presencia de fiebre y hemorragias en humanos, causado por virus pertenecientes a distintas familias (Filoviridae, Arenaviridae, Bunyaviridae y Flaviviridae), transmitidos al hombre por artrópodos (mosquitos y garrapatas), reservorios vertebrados, e incluso por transmisión directa.

#### **3.3.1. Fiebre del Valle del Nilo Occidental (FNO) o West Nile Fever**

Es una zoonosis causada por determinadas cepas del virus del Nilo Occidental (VNO) que se transmite por mosquitos (se localizan en las glándulas salivares principalmente del género *Culex*). Dicho virus se mantiene gracias a un ciclo de transmisión mosquito-ave-mosquito. Los seres humanos y los équidos se consideran huéspedes finales del virus por lo que no transmiten la enfermedad, pero sí que la padecen.

Los mosquitos no se infectan al picar a los caballos, ni se transmite entre caballos y personas.



Las aves son consideradas reservorio de la enfermedad, es decir son capaces de mantener el virus sin tener en algunos casos síntoma alguno, jugando un papel muy importante en el mantenimiento y diseminación del virus.

Se trata de una enfermedad infecciosa no contagiosa causada por un Arbovirus incluido en la familia *Flaviviridae*, género *Flavivirus* dentro del complejo antigénico de la encefalitis japonesa, que incluye los virus de la encefalitis de Saint Louis (SLE), virus de la encefalitis japonesa o virus del valle de Murray. Por epidemiología molecular se han descrito un total de 7 linajes, si bien existen dos más importantes: el Linaje 1 distribuido a nivel mundial y el Linaje 2 en África Subsahariana.

Es una enfermedad de declaración obligatoria (RD 526/2014). El Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación elabora un Programa nacional de vigilancia, control y erradicación.



Los objetivos de dicho programa (2022) son detectar la presencia de circulación vírica en una zona, de modo que se puedan identificar las áreas de riesgo en las que, y a partir de las cuales, se puede difundir la enfermedad así como disponer de información que permita:

- Valorar el riesgo de aparición de la enfermedad desde el punto de vista de la sanidad animal y de la salud pública, con el fin de dar una respuesta eficaz en tiempo y forma.
- Valorar la necesidad de poner en marcha medidas de lucha específicas, así como programar en el tiempo las mismas.

**Diagnóstico Diferencial.** El diagnóstico inicial está basado en la aparición de sintomatología nerviosa en équidos o en los hallazgos anatomopatológicos en aves. En aves debe distinguirse de Enfermedad de Newcastle, Influenza aviar altamente patógena, intoxicación por inhibidores de acetilcolinesterasas, salmonelosis y ornitosis. En caballos de otras encefalitis víricas.

**Diagnóstico Laboratorial.** El diagnóstico de laboratorio se basará en pruebas de detección directa y pruebas serológicas.

- Pruebas de detección directa: las muestras a analizar serán líquido cefalorraquídeo, cerebro, riñones o corazón, La muestra de pluma es de elección en animales vivos. La técnica a utilizar es la amplificación del ácido nucleico del virus mediante la reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR) y en caso de PCR positiva se procede al aislamiento del virus en cultivos celulares.
- Pruebas serológicas: las muestras más adecuadas serán suero y líquido cefalorraquídeo, y se detectarán fundamentalmente inmunoglobulinas de tipo IgM e IgG. En cuanto a las técnicas disponibles, se puede utilizar el ELISA, cuya interpretación puede ser a veces difícil debido a reacciones cruzadas con otros flavivirus. Para evitarlo se empleará la seroneutralización.

El VNO es en la actualidad el Arbovirus más extendido en el mundo, encontrándose presente en todos los continentes excepto en la Antártida. La profilaxis se basa fundamentalmente en la utilización de medidas que minimicen el riesgo de exposición a posibles vectores en las zonas de alto riesgo, tales como el uso de repelentes y/o desinfectantes y evitar salidas al exterior en las horas de máxima actividad del vector. Por otro lado, existe una vacuna para su uso en équidos que se ha utilizado en Estados Unidos y ha sido recientemente autorizada su comercialización en la Unión Europea. Es una vacuna inactivada y está indicada para la vacunación de los caballos mayores de 6 meses.

### 3.3.2. Virus Usutu

El **Virus Usutu** (USUV) es un *Arbovirus* transmitido por mosquitos, del género *Flavivirus*, de la Familia *Flaviviridae*, grupo IV.

El virus Usutu (USUV) identificado por primera vez en Sudáfrica en 1959, es un Arbovirus zoonótico emergente de interés debido a su patogenicidad para los humanos y su similitud en la ecología con otros Arbovirus como el Virus del Nilo Occidental. Este virus Usutu es un flavivirus perteneciente al complejo de la Encefalitis Japonesa.

El rango de hospedaje de USUV incluye principalmente mosquitos *Culex*, aves y humanos. La detección de USUV en especies de mosquitos confirma el papel de *Culex pipiens* como vector. Volvió aparecer en Austria en 2001 en mirlos silvestres y un carabao lapón cautivo y en 2005 se detectó en un mirlo hallado muerto en Hungría. Desde entonces ha habido casos en aves en Italia (2009), Suiza (2011), Alemania 2011- 2012 con la posible participación de *Aedes*

albopictus en el ciclo del virus. En España se ha detectado en mosquitos en el año 2006 y 2009, sin mortalidad aviar asociada.

La Primera detección en humana ocurrió en Alemania en un donante de sangre sano (2012). Un estudio pormenorizado de secuencias sugiere la cocirculación de 3 cepas de Usutu en Italia (2008-2011).

El diagnóstico se realiza por técnicas moleculares de detección de virus (RT-PCR).

Para la detección del virus, el aislamiento vírico es el método de elección, pero generalmente se ve obstaculizado por la corta duración y los bajos niveles de viremia, por lo tanto, no se aplica de manera rutinaria para el diagnóstico de USUV.

El diagnóstico serológico de una infección aguda de USUV se lleva a cabo mediante la determinación de anticuerpos IgM específicos de USUV en suero o líquido cefalorraquídeo. Como prueba confirmatoria, se realiza el PRNT (neutralización por reducción de placas), para la confirmación de anticuerpos específicos de USUV, y la exclusión de anticuerpos por otros flavivirus. Los sueros deben analizarse frente a diferentes virus relacionados.

### **3.3.3. Fiebre Hemorrágica Crimea Congo (FHCC)**

Enfermedad zoonótica en muchos países de Asia, África, Oriente Medio y el sureste de Europa.

Es un virus ARN monocatenario de la familia *Bunyaviridae* del género *Nairovirus*. Es una enfermedad transmitida por garrapatas duras (*Ixodidae*) principalmente del género *Hyalomma* que produce una enfermedad grave en el hombre. El virus circula en un ciclo de garrapata-vertebrado-garrapata, pero también puede transmitirse horizontal y verticalmente dentro de la población de garrapatas. Los animales no desarrollan sintomatología clínica pero la garrapata pica a animales silvestres como ciervos, liebres y animales domésticos como cabras, ovejas y bovinos.

Muchas aves son resistentes a la infección, pero las avestruces son vulnerables y pueden mostrar una alta prevalencia de la infección en las zonas endémicas, donde han sido identificados como el origen de casos humanos.

Contrariamente a lo que ocurre en los animales, las infecciones humanas pueden dar lugar a una enfermedad grave: la fiebre hemorrágica de Crimea Congo (FHCC).

#### **Diagnóstico de laboratorio**

Se diagnostica a partir de muestras de sangre, suero e hígado.

Puede lograrse un diagnóstico rápido por detección de ácido nucleico vírico en el suero o el plasma empleando una PCR con transcripción inversa (RT) convencional o en tiempo real. Debido al riesgo de contracción de infecciones en el laboratorio, el trabajo con el VFHCC debe llevarse a cabo en instalaciones de bioseguridad adecuadas.

El virus se puede aislar de suspensiones de suero y de órganos en gran variedad de cultivos celulares, como células Vero, LLC-MK2, SW-13, CER y BHK21, y puede identificarse mediante inmunofluorescencia empleando anticuerpos específicos. El aislamiento y la identificación del

virus se logran en 1-5 días, pero los cultivos celulares carecen de sensibilidad y normalmente solo detectan concentraciones altas del virus en la sangre. Para aislar el virus, la inoculación intracerebral de ratones lactantes es más sensible que los cultivos celulares, pero no se recomienda por motivos de bienestar animal.

También se pueden realizar pruebas serológicas como la seroneutralización, aunque casi nunca se utiliza para diagnosticar el VFHCC; ya que, los miembros del género Nairovirus en general inducen una respuesta de anticuerpos neutralizantes más débil que miembros de otros géneros de la familia Bunyaviridae y, además por la necesidad de llevar a cabo esta prueba a un nivel alto de biocontención para la bioseguridad, porque se utiliza virus vivo.

Actualmente, solo existen algunos kits comerciales de detección del VFHCC basados en ELISA de IgM o IgG o en inmunofluorescencia (IFA). Están diseñados para el mercado de diagnóstico en el ser humano, pero es posible adaptar estos ELISA e IFA a la detección serológica en los animales.

Los ELISA para la detección de anticuerpos IgM e IgG específicos del VFHCC son específicos y más sensibles que la IFA. Los anticuerpos IgM del ganado (ovejas, cabras y ganado vacuno) pueden detectarse con un ELISA de captura de IgM. Los anticuerpos IgG se pueden detectar mediante un ELISA tipo sándwich para detección de IgG o indirecto, y los anticuerpos totales pueden detectarse mediante un ELISA de competición. La ventaja del ELISA de competición es la capacidad de investigar distintas especies animales, porque son independientes de la especie hospedadora.

#### **3.3.4. El virus de la Encefalitis Japonesa (VEJ)**

Forma parte del género *Flavivirus*, en la familia *Flaviviridae*, y causa encefalitis, principalmente en los caballos y en el ser humano. El VEJ también infecta a los cerdos, en los que causa abortos o animales nacidos pero muertos.

El VEJ se mantiene en la naturaleza entre los mosquitos, los cerdos y las aves acuáticas. El principal vector del VEJ en la mayor parte de Asia es *Culex tritaeniorhynchus*, pero localmente pueden adquirir importancia otras especies. Los cerdos actúan como importantes amplificadores del virus, aunque en la amplificación y diseminación al medio también pueden intervenir aves.

El virus de la encefalitis japonesa es un Arbovirus. Existe sólo 1 serotipo, pero existen 2 subtipos del virus (Nakayama y JaGar-01). Las cepas virales también se pueden agrupar en 4 o tal vez en 5 genotipos. El virus de la encefalitis japonesa está estrechamente relacionado con el virus de la encefalitis de San Luis, virus de la encefalitis del Valle Murray y el virus del Nilo occidental. Estos virus y algunos otros comprenden el serogrupo de encefalitis japonesa de los flavivirus.

**Diagnóstico Clínico:** se debe sospechar de encefalitis japonesa en caballos con fiebre y signos neurológicos. En las regiones templadas, esta enfermedad es más habitual al final del verano y principios del otoño. El signo principal en cerdos es el nacimiento de una camada con una gran cantidad de mortinatos o lechones momificados o débiles.

**Diagnóstico de laboratorio:** se puede realizar un diagnóstico definitivo mediante el aislamiento del virus. Este virus se puede aislar en embriones de pollo, células de riñón de cerdo o hámster, células (Vero) de riñón de mono verde africano, línea celular MDBK o líneas celulares de mosquitos (por ejemplo, C3/36). Las muestras de tejido también se inoculan en ratones de 2 a 4 días de edad.

El virus aislado se puede reconocer como un flavivirus mediante la inhibición de hemaglutinación o los ensayos por inmunoadsorción ligados a enzimas (ELISA).

Se puede confirmar mediante la neutralización del virus, pruebas de reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa (RT-PCR), o inmunofluorescencia para la detección de antígenos virales. El aislamiento del virus de caballos enfermos o muertos generalmente no es exitoso. Las RT-PCR también pueden detectar ácidos nucleicos virales directamente en tejidos o sangre. Se ha utilizado inmunohistoquímica para la identificación de antígenos virales en el sistema nervioso central (SNC). La histopatología también resulta útil.

### 3.4. ENCEFALITIS TRANSMITIDA POR GARRAPATAS

La encefalitis transmitida por garrapatas es una enfermedad aguda del sistema nervioso central, causada por un Arbovirus del género *Flavivirus* de la familia *Flaviviridae*. Se han descrito 3 subtipos del virus de la encefalitis transmitida por garrapatas:

- El virus del oeste y centro Europa que incluye el virus Kumlinge de Finlandia.
- El subtipo siberiano, incluido el descrito en el oeste de Finlandia.
- El subtipo del lejano oriente.

Los reservorios más frecuentes son los pequeños roedores, aunque muchos otros mamíferos salvajes o domésticos contribuyen a su circulación. La forma de transmisión más frecuente es por la picadura de una garrapata infectada, principalmente del género *Ixodes ricinus*. La transmisión vertical y accidental en el laboratorio o medio sanitario también es posible, aunque poco frecuente. Los humanos son huéspedes finales, sin capacidad de actuar como reservorio.

La enfermedad se presenta en dos fases diferenciadas:

- La primera fase de viremia dura de 2 a 8 días donde a menudo es asintomática o con síntomas pseudogripales.
- La segunda fase, 2 a 4 semanas después de la infección, se caracteriza por la afectación del sistema nervioso central. El cuadro clínico puede ser: meningitis, encefalitis, meningoencefalomielitis, o meningoencefalorradiculitis. Un alto porcentaje de estos enfermos (35-58%) sufrirán secuelas, pudiendo producir la muerte en algunos casos (1-3%)

Es endémica en diversos países de Asia y Europa central y del Norte.

España permanece libre de la enfermedad, aunque existe el vector principal (garrapatas Ixoides).

No existe tratamiento específico. Para la prevención de la enfermedad, existe vacuna eficaz y segura, recomendada en personas expuestas (residentes o trabajadores) en zonas de riesgo y en algunos casos en viajeros a dichas zonas.

### **Diagnóstico de laboratorio**

Las características clínicas y los resultados de laboratorio de la sangre y del líquido cefalorraquídeo no son específicos. La confirmación rutinaria de laboratorio se basa principalmente en la detección de anticuerpos IgM e IgG específicos en el suero y el líquido cefalorraquídeo.

### **3.5. ENCEFALOMIELITIS EQUINA DEL ESTE (EEE), DEL OESTE (EEO) Y VENEZOLANA (EEV)**

Los virus de la encefalomiélitis equina del Este (EEE), del Oeste (EEO) y venezolana (EEV) pertenecen al género *Alphavirus*, en la familia *Togaviridae*. Aunque están estrechamente relacionados, los virus de la EEE, EEO y EEV son genética y antigénicamente distintos.

Los Alphavirus de la EEE, la EEO y la EEV se encuentran en el continente americano y pueden causar enfermedad tanto en el ser humano como en los équidos, originando encefalitis en la mayoría de los casos clínicos.

Los virus de la EEE, la EEO y la EEV suelen mantenerse en la naturaleza alternando entre hospedadores vertebrados y mosquitos vectores. La infección por el virus de la EEE en los caballos es a menudo fatal, mientras que el virus de la EEO puede provocar una enfermedad subclínica o moderada con menos de un 30% de mortalidad.

La ecología natural para el mantenimiento del virus normalmente tiene lugar mediante la infección alterna de aves y mosquitos (EEE y EEO), y mosquitos y roedores (ciclo enzoótico del virus de la EEV) o mosquitos y caballos (ciclo enzoótico del virus de la EEV). El virus de la EEE se ha aislado de serpientes, y éstas podrían intervenir como hospedadores reservorio.

Puede presentarse la enfermedad clínica en los humanos y en los caballos, los cuales son hospedadores fortuitos definitivos tanto del virus de la EEE como del de la EEO. No obstante, algunos caballos pueden desarrollar una viremia transitoria que se ha sugerido como posiblemente suficiente para transmitir el virus de la EEE a mosquitos si se dan las condiciones adecuadas.

Los signos clínicos de la EEE, la EEO y la EEV pueden ser idénticos. La enfermedad causada por cualquiera de los tres virus también se denomina enfermedad del sueño. Después de un periodo de incubación de entre 1 y 14 días, en función del virus y de la cepa, los signos clínicos son fiebre, anorexia y depresión. Puede realizarse un diagnóstico preliminar de la encefalomiélitis vírica equina en los caballos no vacunados si se observa la somnolencia típica cuando el vector (mosquito) es abundante durante el verano en los climas templados, o durante la estación húmeda en los climas tropicales o subtropicales. Sin embargo, varias enfermedades, como la causada por el virus del Nilo occidental, la rabia y otras enfermedades infecciosas, parasitarias o no infecciosas, pueden ocasionar signos clínicos parecidos.

El virus de la EEE causa una enfermedad grave en los seres humanos con una tasa de mortalidad del 30-70% y una elevada frecuencia de aparición de secuelas permanentes en los

supervivientes. Se han notificado casos de enfermedad clínica grave y muerte causada por virus de la EEE y de la EEO en trabajadores de laboratorio. Las manipulaciones de laboratorio deben llevarse a cabo a un nivel apropiado de bioseguridad y bioprotección.

### **Diagnóstico Laboratorial**

El método definitivo para el diagnóstico de la EEE o la EEO consiste en el **aislamiento seguido de la tipificación**. El encéfalo es el tejido preferido para el aislamiento del virus, aunque este ha sido aislado a partir de otros tejidos, como el hígado o el bazo. Los virus de la EEE, la EEO y la EEV pueden aislarse en varios tipos de cultivos celulares. Los que más se utilizan son los fibroblastos de embrión de pollo o pato, las líneas celulares continuas de riñón de mono verde africano (Vero), el riñón de conejo (RK-13), o el riñón de hámster recién nacido (BHK21). También puede inocularse suspensiones de tejido en la yema de huevos de pollo embrionados de 6-8 días.

Las cepas víricas aisladas se pueden identificar mediante la reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa (RT-PCR), mediante la prueba de la inmunofluorescencia indirecta o directa o mediante la prueba de la neutralización por reducción de placas (PRN) empleando anticuerpos policlonales o monoclonales contra virus específicos.

Para el diagnóstico molecular se han desarrollado PCR convencional y PCR en tiempo Real.

La confirmación serológica de la infección por el virus de la EEE o la EEO implica un aumento o descenso de 4 o más veces en el título de anticuerpos de las muestras de pares de sueros recogidos con 10–14 días de diferencia. Cuando se manifiesta la enfermedad clínica, la mayoría de los caballos infectados por los virus de la EEE o la EEO presentan un título elevado de anticuerpos. Se pueden realizar pruebas como ELISA, fijación de Complemento o la inhibición de la hemaglutinación, neutralización por reducción de placas.

### **3.6. ENFERMEDAD DE NEWCASTLE**

La enfermedad de Newcastle es una zoonosis muy leve (o sea, una enfermedad animal que puede infectar a los humanos) y puede causar conjuntivitis en el hombre, pero suele ser muy leve y limitada.

La enfermedad de Newcastle (EN) está causada por cepas virulentas de Paramixovirus tipo 1 (APMV-1), del género *Orthoavulavirus*, perteneciente a la subfamilia *Avulavirinae*, familia *Paramyxoviridae*.

En la actualidad, hay 21 serotipos de paramixovirus aviar, designados como APMV-1 a APMV-21. Cada virus pertenece a una especie vírica y están distribuidos entre tres géneros, denominados: metaavulavirus aviares, Orthoavulavirus aviares y paraavulavirus aviares.

La enfermedad aparece en tres formas: lentogénica o leve, mesogénica o moderada, y velogénica o muy virulenta, también llamada enfermedad exótica de Newcastle. Las cepas lentogénicas están muy difundidas, pero causan pocos brotes.

La forma usual es una infección respiratoria, pero los signos clínicos predominantes pueden ser depresión, manifestaciones nerviosas o diarrea.

Es una enfermedad de declaración obligatoria.

### **Diagnóstico de laboratorio**

La enfermedad de Newcastle puede presentar un cuadro clínico muy similar al de la influenza aviar, por lo que se requieren pruebas de laboratorio para confirmar el diagnóstico.

El aislamiento del virus en huevo embrionado de pollo es el método de referencia, pero es laborioso y lento, se utiliza sobre todo para el diagnóstico de un primer caso clínico de un brote y para obtener cepas víricas para posteriores análisis de laboratorio.

También se puede realizar el aislamiento en cultivos celulares, puede replicarse en gran variedad de cultivos celulares de origen aviar y no aviar, entre los cuales los más utilizados son los siguientes: células de hígado de embrión de pollo (CEL), células de riñón de embrión de pollo (CEK), fibroblastos de embrión de pollo (CEF), células de riñón de mono verde africano (Vero), células miógenas aviares (QM5) y células relacionadas con el embrión de pollo (CER).

Para identificar el virus aislado se emplea la técnica de Hemoaglutinación (HA) o la técnica de PCR en tiempo Real.

Para determinar la patogenicidad de la cepa se emplean técnicas de secuenciación.

Para el diagnóstico serológico se emplea la prueba Inhibición de la Hemaglutinación (IH) y la técnica ELISA.

Para finalizar no podemos dejar de mencionar la aparición en los últimos años de las denominadas enfermedades emergentes y reemergentes muchas de las cuales son zoonosis.

La OMS considera como enfermedad emergente aquella que aparece por primera vez, aquellas otras que incrementa una presencia y aparecen en zonas nuevas o en hospedadores nuevos, las que incrementan su gravedad o las que presentan nuevos tipos de transmisión.

Y considera como enfermedad reemergente aquellas que en el pasado constituyeron un problema en Sanidad, redujo su incidencia, hasta prácticamente eliminarla y por distintas razones vuelven a estar de actualidad.

En este contexto desde el 2010 la OIE forma parte junto con la OMS y la FAO de la Alianza Tripartita para luchar contra las enfermedades de gran impacto económico y sanitario y en especial las zoonosis, aplicando el concepto de una sola salud.

El concepto “Una sola salud” resume una idea conocida desde hace más de un siglo: la salud humana, la sanidad animal y la salud del medio ambiente están intrínsecamente conectadas y son interdependientes. La salud de uno afecta la salud de todos. Consideramos e implementamos “Una sola salud” como un enfoque colaborativo global destinado a comprender y gestionar los riesgos para la salud del planeta y abogar por ecosistemas sostenibles más equilibrados.

## **BIBLIOGRAFÍA**

Informe sobre zoonosis de 2019 de One Health de la Unión Europea

Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria, Centro Europeo para la Prevención y el Control de Enfermedades Publicado 27 febrero 2021

<https://doi.org/10.2903/j.efsa.2021.6406>

Página WEB del MAPA (Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación)

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

Manual de pruebas diagnósticas y vacunas para los animales terrestres y acuáticos

[Home - WOA - World Organisation for Animal Health](http://www.woah.org/)

EFSA Panel on Animal Health and Welfare (AHAW); Scientific Opinion on Geographic Distribution of Tickborne Infections and their Vectors in Europe and the other Regions of the Mediterranean Basin. EFSA Journal 2010; 8(9):1723. [280 pp.] doi:10.2903/j.efsa.2010.1723.

[www.efsa.europa.eu/efsajournal.htm](http://www.efsa.europa.eu/efsajournal.htm).

EFSA Panel on Animal and Welfare (AHAW); Scientific Opinion on the Role of Tick Vectors in the Epidemiology of Crimean Congo Hemorrhagic Fever and African Swine Fever in Eurasia.

EFSA Journal 2010 ;8 (8):1703. [156 pp.] doi: 10.2903/j.efsa.2010.1703. Available online :

[www.efsa.europa.eu/efsajournal.htm](http://www.efsa.europa.eu/efsajournal.htm).

[https://www.mscbs.gob.es/profesionales/saludPublica/ccayes/analisisituacion/doc/ER\\_FHCC.pdf](https://www.mscbs.gob.es/profesionales/saludPublica/ccayes/analisisituacion/doc/ER_FHCC.pdf)

**MATERIAL PARA LA PREPARACIÓN DEL TEMA 58**

**FIEBRE AFTOSA Y OTRAS ENFERMEDADES VESICULARES. MARCO LEGAL.  
MEDIDAS DE LUCHA CONTRA LA FIEBRE AFTOSA. DIAGNÓSTICO DE  
LABORATORIO**

*Este material no tiene carácter oficial, por lo que en ningún caso vinculará al Tribunal Calificador. Constituye, únicamente, un instrumento complementario que servirá de apoyo al opositor para enfocar cada uno de los epígrafes, pero nunca de forma exclusiva ni excluyente. El Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación no se hace responsable del contenido del mismo.*

*Los materiales no serán objeto de actualización constante.*

## **ÍNDICE**

### **1. INTRODUCCIÓN**

### **2. FIEBRE AFTOSA**

2.1. ETIOLOGÍA.

2.2. EPIDEMIOLOGÍA Y DISTRIBUCIÓN.

2.3. PATOGENIA.

2.4. SINTOMATOLOGÍA Y LESIONES.

### **3. OTRAS ENFERMEDADES VESICULARES**

3.1. ENFERMEDAD VESICULAR PORCINA

3.1.1. Etiología

3.1.2. Epidemiología y distribución.

3.1.3. Síntomas y Lesiones

3.2. ESTOMATITIS VESICULAR

3.2.1. Etiología.

3.2.2. Epidemiología y distribución.

3.2.3. Síntomas y lesiones.

### **4. MARCO NORMATIVO.**

### **5. MEDIDAS DE LUCHA CONTRA LA FIEBRE AFTOSA.**

### **6. DIAGNÓSTICO LABORATORIAL.**

6.1.1. Diagnóstico diferencial.

6.1.2. Recogida y Envío de muestras

6.1.3. Técnicas de Diagnóstico

6.1.3.1. Detección del Agente

6.1.3.2. Pruebas serológicas

## 1. INTRODUCCIÓN

Las enfermedades vesiculares agrupan a una serie de enfermedades infectocontagiosas con manifestaciones clínicas similares y lesiones fundamentadas en la aparición de aftas en diversas localizaciones. Afectan a varias especies animales y tienen un elevado poder de difusión. En esta situación se hace fundamental la realización de un adecuado diagnóstico laboratorial para detectar el agente causal y aplicar así las medidas sanitarias pertinentes.

Entre ellas se encuentran La Fiebre Aftosa, la Enfermedad Vesicular Porcina, la Estomatitis Vesicular y el Exantema vesicular. Dada la mayor relevancia económica y sanitaria de la Fiebre Aftosa, será ésta la que será desarrollada en el tema. Para el resto de las enfermedades se remarcará aquellos aspectos diferenciales de relevancia con respecto a la Fiebre Aftosa.

## 2. FIEBRE AFTOSA

La Fiebre Aftosa es una enfermedad infecciosa vírica muy contagiosa producida por un **virus ARN** clasificado dentro de la **familia Picornaviridae, género Aphthovirus**. El virus afecta a los animales de **pezuña hendida** tanto de especies silvestres como domésticas, provocando grandes pérdidas económicas, por su incidencia en distintas especies (se han descrito más de 30 especies), por su alta tasa de morbilidad, por una disminución de la producción, por las medidas de inmovilización y sacrificio, aislamiento y cierre de mercado que conlleva.

### 2.1. ETIOLOGÍA

El Virus de la Fiebre Aftosa se trata de un virus **ARN monocatenario** cuyo genoma se encuentra incluido en una cápside proteica de morfología icosaédrica, formada por protómeros integrados por **4 proteínas estructurales** distintas que reciben las designaciones VP1, VP2, VP3 y VP4. De entre ellas, la proteína VP1 es la más importante, ya que constituye uno de los antígenos más inmunógenos y biológicamente activos del virus, al intervenir en el reconocimiento de los receptores celulares y la formación de anticuerpos neutralizantes. Esta proteína es, además, altamente variable, lo que la hace responsable en gran medida de esta característica del virus. El hecho de que parte de su cadena aminoacídica se disponga en forma de bucle proyectándose hacia el exterior le proporciona al virus una gran movilidad, funcionalidad y variabilidad siendo el punto básico en las reacciones de neutralización. Las proteínas VP2 y VP3 también ocupan posiciones externas junto con la VP1 y son por tanto activas en fenómenos de reconocimiento y antigenicidad.

Las diferentes secuencias genómicas que codifican VP1 son precisamente las responsables de la existencia de los diferentes serotipos y subtipos que, tradicionalmente, han sido establecidos en base a reacciones de base humoral.

El genoma vírico, integrado por ARN monocatenario de polaridad positiva (de unos 8500 nucleótidos), se estructura en una fase de lectura abierta (**Open Reading Frame, ORF**) central

situada entre dos zonas no codificadoras. De ellas, la zona no codificadora situada en el extremo 5' presenta unida covalentemente una proteína (VPg) que participa en el inicio de la neosíntesis de ARN vírico. Existe además otra región en el genoma vírico que determina una estructura muy conservada, denominada IRES, e implicada en el reconocimiento de ribosomas en el interior de la célula hospedadora.

La zona ORF codifica tres poliproteínas (P1-2A, P2 y P3) que, posteriormente, sufrirán diversos cortes enzimáticos por proteasas víricas. El precursor P1-2A originará finalmente las cuatro proteínas estructurales antes mencionadas, mientras que P2 y P3 darán lugar a otras 8 proteínas no estructurales. Estas, junto con diversos precursores, realizan funciones necesarias para la compleción del ciclo vírico intracelular: las derivadas de P2 (2A, B y C) intervienen en la inducción de síntesis de ARN vírico o en la formación de vesículas en membrana; por su parte, las originadas a partir de P3 (3ABC y D) intervienen en el anclaje a células hospedadoras, el efecto citopático, la inhibición de síntesis proteica celular y, especialmente relevante es la acción ARN Polimerasa de 3D, la antiguamente conocida como antígeno vírico asociado a infección (VIA).

**Inmunológicamente pueden distinguirse 7 tipos**, que responden a las denominaciones **A (Alemania), O (Oise), C (así denominado asumiendo que los anteriores serían renombrados "A" y "B"), SAT1, SAT2, SAT3 (por South African Territories) y Asia1**. Dentro de cada serotipo existen numerosos subtipos, hasta un total de aproximadamente 65. El agrupamiento en estas categorías, inicialmente se basaba en estudios de protección cruzada en animales, y luego, a efectos de su estandarización, fue establecida mediante paneles de sueros.

A la gran diversidad de serotipos y subtipos debe añadirse la circunstancia de que **el virus de la Fiebre Aftosa es extraordinariamente variable desde el punto de vista genómico**, con una gran facilidad para modificar las secuencias que codifican tanto sus proteínas estructurales como no estructurales, así como de hacer estables las nuevas variaciones.

Se han descrito mecanismos para este fenómeno similares a los que presentan los virus influenza (entre los que se cuenta el de la gripe), el denominado **drift antigénico**, esto es, un cambio menor caracterizado por una cierta cantidad de reemplazos aminoacídicos. Pero, igualmente que este tipo de modificaciones, se han descrito otros cambios de gran magnitud en los que ciertos aminoácidos de localización crítica se ven sustituidos, alterándose de esta forma varios epítomos o determinantes antigénicos a un tiempo (lo que se conoce para los virus influenza precisamente como **shift antigénico**). Incluso pueden darse variaciones antigénicas en el curso de una misma onda epizootica. La variabilidad mencionada no sólo se restringe a elementos estructurales o incluso funcionales, sino que pueden determinar una marcada modificación de las propiedades biológicas, entre ellas la virulencia del virus para diversas especies animales.

## 2.2. EPIDEMIOLOGÍA Y DISTRIBUCIÓN

La epidemiología de la Fiebre Aftosa es enormemente compleja, aunque, en términos generales, bastante bien conocida. De entre los aspectos más relevantes destacan:

- la gran cantidad de **especies susceptibles**,
- la enorme **contagiosidad y capacidad de transmisión** del virus,
- la existencia de **portadores inaparentes** y su relación con la variabilidad vírica,
- la **vasta distribución geográfica y las negativas repercusiones económicas y comerciales** que esta enfermedad acarrea.

Tiene como hospedadores a un elevadísimo número de especies animales domésticas y salvajes (todos los fisípedos), constituyendo **los óvidos, cápridos, bóvidos, suidos y cérvidos** los grupos más importantes en nuestro ámbito geográfico. Deben añadirse también otros animales de importancia económica en otras zonas, como por ejemplo camélidos o proboscídeos, así como otras especies salvajes de distribución geográfica muy variada. En la especie humana hay descritos unos 40 casos en la literatura científica, benignos en general y casi siempre asociados al contacto con animales o materiales infectados. **La Fiebre Aftosa no es considerada una enfermedad relevante desde el punto de vista de la Salud Pública.**

Presenta una **bajísima mortalidad** excepto en animales jóvenes. Por tanto, la inmensa mayoría de los animales se recuperan de la etapa clínica de la enfermedad, aunque algunos permanecen como portadores durante meses (oveja, cabra) o incluso años (vaca, búfalo) en base a un aparente mecanismo de equilibrio entre patógeno y hospedador. Excepción a este hecho la constituyen los cerdos y suidos en general, en los que, si bien la excreción es masiva en la fase aguda de la enfermedad, ésta cesa en el transcurso de un mes aproximadamente desde el inicio de los síntomas, por lo que se considera que los suidos no actúan como portadores.

Uno de los problemas de los animales portadores es que pueden incluso llegar a serlo con independencia de su estatus inmunológico, esto es, que animales que han sido vacunados o aquéllos otros que no llegan a desarrollar la forma clínica de la enfermedad, pueden, no obstante, actuar como portadores.

**La distribución**, en términos generales, Europa, Japón, Australia, Nueva Zelanda, América Central y del Norte se consideran zonas exentas, si bien en alguno de estos puntos han aparecido brotes que han sido controlados con rapidez y eficacia a excepción del de Gran Bretaña en 2001. Por el contrario, la mayor parte de América del Sur, Oriente Próximo, Asia y África, son zonas endémicas o con brotes frecuentes, en los que, en consecuencia, se sigue por lo general una política activa de vacunación. Desde que la Unión Europea cesó en las vacunaciones, se han producido además del anterior, brotes en Italia (1993) y Grecia (1994, 1996 y 2000), así como en zonas limítrofes orientales en el curso del brote de 1996: Albania, Macedonia, Serbia, Bulgaria (también en 1991 y 1993) y la parte europea de Turquía. En España, el último brote se produjo en 1986 (Talavera).

Si tenemos en cuenta los serotipos del Virus de la Fiebre Aftosa, su distribución es de la siguiente manera:

- Europa, tipos A, O y C;
- Próximo Oriente y Asia, tipos A, O, C, Asia1;
- África tipos A, O, C (sólo en el Norte) y SAT1, SAT2 y SAT3;

- En América, han predominado tradicionalmente los serotipos A, O y C.

En los brotes más recientes se ha puesto de manifiesto una vez más los peligros potenciales de la globalización, ya que, aparentemente, el brote de Grecia durante el año 2000 fue causado por una cepa de serotipo Asia1. Por su parte la cepa de serotipo O que apareció en la India en 1990 se ha extendido en dirección Oeste hasta, finalmente, alcanzar Gran Bretaña en 2001. Por el contrario, el serotipo C no ha causado brote alguno en los últimos años.

Según la información publicada por la OIE, desde comienzos de 2021 la enfermedad está presente en Botsuana, Rep. Pop. De China, Comoras, Rep. de Corea, Rep. Pop. Dem. de Corea, Gambia, Guinea, Guinea Bissau, Israel, Kenia, Libia, Malawi, Mauricio, Mongolia, Mozambique, Myanmar, Namibia, Ruanda, Sierra Leona, Sudáfrica, Turquía, Uganda, Zambia y Zimbabue.

**Para Europa, uno de los mayores riesgos es la presencia de la enfermedad en Oriente Próximo, Asia Central y norte de África.** En los últimos años han circulado varios serotipos en diferentes países de la región del Magreb. De esta manera, los serotipos A y O han circulado por Túnez y Argelia mientras que por Egipto, Libia y Marruecos ha sido el serotipo O quien ha estado presente.

## **2.2. PATOGENIA**

El virus de la Fiebre aftosa penetra en el animal generalmente por vía aérea mediante la formación de aerosoles siendo pocas las partículas virales necesarias para iniciar la infección en la mayoría de las especies excepto en el cerdo. La especie porcina es más resistente a la infección que la bovina o la ovina por vía respiratoria siendo, sin embargo, mucho más sensible por vía oral.

El virus de la Fiebre aftosa presenta un tropismo por las células epiteliales en las que se replica rápidamente en la misma puerta de entrada (mucosas del tracto superior respiratorio, mucosa bucal o pliegues de la piel como, por ejemplo, en la zona interdigital) dando lugar a unas vesículas denominadas aftas primarias que generalmente suelen pasar inadvertidas.

Tras esta primera replicación, el virus pasa a sangre produciéndose una viremia que se caracteriza por temperatura elevada y mal estar general del animal. En esta fase el virus de la Fiebre Aftosa producirá una segunda replicación en las células reticuloendoteliales y en el parénquima de los órganos diana (hígado, bazo, médula ósea y músculo estriado).

Finalmente, el virus vuelve de nuevo a los lugares de predilección (células epiteliales), produciendo las vesículas secundarias características de la enfermedad, fundamentalmente en hocico y patas.

El virus de la Fiebre aftosa no afecta con la misma sensibilidad a las diferentes especies animales, así como es muy diferente la capacidad de excreción del virus y por tanto el potencial de transmisión de la enfermedad según la especie afectada.

Así, el ganado vacuno es, con mucho, el más susceptible a la adquisición de la enfermedad por vía aerógena, lo que, en parte, se relaciona con el mayor volumen respiratorio de esta especie

en relación con la porcina, ovina o caprina (la dosis infectiva mínima por la vía aerógena es de 5 a 10 partículas víricas para el ganado vacuno lo que representa unas dos veces y media menor que la necesaria para la oveja).

En cuanto al cerdo, las dosis infectivas mínimas por vía aerógena son mucho más elevadas que en el caso de la vaca, siendo en cambio la especie doméstica más sensible a la infección cuando ésta tiene lugar por vía oral.

En relación con la capacidad de excreción vírica, ésta es también muy diferente entre las especies domésticas. Los cerdos son grandes excretores de virus, y en concreto por vía aerógena, la especie más relevante desde el punto de vista de la transmisión lejana. El cerdo puede llegar a excretar hasta 3000 veces más partículas víricas por día (108 unidades infectivas) que una oveja o una vaca en idéntico período de tiempo.

Por lo tanto, la transmisión de la Fiebre Aftosa es extraordinariamente sencilla. Las principales vías son:

- Por contacto directo entre individuos sanos e infectados,
- Por vía aerógena:
  - inmediata o cercana: por alta concentración de partículas víricas en las explotaciones, especialmente en las de intensivo
  - y lejana, cuya transmisión depende de factores climáticos como la humedad (por encima del 60% se asegura una mejor viabilidad vírica), temperatura, corrientes de aire, nubosidad o niebla y la ausencia de precipitaciones.
- Por el contacto a través de productos contaminados de origen animal como carnes, leche, piel y cueros.
- Por semen, por lo que puede ser transmitida por inseminación artificial.
- Por contacto con objetos contaminados, (transporte, utensilios de manejo, ropa, calzado, personas...).

Podemos considerar entonces, que las fuentes principales del virus son:

- Animales en periodo de incubación, clínicamente afectados, y portadores.
- Aire expirado, saliva, heces y orina; Leche y semen, (hasta 4 días antes de los síntomas clínicos).
- Carnes y productos derivados en que el pH se mantuvo por encima de 6,0. El virus sobrevive durante semanas o meses en medula ósea, ganglios linfáticos, y coágulos sanguíneos de los grandes vasos. Sin embargo, la supervivencia en los órganos internos y músculos es mucho menor debido a la presencia del ácido láctico y otras sustancias que lo inactiva.

## **2.4. SÍNTOMAS Y LESIONES**

Todas las enfermedades vesiculares (Enfermedad vesicular del cerdo, Estomatitis y Exantema vesicular) cursan con signos clínicos muy semejantes, por lo que requiere siempre del diagnóstico del laboratorio para su diferenciación fiable.

Dependiendo de la virulencia del agente etiológico, de factores epidemiológicos y de las características del hospedador, la enfermedad se puede presentar de diferentes formas clínicas: aguda, subaguda o crónica, siendo la más frecuente la aguda. En estos casos, la enfermedad cursa con una alta morbilidad y baja mortalidad (inferior al 5%) excepto en lechones y terneros donde puede alcanzar tasas de hasta el 50%.

Tras la infección, en las primeras 10-12 horas aparecen las aftas primarias en el lugar de la entrada del virus. Suelen ser en un principio de tamaño muy pequeño, por lo que suelen pasar desapercibidas, si bien, en ocasiones se fusionan varias aftas originando una vesícula de hasta 5 cm de diámetro.

Entre 1 y 5 días después de la infección, la temperatura corporal aumenta bruscamente al comenzar la etapa virémica, alcanzando los 40-41°C. A continuación, se desarrollarán las aftas secundarias especialmente en los espacios interdigitales, rodetes coronarios, piel del tarso y del carpo, boca y en las mamas.

La aparición de las aftas comienza con una zona eritematosa, posteriormente tumefacta, adquiriendo turgencia y un color más pálido para finalmente llenarse de un líquido amarillento seroso. Tras 6-24 horas las aftas se rompen y pierden su epitelio. En ocasiones la conjunción de varias vesículas hace que los daños sean muy considerables, llegando a perder la pezuña completa, causar deformidades de la pezuña o desprenderse todo el epitelio de la lengua, especialmente en bovino.

Debido a la fiebre inicial los animales suelen aparecer inaparentes y postrados en las primeras fases de la enfermedad.

Dependiendo de la localización de las aftas secundarias **las manifestaciones clínicas** pueden variar:

- **Cojera** de intensidad variable que hace que los animales caminen con normalidad o permanezcan más tiempo tumbados.
- **Ptialismo y sialorrea**, dolor en la deglución y pérdida de apetito.
- **Agalaxia** o imposibilidad de lactación u ordeño.

La fiebre desaparecerá en 10 días y las lesiones se resuelven en 1-2 semanas si no aparecen infecciones bacterianas secundarias, con consecuencias variables.

En hembras gestantes también se han descrito **abortos y partos prematuros** en el periodo febril, sin que se haya podido demostrar la infección del feto.

**En la forma sobreaguda**, poco frecuente en animales adultos, la tasa de mortalidad aumenta en lechones, debido fundamentalmente a un acusado miotropismo del virus que produce una miocarditis con muerte del animal, a veces incluso sin ninguna otra lesión. Esta lesión se describe como "corazón atigrado" y es debida a los cambios degenerativos del músculo cardíaco, que se manifiestan como franjas de color amarillento.

**Las formas subagudas**, con síntomas inaparentes, se han descrito principalmente en ovejas y cabras. En bovinos también se ha descrito un estado de infección persistente, en el cual el

virus replica sin aparición de los síntomas clínicos característicos. Este estado no se ha descrito en cerdos. En esta forma, como apenas aparecen manifestaciones clínicas de la enfermedad, su detección por las lesiones resulta complejo sin pruebas laboratoriales de apoyo.

### **3. OTRAS ENFERMEDADES VESICULARES**

#### **3.1. ENFERMEDAD VESICULAR PORCINA**

La enfermedad vesicular porcina (EVP) es una enfermedad viral, que se caracteriza por la formación de vesículas y erosiones, que **sólo afecta a los cerdos**. A pesar de que puede causar una enfermedad de leve a grave, esta infección es transitoria y no compromete la vida del animal. Su gran importancia, es el parecido con otras enfermedades vesiculares, en particular la fiebre aftosa. Además, la estabilidad del virus de la enfermedad vesicular porcina en el medio ambiente complica su erradicación y hace indispensable el reconocimiento rápido para el control.

##### **3.1.1. Etiología**

El virus de la enfermedad vesicular porcina (VEVP) es miembro del género Enterovirus de la familia Picornaviridae ARN monocatenario. Este virus parece haber evolucionado del virus humano coxsakievirus B5 (CVB5). El VEVP se clasifica actualmente como una variante de la especie porcina CVB5 y el VEVP es un sinónimo aceptado para esta variante. Se ha sido identificado un serotipo del VEVP y varias cepas.

El virión está constituido por una cápside proteica de simetría icosaédrica sin envuelta compuesta por cuatro proteínas estructurales (VP1, VP2, VP3 y VP4).

##### **3.1.2. Epidemiología y Distribución**

La EVP es una enfermedad infecciosa exclusiva del ganado porcino (cerdos y jabalíes) en condiciones naturales, aunque ocasionalmente también puede infectar al hombre, habiéndose comprobado que el personal de laboratorio puede desarrollar anticuerpos contra la enfermedad.

La EVP se difunde principalmente **por contacto directo** de cerdos sanos con enfermos, y con sus excreciones y secreciones. La contaminación mediante heces y orina, y la ingestión de alimentos contaminados son las principales fuentes de infección por contacto indirecto.

El virus penetra rápidamente en el animal a **través de lesiones en la piel y mucosas**, especialmente en las pezuñas o en cavidad bucal, y también por ingestión de saliva, orina, heces y fluidos nasales y lacrimales, que llegan a las mucosas orales y nasales de los animales sanos. La transmisión aerógena no es frecuente

La enfermedad se identificó por primera vez en 1966 en Italia, siendo en un principio considerada como Fiebre Aftosa por las lesiones que presentaban los animales. En las

siguientes décadas ha afectado a otros países europeos y asiáticos, incluido España (1993 en Huesca y Lérida), siendo en Calabria (Italia) donde se ha declarado el último foco Europeo.<sup>1</sup>

**En la actualidad no es una enfermedad de declaración obligatoria de la Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE) ni se ajusta a los criterios previstos en el artículo 5, apartado 3, del Reglamento (UE) 2016/429 por lo que su importancia radica en el establecimiento de un diagnóstico diferencial claro con la Fiebre Aftosa.** En este sentido, la UE no ha designado un laboratorio comunitario de referencia para esta enfermedad siendo competencia del europeo de referencia para la Fiebre Aftosa mediante el establecimiento del diagnóstico diferencial.

### 3.1.3. Síntomas y Lesiones

El período de incubación del virus de la EVP está relacionado con la vía de entrada, dosis, virulencia de la cepa y edad de los animales (los cerdos jóvenes son más susceptibles que los adultos).

Una vez en el animal, el virus inicia la replicación en el lugar de entrada (en los ganglios linfáticos regionales) y por vía linfática alcanza la corriente circulatoria, desde donde se distribuye por todo el organismo en 24 – 48 horas, provocando una viremia primaria que cursa sin síntomas claros. Durante esta viremia primaria el virus se localiza en epitelios del tracto digestivo y respiratorio superior, epitelios podales y mamarios. En estas localizaciones se producen vesículas de diferente grado dependiendo de la dureza de los suelos y del peso de los animales.

Antes de la aparición de los primeros síntomas, el virus de la EVP se encuentra en las secreciones y excreciones corporales. Tras la aparición de las vesículas, se puede recuperar el virus con título más alto del líquido y del epitelio de las mismas.

El virus también tiene tropismo por las tonsilas, miocardio y sistema nervioso central, causando una viremia secundaria que va acompañado de títulos máximos en el suero sanguíneo entre el día 2 al 5 postinfección, aunque el período de incubación se puede prolongar hasta el día 11.

Los anticuerpos frente al virus de la EVP aparecen a partir de los 7 días postinfección, con un título máximo a los 28 dpi.

No hay evidencia de que se produzca transmisión vertical.

Los síntomas clínicos no se diferencian de los presentes en otras enfermedades vesiculares por lo que a la aparición de sintomatología vesicular se debe activar el protocolo de sospecha de Fiebre Aftosa. Los cerdos más jóvenes se ven más afectados, aunque es muy rara la mortalidad (a diferencia de la fiebre aftosa) y, si se produce, lo hará de forma repentina debido a la aparición de necrosis de miocardio.

---

<sup>1</sup> 7 de mayo de 2015, la Comisión Europea reconoció a Italia territorio libre de la enfermedad porcina vesicular mediante la decisión de ejecución de la Comisión (UE) 2019/470 del 20 de marzo de 2019

Las lesiones macroscópicas tienen las mismas características en todas las localizaciones, aunque la probabilidad de infección bacteriana es mayor y más grave en las extremidades. Si no existen infecciones bacterianas secundarias los animales se recuperan en 15-20 días.

### 3.2. ESTOMATITIS VESICULAR

La estomatitis vesicular es una enfermedad contagiosa de origen viral que afecta a bovinos, **equinos**, porcinos y a diversas especies de animales silvestres (ciervo o venado de cola blanca y otros pequeños mamíferos de los trópicos) y eventualmente al hombre, en el que se desarrolla como un proceso clínico similar al producido por la gripe que suele durar no más de 4 días. Se la considera por lo tanto una Zoonosis, aunque de tipo menor.

#### 3.2.1. Etiología

El virus de la EV está clasificado dentro de la familia Rhabdoviridae, género Vesiculovirus, formado por un ARN no segmentado de polaridad negativa de 11 Kb que codifica la síntesis de cuatro proteínas estructurales internas denominadas proteína de la nucleocápside (N), fosfoproteína (P), proteína de la matriz (M) y la polimerasa (L). A nivel externo encontramos una glicoproteína de transmembrana (G) que es la responsable de inducir la respuesta inmune en los huéspedes infectados.

Existen dos serotipos virales, Indiana (I) y New Jersey (NJ). Esta clasificación está basada en los anticuerpos neutralizantes que produce el huésped contra la glicoproteína G del virus. El serotipo NJ es considerado el más importante desde el punto de vista económico ya que causa la mayoría de los casos clínicos y se ha observado que la patogenicidad es mayor que la causada por el serotipo Indiana.

#### 3.2.2. Epidemiología y distribución

De manera natural la enfermedad afecta a bovinos, porcinos y equinos y raramente ovejas y cabras. Desde el punto de vista epidemiológico, todos estos animales podrían estar implicados en el ciclo natural de la Estomatitis Vesicular, ya sea como hospedadores, portadores, amplificadores o reservorios<sup>2</sup>.

La transmisión puede ser por contacto directo con animales enfermos o por medio de vectores<sup>3</sup>.

Presenta una **marcada estacionalidad**, siendo más frecuente en la estación de lluvias en las zonas tropicales enzoóticas, aunque en algunos países también se da en la estación seca

---

<sup>2</sup> burros, perros, antilopes, cerdos ferales o jabalíes, alces, ciervos de cola blanca, mapaches, zorros, ardillas, conejos, pequeños roedores, monos, murciélagos y una gran variedad de aves, entre otros

<sup>3</sup> La mosca de la arena, mosquitos del género Aedes y Culez, ácaros y pulgas e insectos de las plantas

después de las lluvias. En las zonas templadas normalmente desaparece con las primeras heladas lo cual corrobora la participación de algún tipo de vector invertebrado en su ciclo.

Es una enfermedad que se encuentra exclusivamente en el continente Americano. La enfermedad tiene carácter enzoótico en los países tropicales de Centro y de América del Sur donde se extiende por zonas planas pantanosas con mucha vegetación y humedades altas.

### 3.2.3. Síntomas y lesiones

La sintomatología es similar a la de la fiebre aftosa, con la cual se puede confundir fácilmente, solo en los casos en los que existen en la explotación de équidos, y estos son infectados, se pueden diferenciar, ya que los équidos son resistentes al virus de la fiebre aftosa.

## 4. MARCO NORMATIVO

El marco normativo hace referencia a la Fiebre Aftosa por las razones expuestas durante el tema. En el **marco internacional**, es fundamental mencionar la inclusión del Virus de la Fiebre Aftosa en **la lista de enfermedades de declaración obligatoria de la OIE**.

A nivel **comunitario**, desde su entrada en vigor en abril de 2021 se debe atender a lo dispuesto en la **Legislación Europea sobre Sanidad Animal**. En este sentido, desde la Unión Europea se ha publicado normativa de aplicación ante la Fiebre Aftosa **representada por:**

- **Reglamento (UE) 2016/429, del Parlamento y del Consejo, de 9 de marzo de 2016, relativo a las enfermedades transmisibles de los animales** y por el que se modifican o derogan algunos actos en materia de sanidad animal («Legislación sobre sanidad animal») donde incluye a la Fiebre Aftosa en su artículo 5 como una de las enfermedades objeto de aplicación del Reglamento.
- **Reglamento de Ejecución (UE) 2018/1882 de la Comisión, de 3 de diciembre de 2018** relativo a la aplicación de determinadas normas de prevención y control a categorías de enfermedades enumeradas en la lista y por el que se establece una lista de especies y grupos de especies que suponen un riesgo considerable para la propagación de dicha enfermedad de la lista.
- **La Fiebre Aftosa aparece categorizada como A+D+E**, siendo por tanto de aplicación medidas inmediatas para su erradicación ante su detección, medidas de prevención durante los movimientos y medidas de vigilancia.
- La Enfermedad vesicular porcina y la Estomatitis vesicular no vienen categorizadas específicamente en este Reglamento de ejecución
- **Reglamento Delegado (UE) 2020/687 de la Comisión, de 17 de diciembre de 2019**, por el que se completa el Reglamento (UE) 2016/429 del Parlamento Europeo y del Consejo en lo referente a las normas relativas a la prevención y el control de determinadas enfermedades de la lista.
- **Reglamento Delegado (UE) 2020/688 de la Comisión, de 17 de diciembre de 2019**, por el que se completa el Reglamento (UE) 2016/429 del Parlamento Europeo y del

Consejo en lo referente a los requisitos zoonosarios para los desplazamientos dentro de la Unión de animales terrestres y de huevos para incubar a efecto de garantizar que tales productos no planteen un riesgo significativo de propagación de la enfermedad.

- **Reglamento Delegado (UE) 2020/689 de la Comisión**, de 17 de diciembre de 2019, por el que se completa el Reglamento (UE) 2016/429 del Parlamento Europeo y del Consejo en lo referente a las normas de vigilancia, los programas de erradicación y el estatus de libre de enfermedad con respecto a determinadas enfermedades de la lista y enfermedades emergentes.
- **Reglamento Delegado (UE) 2020/692 de la Comisión**, de 30 de enero de 2020, que contempla el Reglamento (UE) 2016/429 del Parlamento Europeo y del Consejo en lo referente a las normas para la entrada en la Unión, y para el desplazamiento y la manipulación tras la entrada, de las partidas de determinados animales, productos reproductivos y productos de origen animal.
- **Reglamento Delegado (UE) 2020/2002 de la Comisión**, de 7 de diciembre de 2020, por el que se establecen normas de desarrollo del Reglamento (UE) 2016/429 del Parlamento Europeo y del Consejo relativas a la notificación a la Unión y al envío de informes a la Unión sobre enfermedades de la lista, al sistema informático de información, así como a los formatos y los procedimientos de presentación y envío de informes relacionados con los programas de vigilancia y erradicación de la Unión y con la solicitud de reconocimiento del estatus de libre de enfermedad.
- **Reglamento (UE) 2017/625 del Parlamento Europeo y del Consejo**, de 15 de marzo de 2017, relativo a los controles y otras actividades oficiales realizados para garantizar la aplicación de la legislación sobre alimentos y piensos, y de las normas sobre salud y bienestar de los animales, sanidad vegetal y productos fitosanitarios
- **Decisión de ejecución (UE) 2017/675 de la CE, de 7 de abril de 2017**, sobre medidas para impedir la introducción en la Unión Europea del virus de la FA procedente de Argelia, Libia, Marruecos y Túnez.
- **Decisión de Ejecución (UE) 2020/1723 de la Comisión, de 16 de noviembre de 2020**, relativa a las medidas para impedir la introducción en la Unión del virus de la fiebre aftosa procedente de Argelia, Egipto, Israel, Líbano, Libia, Marruecos, Palestina, Siria, Túnez y Turquía.
- **Reglamento de Ejecución (UE) 2021/634 de la Comisión, de 15 de abril de 2021**, por el que se modifica el Reglamento de Ejecución (UE) 2021/404 por lo que respecta a las disposiciones transitorias, las entradas del Reino Unido y las dependencias de la Corona de Guernesey, Isla de Man y Jersey, y la lista de terceros países desde los que se autoriza la entrada en la Unión de los productos lácteos que deben someterse obligatoriamente a un tratamiento específico de reducción del riesgo contra la fiebre aftosa.
- **Decisión de Ejecución (UE) 2022/575 de la Comisión de 6 de abril de 2022** relativo a medidas de emergencia para impedir la introducción de la fiebre aftosa en la Unión a través de las partidas de heno y de paja procedentes de terceros países o territorios y por el que se deroga el Reglamento de Ejecución (UE) 2020/2208

En el **ámbito nacional**, se debe tener en cuenta que la mayoría de las normas están actualmente en revisión para adaptarse a la nueva normativa europea en el ámbito de la Sanidad Animal. Aun así, las principales disposiciones a considerar son:

- **Ley 8/2003, de Sanidad Animal**
- **Real Decreto 526/2014**, en el cual se incluye como una enfermedad de declaración obligatoria
- **Real Decreto 2179/2004, de 12 de noviembre**, por el que se establecen medidas de lucha contra la fiebre aftosa.
- **Orden AAA/2444/2015**, por la que se establecen medidas de emergencia preventivas frente a la fiebre aftosa en el Magreb.
- **Orden AAA/2719/2015**, por la que se modifica la Orden AAA/2444/2015, por la que se establecen medidas de emergencia preventivas frente a la fiebre aftosa en el Magreb.
- **Orden APM/692/2017, de 21 de julio**, por la que se modifica la Orden AAA/2444/2015, de 19 de noviembre, por la que se establecen medidas de emergencia preventivas frente a la fiebre aftosa en el Magreb.
- **Orden APM/607/2018, de 1 de junio**, por la que se modifica la Orden AAA/2444/2015, de 19 de noviembre, por la que se establecen medidas de emergencia preventivas frente a la fiebre aftosa en el Magreb.
- **Orden APA/791/2018, de 26 de julio**, por la que se modifica la Orden AAA/2444/2015, de 19 de noviembre, por la que se establecen medidas de emergencia preventivas frente a la fiebre aftosa en el Magreb.
- **Real Decreto 650/1994, de 15 de abril**, por el que se establece medidas generales de lucha contra determinadas enfermedades de los animales y medidas específicas contra la enfermedad vesicular porcina.
- **Real Decreto 1314/2007, de 5 de octubre**, por el que se modifica el Real Decreto 650/1994, de 15 de abril, por el que se establece medidas generales de lucha contra determinadas enfermedades de los animales y medidas específicas contra la enfermedad vesicular porcina.

## 5. MEDIDAS DE LUCHA CONTRA LA FIEBRE AFTOSA

Según establece la ley 8/2003, de Sanidad Animal, *“toda persona física o jurídica, pública o privada, tiene la obligación de comunicar a la Autoridad Competente, de manera inmediata, en la forma y plazo establecidos, todos los focos de que tenga conocimiento de enfermedades de carácter epizootico, o que por su especial virulencia, extrema gravedad o rápida difusión impliquen un peligro potencial de contagio para la población animal, incluida la doméstica o salvaje, o un riesgo para la salud pública o el medio ambiente. En los supuestos en que no se prevea un plazo específico en la normativa aplicable, éste será de 24 horas como máximo para las enfermedades de declaración obligatoria”*

En este sentido lo más importante es un reconocimiento rápido y preciso de cualquier signo clínico compatible con la enfermedad. La vigilancia que se realiza en España para la fiebre

aftosa está en línea con las normas establecidas por la OIE y por la normativa comunitaria, y es similar a la vigilancia establecida en otros países de la UE. El hecho de ser un país libre sin vacunación en el que los animales no presentan ninguna inmunidad, asociado al hecho de que los síntomas de esta enfermedad sean muy característicos, hace **que la vigilancia de la fiebre aftosa sea pasiva**, tanto en animales domésticos como en animales silvestres, descartando laboratorialmente los casos en que se declara una sospecha clínica por aparición de signos compatibles.

Este tipo de vigilancia se basa en dos elementos esenciales:

- el reconocimiento de los síntomas característicos de la enfermedad en las distintas especies animales
- y la notificación inmediata a los servicios veterinarios oficiales de cualquier sospecha que se produzca.

Sólo de esta forma se podrá llevar a cabo una respuesta rápida a cualquier incursión de la enfermedad en nuestro territorio.

Ante la aparición de un brote de FA, y considerando su gran poder de difusión, en la Unión Europea (UE) se ha establecido **una política de erradicación de la enfermedad** en el menor tiempo posible, limitando de este modo la propagación de la enfermedad y el impacto económico que pueda causarse al sector ganadero afectado.

Por ser una enfermedad de la lista de enfermedades de declaración obligatoria de la UE, no está permitido el tratamiento. Cualquier sospecha deberá ser comunicada con carácter de urgencia a los servicios veterinarios oficiales (SVO) de la Comunidad Autónoma. La FA es una enfermedad de declaración obligatoria incluida en el RD 526/2014, por el que se establece la lista de enfermedades de animales de declaración obligatoria y se regula su notificación.

La lucha contra la enfermedad está basada en una combinación de las siguientes estrategias:

- Sacrificio inmediato de todos los animales susceptibles que se encuentren en la explotación y destrucción de los cadáveres.
- Movimientos controlados, en las áreas declaradas, de los animales y de sus productos, deyecciones y todo aquel material relacionado con el manejo de los animales que pudiese estar contaminado para evitar la propagación del virus.
- Estrictas medidas de bioseguridad, desinfección de instalaciones, material y vehículos de transporte que pudiesen estar contaminados.
- Rastreabilidad y vigilancia para determinar la fuente de contagio y las vías de difusión de la enfermedad.
- Regionalización, para establecer áreas infectadas y aquellas libres de la enfermedad, así como para controlar los movimientos de animales, productos y vehículos que puedan suponer un riesgo para la transmisión de la enfermedad.
- Vacunación en aquellos casos que se requiera debido a la situación epidemiológica, densidad de población, etc

En líneas generales, la política de erradicación de la Fiebre Aftosa está basada en el sacrificio sanitario de los animales afectados y en contacto, estando prohibida la aplicación de vacuna frente a esta enfermedad. No obstante, en el caso de que se haya confirmado la enfermedad y amenace con propagarse a la cabaña ganadera del país, se podrá decidir **la vacunación emergencia**.

Las primeras vacunas frente al virus de la Fiebre aftosa se comenzaron a emplear en los años 20, utilizando, como fuente de virus, epitelios infectados de animales susceptibles a la enfermedad, inactivados con formaldehído y usando como adyuvante hidróxido de aluminio.

A principios de los años 60 se desarrolló el primer cultivo de células BHK-21, susceptible al virus de Fiebre Aftosa, lo que facilitó la producción masiva del virus utilizado como inmunógeno en las vacunas inactivadas, que son las utilizadas en la actualidad.

Actualmente como inactivante se emplea AEI y BEI, y como adyuvante los de tipo oleoso.

Esta vacuna inactivada puede presentarse en forma monovalente (frente a un solo serotipo) o polivalente (frente a varios serotipos del virus). Dependiendo del serotipo o serotipos que afecten a un determinado país se debe adaptar la vacuna correspondiente. La respuesta inmune protectora suele ser de aproximadamente seis meses.

Al ser una vacuna inactivada la respuesta inmune no es completa ya que al no existir replicación viral en las células susceptibles la expresión inmune está limitada a una respuesta mayoritariamente de CD 4 con menor producción de citocinas.

No obstante, se conoce perfectamente que los anticuerpos circulantes inducidos por estas vacunas inactivadas son suficientes para inducir protección a los animales frente al virus homólogo virulento, existiendo una correlación entre el título de anticuerpos y el de protección del animal.

Los inconvenientes de estas vacunas inactivadas son:

- los derivados del manejo de grandes cantidades de virus,
- la necesidad de refrigeración durante el almacenamiento y distribución,
- el bajo rendimiento de algunas cepas en cultivos celulares,
- la gran variabilidad antigénica del virus
- y la dificultad en asegurar la completa inactivación viral de los lotes vacunales.

En este sentido, se han relacionado en ocasiones la aparición de algún brote de la enfermedad con un origen vacunal.

Los nuevos desarrollos en vacunas de nueva generación se dirigen actualmente hacia la caracterización molecular y obtención de epítomos T y B de la proteína VP1, utilizando técnicas de DNA recombinante, como futuros inmunógenos formados por todo el repertorio completo de epítomos B y T presente en el virión intacto, sin la presencia del material genético viral, evitando por tanto su replicación.

El desarrollo de los ELISAs de proteínas no estructurales, que se mencionarán el apartado de diagnóstico laboratorial, permite en la **actualidad la diferenciación de aquellos rebaños**

**infectados de los vacunados**, lo que ha supuesto un cambio en la estrategia de la erradicación de la enfermedad en la UE en el futuro, ya que permitirá eliminar barreras al movimiento de los animales vacunados lo cual facilitará el uso de la vacunación como herramienta de control de la enfermedad.

Se hace imprescindible además **el control sobre el desplazamiento** de los animales vivos entre países, que se debe apoyar en un sistema de diagnóstico y de información epidemiológica rápido y eficaz, de modo que permita la puesta al día constante de la situación a los órganos encargados del control.

En general, la profilaxis debe estar basada en la aplicación de medidas encaminadas a impedir la introducción de la enfermedad desde el exterior, así como impedir la **diseminación de la enfermedad una vez que ésta se ha detectado en nuestra ganadería**.

Para impedir la diseminación de la enfermedad en caso de declaración de un brote de Fiebre Aftosa es importante, por tanto:

- Inspeccionar minuciosamente las explotaciones sospechosas.
- Rápida detección de los animales afectados y confirmación de la enfermedad en el laboratorio.
- Rápida comunicación a los Servicios Veterinarios Oficiales en todos los casos declarados sospechosos.
- Rápida identificación de las explotaciones, productos, mataderos y otras instalaciones potencialmente infectadas.
- Limpieza y desinfección de los transportes.
- Aislamiento y sacrificio de los animales infectados y susceptibles de contraer la enfermedad, seguido de desinfección y vacío sanitario de las explotaciones afectadas.
- Establecimiento de zonas de protección y vigilancia donde se pongan en funcionamiento medidas específicas de control de la enfermedad: limitación en el movimiento de animales, seguimiento clínico, toma de muestras, refuerzo de medidas de bioseguridad, etc.
- Vacunación en caso de que la situación epidemiológica lo haga recomendable.

Por último, es conveniente destacar que **el Real Decreto 2179/2004**, de 12 de noviembre, por el que se establecen medidas de lucha contra la fiebre aftosa está actualmente en revisión para adaptarse al nuevo enfoque normativo que se está implantando desde la UE en el ámbito de la Sanidad Animal.

## **6. DIAGNÓSTICO LABORATORIAL**

### **6.1. DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL**

Las patologías a tener en cuenta en el diagnóstico diferencial de la Fiebre Aftosa dependerán de la presentación clínica y la especie o especies afectadas.

Para el **ganado bovino**, habría que establecer un diagnóstico diferencial frente a las siguientes enfermedades:

- Estomatitis Vesicular
- Lengua azul
- Enfermedad de las mucosas
- Fiebre catarral maligna
- Actinobacilosis
- Estomatitis papular bovina
- Diarrea viral bovina
- Rinotraqueitis infecciosa bovina (IBR)
- Peste bovina
- Otras patologías como fotosensibilización y toxicidad de plantas, abrasiones químicas, laminitis, abscesos en las pezuñas o dermatitis interdigital.

Para los **pequeños rumiantes** habría que establecer un diagnóstico diferencial frente:

- Lengua azul
- Peste de los pequeños rumiantes
- Ectima contagioso
- Otras patologías como dermatitis de contacto, fotosensibilización y toxicidad de plantas, abrasiones químicas, laminitis o abscesos.

Por último, para el **ganado porcino**, el diagnóstico diferencial habría que hacerlo frente:

- Enfermedad vesicular porcina
- Exantema vesicular del cerdo
- Estomatitis vesicular
- Senecavirus tipo A

## 6.2. RECOGIDA Y ENVÍO DE MUESTRAS

Con el fin de poder realizar un adecuado diagnóstico es muy importante que la elección de la muestra sea la adecuada, así como que llegue en buen estado al laboratorio. **No puede haber un buen diagnóstico sin una buena muestra.**

El diagnóstico clínico no permite realizar un diagnóstico diferencial entre las enfermedades vesiculares, siendo necesaria la confirmación laboratorial. Dada la alta difusión de la enfermedad es importante realizar un diagnóstico de laboratorio rápido para adoptar las medidas sanitarias lo antes posible para el control y erradicación de la enfermedad.

Las muestras han de ser recogidas de forma estéril y debe tenerse mucha precaución para que las mismas no entren en contacto con ningún desinfectante que pudiera producir una inactivación viral. Las muestras deben ser identificadas de forma que se asegure su **trazabilidad**. En caso de tomar muestras de animales vivos, es esencial considerar además cuestiones de **bienestar animal**.

Los virus pueden presentarse en todas las secreciones y excreciones de los animales con infección aguda, incluyendo el aire espirado, siendo las muestras de elección para la FA las siguientes:

- **Vesículas:** El epitelio de las vesículas y el líquido contenido en ellas procedente de los animales sospechosos son las muestras de elección. Presentan títulos muy elevados de virus. La extensión mínima de las muestras de epitelio es de 2 cm<sup>2</sup>.
- **Sangre con anticoagulante** (preferentemente EDTA). El período de viremia de los animales suele ser muy corto (normalmente no superior a 5 días), por lo que su utilidad es escasa.
- **Sangre sin anticoagulante:** Al igual que la sangre no resulta de gran utilidad para la detección del virus, pero sí para detectar anticuerpos, particularmente útil en el caso de ovejas y cabras, animales en los que la aparición de aftas es poco frecuente o se limita a ligeras erosiones en la cavidad bucal, por lo que la detección de anticuerpos resulta de gran importancia a la hora de identificar los animales que han tenido contacto con el virus. Los anticuerpos pueden aparecer a partir de los 4 días post-infección.
- **Saliva:** De gran utilidad en ganado ovino, ya que se puede detectar el virus en la saliva durante largos períodos de tiempo.
- **Hisopos faríngeos y nasales (frotis):** Puesto que, especialmente en rumiantes, el lugar de replicación del virus y donde éste persiste más tiempo es fundamentalmente el tracto respiratorio superior, las muestras de fluido y células recogidos mediante hisopos, tanto faríngeos como nasales, constituyen también buenas muestras para el diagnóstico de laboratorio. También se puede tomar este tipo de muestras en el porcino.
- **Muestras faringoesofágicas (Probang cups):** el objetivo es obtener líquido orofaríngeo y, especialmente, las células epiteliales superficiales de esas zonas, incluida la parte anterior del esófago, las paredes de la faringe, las grutas de las amígdalas y la superficie del velo del paladar. Especialmente indicado en ganado bovino, y también en pequeños rumiantes, para la detección de animales portadores (los cerdos no se convierten en portadores) y en estadios tardíos de la enfermedad.
- **Tejidos:** Corazón, riñón, ganglios linfáticos e hígado en caso de muerte del animal.
- **Leche:** El VFA se puede detectar en la leche incluso 4 días antes de la aparición de las primeras lesiones o signos clínicos de la enfermedad. Se deberá remitir la muestra al laboratorio a 4º C, o congelada para evitar cambios de pH en caso de que se vaya a retrasar el envío de la muestra.

Para el envío de las muestras al laboratorio es importante tener en cuenta que el virus de la Fiebre Aftosa es extremadamente **sensible a las variaciones de pH**. Por esta razón, determinadas muestras deben enviarse incluidas en un medio de transporte que garantice la estabilidad del pH entre 7,2 y 7,6. El medio llevará incorporado un indicador de pH, como el rojo fenol que pondrá de manifiesto cualquier cambio y antibióticos y antimicóticos para evitar el crecimiento de flora contaminante.

Según el tipo de muestra el acondicionamiento será el siguiente:

- La sangre, con o sin anticoagulante, en el propio tubo de vacío.
- Las muestras líquidas como en contenido de las vesículas o la leche se recogerán en tubos estériles sin medio de transporte.
- Las muestras de los epitelios se incluirán en un medio de transporte tipo A constituido con tampón fosfato y glicerol a partes iguales. Es importante que las muestras queden bien sumergidas en el medio.
- Los frotis nasales y orales tomados con hisopos y las muestras faringoesofágicas con contenido celular se incluirán en un medio de transporte tipo B con tampón fosfato y seroalbúmina bovina.

Las muestras deben mantenerse refrigeradas a 4°C hasta su llegada al laboratorio.

Las muestras de un animal sospechoso de presentar Fiebre Aftosa deberán ser envasadas y etiquetadas correctamente para evitar la propagación del virus. Conforme a la normativa vigente en materia de transporte de material biológico peligroso las muestras deben ser embaladas **en triple envase** y catalogadas como sustancias **infecciosas de categoría B**, con el **código UN 3373**. Es importante el aviso previo del envío de las muestras al laboratorio ya que la manipulación de las mismas se debe realizar en instalaciones de contención biológica.

### **6.3. TÉCNICAS DE DIAGNÓSTICO**

El diagnóstico de laboratorio puede ser mediante técnicas de detección del agente (el aislamiento del virus, la detección de sus antígenos virales o la detección del ácido nucleico viral por PCR), y por técnicas para la detección de anticuerpos específicos, frente a proteínas estructurales o no estructurales, permitiendo en este último caso diferenciar animales vacunados de infectados.

Además, se dispone de sistemas de tipificación genética determinando la secuencia nucleotídica de porciones del genoma vírico de las cepas aisladas, que resulta de gran ayuda para conocer el posible origen de la enfermedad mediante los pertinentes estudios de epidemiología molecular.

#### **6.3.1. Detección del agente**

- Aislamiento viral

Técnica laboriosa y lenta que requiere entre 3 y 10 días para ofrecer un resultado definitivo. Se pueden utilizar líneas celulares establecidas como BHK-21 (fibroblastos de hámster) e IBRS-2 (células epiteliales porcinas), donde el virus produce efecto citopático (ECP) en las células infectadas entre 24 y 72 horas post-inoculación. Los sobrenadantes obtenidos de los cultivos que muestren ECP se deberán examinar posteriormente mediante ELISA de Antígeno indirecto tipo sándwich o por RT-PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa con Transcriptasa Reversa) para confirmar la presencia del virus en las muestras y determinar el serotipo.

Se puede dar el caso de que una muestra positiva no produzca ECP en un primer pase en el cultivo celular debido a que la carga vírica de la muestra no sea lo suficientemente elevada, por lo que es siempre recomendable el realizar hasta 3 pases ciegos en cultivos celulares pre confluentes antes de emitir un resultado definitivo de negatividad, lo que supone cerca de dos semanas de tiempo. Además, existen numerosos aislados del VFA que no replican bien en las líneas celulares continuas IBRS-2 y BHK-21, por lo que previamente a su aislamiento deben adaptarse a dichos cultivos.

Es importante destacar que el material enviado al laboratorio para la realización del diagnóstico ha de ser de gran calidad y debe haber sido enviado en condiciones óptimas de conservación, especialmente en cuanto al mantenimiento de un adecuado pH y temperatura, porque el resultado negativo obtenido pudiera ser debido a una mala calidad de las muestras y no a una ausencia del virus en el animal.

Para el EVP se utilizan líneas celulares renales porcinas como IBRS-2, PK-15 y SK6 o una línea ST de células testiculares porcinas.

- Detección de antígenos virales

La técnica de ELISA se utiliza tanto para la detección del virus de la Fiebre Aftosa como para la determinación de serotipo. Los ELISAs utilizados son de tipo sándwich indirecto frente a los diferentes serotipos. Poseen una sensibilidad limitada, detectando el virus a partir de títulos superiores a 10<sup>4</sup> DITC50/ml. Es una técnica de rápida realización (3-4 horas) y por la que se puede analizar un elevado número de muestras diariamente. Permite además identificar el serotipo correspondiente del virus detectado.



Apps.sanidadanimal.info

- Detección del ácido nucleico viral

La técnica de RT-PCR pone de manifiesto la presencia del virus mediante la detección del genoma viral, por amplificación de fragmentos específicos de su ARN (en concreto 5'UTR y 3D para la detección genérica del virus). Mediante esta técnica se pueden detectar animales recientemente infectados, a partir del tercer día post-infección, incluso antes de que éstos presenten síntomas clínicos. La RT-PCR es una técnica rápida (5-6 horas).

Se dispone de la técnica de PCR para la detección específica de las principales enfermedades vesiculares (Fiebre Aftosa, EVC y EV).

La proteína estructural VP1 es la determinante de serotipo. Debido a la existencia de diferentes topotipos dentro de cada serotipo, resulta complicado el diseño de PCRs dirigidas al segmento que codifica para la proteína VP1 capaces de cubrir toda la variedad de topotipos existentes para cada serotipo de FA. Por este motivo, la RT-PCR no es la técnica de elección para la tipificación de esta enfermedad.

Se dispone de una técnica de PCR múltiple que permite la diferenciación específica mediante un único ensayo de las tres principales enfermedades vesiculares: Fiebre Aftosa, Enfermedad Vesicular del Cerdo y Estomatitis Vesicular.

- Análisis filogenético de las cepas aisladas del Virus de la Fiebre Aftosa

Si utilizando alguna de las parejas de primers descritas para amplificar un fragmento de la región que codifica para la proteína VP1 se consigue un resultado positivo, el producto amplificado se puede secuenciar con objeto de realizar estudios de epidemiología molecular que nos permitan determinar el origen más probable de un virus mediante la elaboración del correspondiente árbol filogenético. Actualmente se dispone de bancos de datos con una amplia colección de secuencias de gran número de cepas de VFA.

Mediante al análisis y comparación de estas secuencias se elaboran los correspondientes árboles filogenéticos, permitiendo determinar el posible origen epizootiológico ante la aparición de un nuevo foco en una zona.

La comparación de las secuencias obtenidas de aislados procedentes de un foco y de las cepas vacunales proporciona una información de gran utilidad al elegir la vacuna que se empleará en caso de una eventual vacunación en la región.

### **6.3.2. Pruebas serológicas**

La detección de anticuerpos frente al VFA resulta de gran utilidad en casos de:

- Como ayuda al diagnóstico cuando no existe tejido epitelial disponible.
- Cuando se sospecha de casos subclínicos de enfermedad, especialmente de ovino y caprino, en los cuales no se podrán recoger muestras de vesículas y el contacto del animal con el virus se puede poner de manifiesto mediante la presencia de anticuerpos específicos frente al virus.
- Para llevar a cabo estudios epidemiológicos en poblaciones animales, siendo posible actualmente diferenciar animales vacunados con vacunas inactivadas de los animales infectados, mediante la detección de anticuerpos frente a proteínas no estructurales.
- Realizar estudios de respuesta frente a campañas de vacunación.

Las técnicas más utilizadas en la actualidad para la detección de anticuerpos específicos de la Fiebre Aftosa son la Virusneutralización (VN) y las técnicas de ELISA, que se pueden diferenciar

entre las que detectan anticuerpos frente a proteínas no estructurales del virus (NSP), y los que detectan anticuerpos frente a todas las proteínas del virus.

- Virusneutralización

**La Virusneutralización** es una técnica sensible, específica, semicuantitativa y que permite la identificación específica de serotipo. Es la técnica de referencia y **está recomendada para la confirmación de sueros positivos o dudosos por ELISA**, pues por su laboriosidad y necesidad de utilización de cultivos celulares no permite el estudio sobre un número elevado de muestras. Otros dos inconvenientes añadidos son la necesidad de un mínimo de 2-3 días para la realización de esta técnica y la necesidad de emplear virus vivo de Fiebre Aftosa, lo que implica la necesidad de emplear laboratorios con niveles de bioseguridad elevado debido al riesgo de escape de virus.

- ELISA

Mediante este método se puede analizar un gran número de muestras (todas las fases se pueden automatizar) en un relativo corto periodo de tiempo (4 horas), siendo una técnica sensible y específica, que no precisa el empleo de cultivos celulares y que permite también la identificación del serotipo.

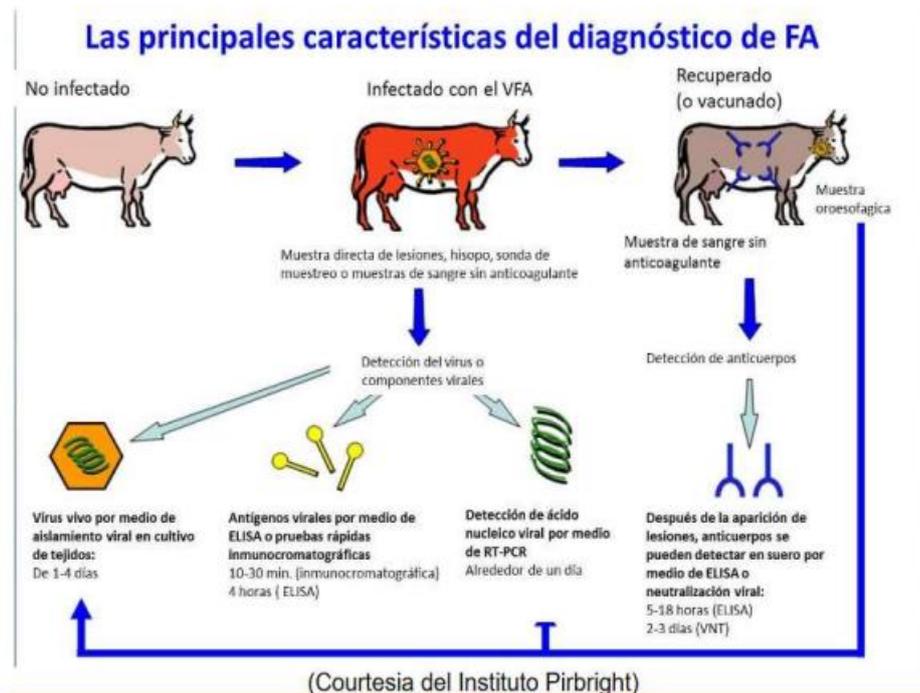
Existen diferentes métodos ELISA, pudiéndose distinguir primeramente entre los que detectan anticuerpos frente a **proteínas no estructurales** de aquéllos que detectan anticuerpos frente a todo tipo de proteínas.

Por último, concluir el tema con el ELISA frente a proteínas no estructurales. Dentro de este tipo, **existe el ELISA de Bloqueo en Fase Líquida (ELISA-LPB) o el de Competición en Fase Sólida (ELISA-SPC)**. Estos ELISAs detectan anticuerpos tanto frente a proteínas estructurales como no estructurales, por lo que tanto los animales infectados como los vacunados frente al VFA resultarán positivos sin poderse diferenciar. Además, estos ELISAs son específicos de serotipo.



Apps. Sanidadanimal.info

Los ELISAs de proteínas no estructurales (ELISA-NS) permiten la **diferenciación eficaz entre animales vacunados e infectados**, con un elevado nivel de sensibilidad y especificidad, **empleando para ello como antígeno la proteína 3ABC** del virus u otros péptidos sintéticos. Un animal inmunizado con vacuna inactivada resultará negativo al ser analizado mediante estos ELISAs de proteínas no estructurales, mientras que un animal en el que ha replicado el virus, bien por infección natural con virus campo o bien por inmunización con vacuna atenuada, resultaría positivo. Estos ELISAs no permiten diferenciar serotipo.



En la siguiente tabla se resume las pruebas laboratoriales a realizar dependiendo de la antigüedad de la lesión encontrada en los animales y de la muestra obtenida.

Tipo de muestra	Lesión reciente con una antigüedad inferior a los 3-4 días	Lesión con una antigüedad superior a los 3-4 días
Muestra epitelial	RT-PCR, ELISA de Antígeno, Aislamiento viral	Ninguna
Sangre	RT-PCR	ELISA para detección de Anticuerpos (proteínas NS y E)
Saliva/muestra nasal	RT-PCR	Ninguna
Muestra esofágica	RT-PCR, Aislamiento viral	RT-PCR, Aislamiento viral

## BIBLIOGRAFÍA

Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE). Manual de las Pruebas Diagnósticas y de las Vacunas para los Animales Terrestres. Capítulos 3.1.8. (Infección por el Virus de la Fiebre Aftosa).

[https://www.woah.org/fileadmin/Home/esp/Health\\_standards/tahm/3.01.08\\_Fiebre%20aftosa.pdf](https://www.woah.org/fileadmin/Home/esp/Health_standards/tahm/3.01.08_Fiebre%20aftosa.pdf)

Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE). Código Sanitario para los Animales Terrestres. Capítulos 8.8. (Infección por el Virus de la Fiebre Aftosa).

[https://www.woah.org/es/que-hacemos/normas/codigos-y-manuales/acceso-en-linea-al-codigo-terrestre/?id=169&L=1&htmfile=chapitre\\_fmd.htm](https://www.woah.org/es/que-hacemos/normas/codigos-y-manuales/acceso-en-linea-al-codigo-terrestre/?id=169&L=1&htmfile=chapitre_fmd.htm)

Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación (Gobierno de España).

[https://www.mapa.gob.es/es/ganaderia/temas/sanidad-animal-higiene-ganadera/sanidad-animal/enfermedades/fiebre-aftosa/fiebre\\_aftosa.aspx](https://www.mapa.gob.es/es/ganaderia/temas/sanidad-animal-higiene-ganadera/sanidad-animal/enfermedades/fiebre-aftosa/fiebre_aftosa.aspx)

Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE). Manual Sanitario para los Animales Terrestres. Capítulos 3.1.23 (Estomatitis Vesicular).

[https://www.oie.int/fileadmin/Home/esp/Health\\_standards/tahm/3.01.23\\_VESICULAR\\_STOMATITIS.pdf](https://www.oie.int/fileadmin/Home/esp/Health_standards/tahm/3.01.23_VESICULAR_STOMATITIS.pdf)

Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación (Gobierno de España).

<https://www.mapa.gob.es/es/ganaderia/temas/sanidad-animal-higiene-ganadera/sanidad-animal/enfermedades/estomatitis-vesicular/estomatitis-vesicular.aspx>

Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación (Gobierno de España).

[https://www.mapa.gob.es/es/ganaderia/temas/sanidad-animal-higiene-ganadera/sanidad-animal/enfermedades/enfermedad-vesicular-porcina/enf\\_vesicular\\_porcina.aspx](https://www.mapa.gob.es/es/ganaderia/temas/sanidad-animal-higiene-ganadera/sanidad-animal/enfermedades/enfermedad-vesicular-porcina/enf_vesicular_porcina.aspx)

**MATERIAL PARA LA PREPARACIÓN DEL TEMA 59**

**PESTE DE LOS PEQUEÑOS RUMIANTES. MARCO LEGAL. PROGRAMA NACIONAL DE VIGILANCIA. DIAGNÓSTICO DE LABORATORIO.**

*Este material no tiene carácter oficial, por lo que en ningún caso vinculará al Tribunal Calificador. Constituye, únicamente, un instrumento complementario que servirá de apoyo al opositor para enfocar cada uno de los epígrafes, pero nunca de forma exclusiva ni excluyente. El Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación no se hace responsable del contenido del mismo.*

*Los materiales no serán objeto de actualización constante.*

## **ÍNDICE**

### **1. PESTE DE LOS PEQUEÑOS RUMIANTES.**

- 1.1. ETIOLOGÍA
- 1.2. EPIDEMIOLOGÍA Y TRANSMISIÓN
- 1.3. SINTOMATOLOGÍA Y LESIONES
- 1.4. PROFILAXIS

### **2. MARCO LEGAL.**

### **3. PROGRAMA NACIONAL DE VIGILANCIA.**

### **4. DIAGNÓSTICO DE LABORATORIO.**

- 4.1. DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL.
- 4.2. CARACTERÍSTICAS MOLECULARES Y SEROLÓGICAS PARA EL DIAGNÓSTICO
- 4.3. CARACTERÍSTICAS PARA EL ENVÍO DE MUESTRAS AL LABORATORIO
- 4.4. DIAGNÓSTICO VIROLÓGICO (Identificación del agente)
- 4.5. DIAGNÓSTICO SEROLÓGICO

## 1. PESTE DE LOS PEQUEÑOS RUMIANTES.

### 1.1. ETIOLOGÍA

La peste de los pequeños rumiantes (PPR), también conocida como peste ovina y peste caprina, es una enfermedad contagiosa aguda, caracterizada por fiebre, llagas en la boca, diarrea, neumonía y a veces la muerte.

Está causada por un virus que tiene similitudes con los virus de la peste bovina, el moquillo canino y los virus del sarampión, por ello se ha clasificado dentro del género *Morbillivirus* de la familia Paramyxoviridae.

### 1.2. EPIDEMIOLOGÍA Y TRANSMISIÓN

La PPR fue descrita por primera vez en Costa de Marfil (Gargadennec & Lalanne, 1942) y desde entonces, la PPR está de forma endémica en Oriente Medio (Península Arábiga, Turquía, Irán e Irak), sur de Asia (India, Nepal y Bangladesh) y África, continente en el que, a excepción de Egipto, la enfermedad se encontraba acantonada en los países al sur del Sáhara, hasta que en julio de 2008 Marruecos notificó oficialmente a la OIE la aparición de la enfermedad en su territorio, donde la enfermedad se dispersó rápidamente por todo el país. La PPR se ha expandido rápidamente en los últimos 15 años y está presente en alrededor de 70 países en el sur y el este de Asia, África y Medio Oriente. En junio de 2018 la enfermedad llegó a la Unión Europea, con un primer caso detectado en Bulgaria.

Según la información publicada por la OIE, desde comienzos de 2021 la enfermedad está presente en Argelia, Bulgaria, China, Comoras, Israel, Kenia, Libia, Maldivas, Marruecos, Mongolia, Sierra Leona, Tailandia, Túnez y Uganda.

El hospedador natural del virus de la Peste de los pequeños rumiantes (PPR) son las ovejas y cabras, aunque también se ha descrito la enfermedad en otras especies de ungulados salvajes como gacelas y órices. Además, puede infectar también a ganado bovino, búfalos, camellos y cerdos, en los que no se desarrollan signos clínicos y no pueden transmitir la enfermedad a otros animales.

Para la transmisión de la enfermedad se requiere un estrecho contacto entre los animales infectados y los susceptibles. El virus se puede encontrar en las secreciones nasales y oculares, en expectoraciones y en todas las secreciones y excreciones de los animales enfermos o en periodo de incubación.

Las principales vías de transmisión son a través de:

- a) Inhalación de aerosoles producidos por estornudos y toses de los animales infectados.
- b) Contacto directo con secreciones nasales, oculares u orales.
- c) Contacto directo con heces.
- d) Fómites contaminados como agua, alimentos o camas.

No se ha descrito la existencia de animales portadores del virus después de recuperarse de la enfermedad.

### 1.3. SINTOMATOLOGÍA Y LESIONES

El período de incubación suele ser de 4–6 días, pero puede oscilar entre los 3 y los 10 días. La enfermedad clínica es aguda, mostrando la siguiente sintomatología:

- Fiebre alta (hasta 41°C) que puede durar 3–5 días; los animales muestran decaimiento, anorexia y hocico reseco.
- Las secreciones oculonasales serosas se vuelven progresivamente mucopurulentas y, si no se produce la muerte, persisten unos 14 días.
- En los cuatro días siguientes a la aparición de la fiebre, las encías se vuelven hiperémicas y aparecen lesiones erosivas en la cavidad oral, produciéndose una abundante sialorrea. Estas lesiones pueden volverse necróticas.
- En la última etapa es frecuente una diarrea sanguinolenta acuosa.
- También provoca neumonía, tos, crepitaciones pleurales y respiración abdominal.

En la PPR, la morbilidad es cercana al 90%, y la mortalidad depende de la edad de los animales afectados y su estado sanitario, pero puede llegar hasta un 50-80%. No obstante, tanto la morbilidad como la mortalidad pueden ser muy inferiores en los brotes más leves, de tal modo que la enfermedad puede pasar desapercibida. Puede establecerse un diagnóstico provisional de la PPR en base a los signos clínicos, pero para el diagnóstico diferencial con otras enfermedades de signos similares se requiere la confirmación del laboratorio.

Las lesiones son muy similares a las observadas en la necropsia en el ganado vacuno afectado por la peste bovina, con la salvedad de que en la PPR aparecen con frecuencia llamativas costras en la parte externa de los labios y neumonía intersticial.

Asimismo, pueden aparecer lesiones erosivas desde la boca hasta la unión del rumen con el retículo. Pueden aparecer unas características zonas rojas lineales de congestión o hemorragia a lo largo de los pliegues longitudinales de la mucosa del intestino grueso y del recto (rayas de cebrá), pero no son un hallazgo constante.

Normalmente hay enteritis erosiva o hemorrágica y la unión ileocecal suele estar afectada. Las placas de Peyer podrían estar necróticas.

Los ganglios linfáticos están aumentados de tamaño, y el bazo y el hígado podrían presentar lesiones necróticas.

### 1.4. PROFILAXIS

La política de erradicación de la PPR en la UE está basada en el sacrificio sanitario de los animales afectados y de aquéllos que se hallen en contacto, o relacionados epidemiológicamente.

Se hace imprescindible además el control sobre el desplazamiento de los animales vivos entre países, que se debe apoyar en un sistema de diagnóstico y de información epidemiológica rápido y eficaz, de modo que permita la puesta al día constante de la situación a los órganos encargados del control.

En general, la profilaxis debe estar basada en la aplicación de **medidas encaminadas a impedir la introducción de la enfermedad desde el exterior**, así como impedir la diseminación de la enfermedad una vez que ésta se ha detectado en nuestra ganadería. Estas medidas incluyen:

- Control de movimiento de animales.
- Inspección de las explotaciones.
- Rápida detección y confirmación de la enfermedad en el laboratorio.
- Rápida denuncia a las autoridades competentes de todos los casos declarados sospechosos.
- Rápida identificación de las explotaciones, productos, mataderos, y otras instalaciones potencialmente infectadas.
- Limpieza y desinfección de los transportes.
- Aislamiento y sacrificio de los animales infectados y susceptibles de contraer la enfermedad, seguido de desinfección y vacío sanitario de las explotaciones afectadas.
- Establecimiento de zonas de protección y vigilancia donde se pongan en funcionamiento medidas específicas de control de la enfermedad: limitación en el movimiento de animales, seguimiento clínico, toma de muestras, etc.

Asimismo, se dispone de **una vacuna homóloga** contra la PPR. En 1998, el Comité Internacional de la OIE aprobó el uso de esta vacuna en los países que han decidido seguir las directrices de la OIE para la vigilancia epidemiológica en relación con la peste bovina, con el fin de evitar la confusión cuando se realicen los estudios serológicos.

En los países que se vacuna, las ovejas y las cabras vacunadas con una cepa atenuada de PPR o que se recuperan de la PPR desarrollan una inmunidad activa de por vida contra la enfermedad (Durojaiye, 1982). Se dispone de varias vacunas contra la PPR, todas las cuales son cepas naturales del VPPR atenuadas en cultivo celular (Sen et al., 2010). Se ha comprobado en ensayos experimentales que las dos cepas vacunales más utilizadas (Nigeria/75/1 and Sungri/96) protegen a los animales contra cepas del VPPR de todos los linajes (Hodgson et al., 2018)

Dependiendo de la situación epidemiológica se prevé emplear dos modalidades de vacunación de emergencia siguiendo las recomendaciones efectuadas por el Grupo de Expertos:

1. Vacunación profiláctica: vacunación de urgencia “en sábana” que no implica la realización del sacrificio posterior de los animales inmunizados. Se llevaría a cabo especialmente en aquellos casos en los cuales no se considerase viable la erradicación de la enfermedad mediante sacrificio masivo. Se establecerá alrededor del perímetro de la zona de vacunación una zona de vigilancia de 10 km. En la que estará prohibida la vacunación, se intensificará la vigilancia y los movimientos de animales de especies sensibles que estarán sometidos a control oficial.

2. Vacunación supresora: vacunación de emergencia que se realizará únicamente en conexión con el sacrificio preventivo. Dependiendo de la situación epidemiológica se aplicará en un radio de 1 a 3 km. alrededor del foco, siempre dentro de la zona de protección y en explotaciones claramente identificadas. Todos los animales vacunados deberán estar debidamente marcados para facilitar su identificación antes de su posterior sacrificio.

## 2. MARCO LEGAL.

### 2.1. Marco legal a nivel nacional:

- La Enfermedad es de declaración obligatoria según el **Real Decreto 526/2014**, de 20 de junio, por el que se establece la lista de las enfermedades de los animales de declaración obligatoria y se regula su notificación.

La PPR está dentro de las **Enfermedades, infecciones e infestaciones de la Lista Única de la OIE**.

### 2.2. Marco legal de la Unión Europea que aplica a la PPR:

- **Reglamento (UE) 2016/429** del Parlamento Europeo y del Consejo, de 9 de marzo de 2016, relativo a las enfermedades transmisibles de los animales y por el que se modifican o derogan algunos actos en materia de sanidad animal («Legislación sobre sanidad animal»). La PPR se incluye en el Anexo II como una de las enfermedades objeto de aplicación del Reglamento.
- **Reglamento de Ejecución (UE) 2018/1882** de la Comisión, de 3 de diciembre de 2018 relativo a la aplicación de determinadas normas de prevención y control a categorías de enfermedades enumeradas en la lista y por el que se establece una lista de especies y grupos de especies que suponen un riesgo considerable para la propagación de dicha enfermedad de la lista.  
La PPR aparece categorizada como A+D+E, siendo por tanto de aplicación medidas inmediatas para su erradicación ante su detección, medidas de prevención durante los movimientos y medidas de vigilancia.
- **Reglamento Delegado (UE) 2020/687** de la Comisión, de 17 de diciembre de 2019, por el que se completa el Reglamento (UE) 2016/429 del Parlamento Europeo y del Consejo en lo referente a las normas relativas a la prevención y el control de determinadas enfermedades de la lista.
- **Reglamento Delegado (UE) 2020/688** de la Comisión, de 17 de diciembre de 2019, por el que se completa el Reglamento (UE) 2016/429 del Parlamento Europeo y del Consejo en lo referente a los requisitos zoonosanitarios para los desplazamientos dentro de la Unión de animales terrestres y de huevos para incubar.
- **Reglamento Delegado (UE) 2020/689** de la Comisión, de 17 de diciembre de 2019, por el que se completa el Reglamento (UE) 2016/429 del Parlamento Europeo y del Consejo en lo referente a las normas de vigilancia, los programas de erradicación y el estatus de

libre de enfermedad con respecto a determinadas enfermedades de la lista y enfermedades emergentes.

- **Reglamento Delegado UE) 2020/692** de la Comisión, de 30 de enero de 2020, que contempla el Reglamento (UE) 2016/429 del Parlamento Europeo y del Consejo en lo referente a las normas para la entrada en la Unión, y para el desplazamiento y la manipulación tras la entrada, de las partidas de determinados animales, productos reproductivos y productos de origen animal.
- **Reglamento de Ejecución (UE) 2020/2002** de la Comisión, de 7 de diciembre de 2020, por el que se establecen normas de desarrollo del Reglamento (UE) 2016/429 del Parlamento Europeo y del Consejo relativas a la notificación a la Unión y al envío de informes a la Unión sobre enfermedades de la lista, al sistema informático de información, así como a los formatos y los procedimientos de presentación y envío de informes relacionados con los programas de vigilancia y erradicación de la Unión y con la solicitud de reconocimiento del estatus de libre de enfermedad.
- El 30 de junio de 2016 La Comisión Europea publicó una convocatoria de candidaturas para seleccionar y designar un laboratorio de referencia de la UE para la PPR. El laboratorio elegido fue el "Centre de coopération internationale en recherche agronomique pour le développement (CIRAD)" en Montpellier, según se publicó en el **Reglamento (UE) 2017/212** de la Comisión de 7 de febrero de 2017. Además de las funciones y los cometidos generales establecidos en la normativa comunitaria, se le han asignado al laboratorio elegido determinadas tareas y responsabilidades específicas, en particular en lo que respecta a la colaboración entre los laboratorios nacionales de referencia de los Estados miembros, en apoyo de sus funciones y para proporcionar métodos óptimos de diagnóstico de la PPR.

### 3. PROGRAMA NACIONAL DE VIGILANCIA.

España es un país libre de PPR en el que los animales no presentan ninguna inmunidad porque no se realiza vacunación. Por tanto, el tipo de vigilancia que se hace es **vigilancia pasiva** tanto en animales domésticos como en animales silvestres.

Los casos de sospecha por aparición de signos compatibles con la enfermedad se envían las muestras al LNR, donde se descartan laboratorialmente.

Este tipo de vigilancia se basa y depende de forma importante de dos elementos esenciales que son:

- el reconocimiento de los síntomas característicos de la enfermedad
- y la notificación inmediata a los servicios veterinarios oficiales de cualquier sospecha que se produzca.

La vigilancia que se realiza en España está en línea con las normas establecidas por la OIE y por la normativa comunitaria y es similar a la vigilancia establecida en otros países de la UE.

## 4. DIAGNÓSTICO DE LABORATORIO.

### 4.1. DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL.

Debido al cuadro clínico se debe realizar el diagnóstico diferencial frente a Peste bovina, Pasterelosis, Fiebre aftosa, Lengua azul, Perineumonía contagiosa caprina, Ectima contagioso, Parasitosis por Coccidios o Helmintos e intoxicaciones.

### 4.2. CARACTERÍSTICAS MOLECULARES Y SEROLÓGICAS PARA EL DIAGNÓSTICO

Los virus de la PPR es un virus ARN que tiene seis proteínas estructurales:

- la proteína de la nucleocápsida (Np), que encapsula el ARN genómico vírico,
- la fosfoproteína (P), que se asocia a la proteína de la polimerasa (L viene de “large”, que en inglés hace referencia a una proteína de gran tamaño),
- la proteína de la polimerasa (L)
- la proteína de la matriz (M),
- la proteína de fusión (F) y
- la proteína de hemoaglutinación (H).

La proteína de la matriz, íntimamente asociada con la cara interna de la envoltura vírica, hace de enlace entre la nucleocápsida y las glucoproteínas externas H y F, que son responsables, respectivamente, de la unión y de la penetración del virus en el interior de las células a las que infecta.

El genoma del VPPR también codifica dos proteínas no estructurales, la C y la V.

### 4.3. CARACTERÍSTICAS PARA EL ENVÍO DE MUESTRAS AL LABORATORIO.

Debido al alto riesgo de difusión de la PPR, siempre que se visite una explotación, así como en la propia explotación sospechosa, se deben mantener unas estrictas medidas de bioseguridad.

Algunos aspectos de bioseguridad que son importantes recordar serían los siguientes:

- medidas a tomar para la entrada en la explotación,
- restricción y control de movimientos en la explotación sospechosa,
- limpieza y desinfección fundamental para evitar la diseminación del virus.

La toma de muestras debe realizarse con material estéril y deberán ser enviadas de forma rápida y segura al Laboratorio Nacional de Referencia para la PPR, que es el Laboratorio Central de Veterinaria de Algete.

Las muestras se enviarán refrigeradas (4°C) cuando el tiempo de transporte sea inferior a 72 horas, en caso de que sea superior deberán ir congeladas (-20°C o -70°C).

Las muestras irán dentro de un triple envase, en el exterior del mismo irá localizada la documentación que contendrá toda la información relacionada con las muestras. Al

transportar material biológico, el remitente debe determinar si el material debe clasificarse como mercancía peligrosa o no. En caso de transportar muestras sospechosas de contener el virus de la PPR, se deberían clasificar como Sustancia biológica perteneciente a la categoría B (UN3373) y seguir la instrucción de embalaje P650, de acuerdo con la Reglamentación sobre Materiales Peligrosos (DGR) de la Asociación Internacional de Transporte Aéreo (IATA).

Las **muestras que se tomarán para ser enviadas al laboratorio** son las siguientes:

- A) Para la realización del **diagnóstico serológico**:
  - Suero: sangre completa empleando tubos estériles sin anticoagulante para la detección de anticuerpos frente al virus de la PPR.
- B) Para realizar el diagnóstico virológico:
  - Sangre: sangre completa con EDTA procedente de animales en fase de viremia con fiebre, vesículas u otros signos clínicos de enfermedad.
  - Frotis de secreciones oculares y de las mucosas nasal y oral.
  - A partir de animales muertos:
    - Ganglios mesentéricos y bronquiales
    - Bazo
    - Pulmones
    - Mucosa del intestino

#### **4.4. DIAGNÓSTICO VIROLÓGICO (Identificación del agente)**

##### **4.4.1. Aislamiento del virus**

El aislamiento se realizará a partir de muestras de campo que hayan sido positivas a RT-PCR, que se inocularán en cultivos celulares de línea celular VERO (células de riñón de mono verde).

Los cultivos inoculados se observarán diariamente para ver la aparición de efecto citopático (ECP). El ECP puede aparecer en 5 días, pero si en el primer pase no se observa ECP, debido a que la carga vírica de la muestra no sea lo suficientemente elevada, es siempre recomendable el realizar hasta 3 pases ciegos en cultivos celulares antes de emitir un resultado definitivo de negatividad. Todos estos pases se analizarán por RT-PCR para confirmar o descartar la presencia del virus.

##### **4.4.2. ELISA de captura**

El enzimoimmunoanálisis de inmunocaptura (IC-ELISA) (Libeau et al., 1994) en el que se utilizan dos anticuerpos monoclonales (MAb) generados contra la proteína N permite una rápida identificación del VPPR.

La prueba es muy específica y sensible. Los resultados se obtienen en menos de 2 horas. Existe un kit comercial de esta prueba.

#### **4.4.3. Inmunodifusión en gel de agar (AGID)**

La Inmunodifusión en gel de agar (AGID) es una prueba muy sencilla y barata que puede realizarse en cualquier laboratorio e incluso sobre el terreno.

Esta prueba no es suficientemente sensible como para detectar formas leves de la PPR, debido a la baja cantidad de antígeno vírico que se excreta.

#### **4.4.4 Técnicas moleculares: RT-PCR**

Se han desarrollado una PCR con transcripción inversa (RT-PCR) basadas en la amplificación de partes de los genes de las proteínas N y F para el diagnóstico específico de la PPR (Couacy-Hymann et al., 2002).

La ventaja de esta técnica es que los resultados se obtienen en 5 horas, incluida la extracción de ARN, en comparación con los 10-12 días que se tarda en realizar el aislamiento del virus.

La RT-PCR en tiempo real ha mejorado el diagnóstico de la PPR, siendo más sensible que la RT-PCR convencional.

#### **4.5. DIAGNÓSTICO SEROLÓGICO**

Las pruebas serológicas utilizadas sistemáticamente son:

##### **4.5.1. ELISA**

Se han descrito varios ELISA de competición (C-ELISA) que se basan en el uso de MAb que reconocen proteínas del virus. Son de dos tipos: aquellos cuyo MAb reconoce la proteína N y emplean proteína N recombinante producida en baculovirus como antígeno (p. ej., Libeau et al., 1995); y aquellos que utilizan un MAb específico de la proteína vírica de adhesión (H) y un antígeno que consiste en VPPR purificado o parcialmente purificado (cepa vacunal) (p. ej., Anderson & McKay, 1994; Saliki et al., 1993). Todas las pruebas funcionan en base al principio de que los anticuerpos contra el VPPR de los sueros problema pueden bloquear la unión del MAb al antígeno.

##### **4.5.2. Virusneutralización (VN)**

La seroneutralización para la detección de anticuerpos específicos frente a un determinado virus se basa en que los anticuerpos neutralizantes que pueda contener la muestra de suero, enfrentados directamente contra una concentración previamente determinada del virus específico, puede prevenir los efectos que ese virus produce en un cultivo celular (ECP).

Si una muestra de suero enfrentada a un virus específico no presenta efecto, queda demostrada la existencia de anticuerpos neutralizantes, siempre y cuando los controles de células, de virus, de suero positivo y negativo, y el testigo de suero cumplan los criterios de aceptación.

Aunque esta prueba es sensible y específica, su ejecución lleva mucho tiempo.

Las características de la VN de la PPR son:

- Se utilizan cultivos celulares de células VERO y placas de 96 pocillos.
- Se utiliza virus vivo por lo que la técnica se debe realizar en instalaciones de contención biológica de tipo 3.
- Se lee a los 7 y 10 días de incubación. El virus produce efecto citopático

MATERIAL NO OFICIAL

## **BIBLIOGRAFÍA**

Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. Peste de los Pequeños Rumiantes  
[https://www.mapa.gob.es/es/ganaderia/temas/sanidad-animal-higiene-ganadera/sanidad-animal/enfermedades/peste-pequenos-rumiantes/peste\\_peq\\_rumiantes.aspx](https://www.mapa.gob.es/es/ganaderia/temas/sanidad-animal-higiene-ganadera/sanidad-animal/enfermedades/peste-pequenos-rumiantes/peste_peq_rumiantes.aspx)

Manual Terrestre de la Organización Mundial de Sanidad Animal. Capítulo 3.8.9. Peste de los pequeños rumiantes (infección por el morbillivirus de los pequeños rumiantes)  
[fmd with viaa test incl. \(woah.org\)](http://www.woah.org/emergency/diseases/fmd_with_viaa_test_incl/)

Organización de las Naciones Unidas para la alimentación y la Agricultura. PPR.  
<https://www.fao.org/resilience/noticias-eventos/historia-detalle/es/c/1460118/>

Organización de las Naciones Unidas para la alimentación y la Agricultura. Infografía PPR.  
<https://www.fao.org/documents/card/es/c/cde0a4b1-be13-4494-a8d8-f2e49122bb17/>

MATERIAL NO OFICIAL

**MATERIAL PARA LA PREPARACIÓN DEL TEMA 60**

**VIRUELA OVINA Y CAPRINA. MARCO LEGAL. VIGILANCIA. DIAGNÓSTICO DE LABORATORIO**

*Este material no tiene carácter oficial, por lo que en ningún caso vinculará al Tribunal Calificador. Constituye, únicamente, un instrumento complementario que servirá de apoyo al opositor para enfocar cada uno de los epígrafes, pero nunca de forma exclusiva ni excluyente. El Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación no se hace responsable del contenido del mismo.*

*Los materiales no serán objeto de actualización constante.*

## **ÍNDICE**

### **1. INTRODUCCIÓN.**

- 1.1. ETIOLOGÍA
- 1.2. EPIDEMIOLOGÍA Y TRANSMISIÓN
- 1.3. SÍNTOMAS Y LESIONES

### **2. MARCO LEGAL**

- 2.1. NORMATIVA EUROPEA
- 2.2. NORMATIVA NACIONAL

### **3. VIGILANCIA DE LA ENFERMEDAD**

### **4. DIAGNÓSTICO DE LABORATORIO**

- 4.1. DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL
- 4.2. REQUERIMIENTO PARA EL ENVÍO Y PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS
- 4.3. TÉCNICAS LABORATORIALES
  - 4.3.1. Aislamiento del virus de la viruela ovina y caprina
  - 4.3.2. Identificación del agente causal
  - 4.3.3. Análisis serológico

## 1. INTRODUCCIÓN

La viruela ovina y la viruela caprina son enfermedades víricas de las ovejas y de las cabras que se caracterizan por fiebre, aparición de pápulas o nódulos generalizados, vesículas (en ocasiones muy infrecuentes), lesiones internas (en concreto en los pulmones), y la muerte.

Ambas enfermedades están causadas por cepas de un capripoxvirus. Aunque la mayoría de las cepas examinadas causan la enfermedad clínica en su forma más grave, o bien en las ovejas o bien en las cabras, se han aislado algunas cepas que son igual de patógenas en ambas especies, pudiendo alcanzar un 100% de mortalidad en razas completamente susceptibles. Los virus de la viruela ovina y de la viruela caprina son endémicos en la parte de África situada al norte del ecuador, en Oriente Medio y en Asia, aunque ciertas partes de Europa han experimentado brotes recientemente.

### 1.1. ETIOLOGÍA

El virus de la viruela ovina (VVO) y el virus de la viruela caprina (VVC) son agentes causales de la viruela ovina y caprina, y junto con el virus de la dermatitis nodular contagiosa, configuran el género Capripoxvirus, que pertenece a la familia Poxviridae (virus de ADN).

### 1.2. EPIDEMIOLOGÍA Y TRANSMISIÓN

La viruela ovina y la viruela caprina son endémicas en muchos países de África, de Oriente Medio y de Asia (incluyendo el sur de Rusia y China occidental) y el Subcontinente indio, tan lejos al este como Myanmar.

La viruela ovina y caprina tiene la capacidad de propagarse y establecerse en países fuera de su distribución normal. En 1983 se propagó a Italia, en 1985 y 1989 a Chipre, y en 1988 y en numerosas ocasiones posteriores a Grecia, pero no llegó a establecerse en estos países.

Sin embargo, en 1984 se propagó a Bangladesh donde persiste. Durante la última década se produjeron apariciones más frecuentes en Grecia y en Bulgaria. Actualmente, en 2015 la enfermedad está presente en países que no eran típicamente endémicos, con focos declarados en los últimos años en zonas cercanas a la UE, como es el caso de Turquía y en todo el norte de África en países como Argelia, Marruecos y Túnez, entre otros, lo cual supone un riesgo particularmente importante para nuestro país.

En España no se han declarado focos desde 1968, por lo que es un país con estatus libre de enfermedad

Los animales afectados por la viruela ovina y caprina son sólo ovinos y caprinos. La infección nunca se ha descrito en ungulados silvestres. **La transmisión** del virus se produce frecuentemente **por vía respiratoria**, aunque también puede penetrar en el organismo a través de otras mucosas y erosiones cutáneas y a través de heridas durante el contacto entre los animales infectados y los susceptibles.

El virus se puede encontrar también en la saliva, secreciones nasales y conjuntivales, heces y lesiones cutáneas (costras, nódulos) provocados por pulverizaciones de animales enfermos.

Las principales vías de transmisión son:

- el contacto directo,
- indirecto por instrumentos,
- y contaminación por inhalación, inoculación intradérmica o subcutánea o por vías respiratorias, transcutáneas y a través de las mucosas.

### **1.3. SINTOMAS Y LESIONES**

El período de incubación de los virus de la viruela ovina y de la viruela caprina dura entre 8 y 13 días después del contacto entre un animal infectado y los animales susceptibles. Algunas razas de oveja europea, tal como la Soay, pueden morir de una infección aguda antes de que aparezcan las lesiones cutáneas. En otras razas se produce una elevación inicial de la temperatura rectal por encima de los 40°C, seguida inicialmente, en 2–5 días, por la aparición de máculas<sup>1</sup> y, posteriormente, por la aparición de pápulas<sup>2</sup> que pueden cubrir todo el cuerpo o restringirse a las ingles, las axilas y el periné. Las pápulas pueden estar cubiertas por vesículas llenas de líquido, pero esto es muy infrecuente. Algunos investigadores han distinguido entre una forma vesicular y una nodular de la viruela ovina y la viruela caprina.

Dentro de las 24 horas posteriores a la aparición generalizada de pápulas, los animales afectados presentan rinitis, conjuntivitis y un aumento del tamaño de todos los ganglios linfáticos superficiales, y en concreto de los ganglios preescapulares.

Las pápulas de los párpados producen blefaritis de gravedad variable. Conforme se ulceran las pápulas de las mucosas ocular y nasal, las secreciones se vuelven mucopurulentas, y las mucosas oral, anal y prepucial o vaginal se necrosan.

La respiración se hace pesada y ruidosa por la presión sobre las vías respiratorias altas causada por los ganglios linfáticos retrofaríngeos, que están hinchados como consecuencia de las lesiones pulmonares en desarrollo. Si el animal afectado no muere en esta fase aguda de la enfermedad, las pápulas comienzan a necrosarse a partir de la necrosis isquémica derivada de la formación de trombos en los vasos sanguíneos situados en la base de la pápula.

En los siguientes 5–10 días, las pápulas forman costras que persisten hasta 6 semanas dejando pequeñas cicatrices.

Las lesiones cutáneas son susceptibles al ataque de las moscas, y es frecuente una neumonía secundaria. No es habitual la anorexia a no ser que las lesiones de la boca interfieran físicamente con la alimentación. El aborto es poco frecuente.

En el examen post-mortem, las lesiones cutáneas son a menudo menos manifiestas en el animal con infección aguda que en el animal vivo. Las mucosas aparecen necrosadas y todos los ganglios linfáticos del cuerpo han aumentado de tamaño y están edematosos. Las pápulas,

---

<sup>1</sup> Pequeñas zonas de hiperemia delimitadas que son más evidentes en la piel no pigmentada

<sup>2</sup> Hinchazones duras de entre 0,5 y 1 cm de diámetro

que pueden ulcerarse, se pueden encontrar habitualmente en la mucosa abomasal, y algunas veces en la pared del rumen y del intestino grueso, en la lengua, en el paladar duro y en el blando, en la tráquea y en el esófago.

Ocasionalmente, pueden observarse zonas pálidas de aproximadamente 2 cm de diámetro en la superficie del riñón y del hígado, y se ha descrito su presencia en los testículos. Con frecuencia se observan numerosas lesiones graves de hasta 5 cm de diámetro por todas las partes de los pulmones, pero sobre todo en los lóbulos diafragmáticos.

Los signos clínicos y las lesiones observadas en el examen post-mortem varían considerablemente en función de la raza del hospedador y de la cepa de capripoxvirus. Las razas autóctonas son menos sensibles y, con frecuencia, muestran solo unas pocas lesiones que pueden confundirse con picaduras de insectos o con la dermatitis pustular contagiosa. Sin embargo, se observan con frecuencia casos de animales afectados por viruela ovina o caprina de forma generalizada y a veces mortal en: corderos que han perdido su inmunidad materna; animales a los que se ha mantenido aislados; y animales llevados a zonas endémicas, procedentes de pueblos aislados, en concreto si se les ha sometido al estrés del desplazamiento a largas distancias y se les ha mezclado con otras ovejas y cabras y sus agentes patógenos. Después de la infección con capripoxvirus se produce invariablemente una alta mortalidad en razas ovinas y caprinas importadas sin ninguna protección previa. Ni la viruela ovina ni la caprina son infecciosas para los humanos.

## **2. MARCO LEGAL**

### **2.1. NORMATIVA EUROPEA**

La viruela ovina y caprina se encuentra incluida en la Lista de enfermedades de notificación obligatoria de la Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE), así como en la lista de enfermedades de notificación obligatoria de la Unión Europea. La normativa que le aplica en el marco europeo es la siguiente:

- **Reglamento (UE) 2016/429 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 9 de marzo de 2016**, relativo a las enfermedades transmisibles de los animales y por el que se modifican o derogan algunos actos en materia de sanidad animal («Legislación sobre sanidad animal»).
- **Reglamento de Ejecución (UE) 2018/1882**, relativo a la aplicación de determinadas normas de prevención y control a categorías de enfermedades enumeradas en la lista y por el que se establece una lista de especies y grupos de especies que suponen un riesgo considerable para la propagación de dichas enfermedades de la lista. Conforme a este Reglamento la VOC es categorizada como una enfermedad de categoría A (enfermedad de erradicación inmediata), categoría D (enfermedad con medidas para evitar su propagación) y categoría E (enfermedad con programa de vigilancia).
- **Reglamento de ejecución (UE) 2020/2002**, por el que se establecen normas de desarrollo del Reglamento (UE) 2016/429 del Parlamento Europeo y del Consejo relativas a la notificación a la Unión y al envío de informes a la Unión sobre enfermedades de la lista, al sistema informático de información, así como a los formatos

y los procedimientos de presentación y envío de informes relacionados con los programas de vigilancia y erradicación de la Unión y con la solicitud de reconocimiento del estatus de libre de enfermedad.

- **Reglamento de ejecución (UE) 2021/620**, por el que se establecen normas para la aplicación del Reglamento (UE) 2016/429 del Parlamento Europeo y del Consejo relativas a la aprobación del estatus de libre de enfermedad y el estatus de libre de enfermedad sin vacunación de determinados Estados miembros, zonas o compartimentos de estos en lo que respecta a determinadas enfermedades de la lista y a la aprobación de los programas de erradicación de dichas enfermedades de la lista.
- **Reglamento Delegado (UE) 2020/687**, referente a las normas relativas a la prevención y el control de determinadas enfermedades de la lista.
- **Reglamento Delegado (UE) 2020/688**, referente a los requisitos zoonosarios para los desplazamientos dentro de la Unión de animales terrestres y de huevos para incubar.
- **Reglamento Delegado (UE) 2020/689**, referente a las normas de vigilancia, los programas de erradicación y el estatus de libre de enfermedad con respecto a determinadas enfermedades de la lista y enfermedades emergentes.
- **Reglamento Delegado (UE) 2020/692**, que completa el Reglamento (UE) 2016/429 del Parlamento Europeo y del Consejo en lo referente a las normas para la entrada en la Unión, y para el desplazamiento y la manipulación tras la entrada, de las partidas de determinados animales, productos reproductivos y productos de origen animal.

## **2.2. NORMATIVA NACIONAL**

Las medidas de prevención y lucha contra la enfermedad adoptadas en España se enmarcan en la política de la UE en materia de sanidad animal. El ámbito legal que define todas las actuaciones de lucha frente a la VOC se halla recogido en la siguiente normativa:

- **Ley 8/2003, de 24 de abril, de Sanidad Animal**
- **Real Decreto 526/2014, de 20 de junio**, por el que se establece la lista de las enfermedades de los animales de declaración obligatoria y se regula su notificación.
- **Real Decreto 1440/2001, de 21 de diciembre**, por el que se establece el sistema de alerta sanitaria veterinaria.

## **3. VIGILANCIA DE LA ENFERMEDAD**

La vigilancia que se realiza en España está en línea con las normas establecidas por la OIE y por la normativa comunitaria y es similar a la vigilancia establecida en otros países de la UE.

El hecho de ser un país libre en el que los animales no presentan ninguna inmunidad hace que la vigilancia sea **pasiva**, tanto en animales domésticos como en animales silvestres,

descartando laboratorialmente los casos en que se declara una sospecha clínica por aparición de signos compatibles.

Este tipo de vigilancia se basa y depende de forma importante, de dos elementos esenciales que son: el reconocimiento de los síntomas característicos de la enfermedad y la notificación inmediata a los servicios veterinarios oficiales de cualquier sospecha que se produzca.

Debido a que la vigilancia en España es de tipo pasivo, es básico que los veterinarios de las explotaciones identifiquen rápidamente los síntomas de la enfermedad, y notifiquen la sospecha a los veterinarios oficiales para proceder a la confirmación o no de dicha enfermedad.

En caso de sospecha, el veterinario oficial pondrá la explotación bajo vigilancia oficial, y comprobará el registro, identificación y censado de los animales de las especies sensibles, asegurándose de que coinciden con los anotados en el registro de la explotación.

Del mismo modo, se realizará un examen clínico de los animales y tomará muestras a los animales objeto de sospecha y, si la sospecha no afecta a todos los animales de la explotación, a un número que permita detectar la presencia de la enfermedad para una prevalencia del 5%, con un intervalo de confianza del 95%.

Se realizará **una encuesta epidemiológica** para determinar el origen y la transmisión de dicha enfermedad, y comunicará al propietario de la explotación de las medidas adoptadas (inmovilización del ganado sensible a dicha enfermedad presente en la explotación, restricciones para las especies de animales no sensibles, establecimiento de zonas de protección y de vigilancia...). La encuesta epidemiológica se ampliará a aquellas explotaciones para las que exista riesgo de difusión de la enfermedad.

Estas muestras serán enviadas al laboratorio nacional de referencia para esta enfermedad (Laboratorio Central de Veterinaria de Algete). El laboratorio autorizado como laboratorio nacional de referencia debe cumplir la normativa establecida en el Reglamento 2017/625 de controles y otras actividades oficiales, y contar con el personal, recursos, instalaciones y procedimientos adecuados, así como estar acreditado para las actividades oficiales según la norma ISO 17025/2017.

Tras el informe del laboratorio nacional de referencia, la Comunidad Autónoma correspondiente emitirá un informe a la Subdirección General de Sanidad e Higiene Animal y Trazabilidad, y ésta será la encargada de notificar el foco a la Comisión de la UE, a los demás estados miembros, y a la OIE a través de los medios y plazos establecidos.

La confirmación de la enfermedad conlleva **el sacrificio de todos los animales sensibles**, así como la eliminación de los productos derivados, piensos, camas y demás sustancias que puedan estar contaminados. No será necesario el sacrificio de los animales de especies no sensibles siempre que puedan aislarse, limpiarse y desinfectarse de manera eficaz. Tras el sacrificio se procederá sin demora a realizar las operaciones de limpieza y desinfección

Se regionalizará el territorio nacional en zonas libres y zonas restringidas, previa evaluación epizootica y aprobación de la Comisión, cuando a pesar de las medias adoptadas parezca que la enfermedad se sigue propagando, o en caso de que se decida la vacunación de urgencia.

Existen varias **vacunas de capripoxvirus vivas atenuadas e inactivadas** para proteger a las ovejas y a las cabras contra la viruela ovina y caprina. Los estudios actuales indican que cualquiera de las cepas de capripoxvirus generan inmunidad tras la enfermedad al resto de las cepas. Se están desarrollando vacunas combinadas que protejan frente a la viruela ovina y caprina, peste bovina y peste de los pequeños rumiantes.

#### **4. DIAGNOSTICO DE LABORATORIO**

El diagnóstico de la viruela ovina y caprina no se puede realizar exclusivamente mediante el examen clínico al presentar sintomatología compatible con otras enfermedades. Es imprescindible, por lo tanto, la realización de pruebas laboratoriales para el establecimiento de un diagnóstico definitivo.

Este diagnóstico laboratorial puede llevarse a cabo a través de técnicas serológicas, que detecten la respuesta del sistema inmune frente al capripoxvirus, o aislando e identificando el agente causante de la enfermedad (detectando antígenos o secuencias de ADN específicas). Ya que con el diagnóstico clínico

##### **4.1. DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL**

El diagnóstico diferencial es necesario frente a enfermedades que cursan con una sintomatología parecida. Entre las enfermedades en las que habría que establecer un diagnóstico diferencial se encuentran:

- ectima contagioso (dermatitis pustular contagiosa),
- lengua azul,
- dermatofitosis/estreptotricosis,
- sarna (por ej., sarna psoróptica/sarna ovina),
- fotosensibilización o urticaria,
- peste de los pequeños rumiantes,
- neumonía parasitaria,
- picadura de diversos insectos y
- linfadenitis caseosa.

##### **4.2. REQUERIMIENTOS PARA EL ENVÍO DE LAS MUESTRAS**

Las muestras que se recojan para el diagnóstico dependerán de las técnicas que se vayan a emplear en el laboratorio.

Las muestras para el aislamiento del virus deben recogerse mediante biopsia, o en el examen post-mortem de las pápulas cutáneas, las lesiones pulmonares o los nódulos linfáticos. Sin embargo, para el examen histológico, las muestras deben incluir **tejido procedente de las zonas circulantes**, y ser sumergidas en formalina al 10% inmediatamente tras su recogida en un volumen que sea 10 veces el volumen de la muestra.

Para los estudios de serología se recogerá una muestra de **sangre sin anticoagulante**

También pueden recogerse **muestras de sangre** con anticoagulante para aislar el virus de la capa leucocitaria durante la fase virémica de la infección.

La preparación y envío de la muestra debe prepararse cumpliendo con la normativa de bioseguridad, para evitar la dispersión del agente infeccioso al medio ambiente y el contagio al personal que pueda estar en contacto. Las muestras para el aislamiento del virus y los sueros deben enviarse en un paquete con triple envase, **marcado con el código UN3373** de sustancias biológica de **categoría B**, cumpliendo la **normativa P650 de embalajes** y junto con la documentación correspondiente. Las muestras deben mantenerse a 4°C durante 2 días como máximo. Los tejidos en formalina pueden enviarse a temperatura ambiente.

### 4.3. TECNICAS DE LABORATORIO

#### 4.3.1. Aislamiento del virus

El capripoxvirus crece en cultivos de células de origen bovino, ovino y caprino, aunque se considera que los cultivos primarios y secundarios de células de testículo (LT) o de riñón (LK) de cordero son las más susceptibles.

El virus aislado de las muestras obtenidas de los animales sospechosos se inoculara sobre un cultivo de células con un 90% de confluencia, y se deja que adsorba durante 1 hora a 37°C. Posteriormente se lava y se cubre con medio adecuado que contenga antibióticos y suero fetal bovino.

Los cultivos se incuban durante 7-14 días, observando periódicamente la aparición de efecto citopático. Si antes de 7 días no se observa efecto citopático, se congelará y descongelará el cultivo tres veces, y se inoculará en un cultivo de células fresco.

#### 4.3.2. Identificación del agente causal

Se puede identificar el capripoxvirus aislado en el cultivo celular fijando las muestras del cultivo con acetona, y tiñéndolas con Hematoxilina-Eosina. **La presencia de cuerpos de inclusión intracitoplasmáticos eosinófilos** que son de tamaño variable, pero que pueden medir hasta la mitad del tamaño del núcleo y están rodeados por un halo transparente, es indicativa de la infección por el virus de la viruela ovina y la viruela caprina.

El método más extendido para la identificación del agente causal es la amplificación por **PCR**, ya que es la más sensible para la detección a lo largo de todo el curso de la enfermedad, tanto antes como después de la aparición de las respuestas de anticuerpos.

Para desarrollar esta técnica es imprescindible identificar secuencias específicas del capripoxvirus. Puede emplearse la técnica de PCR convencional, PCR a tiempo real, o realizar una secuenciación de la región amplificada para analizar la cepa detectada y su evolución a través de análisis filogenéticos.

La técnica de PCR convencional consiste en amplificar una región específica del capripoxvirus. Para ello es necesario disponer de unos cebadores que flaqueen la región a amplificar, así como la enzima polimerasa, su buffer correspondiente y los dNTPS que son los que se irán uniendo a cada ciclo de amplificación.

La reacción de amplificación se lleva a cabo en termocicladores programados para controlar el tiempo y temperatura necesarios en cada fase de la reacción de amplificación (desnaturalización, hibridación y elongación).

Una vez terminada la amplificación, el resultado se puede analizar en una electroforesis en gel de agarosa, o electroforesis capilar. En aquellas muestras en las que estuviera presente el agente infeccioso se observará amplificación; mientras que las muestras negativas no lo habrá.

Para cumplir con la normativa de calidad según la ISO17025:2017, será necesario tener todos los equipos empleados correctamente calibrados, así como contar con material de referencia adecuado, e incluir en cada ensayo controles tanto negativos como positivos para considerar los resultados válidos.

Otras técnicas menos empleadas podrían ser las pruebas con anticuerpos específicos frente a antígenos del virus marcado tanto con enzimas (**ELISA**) o con **fluorocromos**.

#### **4.3.3. Diagnóstico serológico**

Estas técnicas permiten detectar la respuesta del sistema inmune generada tras el contacto con el agente patógeno.

La **neutralización vírica** es la técnica más empleada. Un suero problema se puede titular bien frente a un título constante de capripoxvirus (100 DICT50 [dosis infectiva 50% en cultivo tisular]) o bien una cepa de un virus de referencia se puede titular frente a una dilución constante de suero problema para calcular un índice de neutralización.

El método preferido es el índice de neutralización debido a la sensibilidad variable de los cultivos de tejidos a capripoxvirus, y la consecuente dificultad para garantizar el uso de 100 DICT50, aunque no requiere un volumen mayor de sueros problema. Se ha descrito que el uso de células Vero en la prueba de neutralización de virus produce resultados más constantes.

El procedimiento consiste en realizar diluciones seriadas de los sueros problema, incluyendo un suero control positivo y otro negativo. Estos sueros se inactivan a 56°C durante 30 minutos,

y se distribuyen en la placa de análisis. A continuación, se añade la cepa de referencia a una concentración determinada sobre cada pocillo, y se incuba durante 1 hora a 37°C.

Se preparan células susceptibles a capripoxvirus sobre cada pocillo. Estas placas se incuban a 37°C durante 9 días, analizando periódicamente la presencia de efecto citopático con un microscopio invertido. La presencia de efecto citopático en los pocillos será indicativo de la ausencia de anticuerpos neutralizantes en la muestra, y por tanto la ausencia de infección en dicho individuo.

El índice de neutralización es la diferencia entre el logaritmo del título vírico en un suero negativo y el del suero problema. Un índice  $\geq 1,5$  se considera positivo. La prueba puede hacerse más sensible si se examina el suero del mismo animal antes y después de la infección.

También se puede detectar la presencia de anticuerpos a través de técnicas de **inmunofluorescencia, AGID, ELISA o enzoinmunoanálisis**, pero estas técnicas resultan menos específicas, al poder dar reacciones cruzadas con otros agentes infecciosos.

MATERIAL NO OFICIAL

## **BIBLIOGRAFÍA**

Carrasco L, Almendral JM 2006. Virus patógenos.

<https://www.fbbva.es/publicaciones/virus-patogenos/>

Manual terrestre OIE 2018. Capítulo 3.8.12. Viruela Ovina y Viruela Caprina.

[fmd with viaa test incl. \(woah.org\)](http://www.woah.org)

Manual práctico de operaciones en la lucha contra la viruela ovina y caprina (voc). Nov 2019

Página web del Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación:

[https://www.mapa.gob.es/es/ganaderia/temas/sanidad-animal-higiene-ganadera/sanidad-animal/enfermedades/viruela-ovina-caprina/viruela\\_ovina\\_caprina.aspx](https://www.mapa.gob.es/es/ganaderia/temas/sanidad-animal-higiene-ganadera/sanidad-animal/enfermedades/viruela-ovina-caprina/viruela_ovina_caprina.aspx)

MATERIAL NO OFICIAL

**MATERIAL PARA LA PREPARACIÓN DEL TEMA 61**

**DERMATOSIS NODULAR CONTAGIOSA. MARCO LEGAL. VIGILANCIA.  
DIAGNÓSTICO DE LABORATORIO**

*Este material no tiene carácter oficial, por lo que en ningún caso vinculará al Tribunal Calificador. Constituye, únicamente, un instrumento complementario que servirá de apoyo al opositor para enfocar cada uno de los epígrafes, pero nunca de forma exclusiva ni excluyente. El Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación no se hace responsable del contenido del mismo.*

*Los materiales no serán objeto de actualización constante.*

## **ÍNDICE**

### **1. INTRODUCCIÓN.**

- 1.1. ETIOLOGÍA
- 1.2. EPIDEMIOLOGÍA Y TRANSMISIÓN
- 1.3. SÍNTOMAS Y LESIONES
- 1.4. PROFILAXIS

### **2. MARCO LEGAL**

- 2.1. NORMATIVA EUROPEA
- 2.2. NORMATIVA NACIONAL

### **3. VIGILANCIA DE LA ENFERMEDAD**

### **4. DIAGNÓSTICO DE LABORATORIO**

- 4.1. DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL
- 4.2. REQUERIMIENTO PARA EL ENVÍO Y PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS
- 4.3. TÉCNICAS LABORATORIALES
  - 4.3.1. Aislamiento del virus de la viruela ovina y caprina
  - 4.3.2. Identificación del agente causal
  - 4.3.3. Análisis serológico

## **1. INTRODUCCIÓN**

La dermatosis nodular contagiosa (DNC) es una enfermedad del ganado bovino causada por un poxvirus, caracterizada por la presentación de un cuadro febril, nódulos en la piel, en las mucosas y en los órganos internos, caquexia, aumento de tamaño de los ganglios linfáticos, edema cutáneo y, a veces, la muerte.

La enfermedad tiene importancia económica porque causa un descenso temporal en la producción de leche, esterilidad temporal o irreversible en los toros, daños en la piel y, ocasionalmente, la muerte. Distintas cepas de capripoxvirus son responsables de esta enfermedad, que son antigénicamente indistinguibles de las que causan la viruela de la oveja y de la cabra, pero claramente distintas a nivel genético. La dermatosis nodular contagiosa tiene una distribución geográfica en parte distinta a la de la viruela ovina y caprina, lo cual sugiere que las cepas bovinas de capripoxvirus no infectan ni se transmiten a las ovejas y las cabras. Se estima que la transmisión del virus productor de la dermatosis nodular contagiosa se efectúa predominantemente por medio de los artrópodos, y que la transmisión natural por contacto, en ausencia de vectores, es ineficaz.

### **1.1. ETIOLOGÍA**

El virus de la dermatosis nodular contagiosa (VDNC) pertenece a la familia Poxviridae, subfamilia Chordopoxviridae, género Capripoxvirus. Al igual que otros poxvirus, el VDNC se replica en el citoplasma de una célula infectada, constituyendo diversos puntos de replicación vírica perinucleares. El virión de la DNC es grande y tiene forma de ladrillo. La estructura del genoma del VDNC también es similar a la de otros poxvirus; con ADN lineal bicatenario, en cuya región central contiene ORF (marco abierto de lectura-open Reading frame) que se predice que codifican proteínas requeridas para la replicación y morfogénesis del virus y que muestran un alto grado de similitud con los genomas de otros poxvirus de mamíferos. Los ORF de las regiones externas del genoma del VDNC tienen menor similitud y probablemente codifican proteínas involucradas en la virulencia vírica y determinantes del rango de hospedadores.

### **1.2. EPIDEMIOLOGÍA Y TRANSMISIÓN**

Hasta 1988, esta enfermedad se limitaba al África sub-sahariana, pero luego se extendió a Egipto. Hasta 2015, sólo se había confirmado en laboratorio un brote de DNC fuera de África, en 1989 en Israel, que se eliminó por sacrificio de todos los animales infectados o en contacto con ellos y por vacunación.

En 2013 se confirmó la entrada de la enfermedad a Turquía, siendo la enfermedad actualmente endémica allí, y habiéndose expandido al oeste a otros países de la región de los Balcanes. Por otro lado, la enfermedad también se extendió desde Oriente Medio a Armenia,

pasando desde ahí a Daguestán, provincia de la Federación Rusa en 2015, suponiendo la primera incursión de la DNC en Rusia.

En España no se han declarado nunca focos de Dermatitis Nodular Contagiosa por lo que es un país libre de esta enfermedad.

Según la información publicada por la OIE, desde comienzos de 2021 la enfermedad está presente en Arabia Saudí, Bután, Camboya, Rep. Pop. De China, Djibouti, Hong Kong, India, Iraq, Laos, Malasia, Mozambique, Myanmar, Namibia, Nepal, Sri Lanka, Tailandia, Tapei Chino, Turquía y Vietnam.

Los animales afectados por la dermatitis nodular contagiosa son los bovinos: *Bos taurus*, cebúes y búfalos domésticos.

Los orices (*Oryx beisa*), jirafas (*Giraffe camelo-pardalis*) e impalas (*Aepyceros melampus*) son susceptibles a la infección experimental, pero la incidencia en la fauna salvaje aún **debe** ser dilucidada. El virus de la dermatitis nodular contagiosa se reproduce también en los ovinos y caprinos después de ser inoculado.

La transmisión del virus no se produce en ausencia de un insecto vector. A pesar de que hasta la fecha no se ha identificado ningún vector en particular, los mosquitos (por ejemplo: *Culex mirificens* y *Aedes natrionus*) y las moscas (por ejemplo: *Stomoxys calcitrans* y *Biomyia fasciata*) pueden jugar un papel muy importante.

Del mismo modo, las garrapatas pueden jugar un papel importante en la transmisión y mantenimiento de la enfermedad, dado que se ha descrito la posibilidad de transmisión trasestadial y trasovárica en algunas especies de garrapata. La transmisión mecánica directa por medio de costras y lesiones cutáneas, saliva, leche, etc., parece resultar una vía menos eficaz.

### **1.3. SÍNTOMAS Y LESIONES**

La gravedad de los síntomas de la dermatitis nodular contagiosa es muy variable, y depende de varios factores:

- como la cepa del virus,
- la edad,
- el estado inmunitario,
- y la raza del hospedador.

Incluso dentro de grupos de ganado de la misma raza, mantenidos juntos en las mismas condiciones, presentan una gran variabilidad de los signos clínicos, que van de una infección subclínica a la muerte.

No se ha descrito el período de incubación en condiciones de campo, pero, después de una inoculación experimental, es de 6 o 9 días hasta la aparición de la fiebre.

En animales con una infección aguda, se presenta una fiebre inicial que puede superar los 41°C y persistir durante una semana. Todos los ganglios linfáticos superficiales presentan aumento de tamaño. En el ganado lechero en lactación, se produce una considerable reducción de la producción de leche.

Aparecen lesiones por todo el cuerpo, en concreto por la cabeza, cuello, ubres, escroto, vulva y periné entre 7 y 19 días después de la inoculación del virus. Las lesiones integumentarias características son pápulas y nódulos múltiples, entre circunscritos y confluyentes, de 0,5-5 cm de diámetro, duros y de superficie plana. Los nódulos afectan la dermis y la epidermis, y pueden alcanzar el tejido subcutáneo y en ocasiones el músculo estriado adyacente.

El interior de estos nódulos es de un color gris cremoso a blanco, e inicialmente pueden exudar suero, pero a lo largo de las 2 semanas siguientes puede aparecer una zona central o secuestro de forma crónica que consiste en un tapón necrótico dentro del nódulo.

Las lesiones histológicas agudas consisten en alteraciones vacuolares epidérmicas con cuerpos de inclusión intracitoplasmáticos y vasculitis dérmica. Los cuerpos de inclusión son numerosos, intracitoplasmáticos, eosinofílicos, homogéneos a granulares en ocasiones y pueden tener lugar en células endoteliales, fibroblastos, macrófagos, pericitos y queratinocitos.

Las lesiones dérmicas consisten en vasculitis con necrosis fibrinoide, edema, trombosis, linfangitis, separación dérmica-epidérmica e infiltrado inflamatorio mixto. Las lesiones crónicas se caracterizan por un tejido infartado con un centro necrótico secuestrado, a menudo ribeteado por tejido de granulación que es desplazado progresivamente por fibrosis madura.

En el momento en que aparecen los nódulos, la secreción ocular y la rinorrea se vuelven mucopurulentas, y puede aparecer queratitis. También pueden aparecer nódulos en las mucosas de la boca y del tracto digestivo, en concreto en el abomaso y en la tráquea y los pulmones, lo cual da lugar a neumonía primaria y secundaria. Los nódulos de las mucosas ocular, nasal, oral, rectal, mamaria y genital se ulceran rápidamente, y para entonces todas las secreciones, la ocular y la nasal, así como la saliva, contienen el virus de la dermatosis nodular contagiosa.

Las patas pueden presentar edema y el animal no tolerará el movimiento. Las vacas gestantes pueden abortar, y existe un informe de transmisión intrauterina. Los toros pueden quedar infértiles de manera temporal o irreversible y el virus puede excretarse en el semen durante largos periodos de tiempo. La recuperación del animal tras una infección grave es lenta; el animal queda caquéctico, puede sufrir neumonía y mastitis, y las obstrucciones necróticas de la piel, que pueden haber sufrido la invasión de moscas, se desprenden dejando profundos agujeros.

#### **1.4. PROFILAXIS**

Hasta la aparición por primera vez de la enfermedad en territorio de la UE en 2015, en la UE no estaba autorizada la aplicación de la vacunación como medida preventiva frente a DNC ante la amenaza de su llegada al territorio de un país miembro. La Comisión Europea sólo autorizaba la aplicación de la vacunación de emergencia tras la valoración de la situación epidemiológica.

Las reservas de las autoridades europeas frente a la vacunación preventiva de DNC en los países hasta ahora libres se basan en la suposición de que la enfermedad introducida puede ser erradicada mediante la aplicación de medidas de sacrificio sanitario en combinación con otras medidas sanitarias, que incluyen el uso de insecticidas o repelentes.

Debido a que no existe vacunación preventiva en el continente europeo, contener la enfermedad sería difícil en caso de aparición de brotes. Por ello, la Comisión Europea ha establecido una serie de medidas (Reglamento de ejecución 2021/1070) en aquellos países considerados en riesgo por su cercanía a países no libres como Rusia o Asia oriental, continuando con la vacunación, control de movimientos y la vigilancia tanto activa como pasiva en países como Bulgaria o Grecia, siendo estas medidas de aplicación hasta el 21 de abril del 2023.

El uso de la vacunación como medida de control de la dermatosis nodular contagiosa está prohibida en España, pero tras el brote de los Balcanes se ha observado que el vaciado sanitario por sí solo no es suficiente para frenar el avance de la enfermedad. Según un informe de EFSA, la estrategia de control más efectiva en las zonas infectadas consiste en la vacunación combinada con el sacrificio total de las explotaciones afectadas, y la vacunación preventiva en las zonas consideradas de riesgo por su proximidad a zonas afectadas.

Todas las cepas de Capripoxvirus examinadas hasta ahora comparten un sitio de neutralización principal, de forma que los animales recuperados de la infección con una cepa son resistentes a la infección por cualquiera de las otras, aunque no es 100% efectiva en todos los casos. Actualmente todas las vacunas disponibles son vacunas vivas atenuadas. Se acepta que las vacunas frente a la viruela ovina y caprina (vacunas heterólogas), aunque inducen cierta inmunidad cruzada, no son eficaces en un nivel adecuado, estando sólo recomendado su utilización en países endémicos en ambas enfermedades.

Se está elaborando una nueva generación de vacunas que utiliza el genoma de Capripoxvirus como vector para los genes de otros patógenos de rumiantes, como los genes de los virus de la peste bovina y de la peste de los pequeños rumiantes.

La vacuna recombinante proporcionará protección contra la Viruela Ovin y Caprina, la Dermatitis nodular contagiosa, la Peste bovina y la Peste de los Pequeños rumiantes en una sola vacuna.

Ninguna vacuna previene la infección y muchos de los animales vacunados pueden desarrollar lesiones propias de la enfermedad. Sin embargo, si la enfermedad pasa desapercibida y adquiere una amplia difusión en un país la vacunación puede hacerse imprescindible para acabar con el brote, de otra manera puede ser difícil sino imposible llegar a este objetivo de

erradicación. Aunque están en desarrollo vacunas inactivadas con las que poder aplicar estrategias DIVA, aún no están disponibles, siendo por el momento imposible diferenciar animales infectados de animales vacunados. Por otro lado, existen problemas para diferenciar anticuerpos frente a la viruela ovina y caprina de los inducidos por el virus de la dermatosis nodular contagiosa.

## **2. MARCO LEGAL**

### **2.1. NORMATIVA EUROPEA**

La dermatosis nodular contagiosa se encuentra incluida en la Lista de enfermedades de notificación obligatoria de la Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE), así como en la lista de enfermedades de notificación obligatoria de la Unión Europea. La normativa que le aplica en el marco europeo es la siguiente:

- **Reglamento (UE) 2016/429 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 9 de marzo de 2016**, relativo a las enfermedades transmisibles de los animales y por el que se modifican o derogan algunos actos en materia de sanidad animal («Legislación sobre sanidad animal»).
- **Reglamento de Ejecución (UE) 2018/1882**, relativo a la aplicación de determinadas normas de prevención y control a categorías de enfermedades enumeradas en la lista y por el que se establece una lista de especies y grupos de especies que suponen un riesgo considerable para la propagación de dichas enfermedades de la lista. Conforme a este Reglamento la VOC es categorizada como una enfermedad de categoría A (enfermedad de erradicación inmediata), categoría D (enfermedad con medidas para evitar su propagación) y categoría E (enfermedad con programa de vigilancia).
- **Reglamento de ejecución (UE) 2020/2002**, por el que se establecen normas de desarrollo del Reglamento (UE) 2016/429 del Parlamento Europeo y del Consejo relativas a la notificación a la Unión y al envío de informes a la Unión sobre enfermedades de la lista, al sistema informático de información, así como a los formatos y los procedimientos de presentación y envío de informes relacionados con los programas de vigilancia y erradicación de la Unión y con la solicitud de reconocimiento del estatus de libre de enfermedad.
- **Reglamento de ejecución (UE) 2021/620**, por el que se establecen normas para la aplicación del Reglamento (UE) 2016/429 del Parlamento Europeo y del Consejo relativas a la aprobación del estatus de libre de enfermedad y el estatus de libre de enfermedad sin vacunación de determinados Estados miembros, zonas o compartimentos de estos en lo que respecta a determinadas enfermedades de la lista y a la aprobación de los programas de erradicación de dichas enfermedades de la lista.
- **Reglamento Delegado (UE) 2020/687**, referente a las normas relativas a la prevención y el control de determinadas enfermedades de la lista.

- **Reglamento Delegado (UE) 2020/688**, referente a los requisitos zoonos sanitarios para los desplazamientos dentro de la Unión de animales terrestres y de huevos para incubar.
- **Reglamento Delegado (UE) 2020/689**, referente a las normas de vigilancia, los programas de erradicación y el estatus de libre de enfermedad con respecto a determinadas enfermedades de la lista y enfermedades emergentes.
- **Reglamento Delegado (UE) 2020/692**, que completa el Reglamento (UE) 2016/429 del Parlamento Europeo y del Consejo en lo referente a las normas para la entrada en la Unión, y para el desplazamiento y la manipulación tras la entrada, de las partidas de determinados animales, productos reproductivos y productos de origen animal.

## **2.2. NORMATIVA NACIONAL**

Las medidas de prevención y lucha contra la enfermedad adoptadas en España se enmarcan en la política de la UE en materia de sanidad animal. El ámbito legal que define todas las actuaciones de lucha frente a la VOC se halla recogido en la siguiente normativa:

- **Ley 8/2003, de 24 de abril, de Sanidad Animal**
- **Real Decreto 526/2014, de 20 de junio**, por el que se establece la lista de las enfermedades de los animales de declaración obligatoria y se regula su notificación.
- **Real Decreto 1440/2001, de 21 de diciembre**, por el que se establece el sistema de alerta sanitaria veterinaria.

## **3. VIGILANCIA DE LA ENFERMEDAD**

La vigilancia que se realiza en España está en línea con las normas establecidas por la OIE y por la normativa comunitaria y es similar a la vigilancia establecida en otros países de la UE.

El hecho de ser un país libre en el que los animales no presentan ninguna inmunidad hace que la vigilancia sea de tipo **pasivo**, tanto en animales domésticos como en animales silvestres, descartando laboratorialmente los casos en que se declara una sospecha clínica por aparición de signos compatibles.

Este tipo de vigilancia se basa y depende de forma importante, de dos elementos esenciales que son: el reconocimiento de los síntomas característicos de la enfermedad y la notificación inmediata a los servicios veterinarios oficiales de cualquier sospecha que se produzca.

Debido a que la vigilancia en España es de tipo pasivo, es básico que los veterinarios de las explotaciones identifiquen rápidamente los síntomas de la enfermedad, y notifiquen la sospecha a los veterinarios oficiales para proceder a la confirmación o no de dicha enfermedad.

En caso de sospecha, el veterinario oficial pondrá la explotación bajo vigilancia oficial, y comprobará el registro, identificación y censado de los animales de las especies sensibles, asegurándose de que coinciden con los anotados en el registro de la explotación.

Del mismo modo, se realizará un examen clínico de todos los animales y tomará muestras a los animales objeto de sospecha y, si la sospecha no afecta a todos los animales de la explotación, a un número que permita detectar la presencia de la enfermedad para una prevalencia del 5%, con un intervalo de confianza del 95%. Estas muestras serán enviadas al laboratorio nacional de referencia para esta enfermedad (Laboratorio Central de Veterinaria).

Se realizará una encuesta epidemiológica para determinar el origen y la transmisión de dicha enfermedad, y comunicará al propietario de la explotación de las medidas adoptadas (inmovilización del ganado sensible a dicha enfermedad presente en la explotación, restricciones para las especies de animales no sensibles, establecimiento de zonas de protección y de vigilancia...).

La confirmación de la enfermedad solo podrá hacerse por métodos laboratoriales. El laboratorio autorizado como laboratorio nacional de referencia debe cumplir la normativa establecida en el Reglamento 2017/625 de controles y otras actividades oficiales, y contar con el personal, recursos, instalaciones y procedimientos adecuados, así como estar acreditado para las actividades oficiales según la norma ISO 17025/2017.

Tras el informe del laboratorio nacional de referencia, la Comunidad Autónoma correspondiente emitirá un informe a la Subdirección General de Sanidad e Higiene Animal y Trazabilidad, y ésta será la encargada de notificar el foco a la Comisión de la UE, a los demás estados miembros, y a la OIE a través de los medios y plazos establecidos.

La confirmación de la enfermedad conlleva el sacrificio de todos los animales sensibles, así como la eliminación de los productos derivados, piensos, camas y demás sustancias que puedan estar contaminados. No será necesario el sacrificio de los animales de especies no sensibles siempre que puedan aislarse, limpiarse y desinfectarse de manera eficaz. Tras el sacrificio se procederá sin demora a realizar las operaciones de limpieza y desinfección. La encuesta epidemiológica se ampliará a aquellas explotaciones para las que exista riesgo de difusión de la enfermedad.

La presencia de vectores resulta de gran importancia para que se pueda producir la transmisión de la enfermedad y su mantenimiento. Por tanto, de manera especial en épocas de máxima actividad del vector es necesario el uso de productos con acción desinsectante o repelente, con el fin de controlar la presencia y actividad del mismo en entornos ganaderos y en los propios animales.

Se regionalizará el territorio nacional en zonas libres y zonas restringidas, previa evaluación epizootica y aprobación de la Comisión, cuando a pesar de las medidas adoptadas parezca que la enfermedad se sigue propagando, adquiriendo la epizootia un carácter importante, o en caso de que se decida la vacunación de urgencia.

Dentro de las zonas restringidas se controlará el transporte y movimiento de animales de especies sensibles, productos y mercancías animales, así como de medios de transporte; se localizarán y marcarán los productos como carnes frescas y leche cruda que no puedan expedirse fuera de la zona restringida; se certificarán específicamente los animales de especies sensibles y sus productos, marcándose adecuadamente aquellos de consumo

humano destinados a su expedición fuera de la zona restringida y que cumplan con las condiciones de expedición.

Además, se localizarán los animales de especies sensibles expedidos desde la zona restringida hacia otros Estados miembros entre la fecha en la que se calcula que se introdujo el virus y la fecha en que se aplique la regionalización, para que dichos animales se aislen bajo control veterinario oficial hasta que se descarte oficialmente su posible infección. Del mismo modo se localizarán las carnes frescas y leche y productos lácteos crudos derivados de animales de especies sensibles producidos en la zona restringida entre la fecha en la que se calcula que se introdujo el virus y la fecha en que se aplique la regionalización.

#### **4. DIAGNOSTICO DE LABORATORIO**

El diagnóstico de la DNC no se puede realizar exclusivamente mediante el examen clínico al presentar sintomatología compatible con otras enfermedades. Es imprescindible, por lo tanto, la realización de pruebas laboratoriales para el establecimiento de un diagnóstico definitivo.

El diagnóstico de la dermatosis nodular contagiosa puede llevarse a cabo aislando e identificando el agente causante de la enfermedad (detectando antígenos o secuencias de ADN específicas), o a través de técnicas serológicas, que detecten la respuesta del sistema inmune frente al capripoxvirus.

##### **4.1. DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL**

El diagnóstico diferencial es necesario frente a enfermedades que cursan con una sintomatología parecida. Entre las enfermedades en las que habría que establecer un diagnóstico diferencial se encuentran:

- pseudodermatitis nodular contagiosa/mamilitis bovina,
- dermatofilosis,
- Dermatophytosis,
- picaduras de insectos o garrapatas,
- besnoitiosis,
- infección de Hypoderma bovis,
- fotosensibilidad,
- estomatitis papular bovina,
- urticaria y
- tuberculosis cutánea.

La mayoría de estas enfermedades pueden distinguirse de la dermatosis nodular contagiosa por los signos clínicos, incluso la duración de la enfermedad, al igual que por la histopatología y otras pruebas de laboratorio.

## 4.2. REQUERIMIENTOS PARA EL ENVÍO DE LAS MUESTRAS

Las muestras que se recojan para el diagnóstico dependerán de las técnicas que se vayan a emplear en el laboratorio.

Las muestras para el aislamiento del virus deben recogerse de los **nódulos de la piel, lesiones pulmonares o nódulos linfáticos** mediante biopsia o post-mortem. Las muestras para el aislamiento deben obtenerse preferiblemente en el plazo de una semana tras la aparición de los síntomas, antes de que se desarrollen los anticuerpos neutralizantes.

También se puede aislar el virus de la capa leucocitaria de **sangre recogida con anticoagulante**.

Para el **examen histológico**, las muestras deben incluir la lesión y el tejido del área adyacente, sumergido en formalina inmediatamente tras su recogida en un volumen 10 veces superior al volumen de la muestra.

Para los estudios de serología se recogerá una **muestra de sangre sin anticoagulante**.

La preparación y envío de la muestra debe prepararse cumpliendo con la normativa de bioseguridad, para evitar la dispersión del agente infeccioso al medio ambiente y el contagio al personal que pueda estar en contacto. Las muestras para el aislamiento del virus y los sueros deben enviarse en un paquete con triple envase, **marcado con el código UN3373** de sustancias biológica de **categoría B**, cumpliendo la **normativa P650 de embalajes** y junto con la documentación correspondiente. Las muestras deben mantenerse a 4°C durante 2 días como máximo. Los tejidos en formalina pueden enviarse a temperatura ambiente.

## 4.3. TÉCNICAS DE LABORATORIO

### 4.3.1. Aislamiento del virus

El virus de la dermatosis nodular contagiosa crece en cultivos de tejidos de origen bovino, ovino y caprino. A menudo se utilizan células MDBK (de riñón bovino Madin-Draby) puesto que permiten un buen crecimiento del virus y están bien caracterizadas. Las células primarias, como las de testículos de cordero (LT) también permiten el crecimiento del virus, pero debe asegurarse que no estén contaminadas por virus como el de la diarrea vírica bovina.

El virus aislado de las muestras obtenidas de los animales sospechosos se inocula sobre un cultivo de células con un 90% de confluencia, y se deja que adsorba durante 1 hora a 37°C. Posteriormente se lava y se cubre con medio adecuado que contenga antibióticos y suero fetal bovino.

Los cultivos se incuban durante 7-14 días, observando periódicamente la aparición de efecto citopático. Las células infectadas desarrollan un efecto citopático característico que consiste en la retracción de la membrana celular de las células circundantes, y finalmente en un redondeamiento de las células y la marginación de la cromatina nuclear. Si después de 14 días no se observa efecto citopático, se congelará y descongelará el cultivo tres veces y, una vez clarificado el sobrenadante, se inocula en una monocapa celular fresca.

#### 4.3.2. Identificación del agente causal

Se puede identificar el capripoxvirus aislado en el cultivo celular fijando las muestras del cultivo con acetona, y tiñéndolas con Hematoxilina-Eosina. **La presencia de cuerpos de inclusión citoplasmáticos que sean eosinófilos**, variables en tamaño pero que pueden ser como la mitad del núcleo y rodeados por un halo claro, constituye un diagnóstico de infección por poxvirus. La PCR puede emplearse como alternativa a la hematoxilina-eosina para la confirmación del diagnóstico.

Para desarrollar la técnica de **PCR** es imprescindible identificar secuencias específicas del virus de la dermatosis nodular contagiosa. Puede emplearse la técnica de PCR convencional, PCR a tiempo real, o realizar una secuenciación de la región amplificada para analizar la cepa detectada y su evolución a través de análisis filogenéticos.

La técnica de PCR convencional consiste en amplificar una región específica del capripoxvirus. Para ello es necesario disponer de unos cebadores que flaqueen la región a amplificar, así como la enzima polimerasa, su buffer correspondiente y los dNTPS que son los que se irán uniendo a cada ciclo de amplificación.

La reacción de amplificación se lleva a cabo en termocicladores programados para controlar el tiempo y temperatura necesarios en cada fase de la reacción de amplificación (desnaturalización, hibridación y elongación).

Una vez terminada la amplificación, el resultado se puede analizar en una electroforesis en gel de agarosa, o electroforesis capilar. En aquellas muestras en las que estuviera presente el agente infeccioso se observará amplificación; mientras que las muestras negativas no lo habrá.

Para cumplir con la normativa de calidad según la ISO17025:2017, será necesario tener todos los equipos empleados correctamente calibrados, así como contar con material de referencia adecuado, e incluir en cada ensayo controles tanto negativos como positivos para considerar los resultados válidos.

Otra técnica para identificar el agente infeccioso puede ser la **prueba de inmunofluorescencia**. Para evitar reacciones inespecíficas en esta técnica se deben incluir muestras de tejidos no infectados como control negativo.

#### 4.3.3. Diagnóstico serológico

Todos los virus del género Capripoxvirus comparten un antígeno común importante para los anticuerpos neutralizantes y por tanto no es posible diferenciar las cepas del capripoxvirus del ganado bovino, las ovejas y las cabras utilizando técnicas serológicas.

La **neutralización vírica** es la técnica más empleada. Un suero problema se puede titular frente a una concentración constante de capripoxvirus (100 DICT50 [dosis infectiva 50% en cultivo de tejidos]) o bien una cepa estándar de virus se puede titular frente a una dilución constante del suero problema para calcular el índice de neutralización. Debido a variaciones en la sensibilidad del cultivo de tejidos a los capripoxvirus y la consiguiente dificultad de asegurar

una siembra exacta y repetible 100 DICT50/pocillo, el método preferido en la mayoría de los laboratorios es el índice de neutralización, aunque ello requiere un mayor volumen de sueros problema.

El procedimiento consiste en realizar diluciones seriadas de los sueros problema, incluyendo un suero control positivo y otro negativo. Estos sueros se inactivan a 56°C durante 30 minutos, y se distribuyen en la placa de análisis. A continuación, se añade la cepa de referencia a una concentración determinada sobre cada pocillo, y se incuba durante 1 hora a 37°C. A partir de monocapas cultivadas con anterioridad se prepara una suspensión celular adecuada, y se añaden a los pocillos.

Es importante dejar determinados pocillos control para analizar la viabilidad del virus, de las células o la citotoxicidad del medio. Estas placas se incuban a 37°C durante 9 días, analizando periódicamente la presencia de efecto citopático con un microscopio invertido. La presencia de efecto citopático en los pocillos será indicativa de la ausencia de anticuerpos neutralizantes en la muestra.

El índice de neutralización es el logaritmo del título de la diferencia entre el título del virus en el suero negativo y en el suero problema. Un índice  $\geq 1,5$  se considera positivo. La prueba se puede hacer más sensible si se examina el suero del mismo animal antes y después de la infección. Debido a que la inmunidad a los capripoxvirus está predominantemente mediada por células, un resultado negativo, en especial después de una vacunación en la que la respuesta puede ser baja, no implica que el animal del que deriva el suero no esté protegido. Pueden detectarse anticuerpos frente al capripoxvirus desde 1 a 2 días después de la aparición de los signos clínicos. Permanecen detectables durante unos 7 meses.

También se puede detectar la presencia de anticuerpos a través de **técnicas de inmunofluorescencia, AGID, ELISA o enzimoimmunoanálisis.**

## BIBLIOGRAFÍA

Carrasco L, Almendral JM 2006. Virus patógenos.

<https://www.fbbva.es/publicaciones/virus-patogenos/>

Manual terrestre OIE 2021. Capítulo 3.4.12. Dermatitis nodular contagiosa.

[fmd with viaa test incl. \(woah.org\)](https://www.woah.org/)

Manual práctico de operaciones en la lucha contra la dermatitis nodular contagiosa. Nov 2019.

[https://www.mapa.gob.es/es/ganaderia/temas/sanidad-animal-higiene-ganadera/manualpracticodncnov2019\\_tcm30-111222.pdf](https://www.mapa.gob.es/es/ganaderia/temas/sanidad-animal-higiene-ganadera/manualpracticodncnov2019_tcm30-111222.pdf)

Página web del Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación:

<https://www.mapa.gob.es/es/ganaderia/temas/sanidad-animal-higiene-ganadera/sanidad-animal/enfermedades/>

Sistema Mundial de Información Zoonosaria (OIE-WAHIS).

Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. Informe de situación epidemiológica. Agosto de 2021.

[https://www.mapa.gob.es/es/ganaderia/temas/sanidad-animal-higiene-ganadera/informednc\\_2021-08-31\\_tcm30-111223.pdf](https://www.mapa.gob.es/es/ganaderia/temas/sanidad-animal-higiene-ganadera/informednc_2021-08-31_tcm30-111223.pdf)

Food and Agriculture Organization of the United Nations. Introduction and spread of lumpy skin disease in South, East and Southeast Asia.

<https://www.fao.org/3/cb1892en/cb1892en.pdf>

**MATERIAL PARA LA PREPARACIÓN DEL TEMA 62**

**RINOTRAQUEITIS INFECCIOSA BOVINA. MARCO LEGAL. PROGRAMA NACIONAL VOLUNTARIO DE PREVENCIÓN, CONTROL Y ERRADICACIÓN. DIAGNÓSTICO DE LABORATORIO**

*Este material no tiene carácter oficial, por lo que en ningún caso vinculará al Tribunal Calificador. Constituye, únicamente, un instrumento complementario que servirá de apoyo al opositor para enfocar cada uno de los epígrafes, pero nunca de forma exclusiva ni excluyente. El Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación no se hace responsable del contenido del mismo.*

*Los materiales no serán objeto de actualización constante.*

## **ÍNDICE**

### **1. RINOTRAQUEITIS INFECCIOSA BOVINA**

- 1.1. INTRODUCCIÓN Y CARACTERÍSTICAS
- 1.2. EPIDEMIOLOGÍA Y TRANSMISIÓN
- 1.3 SINTOMATOLOGÍA Y LESIONES

### **2. MARCO LEGAL**

### **3. PROGRAMA COORDINADO DE LUCHA, CONTROL Y ERRADICACIÓN.**

### **4. DIAGNÓSTICO DE LABORATORIO.**

- 4.1 DIAGNÓSTICO ETIOLÓGICO
  - 4.1.1 Aislamiento de virus
  - 4.1.2 Métodos moleculares
- 4.2 DIAGNÓSTICO SEROLÓGICO

MATERIAL NO OFICIAL

## **1. RINOTRAQUEITIS INFECCIOSA BOVINA**

### **1.1 INTRODUCCIÓN Y CARACTERÍSTICAS**

La rinotraqueitis infecciosa bovina o vulvovaginitis pustular infecciosa (RIB/VPI), causada por el herpesvirus bovino tipo 1 (HVBo-1), forma parte del género Varicellovirus, subfamilia Alphaherpesvirinae, familia Herpesviridae. Es una enfermedad del ganado bovino doméstico y salvaje.

El virus tiene una distribución mundial, pero se ha erradicado de varios países europeos y otros disponen de programas activos de erradicación. La enfermedad se caracteriza por producir infecciones latentes y distintos cuadros clínicos según la vía de entrada del virus y las prácticas de manejo o cría. La enfermedad provoca un amplio rango de manifestaciones clínicas que incluyen rinotraqueítis, vulvovaginitis y balanopostitis pustular infecciosa, conjuntivitis, aborto, enteritis y también encefalitis.

Los signos de enfermedad general son fiebre, depresión, falta de apetito, abortos y reducción de la producción de leche. El virus también puede infectar el tracto genital y causar vulvovaginitis pustulosa y balanopostitis. En los exámenes post-mortem se observa rinitis, laringitis y traqueítis. La mortalidad es baja, y la mayoría de infecciones siguen un curso subclínico. En caso de infecciones bacterianas secundarias, estas pueden conllevar una enfermedad respiratoria más grave, y el HVBo-1 podría intervenir en enfermedades multifactoriales como la “fiebre del transporte”.

El virus tiene una distribución mundial paralela a la distribución del ganado bovino doméstico, aunque hay países libres, como por ejemplo Austria, Suecia, Dinamarca, Finlandia, Suiza y Noruega en el ámbito europeo.

El genoma vírico consiste en un ADN bicatenario que codifica unas 70 proteínas, de las cuales se han identificado 33 estructurales y más de 15 no estructurales. Las glicoproteínas víricas, que se encuentran en la envoltura de la superficie del virión, intervienen de forma importante en la patogenia y la inmunidad.

Se ha clasificado en 3 tipos y 5 subtipos:

BHV-1.1

BHV-1.2a

BHV-1.2b

BHV-1.3a

BHV-1.3b

Los dos últimos reclasificados como BHV-5.

## 1.2 EPIDEMIOLOGÍA Y TRANSMISIÓN:

El virus tiene una distribución mundial, a excepción de los países libres del HVBo-1, paralela a la distribución del ganado bovino doméstico.

Esta enfermedad se encuentra ampliamente distribuida a nivel mundial, con grandes diferencias de prevalencia entre países.

A nivel de la Unión Europea, se ha erradicado en algunos países como Austria, Dinamarca, Alemania, Austria, Finlandia, Suecia, Noruega e Italia (provincia de Bolzano y región del Valle de Aosta), la isla de Jersey en Reino Unido. Mientras que otros países cuentan con un programa aprobado por la Comisión Europea, con el fin de declararse libres en los próximos años y otros tienen implantados sus propios programas de control y erradicación que aún no han sido autorizados por la UE.

La enfermedad se transmite de forma directa por aerosoles o por contacto con animales infectados, a partir de secreciones respiratorias, oculares y del tracto reproductivo, o de forma indirecta a través de personas o equipos. El virus también puede ser transmitido por el semen durante la monta natural o la inseminación artificial e incluso durante la transferencia de embriones.

Tras la infección, se detecta excreción del virus por vía nasal durante 5– 14 días, con títulos pico de  $10^8$ – $10^{10}$  DICT50 (dosis infectantes al 50% en cultivo de tejido) por ml de secreción nasal. Otros Artiodactyla (como cabras, ovejas, búfalos acuáticos o camélidos) pueden resultar infectados por el HVBo-1.

## 1.3 SINTOMATOLOGÍA Y LESIONES

Es una enfermedad que se caracteriza por tener tres formas clínicas. Una vez recuperado el animal del episodio clínico el virus puede permanecer latente en el ganglio trigémino (estado de latencia).

- **Forma Respiratoria (conocida como Rinotraqueítis Infecciosa Bovina)**

El periodo de incubación es de 2 a 4 días, seguido por fiebre (40.5 a 42°C), descarga nasal serosa, conjuntivitis, salivación, tos, inapetencia, depresión y baja en la producción lechera de animales en producción y en pocos días la descarga nasal y ocular cambia a mucopurulenta. Las lesiones necróticas en la nariz pueden progresar a pústulas y úlceras cubiertas por una pseudomembrana que obstruye las vías aéreas superiores, lo que conduce a una respiración bucal. Una frecuente complicación de la forma respiratoria es el aborto que puede ocurrir entre la tercera y la sexta semana posterior a al momento de infección, principalmente en vacas de 5 a 8 meses de gestación. Pueden llegar a abortar hasta un 25% de las vacas preñadas de una explotación.

- **Forma Genital (conocida como Vulvovaginitis Pustular Infecciosa en las hembras y Balanopostitis Pustular Infecciosa en los machos).**

Esta forma clínica ocurre 1 a 3 días después de la monta y resulta en una severa reacción inflamatoria de la mucosa genital, que incluye edema, hiperemia, pequeñas pústulas y descarga mucopurulenta, la enfermedad frecuentemente resulta en infecciones bacterianas secundarias. La fase aguda de la enfermedad dura de 2 a 4 días y la recuperación es de 10 a 14 días posteriores al inicio de los signos.

- **Forma Nerviosa**

La meningoencefalitis ocurre como resultado de una infección por HVBo-1 en animales jóvenes y ha sido informada en todo el mundo. Los signos de esta enfermedad neurológica son incoordinación, temblor muscular, incapaz de levantarse por sus propios medios, ataxia y ceguera que invariablemente conduce a muerte.

## 2. MARCO LEGAL

Esta enfermedad ocasiona pérdidas económicas directas en las explotaciones afectadas, así como limitaciones y/o restricciones tanto en el comercio intracomunitario como en las exportaciones con países terceros de animales, semen, óvulos y embriones.

La estrategia para manejar el riesgo de Rinotraqueítis Infecciosa Bovina (IBR) integra una serie de medidas establecidas tanto a nivel de la Unión Europea como a nivel nacional.

### 2.1. NORMATIVA COMUNITARIA

Así, en el marco del desarrollo de la nueva Ley de Sanidad Animal de la **Unión Europea**, la IBR se ha categorizado recientemente como **enfermedad "C"** (con importancia para determinados Estados miembros y sobre la que deben adoptarse medidas para evitar su propagación a regiones de la Unión declaradas oficialmente libres de ella o que cuentan con programas de erradicación), a través del Reglamento de Ejecución (UE) 2018/1882 de la Comisión de 3 de diciembre de 2018.

- El Reglamento (UE) 2016/429 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 9 de marzo de 2016, relativo a las **enfermedades transmisibles de los animales** y por el que se modifican o derogan algunos actos en materia de sanidad animal («Legislación sobre sanidad animal»).
- Reglamento Delegado (UE) 2020/687 de la Comisión, de 17 de diciembre de 2019, por el que se completa el Reglamento (UE) 2016/429 del Parlamento Europeo y del Consejo en lo referente a las **normas relativas a la prevención y el control** de determinadas enfermedades de la lista.
- El Reglamento Delegado (UE) 2020/688 de la Comisión, de 17 de diciembre de 2019, por el que se contempla el Reglamento (UE) 2016/429 del Parlamento Europeo y del Consejo en lo referente a **los requisitos zoonosanitarios para los desplazamientos** dentro de la Unión de animales terrestres y de huevos para incubar.
- El Reglamento Delegado (UE) 2020/689 de la Comisión, de 17 de diciembre de 2019, por el que se completa el Reglamento (UE) 2016/429 del Parlamento Europeo y del Consejo en lo referente a las **normas de vigilancia, los programas de erradicación y el estatus de libre de**

**enfermedad** con respecto a determinadas enfermedades de la lista y enfermedades emergentes.

- El **Reglamento Delegado UE) 2020/692** de la Comisión, de 30 de enero de 2020, que contempla el Reglamento (UE) 2016/429 del Parlamento Europeo y del Consejo en lo referente a las **normas para la entrada en la Unión**, y para el desplazamiento y la manipulación tras la entrada, de las partidas de determinados animales, productos reproductivos y productos de origen animal.
- El **Reglamento de Ejecución(UE) 2020/2002** de la Comisión, de 7 de diciembre de 2020, por el que se establecen normas de desarrollo del Reglamento (UE) 2016/429 del Parlamento Europeo y del Consejo relativas a **la notificación a la Unión y al envío de informes a la Unión sobre enfermedades de la lista**, al sistema informático de información, así como a los formatos y los procedimientos de presentación y envío de informes relacionados con los programas de vigilancia y erradicación de la Unión y con la solicitud de reconocimiento del estatus de libre de enfermedad.
- El **Reglamento de Ejecución (UE) 2021/620** de la Comisión de 15 de abril de 2021 por el que se establecen normas para la aplicación del Reglamento (UE) 2016/429 del Parlamento Europeo y del Consejo relativas a la **aprobación del estatus de libre de enfermedad y el estatus de libre de enfermedad sin vacunación** de determinados Estados miembros, zonas o compartimento de estos en lo que respecta a determinadas enfermedades de la lista y a la aprobación de los programas de erradicación de dichas enfermedades de la lista.

## 2.2. NORMATIVA NACIONAL

- **Real Decreto 526/2014**, de 20 de junio, por el que se establece la lista de enfermedades de los animales de declaración obligatoria y se regula su **notificación**, hace que esta enfermedad sea de declaración obligatoria dado que se encuentra incluida en la Lista Única de la OIE y, en cumplimiento de lo estipulado en el Código Sanitario para los Animales Terrestres de la OIE, los Países y Territorios Miembros tienen la obligación de notificarla de forma semestral.
- Al no existir normativa específica frente a la enfermedad, ante la aparición de un foco se aplicarían las medidas previstas en la **Ley 8/2003, de 24 de abril, de Sanidad Animal**.
- **Real Decreto 554/2019**, de 27 de septiembre, por el que se establecen las bases de las actuaciones de **prevención, control y erradicación de la rinotraqueítis infecciosa bovina** y se establece un **programa nacional voluntario** de lucha contra dicha enfermedad.

Debido a que la normativa de la Unión Europea prohíbe la comercialización de semen, óvulos y embriones de rebaños seropositivos a la IBR y el transporte de animales vivos infectados a los países o zonas declarados libres o que tienen un programa de control y erradicación aprobado, salvo que se cumplan una serie de medidas sanitarias específicas, hace que cada vez más los países de la UE cuenten con programas de control y erradicación de IBR, para lo cual es preciso establecer un marco nacional para que el control de la enfermedad se realice de forma homogénea en el territorio nacional.

En España, en los últimos años se han puesto en marcha programas de erradicación a nivel autonómico en varias Comunidades Autónomas con distinto nivel de implantación. Con el nuevo marco que proporciona el **Real Decreto 554/2019**, se ha establecido un programa

nacional voluntario de lucha con contra la IBR, y armonizar así el control de la enfermedad a nivel nacional.

Más recientemente se ha publicado el **Real Decreto 985/2021**, de 16 de noviembre, por el que se modifica el Real Decreto 554/2019, de 27 de septiembre, por el que se establecen las bases de las actuaciones de prevención, control y erradicación de la rinotraqueítis infecciosa bovina y se establece un programa nacional voluntario de lucha contra dicha enfermedad, y por el que se derogan varias normas de sanidad animal.

Es un Programa de control oficial y voluntario para todo el sector vacuno.

Es el primer paso hacia un Programa de erradicación aprobado por la UE. La cronología irá en función de la evolución de las prevalencias.

Las explotaciones que se adhieran al Programa deben comprometerse a permanecer en el mismo un mínimo de 3 años

La estrategia de erradicación del programa cuenta con distintas actuaciones, entre las que cabe destacar:

- La sustitución de las vacunas convencionales por vacuna marcadas, delecionadas de la glicoproteína E, que permitan la diferenciación de los animales en función de si han estado en contacto con el virus campo o, por el contrario, han sido vacunados.
- La calificación sanitaria oficial de las explotaciones en función de los resultados serológicos obtenidos y la eliminación progresiva de los animales positivos.
  - **IBR 0** (explotaciones dónde se desconoce la situación sanitaria).
  - **IBR 1** (explotaciones con animales gE + en el grupo de edad de 9-36 meses y vacunación con vacuna marcada).
  - **IBR 1-** (explotaciones con muestreos del grupo de edad de 9-36 meses con resultado gE- en los últimos 12 meses y vacunación con vacuna marcada).
  - **IBR 2** (explotaciones con muestreos del grupo de edad de 9-36 meses con resultado gE- en los últimos 24 meses y vacunación con vacuna marcada).
  - **IBR 3** (explotaciones con el 100% de los animales mayores de 9 meses gE - y vacunación con vacuna marcada).
  - **IBR 4** (explotaciones con el 100% de los animales gB - o gE - (animales vacunados antes de la obtención) y sin vacunación durante los dos últimos años).
- La regulación oficial de los movimientos de los animales y sus productos (semen, óvulos y embriones) entre explotaciones según su situación sanitaria, con objeto de garantizar el mantenimiento de la calificación sanitaria en aquellas explotaciones de mayor estatus.

Se tendrá la obligación de notificar la sospecha o confirmación del IBR.

Se contará con la dirección técnica de un veterinario responsable de la aplicación de programa. Además, se prohíbe el empleo de vacuna no marcada para todos, no solo para los que entren en el programa, y las vacunas se aplicarán por el veterinario de la explotación, por el veterinario responsable de programa o bajo su supervisión.

En la disposición transitoria segunda del Real Decreto 554/2019 se establece, durante un periodo de dos años, la posibilidad de incorporar animales a explotaciones «IBR 4», «IBR 3», «IBR 2» e «IBR 1-» permitiendo que la entrada de animales no se realice de forma exclusiva con animales procedentes de explotaciones con igual o superior nivel de calificación, siempre que éstos obtengan un resultado negativo a la prueba de anticuerpos anti-gE, o en su caso anti-gB o de anticuerpos totales, en una analítica realizada en la explotación de origen, o en su caso de destino.

Sin embargo, la adhesión de explotaciones al programa voluntario a lo largo del primer año de aplicación del real decreto ha sido lenta, por lo que el número de explotaciones calificadas es todavía bajo. La falta de un número suficiente de explotaciones calificadas puede provocar dificultades de suministro de animales hacia las explotaciones calificadas, por lo que, en aras de seguir manteniendo las posibilidades comerciales, salvaguardando al mismo tiempo la situación sanitaria de los movimientos, procede mantener por el momento las condiciones establecidas en el apartado primero de la disposición transitoria segunda. Con objeto de ofrecer mayores garantías sanitarias para las explotaciones de destino, se establece además que las pruebas efectuadas en los animales objeto de movimiento se realicen en la explotación de origen, si bien de forma excepcional y con autorización previa de la autoridad sanitaria de destino dichas pruebas puedan realizarse en la explotación de destino.

Por otra parte, una vez el Laboratorio Nacional de Referencia de IBR (Laboratorio Central de Veterinaria de Algete) ha evaluado la sensibilidad de los kits disponibles para la detección de anticuerpos anti-gE en muestras de leche de tanque, se ha podido comprobar que, en la actualidad, únicamente se puede validar la determinación de anticuerpos en muestras individuales de leche, pues los kits de diagnóstico no disponen de sensibilidad suficiente para realizar análisis de muestras recogidas en los tanques de leche de las explotaciones. En consecuencia, procede eliminar del real decreto 554/2019 las opciones que incluyen estos test, tanto para obtención de calificación como para mantenimiento, establecidas para explotaciones «IBR 3» en el anexo II, y restringir estas opciones sólo para las explotaciones «IBR 4» del anexo II en aquellos casos en los que no existan en la explotación animales que hayan sido vacunados (animales gB+ y gE-).

Del mismo modo, el Laboratorio Central de Veterinaria de Algete ha determinado una mayor sensibilidad en los kits disponibles para la detección de anticuerpos anti-gB que los que detectan anti-gE, por lo que en las pruebas para movimientos entre explotaciones «IBR 4» es preferible el empleo de los primeros kits cuando los animales objeto de movimiento no hayan sido vacunados previamente.

## 4. DIAGNÓSTICO DE LABORATORIO

### 4.1 DIAGNÓSTICO ETIOLÓGICO

#### 4.1.1 Aislamiento del virus.

La detección del virus se realiza a partir de hisopos nasales, oculares o genitales, según la sintomatología del animal. Los hisopos deben frotarse vigorosamente contra las superficies mucosas. También se puede lavar el prepucio con solución salina y recoger el líquido de lavado. Las muestras se suspenden en un medio de transporte (un medio de cultivo celular que contenga antibióticos y 2–10% de suero fetal bovino sin HVBo-1 para evitar la inactivación de los virus), se enfrían a 4°C y se envían rápidamente al laboratorio.

En la necropsia, se recogen para la detección del virus las mucosas del tracto respiratorio y porciones de las amígdalas, pulmones y ganglios linfoides bronquiales. En casos de aborto, se examina el hígado, los pulmones, el bazo, el riñón fetales, así como cotiledones placentarios. Las muestras se deben enviar al laboratorio en hielo con la mayor rapidez posible.

La primera detección se realiza mediante la prueba de **PCR**; posteriormente puede intentarse el **aislamiento viral en líneas celulares**.

Para aislar los virus, distintas células o líneas celulares bovinas son adecuadas para la el aislamiento, incluidas células de riñón o testículo bovino secundarias, cepas celulares de pulmón o tráquea bovina, o la línea celular establecida de riñón bovino Madin-Darby (MDBK). Se observa a diario si los cultivos celulares presentan ECP, que normalmente aparece a los tres días de la inoculación. Se caracteriza por agrupaciones de células redondeadas en forma de racimos que se juntan alrededor de un hueco en la monocapa; a veces, se pueden observar células gigantes con varios núcleos. Se requiere experiencia para reconocer este aspecto característico. Si después de 7 días no aparece el ECP, se debe realizar un pase ciego.

La especificidad del efecto citopático se puede comprobar mediante las pruebas de **inmunofluorescencia, inmunoperoxidasa o la neutralización con un antisuero específico contra el HVBo-1 o con un anticuerpo monoclonal neutralizante o mediante una PCR**.

En el caso de las **muestras de semen fresco** hay que tener en cuenta que en general es citotóxico y **debe prediluirse** (por ejemplo, a 1/10) antes de añadirlo a los cultivos celulares.

También puede comprobarse si en los tejidos recogidos post-mortem hay antígeno anti HVBo-1 mediante análisis de **inmunofluorescencia** de cortes congelados. También podría aplicarse *inmunohistoquímica* para la detección del HVBo-1 y para la determinación de la presencia de antígeno en los tejidos.

#### 4.1.2 Métodos moleculares

##### El ADN vírico se identifica mediante PCR.

En comparación con el aislamiento de virus, la PCR tiene la ventaja principal de que es más sensible y más rápida. También se puede detectar ADN del virus en el ganglio trigémino, en la fase latente de la infección. Se utiliza PCR en tiempo real y PCR cuantitativa.

El Laboratorio Nacional de Referencia de IBR es el Laboratorio Central de Veterinaria en Algete y los laboratorios designados como referencia de la OIE son el APHA en Weybridge, United Kingdom y el Institute of Diagnostic Virology Friedrich-Loeffler, Insel Riems, Alemania.

#### 4.2 DIAGNÓSTICO SEROLÓGICO

La detección de anticuerpos frente a IBR en suero es un indicador fiable de infección y de los estados de latencia.

Todo animal con anticuerpos contra el virus se considera portador y posible excretor intermitente del virus. Las únicas excepciones son los terneros que han adquirido pasivamente anticuerpos del calostro materno, y el ganado bovino no infectado vacunado con vacunas inactivadas.

Por su fiabilidad, rapidez y bajo coste, la prueba serológica de elección es el **ELISA**, que puede utilizarse para muestras de suero y de leche (leche individual, en pool o en tanques de leche). Hay distintos sistemas de enzimo-inmunoanálisis (ELISA indirecto / bloqueo). Es la prueba que más se utilizan para la detección de anticuerpos.

Según el tipo (indirecto, de competición o bloqueo) pueden detectarse anticuerpos frente al virus completo, la glicoproteína B (gB) o la glicoproteína E (gE). En este último caso, la prueba tiene capacidad de diferenciar los animales vacunados de los infectados, siempre que el animal haya sido inmunizado con vacuna marcada delecionada de glicoproteína E. Los animales así vacunados, pero no infectados, son negativos a este ELISA gE.

##### **ELISA indirecto**

El principio de un ELISA indirecto se basa en la unión de anticuerpos específicos anti-HVBo-1 presentes en la muestra problema a antígeno HVBo-1 inmovilizado. Los anticuerpos unidos se detectan utilizando antisuero anti-inmunoglobulina bovina marcado con enzima. La presencia de anticuerpos en la muestra problema dará lugar a color tras añadir la solución de sustrato/cromógeno. Este principio analítico es el más adecuado para las muestras de leche individuales y combinadas.

##### **ELISA de Bloqueo**

El principio del ELISA de bloqueo o competitivo se basa en bloquear la unión de un antisuero anti HVBo-1 o de un anticuerpo monoclonal anti-HVBo-1 marcados con enzima al antígeno, mediante anticuerpos de la muestra problema. La presencia de anticuerpos en

la muestra problema da lugar a una escasa aparición de color tras añadir la solución de sustrato/cromógeno.

La reactividad inespecífica de sueros en los ELISA para la detección del HVBo-1 debe tenerse en cuenta, y se observa con mayor frecuencia en la prueba marcadora que en la serología convencional. Existen varios motivos por los que pueden aparecer reacciones inespecíficas:

- que existan variaciones entre lotes del ELISA utilizado.
- que las muestras se analicen muy rápido tras ser recogidas (fenómeno de frescura).
- que las muestras se analicen mediante un ELISA-gE en un plazo de 4 semanas tras la vacunación con una vacuna marcadora (fenómeno de la vacunación).
- que la muestra tenga mala calidad (por ejemplo, muestras que presenten hemólisis).

Por tanto, deben tenerse en cuenta las siguientes medidas:

- debe implementarse una validación de cada lote de prueba analítica, y deben analizarse las pruebas en el momento de comercializar los lotes.
- las muestras deben guardarse a 4°C y no deben analizarse antes de las 24–48 horas tras la recogida.
- las muestras deben someterse a un ciclo de congelación-descongelación (–20°C); en algunos casos, una posterior inactivación térmica (30 minutos/56°C) puede eliminar reacciones inespecíficas en las muestras de suero.
- en el ganado bovino no deben realizarse pruebas serológicas para detectar el HVBo-1 antes de que pasen 4 semanas tras cualquier vacunación.
- no debe utilizarse gE-ELISA para clasificar animales no vacunados.

**Seroneutralización (SN)** prueba complementaria al ELISA en el caso de que los animales no hayan sido previamente vacunados. La prueba de SN se lleva a cabo con distintas modificaciones. El test varía dependiendo de la cepa vírica utilizada en el ensayo, la dilución inicial del suero, al periodo de incubación del virus/suero (1-24 horas), al tipo de células utilizadas, al día de la lectura final y a la lectura del punto final (50% frente a 100%). Entre estas variables, el periodo de incubación del virus/suero tiene el efecto más destacado en la sensibilidad de la SN. Un periodo de incubación de 24 horas puede dar títulos de anticuerpos hasta 16 veces más altos que un periodo de incubación de 1 hora y se recomienda cuando se requiere la sensibilidad máxima (por ejemplo, a efectos del comercio internacional).

En cada prueba serológica se deben incluir controles adecuados de suero fuertemente positivo, de suero débilmente positivo, y de suero negativo.

## BIBLIOGRAFÍA

Código Sanitario para los Animales Terrestres de la OIE.  
[Home - WOAHA - World Organisation for Animal Health](#)

Manual de las Pruebas de Diagnóstico y de las Vacunas para los Animales Terrestres de la OIE.  
Capítulo 3.4.11. Rinotraqueítis Infecciosa Bovina/vulvovaginitis pustular infecciosa.  
[fmd with viaa test incl. \(oie.int\)](#)

EFSA (Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria) dictámenes científicos independientes.  
Último informe de IBR 30/06/2017.  
<https://www.efsa.europa.eu>

Reglamentos de Sanidad Animal de la UE y Reglamentos delegados y de ejecución para el desarrollo del Reglamento base.

Página WEB del MAPA (Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación)  
[Rinotraqueítis Infecciosa Bovina \(mapa.gob.es\)](#)

Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. Calificación sanitaria de las explotaciones.  
[rd554\\_2019calificacionsanitariaibr\\_tcm30-519990.jpg \(800x800\) \(mapa.gob.es\)](#)

Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. Requisitos de movimiento de los animales.  
[rd554\\_2019\\_requisitosmovimientosisbr\\_nov2021\\_tcm30-519991.png \(536x533\) \(mapa.gob.es\)](#)

**MATERIAL PARA LA PREPARACIÓN DEL TEMA 62**

**LEUCOSIS BOVINA ENZOÓTICA. MARCO LEGAL. PROGRAMA NACIONAL DE VIGILANCIA Y CONTROL. DIAGNÓSTICO DE LABORATORIO.**

*Este material no tiene carácter oficial, por lo que en ningún caso vinculará al Tribunal Calificador. Constituye, únicamente, un instrumento complementario que servirá de apoyo al opositor para enfocar cada uno de los epígrafes, pero nunca de forma exclusiva ni excluyente. El Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación no se hace responsable del contenido del mismo.*

*Los materiales no serán objeto de actualización constante.*

## **ÍNDICE**

### **1. LEUCOSIS ENZOÓTICA BOVINA**

1.1. INTRODUCCIÓN CARACTERÍSTICAS

1.2. EPIDEMIOLOGÍA Y TRANSMISIÓN

1.3 SINTOMATOLOGÍA Y LESIONES

### **2. MARCO LEGAL**

2.1 NORMATIVA COMUNITARIA

2.2. NORMATIVA NACIONAL

### **3. PROGRAMA NACIONAL DE VIGILANCIA Y CONTROL DE LA LEUCOSIS BOVINA ENZOÓTICA 2021-2025.**

### **4. DIAGNÓSTICO DE LABORATORIO.**

4.1 REQUERIMIENTO PARA EL ENVÍO Y LA TOMA DE MUESTRAS

4.2 DIAGNÓSTICO ETIOLÓGICO

4.3 DIAGNÓSTICO SEROLÓGICO

## 1. LEUCOSIS ENZOÓTICA BOVINA

### 1.1. INTRODUCCIÓN Y CARACTERÍSTICAS

La leucosis bovina enzoótica (LBE) es una enfermedad del ganado bovino causada por el virus de la leucemia bovina (VLE), miembro de la familia Retroviridae. El ganado puede infectarse a cualquier edad, incluida la fase embrionaria. La mayoría de las infecciones son subclínicas, pero un porcentaje del ganado mayor de 3 años (~30%) desarrolla una linfocitosis persistente, y un grupo menor, desarrolla linfosarcomas (tumores) en varios órganos internos. También se ha registrado la infección natural en búfalos acuáticos y capibaras<sup>1</sup>. Los síntomas clínicos, cuando se presentan, dependen de los órganos afectados. El ganado bovino con linfosarcomas puede morir súbitamente o a las pocas semanas o meses después de la aparición de los signos clínicos dependiendo de la ubicación y cantidad de los tumores y de las características de crecimiento de los mismos.

El VLE es un retrovirus exógeno y pertenece al género Deltaretrovirus, dentro de la subfamilia Ortoretrovirinae y la familia **Retroviridae**. Está relacionado desde el punto de vista estructural y funcional con los virus de los primates tipos 1,2 y 3 que infectan a los linfocitos T (VLTS-1, -2, -3) y los virus de los humanos tipos 1 y 2 que infectan a los linfocitos T (HTLV-1 y -2).

Las principales células diana del VLE son los linfocitos B.

Las partículas víricas constan de dos ARN monocatenarios de sentido positivo que codifican la nucleoproteína p12, la proteína p24 de la cápsida, la glucoproteína transmembrana gp30, la glicoproteína de la envoltura gp51, y varias enzimas, entre las que se incluye la transcriptasa inversa.

El **periodo de incubación** oscila entre varios meses a más de 3 años.

### 1.2. EPIDEMIOLOGÍA Y TRANSMISIÓN

España fue declarada país oficialmente indemne de LBE en el seno de la UE desde 1999, al cumplir el requisito de mantener al menos el 99,8% de los rebaños bovinos oficialmente indemnes. La estrategia contra la leucosis se basa en medidas de vigilancia, control y erradicación y de mantenimiento de este estatus sanitario, que se contemplan en el programa nacional de vigilancia de la LBE.

La transmisión tiene lugar vía horizontal por la transferencia de células infectadas (linfocitos B) a través de secreciones orgánicas como sangre, secreción nasal o uterina (durante el parto), semen, calostro y leche, además de por prácticas de manejo inadecuadas como el uso de agujas e instrumental reutilizable que no esté adecuadamente desinfectado. Además, también puede darse una transmisión vertical durante la gestación o en el periparto. Los vectores (insectos

---

<sup>1</sup> capibara, carpincho o chigüire (*Hydrochoerus hydrochaeris*) es una especie de roedor de la familia de los cávidos. Es el roedor viviente de mayor tamaño y peso del mundo.

hematófagos, especialmente tábanos) también pueden contribuir a su transmisión por vía indirecta.

### **1.3. SINTOMATOLOGÍA Y LESIONES**

Los linfosarcomas del ganado bovino pueden tener varias causas, pero la única causa conocida es el retrovirus de la leucemia bovina (VLE), que origina la leucosis bovina enzoótica (LBE). El término “leucosis bovina esporádica” (LBES) se reserva normalmente para los animales jóvenes (terneros), así como para los linfomas de tipo cutáneo y tímico, que se definen de acuerdo con la edad del animal afectado y por la distribución de los tumores. Se desconoce la causa de la LBES. También puede haber trastornos linfosarcomatosos que no correspondan a las categorías de la LBES ni la LBE, como el caso del linfoma multicéntrico de adultos, de aparición esporádica y de etiología desconocida.

Solamente deben denominarse “leucosis” o “leucosis enzoótica bovina” los linfomas causados por la infección con el VLE. Aunque los animales pueden resultar infectados por el VLE a cualquier edad, los tumores (linfosarcomas) se observan típicamente en los animales de más de 3 años.

Normalmente las infecciones son subclínicas; solamente el 30–70% del ganado infectado desarrolla una linfocitosis persistente, y el 0,1–10% de los animales infectados desarrolla tumores.

Los signos clínicos dependen del lugar en que aparecen los tumores y pueden incluir desarreglos digestivos, falta de apetito, pérdida de peso, debilidad o decaimiento general y, a veces, signos neurológicos. Los ganglios linfáticos superficiales pueden estar claramente aumentados de tamaño y palparse bajo la piel y mediante un examen rectal.

A la necropsia, los ganglios linfáticos y gran variedad de tejidos están infiltrados por células neoplásicas. Los órganos implicados con más frecuencia son el abomaso, la aurícula derecha del corazón, el bazo, el intestino, el hígado, el riñón, el omaso, los pulmones y el útero. La susceptibilidad del ganado a una linfocitosis persistente está determinada genéticamente, y quizás también el desarrollo del propio tumor.

Cada vez hay más datos que respaldan el papel del virus como causa de disfunciones inmunológicas o del aumento del desvieje, disminución media de la producción de leche por vaca en manadas positivas al VLE en comparación con manadas negativas. Además, se ha observado una tasa de concepción un 7% inferior en las vacas positivas al VLE que en las negativas. Asimismo, también se ha observado un aumento de las tasas de desvieje y una mayor susceptibilidad a otras enfermedades de etiología infecciosa, como las mastitis, diarrea y neumonía en manadas positivas al VLE. También se ha descrito una reducción de la inmunidad protectora tras la vacunación de ganado bovino infectado por el VLE. Por tanto, a pesar de que no hay signos clínicos evidentes durante el largo periodo de infección subclínica, las pérdidas económicas causadas por las infecciones persistentes por el VLE parecen ser importantes.

## 2. MARCO LEGAL

### 2.1. NORMATIVA COMUNITARIA

En el seno de la **Unión Europea**, la normativa aplicable desde el 21/04/2021 es la siguiente:

- El **Reglamento (UE) 2016/429** del Parlamento Europeo y del Consejo, de 9 de marzo de 2016, relativo a las **enfermedades transmisibles de los animales** y por el que se modifican o derogan algunos actos en materia de sanidad animal («Legislación sobre sanidad animal»), que incluye en su Anexo II a la LBE, tras su modificación por el **Reglamento Delegado (UE) 2018/1629** de la Comisión, de 25 de julio de 2018, que modifica la lista de enfermedades recogidas en el anexo II del Reglamento (UE) 2016/429 del Parlamento Europeo y del Consejo, relativo a las enfermedades transmisibles de los animales y por el que se modifican o derogan algunos actos en materia de sanidad animal.
- El **Reglamento Delegado (UE) 2020/689** de la Comisión, de 17 de diciembre de 2019, por el que se completa el Reglamento (UE) 2016/429 del Parlamento Europeo y del Consejo en lo referente a las **normas de vigilancia, los programas de erradicación y el estatus de libre de enfermedad** con respecto a determinadas enfermedades de la lista y enfermedades emergentes.

Se categoriza a la LEB como una enfermedad de los bovinos con **categoría C+D+E** sobre la que es pertinente establecer medidas de vigilancia, prevención y control, así como medidas en las importaciones de animales desde terceros países y en los intercambios comerciales a escala de la UE para evitar su propagación a regiones oficialmente libres.

- El **Reglamento Delegado (UE) 2020/688** de la Comisión, de 17 de diciembre de 2019, por el que se completa el Reglamento (UE) 2016/429 del Parlamento Europeo y del Consejo en lo referente a los **requisitos zoonosanitarios para los desplazamientos dentro de la Unión** de animales terrestres y de huevos para incubar.
- **Reglamento de ejecución 2021/620**, de la Comisión, de 15 de abril de 2021 por el que se establecen normas para la aplicación del Reglamento (UE) 2016/429 del Parlamento Europeo y del Consejo relativas a la aprobación del estatus de libre de enfermedad y el estatus de libre de enfermedad sin vacunación de determinados Estados miembros, zonas o compartimentos de estos en lo que respecta a determinadas enfermedades de la lista y a la aprobación de los programas de erradicación de dichas enfermedades de la lista

### 2.2. NORMATIVA NACIONAL

- La **Ley 8/2003**, de sanidad animal.
- El **Real Decreto 2611/1996**, de 20 de diciembre, y sus modificaciones, por el que se regulan **los programas nacionales de erradicación de enfermedades de los animales**; constituye la base legal de las medidas de vigilancia, control y erradicación de la LBE.

### **3. PROGRAMA NACIONAL DE VIGILANCIA Y CONTROL DE LA LEUCOSIS BOVINA ENZOÓTICA 2021-2025.**

Actualmente está en vigor.

#### **3.1. OBJETIVO PRINCIPAL DEL PROGRAMA**

Los Estados Miembros son los primeros responsables de la vigilancia de la leucosis bovina. Por lo tanto, el objetivo final es la vigilancia para demostrar la ausencia de la enfermedad y el mantenimiento del estatuto de España como oficialmente indemne de leucosis bovina enzoótica. Desde el 21/04/2021 se sigue un programa de vigilancia basado en el riesgo.

#### **3.2. POBLACIÓN DIANA:**

Desde 21/04/2021 el programa de vigilancia y control de LEB mantiene, como en los anteriores, programas sobre los bovinos, incluidos búfalos y bisontes y excluidas todas las unidades de cebo, ya que dichos rebaños contienen, en su amplia mayoría, animales menores de 12 meses, de acuerdo al Reglamento Delegado (UE) 2020/689.

Actualmente la vigilancia en la UE frente a la LBE está dirigida principalmente a la detección de linfomas en mataderos, aunque se pretende adaptar esta vigilancia a los criterios de la EFSA, en base a los factores de riesgo de transmisión.

De acuerdo al Anexo III, sección 3 del Reglamento Delegado (UE) 2020/689, **las pruebas diagnósticas serológicas oficiales para mantenimiento del estatus de LEB** son las siguientes:

##### **a) pruebas para muestras de sangre:**

- i) prueba de inmunodifusión en gel de agar
- ii) ensayo inmunoenzimático de bloqueo (ELISA de bloqueo o b-ELISA)
- iii) ensayo inmunoenzimático de bloqueo i-ELISA

##### **b) pruebas para muestras de leche: i-ELISA**

En el marco de este programa de vigilancia de la LBE se tomarán muestras principalmente de sangre. Las que obtengan un resultado positivo a la prueba de screening (b-ELISA) se remitirán al Laboratorio Nacional de Referencia de la LBE, el Laboratorio Central de Veterinaria de Algete (Madrid), donde se realizará la prueba de i-ELISA.

Como pruebas de confirmación de los resultados serológicos positivos o de los tumores compatibles se recogerán las muestras que se describen en el Manual de toma de muestras para su envío al LNR de Algete y la realización de pruebas de biología molecular (PCR).

La leucosis bovina es una enfermedad de declaración obligatoria en España. En el caso de detectar lesiones post-mortem compatibles con LBE (linfomas), la comunicación corresponderá a los SVO de los mataderos, a las autoridades competentes en sanidad animal de la Comunidad Autónoma donde radique el matadero.

## 4. DIAGNÓSTICO DE LABORATORIO

### 4.1. REQUERIMIENTO PARA EL ENVÍO Y LA TOMA DE MUESTRAS

La infección por el VLE dura toda la vida y origina una respuesta persistente de anticuerpos, los cuales se detectan por primera vez a las 3–16 semanas post-infección.

Los anticuerpos derivados de la madre confieren una inmunidad pasiva que puede tardar de 6 a 7 meses en desaparecer.

No hay modo de distinguir entre los anticuerpos adquiridos por transferencia pasiva y los que se generan como consecuencia de una infección activa. Sin embargo, la infección activa se puede confirmar mediante la detección del provirus del VLE mediante la PCR. Los anticuerpos pasivos tienden a proteger a los terneros contra la infección. Durante el período periparto, las vacas pueden tener anticuerpos séricos que son indetectables mediante la AGID debido al paso de los anticuerpos desde el sistema circulatorio de la vaca al calostro.

Por tanto, cuando se utiliza la prueba AGID, un resultado negativo de la prueba con suero tomado en ese momento (2–6 semanas antes del parto y 1–2 semanas después del parto) no es concluyente y la prueba debe repetirse. No obstante, la prueba AGID se puede realizar en esta fase con el calostro inicial. Los anticuerpos que primero se detectan son los dirigidos contra la gp51 y la p2

Las muestras a tomar para el diagnóstico de la enfermedad son:

A. En el establecimiento (animales vivos): para la detección del VLE mediante estas pruebas diagnósticas, se debe tomar, de cada animal sospechoso:

- Sangre: tubos de 10 ml de sangre sin anticoagulante (para posterior extracción de suero y para poder utilizar el suero como control positivo) y un tubo de 5 ml de sangre con EDTA.
- Leche (en el caso de ser animales en lactación): tras limpiar las mamas y secar con un trapo/papel limpio, se recogerá una proporción de leche de cada cuarterón en un bote estéril con tapa o cierre de rosca (tipo duquesa), rechazando el primer chorro de cada uno de ellos.

B. En el matadero (carcasas): las muestras para la detección de VLE en matadero se recogerán principalmente de omaso/abomaso, aurícula derecha del corazón, bazo, duodeno, hígado, riñón, pulmones, linfonodos torácicos (traqueobronquiales y mediastínicos) y útero.

La LBE debe diferenciarse principalmente de la tuberculosis bovina, debido a la similitud de las lesiones en los linfonódulos y por las características clínicas de los animales afectados (adelgazamiento progresivo y bajo rendimiento productivo).

Todas las muestras deben enviarse al laboratorio conforme a la normativa vigente para el envío de muestras infecciosas. Este envío debe realizarse en un triple embalaje para asegurar la bioseguridad de las muestras y etiquetadas como material infeccioso **de Categoría B con el código UN 3373**.

## 4.2. DIAGNÓSTICO ETIOLÓGICO

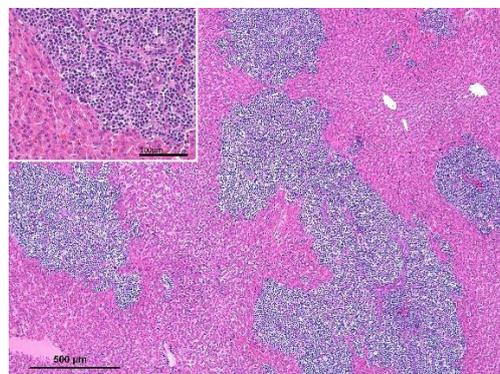
Los virus se pueden detectar en el sobrenadante del cultivo mediante **el cultivo in vitro de células mononucleares de sangre periférica (PBMC)** de los animales infectados, o **mediante pruebas de detección del antígeno, mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) o por microscopía electrónica**. También se puede detectar el ADN del provirus en PBMC o en los tumores de animales infectados mediante la PCR.

Las PBMC se aíslan en un gradiente de densidad a base de ficoll/metrizoato sódico, partiendo de 1,5 ml de sangre periférica tratada con ácido etilendiaminotetraacético (EDTA). Después se cultivan con  $2 \times 10^6$  células de pulmón fetal bovino (FBL) y se cultivan durante 3–4 días en 40 ml de medio mínimo esencial (MEM) que contenga un 20% de suero fetal bovino. El virus hace que aparezcan sincitios en la monocapa de las células FBL.

Se puede confirmar la infección tras realizar un cultivo en un medio celular específico, para luego analizar la presencia de partículas virales mediante microscopía electrónica o PCR. La PCR en tiempo real es el método más sensible y rápido.

La PCR se utiliza principalmente como ayuda a la serología para la confirmación de los resultados positivos. La detección del VLE en animales determinados mediante PCR puede ser útil en las siguientes circunstancias:

- Terneros jóvenes con anticuerpos del calostro.
- Casos de tumor, para diferenciar entre linfoma esporádico e infeccioso.
- Tejido tumoral de casos sospechosos recogidos en mataderos.
- Nuevas infecciones, antes del desarrollo de anticuerpos contra el VLE.
- Casos de resultados débilmente positivos o dudosos en el ELISA.
- Análisis sistemático de ganado en centros de análisis de la descendencia (antes de la introducción en centros de inseminación artificial).
- Ganado utilizado en la producción de vacunas, para comprobar que están exentos de VLE.



Microfotografía con tinción de Hematoxilina Eosina. Se puede observar el característico infiltrado linfomatoso (azul) en el parénquima hepático (rosa). Arriba a la izquierda: detalle aumentado de la población celular infiltrante. Info: CRESA

### **4.3 DIAGNÓSTICO SEROLÓGICO**

Los métodos de detección de los anticuerpos más utilizados son:

- La inmunodifusión en gel de agar (AGID), en la que se utilizan sueros.
- Enzimoimmunoanálisis (ELISA), en el que se utilizan sueros o muestras de leche

Los anticuerpos que primero se detectan son los dirigidos contra la gp51 y la p24 del virus. La mayor parte de las pruebas rutinarias AGID y ELISA detectan anticuerpos contra la glicoproteína gp51, ya que es de aparición temprana. Los ELISA son normalmente más sensibles que las AGID.

Existen sueros liofilizados e irradiados para utilizarlos en ELISA como sueros de referencia de la OIE, que son débilmente positivos y negativos, y están disponibles en el Laboratorio de Referencia de la OIE el Instituto Nacional de Investigación Veterinaria de Pulawy (Polonia).

La calibración de estos sueros se basa en el suero de referencia acreditado de la OIE, llamado "E05", que ha sido validado frente al anterior de suero de referencia "E4" por AGID y diferentes ELISAs. El E05 define el límite inferior de sensibilidad para las pruebas de rutina AGID y ELISA para muestras de suero y leche.

La prueba **AGID** es específica, pero no muy sensible, para detectar anticuerpos en muestras de suero individuales. Sin embargo, no es adecuada para muestras de leche (excepto el primer calostro) debido a su escasa especificidad y sensibilidad. La prueba AGID es sencilla y fácil de realizar y ha sido muy útil y eficiente como base para programas de erradicación. En los kits comerciales de AGID se incluyen sueros de referencia.

La prueba **ELISA** pueden ser de dos tipos:

- Se puede utilizar un ELISA indirecto
- O se puede utilizar un ELISA de bloqueo.

Las pruebas basadas en estos principios están comercializadas; se pueden necesitar kits diferentes para las muestras de suero que para las de leche. Algunos ELISA son lo suficientemente sensibles como para utilizarse con muestras de leche y suero.

Los ELISA se realizan en microplacas de fase sólida. El antígeno del VLE se utiliza para recubrir las placas, bien directamente o por medio de un anticuerpo policlonal o monoclonal de captura. El antígeno se prepara a partir del sobrenadante del cultivo de líneas celulares infectadas persistentemente con VLE. Las células de riñón de cordero fetal (FLK) son las más frecuentemente utilizadas en los kits comerciales.

## **BIBLIOGRAFÍA.**

Código Sanitario para los Animales Terrestres de la OIE. [www.oie.int](http://www.oie.int)

Manual de las Pruebas de Diagnóstico y de las Vacunas para los Animales Terrestres de la OIE.  
Capítulo 3.4.9. Leucosis Bovina Enzoótica.  
[Leucosis Bovina Enzoótica \(mapa.gob.es\)](http://mapa.gob.es)

EFSA (Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria) dictámenes científicos independientes.  
Último informe sobre la LEB de 10/07/2015. <https://www.efsa.europa.eu>

Reglamentos de Sanidad Animal de la UE y Reglamentos delegados y de ejecución para el desarrollo del Reglamento base.

Página WEB del MAPA (Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación). Enfermedades de los animales. Leucosis Bovina Enzoótica.  
[Leucosis Bovina Enzoótica \(mapa.gob.es\)](http://mapa.gob.es)

Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. Programa Nacional de Vigilancia.  
[PROGRAMA NACIONAL DE VIGILANCIA DE LA LEUCOSIS BOVINA ENZOÓTICA Y DE LA PRINEUMONÍA CONTAGIOSA BOVINA \(mapa.gob.es\)](http://mapa.gob.es)

**MATERIAL PARA LA PREPARACIÓN DEL TEMA 64**

**PESTE PORCINA AFRICANA. MARCO LEGAL. PROGRAMAS NACIONALES DE VIGILANCIA SANITARIA. DIAGNÓSTICO DE LABORATORIO.**

*Este material no tiene carácter oficial, por lo que en ningún caso vinculará al Tribunal Calificador. Constituye, únicamente, un instrumento complementario que servirá de apoyo al opositor para enfocar cada uno de los epígrafes, pero nunca de forma exclusiva ni excluyente. El Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación no se hace responsable del contenido del mismo.*

*Los materiales no serán objeto de actualización constante.*

## **ÍNDICE**

### **1. PESTE PORCINA AFRICANA.**

- 1.1. ETIOLOGÍA
- 1.2. EPIDEMIOLOGÍA Y TRANSMISIÓN
- 1.3. SINTOMATOLOGÍA Y LESIONES
- 1.4. PROFILAXIS

### **2. MARCO LEGAL.**

- 2.1. NORMATIVA NACIONAL
- 2.2. NORMATIVA COMUNITARIA

### **3. PROGRAMA NACIONAL DE VIGILANCIA SANITARIA.**

### **4. DIAGNÓSTICO DE LABORATORIO.**

- 4.1. DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL.
- 4.2. CARACTERÍSTICAS MOLECULARES Y SEROLÓGICAS PARA EL DIAGNÓSTICO.
- 4.3. CARACTERÍSTICAS PARA EL ENVÍO DE MUESTRAS AL LABORATORIO.
- 4.4. DIAGNÓSTICO VIROLÓGICO (Identificación del agente).
- 4.5. DIAGNÓSTICO SEROLÓGICO.

## **1. PESTE PORCINA AFRICANA (PPA).**

La peste porcina africana (PPA) es una enfermedad de carácter hemorrágico y altamente contagiosa que afecta exclusivamente al ganado porcino, tanto doméstico como salvaje, de todas las razas y edades.

### **1.1. ETIOLOGÍA**

El virus de la peste porcina africana (VPPA) es un virus grande ADN bicatenario con envoltura, con simetría icosaédrica. Se clasifica como el único miembro de la familia *Asfarviridae*, género *Asfivirus*.

Actualmente existen 24 genotipos, todos ellos originarios de África Oriental y Meridional. El genotipo es el reflejo de la variabilidad de un segmento de un solo gen y proteína y se utiliza con fines principalmente filogenéticos y epidemiológicos moleculares, por ejemplo, para identificar el origen de los brotes. Por lo que se sabe, no determina virulencia, ni otros parámetros de la enfermedad. El Genotipo II es el único presente en Europa y Asia, excepto el Genotipo I en Cerdeña.

Es el único virus de ADN conocido que puede transmitirse a través de un vector artrópodo (garrapatas de cuerpo blando del género *Ornithodoros*) y, por tanto, se considera un Arbovirus (ARBO: virus transmitido por artrópodos).

Es un virus muy resistente a las bajas temperaturas y puede ser inactivado por calor a 56°C/70 min; 60°C/20 min y por desinfectantes como: 8/1.000 hidróxido de sodio (30 min), hipocloritos al 2,3%.

El VPPA es muy estable en las excreciones de cerdos infectados, en tejidos, sangre y heces, así como en las carnes frescas de cerdo y algunos de los productos derivados de carne de cerdo.

### **1.2. EPIDEMIOLOGÍA Y TRANSMISIÓN**

La Peste Porcina Africana (PPA) se introdujo en Rusia desde la región del Cáucaso en el año 2007, instaurándose inicialmente en el sur del país y diseminándose posteriormente en dirección norte a partir de mayo del 2011. Durante el año 2012 se incrementó notablemente la notificación de focos de la enfermedad en la zona central de Rusia, confirmándose finalmente su presencia en otros países de la región como Ucrania (2012) y Bielorrusia (junio de 2013) que comparten frontera con países de la Unión Europea.

En 2014, dentro de la UE, se confirmó la presencia del virus de la PPA en jabalíes y/o en explotaciones de cerdo doméstico en Lituania, Letonia, Estonia y Polonia. En el 2016 continuó el empeoramiento de la situación y el riesgo de difusión de la enfermedad. Durante los años 2019, 2020 y 2021 y desde comienzos de 2022 ha continuado la misma tendencia que en años anteriores, con un acusado aumento de casos en verano, confirmándose por primera vez a

finales de julio de 2019 la presencia de la enfermedad en Eslovaquia y en Serbia, mientras que en 2020 se detectó por primera vez en Grecia en cerdo doméstico en febrero y en Alemania en jabalí en el mes de septiembre. A finales de julio de 2021 se confirmó el primer foco en cerdo doméstico en Alemania. En enero de 2022 se detectó por primera vez en Macedonia del Norte en cerdo doméstico y en el norte de Italia en jabalí. El 6 de mayo Italia declara un nuevo foco de PPA en jabalí en la región de Roma.

Los principales problemas con que se están encontrando los países europeos afectados para la erradicación de la enfermedad en cerdos domésticos son:

- Picos estacionales obvios en verano.
- La mayoría de todos los casos se producen en explotaciones con menos de 10 cerdos.
- La mayoría de los casos se han producido por causas ambientales, debido a la contaminación por jabalíes.
- Ocurrencia ocasional en granjas comerciales, por lo que la bioseguridad debe garantizarse en todo momento.

En el caso de los jabalíes los mayores problemas son:

- Persistencia incluso con bajas densidades de jabalíes.
- Altas densidades de población de jabalíes en ciertas áreas / resistencia ambiental al virus de la PPA.
- Saltos del virus por medios humanos.
- Propagación natural lenta pero evidente (entre 2,9 a 11,7 km/año es la velocidad media de propagación).
- Mayor probabilidad de ocurrencia y propagación / repetición de ciclos.

Fuera de la Unión Europea hay que destacar la situación de la PPA en Asia y America:

- ASIA:

La PPA apareció por primera vez en China en agosto de 2018. El vPPA de genotipo II tipo Georgia-07 con alta virulencia es el que ha prevalecido en China desde el inicio del actual brote en 2018, pero en un estudio publicado a comienzos de noviembre de 2021 se informa que también han surgido en China vPPA de genotipo I que causan infección crónica, ya que se han aislado dos virus de la PPA de genotipo I no hemadsorbentes.

La PPA ha continuado su avance por otros países de la región, extendiéndose por el sudeste asiático.

- AMÉRICA:

En julio de 2021 la República Dominicana comunicó a la OIE 2 focos de PPA y en septiembre de ese mismo año las autoridades de Haití comunicaron a la OIE la confirmación del primer brote de PPA desde hacía 37 años.

En relación con las especies que se ven afectadas por la PPA, el único hospedador natural doméstico del virus de la PPA es el cerdo, siendo el jabalí también susceptible a la infección, originando con un cuadro clínico similar al observado en el cerdo. En África existen otras especies de suidos capaces de infectarse sin originar ningún tipo de clínica, como los facoceros

y los potamoqueros. Además, el virus replica en determinadas especies de garrapatas del género *Ornithodoros* (*O. moubata* en África y *O. erraticus* en el suroeste de la península ibérica). El ciclo de infección entre las garrapatas y los cerdos salvajes africanos permiten mantener la enfermedad de forma endémica en extensas zonas de África Sub-sahariana.

En cuanto a la transmisión, la difusión del virus desde animales infectados puede comenzar a partir del segundo día post-infección por saliva, secreciones oculares y nasales y aire. Después de unos días el virus se puede eliminar también por orina, heces y semen. La viremia comienza a los 4-8 días postinfección, y debido a la ausencia de anticuerpos neutralizantes puede durar incluso meses. Las principales vías de transmisión son a través de dos vías:

- **por contacto directo** entre enfermos y sanos: todas las secreciones y excreciones son fuente de contagio (secreciones nasales, saliva, heces, orina, exudado conjuntival, exudado genital y heridas sangrantes).
- **de forma indirecta:** alimentación con desechos que contienen carne infectada, garrapatas del género *Ornithodoros* que actúan como vectores biológicos y son reservorios del virus (*Ornithodoros moubata* en África y *Ornithodoros erraticus* en la Península Ibérica), fomites (locales, vehículos, artefactos, ropa, bebederos, material quirúrgico), personal (ropas, calzados), roedores y otros animales presentes en la explotación.

Tradicionalmente la vía de entrada del virus en un país libre de PPA se ha producido a través de productos cárnicos de origen porcino que han servido de alimento para otros cerdos, especialmente restos de alimentos de aviones y barcos.

Una vez notificada la enfermedad, el contacto entre cerdos sanos y enfermos es el factor más importante de difusión de la enfermedad. Asimismo, juegan un papel fundamental, los animales que se recuperan de la enfermedad actuando como portadores asintomáticos.

Otro factor importante para la persistencia de la enfermedad es la presencia de garrapatas del género *Ornithodoros*. El *Ornithodoros* actúa como vector tomando el virus cuando se alimenta de sangre de cerdos con PPA e inoculando el virus por picadura nuevamente al alimentarse de cerdos susceptibles. Pero no solo actúan como vectores sino también como reservorios, ya que en ellos el virus puede sobrevivir incluso años.

Los jabalíes europeos son susceptibles a la infección por VPPA, mostrando síntomas clínicos y mortalidad similar a las observadas en los cerdos domésticos.

### 1.3. SINTOMATOLOGÍA Y LESIONES

Los cerdos domésticos europeos y los jabalíes son muy susceptibles y muestran un amplio rango de síntomas clínicos desde agudo y subagudo a crónico. Los cerdos salvajes africanos son muy resistentes a la infección, y generalmente no presentan lesiones.

Los síntomas pueden ser muy variados, ya que dependen de la virulencia del virus y de la raza y condición física del cerdo:

- **Forma aguda** (*virus muy virulento*): mortalidad aproximada del 100% en un plazo de 7 días después del comienzo de la enfermedad, fiebre (40-42°C); cuadro hemorrágico generalizado y enrojecimiento de la piel (cerdos blancos), anorexia, apatía, cianosis (de piel, orejas, extremidades, cola y hocico), aborto en hembras gestantes y falta de coordinación 24-48 horas antes de la muerte. Los supervivientes son portadores del virus de por vida, constituyendo así el mayor problema para el control de la enfermedad.
- **Forma subaguda** (*virus moderadamente virulento*): síntomas menos intensos que en la forma aguda, fiebre, letargo, anorexia, hemorragias en la piel (púrpura o equimosis), diarrea, dificultad respiratoria. Aborto en hembras preñadas. La muerte tiene lugar 7-20 días después de la infección. La mortalidad está próxima al 100%.
- **Forma crónica** (*cepas de baja virulencia*): asintomático o con síntomas de abatimiento. Índice de mortalidad bajo (2-10%). Se desarrolla a lo largo de 2-15 meses. Pérdida de peso, alzas irregulares de temperatura, síntomas respiratorios, necrosis en zonas de la piel, úlceras cutáneas crónicas, artritis.

Las lesiones que aparecen:

- **Forma aguda:** Esplenomegalia (bazo característico de color violáceo), edema pulmonar severo, cianosis y eritemas en piel (extremidades, orejas, pecho, abdomen y periné), congestión hemorrágica y aumento de tamaño de ganglios linfáticos (especialmente en los renales y gastrohepáticos), hemorragias petequiales en riñón y mucosa de la vejiga urinaria, hemorragias en la mayor parte de las serosas de los órganos internos y edemas en las cavidades internas.
- **Forma subaguda:** Lesiones vasculares más pronunciadas en ganglios (gastrohepáticos y renales), hemorragia pulmonar y edema menos frecuente, lesiones en bazo, no tan pronunciadas y pericarditis (serosa a fibrinosa).
- **Forma crónica:** Abortos, intensos procesos de necrosis (piel y cavidad bucal) y artritis.



Figura 1. Esquema de la detección de virus y anticuerpos, así como la variabilidad en la virulencia de la cepa después de la exposición a la PPA. Fuente: Laboratorio de referencia de la Unión Europea para la PPA.

#### 1.4. PROFILAXIS

La política de erradicación de la PPA en la UE está basada en el sacrificio sanitario de los animales afectados y en contacto. No existe de momento ninguna vacuna eficaz frente al virus de la PPA.

Además, debe realizarse un estudio sobre la presencia de garrapatas del género *Ornithodoros* en la explotación, efectuándose un control de las mismas en caso de que se confirme su presencia.

En general, la profilaxis debe estar basada en la aplicación de medidas encaminadas a impedir la introducción de la enfermedad desde el exterior, así como impedir la diseminación de la enfermedad una vez que ésta se ha detectado en nuestra ganadería. Estas medidas incluyen:

- Control de movimiento de animales.
- Inspección de las explotaciones.
- Rápida detección y confirmación de la enfermedad en el laboratorio.
- Rápida denuncia a las autoridades competentes de todos los casos declarados sospechosos.
- Rápida identificación de las explotaciones, productos, mataderos, cotos y otras instalaciones potencialmente infectadas.
- Limpieza y desinfección de los transportes.
- Aislamiento y sacrificio de los animales infectados y susceptibles de contraer la enfermedad, seguido de desinfección y vacío sanitario de las explotaciones afectadas.
- Control de jabalíes silvestres.
- Control de vectores biológicos (garrapatas).
- Establecimiento de zonas de protección y vigilancia donde se pongan en funcionamiento medidas específicas de control de la enfermedad: limitación en el movimiento de animales, seguimiento clínico, toma de muestras, etc.

Recientemente (enero 2022) se ha desarrollado un documento en el que se recogen las distintas medidas que ha desarrollado el MAPA en colaboración y coordinación con las distintas CCAA para prevenir la entrada y difusión del virus de la PPA en España dado el riesgo que supone el avance de la enfermedad por distintos países de la Unión Europea.

## 2. MARCO LEGAL.

### 2.1. NORMATIVA NACIONAL

- Enfermedad de declaración obligatoria según el **Real Decreto 526/2014**, de 20 de junio, por el que se establece la lista de las enfermedades de los animales de declaración obligatoria y se regula su notificación.

## 2.2. NORMATIVA COMUNITARIA

- **Reglamento (UE) 2016/429** del Parlamento Europeo y del Consejo, de 9 de marzo de 2016, relativo a las enfermedades transmisibles de los animales y por el que se modifican o derogan algunos actos en materia de sanidad animal («Legislación sobre sanidad animal»). La PPA se incluye en el artículo 5 como una de las enfermedades objeto de aplicación del Reglamento.
- **Reglamento de Ejecución (UE) 2018/1882** de la Comisión, de 3 de diciembre de 2018 relativo a la aplicación de determinadas normas de prevención y control a categorías de enfermedades enumeradas en la lista y por el que se establece una lista de especies y grupos de especies que suponen un riesgo considerable para la propagación de dicha enfermedad de la lista. La PPA aparece categorizada como A+D+E, siendo por tanto de aplicación medidas inmediatas para su erradicación ante su detección, medidas de prevención durante los movimientos y medidas de vigilancia.
- **Reglamento Delegado (UE) 2020/687** de la Comisión, de 17 de diciembre de 2019, por el que se completa el Reglamento (UE) 2016/429 del Parlamento Europeo y del Consejo en lo referente a las normas relativas a la prevención y el control de determinadas enfermedades de la lista.
- **Reglamento Delegado (UE) 2020/688** de la Comisión, de 17 de diciembre de 2019, por el que se completa el Reglamento (UE) 2016/429 del Parlamento Europeo y del Consejo en lo referente a los requisitos zoonosanitarios para los desplazamientos dentro de la Unión de animales terrestres y de huevos para incubar.
- **Reglamento Delegado (UE) 2020/689** de la Comisión, de 17 de diciembre de 2019, por el que se completa el Reglamento (UE) 2016/429 del Parlamento Europeo y del Consejo en lo referente a las normas de vigilancia, los programas de erradicación y el estatus de libre de enfermedad con respecto a determinadas enfermedades de la lista y enfermedades emergentes.
- **Reglamento Delegado (UE) 2020/692** de la Comisión, de 30 de enero de 2020, que contempla el Reglamento (UE) 2016/429 del Parlamento Europeo y del Consejo en lo referente a las normas para la entrada en la Unión, y para el desplazamiento y la manipulación tras la entrada, de las partidas de determinados animales, productos reproductivos y productos de origen animal.
- **Reglamento de Ejecución (UE) 2020/2002** de la Comisión, de 7 de diciembre de 2020, por el que se establecen normas de desarrollo del Reglamento (UE) 2016/429 del Parlamento Europeo y del Consejo relativas a la notificación a la Unión y al envío de informes a la Unión sobre enfermedades de la lista, al sistema informático de información, así como a los formatos y los procedimientos de presentación y envío de informes relacionados con los programas de vigilancia y erradicación de la Unión y con la solicitud de reconocimiento del estatus de libre de enfermedad.
- **Reglamento de Ejecución (UE) 605/2021** de la Comisión, de 7 de abril de 2021, por el que se establecen medidas especiales de control de la peste porcina africana.

El Centro de Investigación de Sanidad Animal (CISA-INIA) es el laboratorio europeo de referencia para la Peste Porcina Africana desde 2006.

### 3. PROGRAMA NACIONAL DE VIGILANCIA SANITARIA.

Hay desarrollados dos programas:

#### 3.1 EL PROGRAMA NACIONAL DE VIGILANCIA SANITARIA PORCINA ADAPTADO AL INCREMENTO DE RIEGO DE INCURSIÓN DE PPA EN LA UE PARA 2022.

El mantenimiento de estatus libre en España de PPA es crucial para el mantenimiento de un flujo comercial y para la rentabilidad de las explotaciones porcinas. Por ello desde 2006 se bien desarrollando un Plan de Vigilancia sanitaria serológica del ganado porcino

Posteriormente modificado y reforzado por el incremento en la incidencia de Peste Porcina Africana (PPA) en los países del centro y este de Europa

El Programa Nacional de Vigilancia Sanitaria porcina adaptado al incremento de riesgo de incursión de PPA en la UE para 2022 perseguirá demostrar la ausencia de peste porcina clásica y de peste porcina africana. Además, se pretende minimizar el riesgo de entrada de la PPA mediante el control serológico de un mayor número de partidas de animales que vienen a España de otros socios comunitarios, así como a través del control de las condiciones de limpieza y desinfección de los vehículos de transporte de animales vivos procedentes de países con mayor riesgo sanitario en relación con la posibilidad de entrada del virus de la PPA. También se plantea como instrumento para la detección temprana de enfermedades exóticas o emergentes que permita dar una respuesta rápida a la posible entrada de estas enfermedades en nuestro territorio.

El programa de vigilancia contará con los siguientes componentes principales:

1. Vigilancia pasiva, basada en la notificación de sospechas por parte de ganaderos y veterinarios.
2. Vigilancia activa basada a su vez en:
  - a) *Vigilancia serológica de explotaciones*: muestreo serológico periódico de una muestra de la población de manera que sea representativa del censo porcino nacional. Las muestras obtenidas se analizarán en los laboratorios designados por las CCAA mediante la técnica de ELISA para la detección de anticuerpos específicos frente a los virus de PPA y PPC. Las muestras que resulten serológicamente positivas/dudosas mediante la técnica de ELISA de PPA deberán ser remitidas al LCV de Algete (LNR para ambas enfermedades) con objeto de confirmar o descartar la presencia de enfermedad. Las técnicas serológicas de confirmación son la técnica de inmunoperoxidasa y la técnica de inmunoblotting.
  - b) *Vigilancia en movimientos intracomunitarios y de terceros países*: análisis serológico y virológico de partidas de animales procedentes de movimientos intracomunitarios y/o de terceros países. El objetivo es la vigilancia de animales con destino para vida procedentes de otros países, especialmente si proceden de países en los que la enfermedad exista en la población doméstica o silvestre en parte de su territorio.

- c) *Vigilancia en mataderos*. Investigación postmortem de lesiones macroscópicas compatibles con ser PPA y PPC.
  - d) *Vigilancia en fauna silvestre (jabalíes)*. Esta vigilancia se desarrolla dentro del Programa nacional de vigilancia epidemiológica de PPC, PPA y enfermedad de Aujeszky en poblaciones de jabalíes. Los jabalíes han jugado un papel principal en la diseminación de la PPA en Europa desde su entrada en 2007 desde Georgia
3. Control de las condiciones de limpieza y desinfección de vehículos provenientes de países de riesgo. Los vehículos de transporte son una vía frecuente de propagación de las enfermedades infecciosas del ganado. Para ello se establecerá una vigilancia específica mediante controles especiales, tanto documentales como físicos, de las condiciones de limpieza y desinfección de los vehículos dedicados al transporte de cerdos vivos que procedan de países considerados de riesgo.

### **3.2 PROGRAMA NACIONAL DE VIGILANCIA EPIDEMIOLÓGICA DE PESTE PORCINA CLÁSICA, PESTE PORCINA AFRICANA Y ENFERMEDAD DE AUJESZKY EN POBLACIONES DE JABALÍES.**

En ciertos países de la Unión Europea está documentada la relación epizootiológica entre la población salvaje de jabalíes y muchos de los focos de PPC. En cuanto a la PPA, el ciclo de infección entre las garrapatas del género *Ornithodoros* spp. y los cerdos salvajes africanos, con transmisión a los cerdos domésticos, permiten mantener la enfermedad de forma endémica en extensas zonas de África Sub-sahariana. Por otro lado, la población de jabalíes ha jugado un papel principal en la diseminación de la PPA en Europa desde su entrada en 2007 desde Georgia.

En lo que respecta a la enfermedad de Aujeszky (EA), el jabalí euroasiático (*Sus scrofa*) tiene un papel importante en la epidemiología de la misma. La situación epidemiológica del virus difiere entre zonas geográficas en paralelo con la demografía y los distintos aprovechamientos de las poblaciones de jabalíes.

El objetivo del programa es determinar la situación sanitaria de las poblaciones de jabalí con respecto a los virus de la PPA y de la PPC, demostrando su ausencia en España según las directrices de la OIE.

En lo que respecta al virus de la EA, el objetivo es realizar un seguimiento de la situación de las poblaciones silvestres de jabalí con la finalidad de monitorizar la distribución geográfica de la enfermedad y la evolución temporal de sus prevalencias en España.

El alcance del programa serán las poblaciones peninsulares de jabalíes silvestres.

El programa de vigilancia se basa en una investigación serológica activa que permita determinar la presencia o ausencia de la enfermedad en la población estudiada. El muestreo se realizará en la temporada de caza.

## 4. DIAGNÓSTICO DE LABORATORIO.

### 4.1. DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL.

Hay varias enfermedades que cursan con síndrome hemorrágico en el cerdo y según el agente etiológico las podemos dividir en:

- Bacterianas:
  - Actinobacilosis
  - Salmonelosis
  - Erisipelas: Mal rojo
  - Pasterelosis aguda
  - Estreptococcosis
- Víricas:
  - Peste Porcina Clásica PPC
  - Circovirus: Síndrome de Dermatitis y Nefropatía Porcina PDNS y PMWS.
  - Enfermedad de Aujeszky
- Intoxicación por cumarinas

Para hacer el diagnóstico diferencial de estas enfermedades son imprescindibles las pruebas de laboratorio.

### 4.2. CARACTERÍSTICAS MOLECULARES Y SEROLÓGICAS PARA EL DIAGNÓSTICO

La partícula viral, de 200 nm de diámetro, está compuesta por tres envolturas concéntricas, con una envoltura externa adicional de forma hexagonal que adquiere al salir por gemación a través de la membrana de la célula infectada.

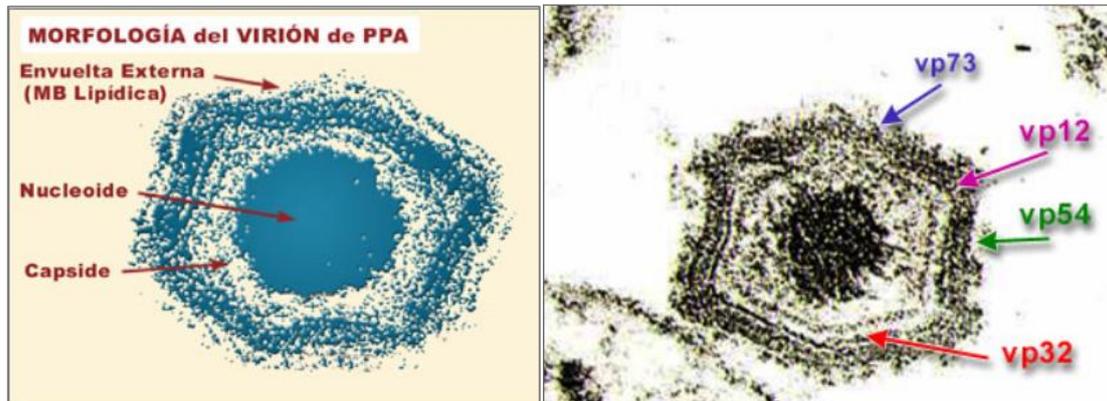
El estudio de la partícula vírica por microscopía electrónica y otras técnicas bioquímicas y genéticas, han permitido identificar **más de 60 proteínas estructurales** con un tamaño comprendido entre 10,000 y 150,000 Da en partículas víricas intracelulares (200 nm) (Alejo et al., 2018). También, se han identificado **más de cien proteínas asociadas a infección** en macrófagos porcinos infectados (Sánchez-Vizcaíno & Arias, 2012).

En relación con las proteínas estructurales:

Las proteínas de adhesión p12 y p24 se encuentran en la membrana externa de las partículas extracelulares, mientras que las proteínas p150, p37, p34 y p14 se localizan en el interior del virus. La envoltura externa contiene también el CD2v (EP402R), es la única glicoproteína de la partícula vírica y está implicada en la **propiedad de hemoadsorción** del virus. La proteína Vp72 es el principal componente de la cápside del virus, que envuelve el interior del virus, pero no es la proteína fundamental de la membrana. Por el contrario, la proteína fundamental de la membrana es la p54, codificada por el gen E183L y localizada en el exterior de la envoltura. La composición interna de la envoltura es muy compleja

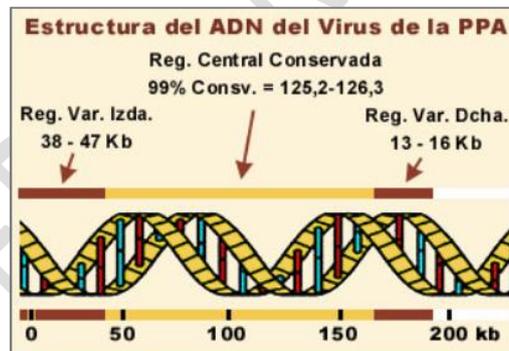
Algunas de estas proteínas son muy antigénicas, como las proteínas estructurales p72, p54 (25 kda) y p12 implicadas en la unión del virus a la célula, y la p32, implicada en eventos relacionados con la internalización del virus. Aunque estas proteínas no se han relacionado

con la inducción de mecanismos inmunitarios que confieran una protección total durante la infección, **son de gran utilidad como antígenos para el diagnóstico serológico.**



[sanidadanimal.info/cursos/enfermedades-infecciosas-porcinas/](http://sanidadanimal.info/cursos/enfermedades-infecciosas-porcinas/)

En el interior de la partícula viral se encuentra el DNA viral de doble cadena de 170-190 kb. Estudios de variabilidad demuestran que el DNA viral está constituido por **una región central más conservada** (con una región que exhibe cierta variabilidad) de aproximadamente 125 kb y **dos regiones variables** situadas en los **extremos** de la molécula, donde se localiza la mayor diversidad entre aislados. Estas regiones variables codifican 5 familias de multigenes que están directamente implicados en la variabilidad del genoma del virus.



[sanidadanimal.info/cursos/enfermedades-infecciosas-porcinas/](http://sanidadanimal.info/cursos/enfermedades-infecciosas-porcinas/)

#### 4.3. CARACTERÍSTICAS PARA EL ENVÍO DE MUESTRAS AL LABORATORIO.

Debido al alto riesgo de difusión de la PPA, siempre que se visite una explotación, así como en la propia explotación sospechosa, se deben mantener unas estrictas medidas de bioseguridad.

Algunos aspectos de bioseguridad que son importantes recordar serían los siguientes:

- medidas a tomar para la entrada en la explotación,
- restricción y control de movimientos en la explotación sospechosa,
- limpieza y desinfección fundamental para evitar la diseminación del virus
- control de vectores

La toma de muestras debe realizarse con material estéril y deberán ser enviadas de forma rápida y segura al Laboratorio Nacional de Referencia para la PPA, que es el Laboratorio Central de Veterinaria de Algete.

Las muestras se enviarán refrigeradas (4°C) cuando el tiempo de transporte sea inferior a 72 horas, en caso de que sea superior deberán ir congeladas (-20°C o -70°C). Las muestras irán dentro de un triple envase, en el exterior de este irá localizada la documentación que contendrá toda la información relacionada con las muestras.

Las **muestras que se tomarán para ser enviadas al laboratorio** son las siguientes:

1. Para la realización del diagnóstico serológico:

- Suero: sangre completa empleando tubos estériles sin anticoagulante para la detección de anticuerpos frente al virus de la PPA.

2. Para realizar el diagnóstico virológico:

- Sangre: sangre completa con EDTA.
- A partir de animales muertos:
  - Tonsilas
  - Ganglios linfáticos gastrohepáticos, retrofaríngeos, submandibulares y renales
  - Bazo
  - Riñón
  - Pulmón
- En caso de cuerpos autolisados, la muestra recomendada será un hueso largo o el esternón
- Garrapatas del género Ornithodoros.

#### **4.4. DIAGNÓSTICO VIROLÓGICO (Identificación del agente)**

##### **4.4.1 Aislamiento del virus**

El virus de PPA se aísla en cultivo primario de leucocitos de porcino. Es capaz de infectar y replicarse de forma natural en cultivos de leucocitos de sangre periférica de cerdo, produciendo un efecto citopático (ECP) y previamente a la lisis celular, un efecto característico de hemoadsorción (HAD).

Este virus en principio no replica en ninguna de las líneas celulares continuas establecidas.

El aislamiento se confirmará por técnicas de PCR.

##### **4.4.2 Técnica de hemoadsorción (HAD)**

Se comprueba la capacidad de HAD del virus aislado, ya que no todas las cepas la presentan.

La HAD consistente en la adhesión de los hematíes del cerdo alrededor de los leucocitos que han sido infectados por virus de PPA. Presenta una imagen al microscopio característica de mórula o corona (roseta) de eritrocitos alrededor de los leucocitos.

Un resultado positivo en las pruebas HAD es definitivo para el diagnóstico de la PPA. Se ha aislado un pequeño número de virus “no hemadsorbentes”, en gran parte avirulentos, aunque algunos producen PPA aguda típica.

Se trata de una técnica laboriosa y lenta.

#### **4.4.3 Detección de antígeno mediante la prueba de inmunofluorescencia directa (FAT).**

Se puede utilizar FAT como un método adicional para detectar antígeno en tejidos de cerdos sospechosos en el campo o inoculados en el laboratorio. La FAT positiva, junto con signos clínicos y lesiones compatibles, puede proporcionar un diagnóstico provisional de la PPA.

#### **4.4.4 Detección del genoma vírico por reacción en cadena de la polimerasa pcr.**

Se han desarrollado técnicas de PCR utilizando cebadores de una región muy conservada del genoma (proteína p72) para detectar e identificar una amplia gama de cepas pertenecientes a todos los genotipos víricos conocidos, incluyendo virus no hemadsorbentes y cepas de baja virulencia.

Las técnicas de la PCR son particularmente útiles para identificar ADN vírico en tejidos de cerdos que son inadecuados para el aislamiento de virus o la detección de antígeno debido a que han sufrido putrefacción o cuando hay buenas razones para sospechar que el virus puede haberse inactivado antes de que las muestras hayan llegado al laboratorio.

Debido a la alta sensibilidad y especificidad, junto con la posibilidad de una aplicación de alto rendimiento, la PCR es un método recomendado para el cribado y la confirmación de los casos sospechosos.

Se han descrito varios métodos de PCR en tiempo real convencional (Agüero et al., 2003; Basto et al., 2006; Fernández-Pinero et al., 2013; King et al., 2003; Tignon et al., 2011) y existen varios kits comerciales de PCR para la detección del VPPA. También se han descrito técnicas de RT-PCR dúplex para la detección simultánea y diferencial del VPPA y del VPPC (Agüero et al., 2004; Haines et al., 2013). Todo protocolo de PCR que se utilice debe haber sido validado para el uso en cuestión, según lo establecido en los capítulos del Manual Terrestre de la OIE relacionados con los métodos de validación de las pruebas de diagnóstico y el de desarrollo y optimización de pruebas de detección de ácido nucleico.

#### **4.4.5 Tipificación genéticas de las cepas aisladas del virus de PPA.**

El producto amplificado mediante la PCR se puede tratar con enzimas de restricción y/o secuenciar con objeto de realizar estudios de epidemiología molecular que nos permitan determinar el origen más probable de un virus mediante la elaboración del correspondiente árbol filogenético. Actualmente se dispone en bancos de datos de una amplia colección de secuencias de gran número de cepas de VPPA. Mediante al análisis y comparación de estas secuencias y de sus perfiles de enzimas de restricción se elaboran los correspondientes árboles filogenéticos, permitiendo determinar el posible origen epizootiológico ante la aparición de un nuevo foco en una zona.

Los estudios de secuenciación están dirigidos a tres regiones del virus:

- gen B646L –Proteína p72 (proteína principal de la cápsida). –Diferencia 24 genotipos.
- gen E183L –Proteína p54
- gen B602L –Secuencias de repetición en tándem (TRS) situadas en la región variable central del gen.

#### **4.5. DIAGNÓSTICO SEROLÓGICO**

La detección de anticuerpos frente al VPPA resulta de gran utilidad en casos de formas subagudas y crónicas de enfermedad, así como para la realización de pruebas a gran escala o programas de erradicación por los siguientes motivos:

- La producción de anticuerpos resulta muy temprana (7-10 días post-infección).
- No se dispone de vacunas contra la PPA, por lo que la aparición de anticuerpos específicos contra la PPA sólo se debe a la infección con el virus de esta enfermedad.
- En cerdos que se hayan recuperado de la enfermedad pueden detectarse anticuerpos específicos durante muchos meses o incluso durante toda la vida.

Las técnicas más utilizadas para la detección de anticuerpos específicos de PPA son la Inmunofluorescencia Indirecta (IFI), el Inmunoblotting (IB), la Inmunoperoxidasa (IPT) y las técnicas de ELISA, indirecto y de bloqueo.

##### **4.5.1 ELISA**

Mediante este método se puede analizar un gran número de muestras (todas las fases se pueden automatizar) en un relativo corto periodo de tiempo (3 horas), siendo una técnica sensible y específica, que no precisa el empleo de cultivos celulares.

Tipos de ELISA:

- El ELISA indirecto se basa en la detección de anticuerpos contra el VPPA ligados a las proteínas víricas, las cuales se unen a una fase sólida, mediante la adición de un conjugado de proteína A con una enzima, que produce una reacción coloreada visible en presencia del sustrato adecuado.
- El ELISA de bloqueo funciona en base al principio de que los anticuerpos contra el VPPA de los sueros problema pueden bloquear la unión de un anticuerpo monoclonal (MAb) al antígeno.

##### **4.5.2 Inmunofluorescencia indirecta (IFI)**

Es una técnica rápida (2 horas) con un elevado grado de sensibilidad y especificidad para la detección de anticuerpos de la PPA, tanto de sueros como de exudados de tejidos. Se basa en la detección de anticuerpos de la PPA que se unen a una monocapa de células MS infectadas con un virus adaptado de la PPA. La reacción antígeno-anticuerpo se detecta por medio de una proteína A o un anti-IgG de cerdo marcada con fluoresceína.

En el caso de las muestras positivas sobre el tapiz celular se localizan fluorescencias en determinados puntos cercanos al núcleo que serán los centros replicativos del virus.

#### **4.5.3 Inmunoperoxidasa (IPT)**

Las técnicas inmunocitoquímicas se aplican sobre células fijadas sobre un soporte celular, para poner en evidencia la unión antígeno-anticuerpo mediante el uso de enzimas, como la peroxidasa.

En el caso de la IPT para la detección de anticuerpos frente a VPPA, las células VERO son infectadas con una cepa de VPPA adaptada a esta línea celular. Estas células infectadas se fijan y se utilizan como soporte para la determinación de la presencia de anticuerpos específicos frente al VPPA en muestras problemas mediante el uso de un anticuerpo (Proteína A) conjugado con la enzima peroxidasa.

Los valores de sensibilidad y especificidad de la IPT son comparables al IB.

Permite analizar un mayor número de sueros a la vez en relación con la técnica de IB.

#### **4.5.4 Inmunoblotting (IB)**

Es una técnica validada con valores de especificidad y sensibilidad del 98%.

Se basa en la inmunotransferencia de anticuerpos presentes en la muestra a través de un filtro de nitrocelulosa previamente antigenado con las proteínas virales del VPPA. Para la obtención de los filtros antigenados de nitrocelulosa las proteínas virales se separan electroforéticamente en geles de poliacrilamida. En estudios experimentales se han determinado las proteínas del VPPA capaces de producir anticuerpos específicos a partir del día 10 post-infección, detectables por IB.

## **BIBLIOGRAFÍA**

Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación

[https://www.mapa.gob.es/es/ganaderia/temas/sanidad-animal-higiene-ganadera/sanidad-animal/enfermedades/peste-porcina-africana/peste\\_porcina\\_africana.aspx](https://www.mapa.gob.es/es/ganaderia/temas/sanidad-animal-higiene-ganadera/sanidad-animal/enfermedades/peste-porcina-africana/peste_porcina_africana.aspx)

Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE). Peste Porcina Africana.

[https://www.oie.int/fileadmin/Home/esp/Health\\_standards/tahm/3.09.01\\_Peste\\_porcina\\_africana.pdf](https://www.oie.int/fileadmin/Home/esp/Health_standards/tahm/3.09.01_Peste_porcina_africana.pdf)

VISAVET.

<https://www.sanidadanimal.info/es/>

MATERIAL NO OFICIAL

**MATERIAL PARA LA PREPARACIÓN DEL TEMA 65**

**PESTE PORCINA CLÁSICA. MARCO LEGAL. PROGRAMAS NACIONALES DE VIGILANCIA SANITARIA. DIAGNÓSTICO DE LABORATORIO.**

*Este material no tiene carácter oficial, por lo que en ningún caso vinculará al Tribunal Calificador. Constituye, únicamente, un instrumento complementario que servirá de apoyo al opositor para enfocar cada uno de los epígrafes, pero nunca de forma exclusiva ni excluyente. El Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación no se hace responsable del contenido del mismo.*

*Los materiales no serán objeto de actualización constante.*

## **ÍNDICE**

### **1. PESTE PORCINA CLÁSICA (PPC).**

- 1.1 ETIOLOGÍA
- 1.2. EPIDEMIOLOGÍA Y TRANSMISIÓN
- 1.3. SINTOMATOLOGÍA Y LESIONES
- 1.4. PROFILAXIS

### **2. MARCO LEGAL.**

- 2.1. NORMATIVA NACIONAL
- 2.2. NORMATIVA COMUNITARIA

### **3. PROGRAMA NACIONAL DE VIGILANCIA SANITARIA.**

### **4. DIAGNÓSTICO DE LABORATORIO.**

- 4.1 DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL.
- 4.2 CARACTERÍSTICAS MOLECULARES Y SEROLÓGICAS PARA EL DIAGNÓSTICO.
- 4.3 CARACTERÍSTICAS PARA EL ENVÍO DE MUESTRAS AL LABORATORIO.
- 4.4 DIAGNÓSTICO VIROLÓGICO (Identificación del agente).
- 4.5. DIAGNÓSTICO SEROLÓGICO.

## **1. PESTE PORCINA CLÁSICA.**

La peste porcina clásica (PPC), también denominada cólera del cerdo es una enfermedad vírica muy contagiosa que afecta al ganado porcino, tanto doméstico como salvaje.

### **1.1. ETIOLOGÍA**

La PPC está causada por un virus ARN monocatenario de la familia Flaviviridae, género Pestivirus. Se encuentra estrechamente relacionado, tanto antigénica como genéticamente con otros dos virus integrantes del mismo género pestivirus, el virus de la Diarrea Vírica Bovina (BVD) y el de la Enfermedad de la Frontera (BD), que, si bien afectan principalmente al ganado bovino y ovino, también pueden infectar al ganado porcino, originando problemas de reacción cruzada en el diagnóstico serológico de laboratorio. Sólo existe un serotipo de virus de la PPC.

El virus es parcialmente resistente a un calor moderado (se inactiva a 56º C durante 60 minutos). Sobrevive bien en condiciones frías y puede sobrevivir un tiempo determinado a algunos procesamientos de la carne, si bien en los productos curados como jamones, lomos y paletillas serranas e ibéricas, el virus se inactiva durante el tiempo de curación comercial de cada producto, oscilando entre los 250 días para el jamón ibérico a los 140 y 126 para el jamón serrano y el lomo ibérico respectivamente.

Es inactivado a pH<3,0 o pH>11,0 y es sensible al éter y cloroformo.

Como desinfectantes se utiliza el ácido cítrico al 0,5%, el hidróxido de sodio (2%), la formalina (1%), yodóforos fuertes (1%) en ácido fosfórico entre otros.

### **1.2. EPIDEMIOLOGÍA Y TRANSMISIÓN**

En España la PPC fue una enfermedad endémica desde el año 1952 hasta su erradicación en 1986. Con posterioridad se han producido dos brotes con carácter epizootico uno en 1997-1998 (afectando a las provincias de Segovia, Sevilla, Zaragoza y Lérida) y otro en 2001-2002 (Lérida, Castellón, Valencia, Cuenca y Barcelona), ambos solventados con éxito. En la actualidad España está declarada como país libre de PPC.

En la actualidad, todos los Estados miembros de la UE cuentan con estatus oficialmente libre según reconocimiento oficial de la OIE. Sin embargo, en las últimas décadas se han declarado focos en algunos países del centro y este de Europa, tanto en explotaciones de cerdos domésticos como en poblaciones de jabalíes silvestres. Desde el año 2010 han sido comunicados a través de ADNS 11 focos de PPC en cerdo doméstico (4 en Letonia, 5 en Lituania y 2 en Serbia) y 91 focos en jabalíes, todos ellos localizados en Letonia. El último foco en cerdo doméstico dentro de la UE se detectó en junio del 2014 en Letonia, en una explotación de traspatio con un censo de 8 cerdos de los que tres estaban afectados y uno muerto. Los últimos focos en jabalíes silvestres fueron notificados en 2015 en Letonia.

La PPC está ampliamente distribuida por los diferentes continentes, suponiendo en este momento una importante amenaza al sistema productivo de la Unión Europea, el virus puede

encontrarse en amplias zonas de la Federación Rusa, Centroamérica y Caribe, Sudamérica y Asia.

Los cerdos y los jabalíes son el único reservorio natural del virus de la PPC.

La transmisión puede producirse por dos vías:

- *por contacto directo entre enfermos y sanos*: todas las secreciones y excreciones son fuente de contagio (secreciones nasales, saliva, heces, orina, exudado conjuntival, exudado genital, semen y heridas sangrantes).
- *de forma indirecta*:
  - Personas que entran en las explotaciones: veterinarios, comerciantes de porcinos, etc.
  - Contacto indirecto a través de materiales contaminados: herramientas, vehículos, ropa, calzado, instrumentos, equipo quirúrgico, etc.
  - Inseminación artificial con semen contaminado.
  - Alimentos para los cerdos a base de desechos insuficientemente cocidos.
  - Purines contaminados.
  - Transmisión de madres portadoras inaparentes a sus lechones (a través de la barrera placentaria) o a otros animales adultos susceptibles

### 1.3. SINTOMATOLOGÍA Y LESIONES

La PPC debe ser descartada ante cualquier caso que curse con cuadro hemorrágico o de sintomatología nerviosa.

La PPC puede cursar con una gran variedad de manifestaciones clínicas y anatomopatológicas dependiendo de la virulencia de la cepa, del estado inmunitario y edad del animal. Las lesiones características descritas para esta enfermedad, en general, se presentan solamente con cepas de alta virulencia, en animales no inmunizados y con más facilidad en lechones que en adultos. Pueden existir animales portadores asintomáticos de gran importancia en la eliminación de virus.

En general se han descrito en cerdos adultos las formas: aguda, subaguda y crónica de la enfermedad. Además, existe una forma transplacentaria de la PPC que puede dar lugar a diversas afecciones fetales y neonatales e infecciones persistentes asintomáticas.

- *Forma aguda*:
  - Fiebre (41°C), anorexia, letargia.
  - Hiperemia multifocal y lesiones hemorrágicas de la piel, conjuntivitis.
  - Cianosis de la piel, especialmente de las extremidades (orejas, miembros, cola, hocico).
  - Estreñimiento transitorio seguido por diarrea.
  - Vómitos (ocasionales)
  - Disnea, tos.
  - Ataxia, paresia y convulsiones.

- Los cerdos se amontonan.
- La muerte se produce 5-15 días después del comienzo de la enfermedad.
- La mortalidad de los cerdos jóvenes puede aproximarse al 100%.
- **Forma subaguda:**

Cursa con un cuadro clínico similar al descrito en la forma aguda, pero con menor severidad, sobreviviendo los animales durante mayor tiempo. La mortalidad generalmente no suele superar el 30% de los efectivos.
- **Forma crónica:**
  - Postración, apetito irregular y periodos intermitentes de pirexia con viremia.
  - Retrasos en el crecimiento o índices de conversión bajos.
  - Neumonía (disnea y tos) y diarrea.
  - Muerte debida frecuentemente a infecciones secundarias.
  - Se pueden originar animales portadores asintomáticos.
- **Forma transplacentaria y congénita persistente:**

El VPPC también atraviesa fácilmente la placenta pudiendo producir lesiones transplacentarias, sin que aparezca otro tipo de signos ni en el animal ni en la explotación. Estas formas son características de infecciones por cepas de baja virulencia en animales gestantes o por cepas de alta o moderada virulencia en gestantes vacunadas. Los efectos que el VPPC produce sobre el feto varían según el tiempo de gestación en que fue infectado, la virulencia de la cepa y el estado inmunitario. En general, se puede observar:

  - Muerte del embrión o feto, momificaciones fetales.
  - Malformaciones fetales.
  - Lechones nacidos muertos o vivos débiles.
  - Infección congénita persistente.

De todas estas formas la infección congénita persistente es una de las más graves pues, no sólo representa un enorme trastorno económico sino también sanitario, al originar lechones que eliminan virus de forma permanente. Los lechones parecen sanos, pero son virémicos y hacia las nueve semanas de edad comienzan a presentar problemas sanitarios de conjuntivitis, anorexia, retraso en el crecimiento, diarreas intermitentes, etc. Como signo más característico de la necropsia, se observa una marcada atrofia del timo. Esta forma es muy grave para los programas de control y erradicación de esta enfermedad.

En cuanto a las lesiones que aparecen, son las siguientes:

- **Forma aguda:**
  - Leucopenia y trombocitopenia.
  - Cianosis y eritemas en piel.
  - Úlceras y necrosis en amígdalas.
  - Congestión hemorrágica y aumento de tamaño de ganglios linfáticos, especialmente en los renales, gastrohepáticos, mesentéricos y submandibulares.
  - Hemorragias e infartos en los pulmones.
  - Congestión e infartos en la zona marginal de bazo.

- Lesiones en riñón con hemorragias de tamaño variable en la corteza y pelvis renal, pudiendo aparecer también en la mucosa de la vejiga de la orina.
- Hemorragias en la mayor parte de las serosas de los órganos internos.
- Edemas en las cavidades internas.
- Encefalomiелitis con manguito perivasculар.
- *Forma subaguda:*
  - Lesiones más variables que en la forma aguda.
  - Hemorragias en ganglios linfáticos y riñón.
  - Consolidación pulmonar de lóbulos craneales.
  - Hemorragias en mucosa intestinal.
- *Forma crónica:*
  - Úlceras en forma de botón en el ciego y el intestino grueso, particularmente cerca de la válvula íleocecal.
  - Depleción generalizada del tejido linfoide, en especial del timo.
  - Pericarditis y consolidación pulmonar que puede llevar a una bronconeumonía.
  - Las lesiones hemorrágicas e inflamatorias suelen estar ausentes.
- *Forma congénita:*
  - Hipomielogénesis, hipoplasia cerebelar, microencefalia, hipoplasia pulmonar, hidropesía y otras malformaciones.

#### 1.4. PROFILAXIS

La política de erradicación del virus de la PPC en la U.E. está basada en el sacrificio sanitario de los animales afectados y en contacto, estando prohibida la aplicación de vacunas frente a esta enfermedad; no obstante, en el caso de que haya confirmado la enfermedad y amenace con propagarse de forma alarmante, se podrá decidir la vacunación de emergencia. En este caso, la autoridad competente elaborará y remitirá al Ministerio de Agricultura Pesca y Alimentación un Plan de vacunación de emergencia.

Las vacunas convencionales frente a la PPC se han basado en el empleo de virus vivo atenuado mediante pases en conejo (lapinizadas como la cepa china) o en cultivos celulares (cepa thiverval). Estas vacunas tienen los inconvenientes de que pueden originar la aparición de animales portadores y de que la respuesta inmune que generan no permite distinguir a los animales vacunados sanos de aquellos que han tenido contacto con el virus campo.

El desarrollo de vacunas marcadoras capaces de instaurar en los animales una inmunidad protectora distinguible mediante técnicas de laboratorio de la reacción inmune producida por la infección natural con virus silvestre puede suponer un arma de gran utilidad que evite el sacrificio masivo de animales, especialmente cuando se encuentren afectadas zonas de alta densidad porcina.

Se hace imprescindible además el control sobre el desplazamiento de los cerdos vivos entre países, que se debe apoyar en un sistema de diagnóstico y de información epidemiológica rápido y eficaz, de modo que permita la puesta al día constante de la situación a los órganos encargados del control.

En general, la profilaxis debe estar basada en la aplicación de medidas encaminadas a impedir la introducción de la enfermedad desde el exterior, así como impedir la diseminación de la enfermedad una vez que ésta se ha detectado en nuestra ganadería. Estas medidas incluyen:

- Control de movimiento de animales.
- Inspección de las explotaciones.
- Rápida detección y confirmación de la enfermedad en el laboratorio.
- Rápida denuncia a las autoridades competentes de todos los casos declarados sospechosos.
- Rápida identificación de las explotaciones, productos, mataderos, y otras instalaciones potencialmente infectadas.
- Limpieza y desinfección de los transportes.
- Aislamiento y sacrificio de los animales infectados y susceptibles de contraer la enfermedad, seguido de desinfección y vacío sanitario de las explotaciones afectadas.
- Establecimiento de zonas de protección y vigilancia donde se pongan en funcionamiento medidas específicas de control de la enfermedad: limitación en el movimiento de animales, seguimiento clínico, toma de muestras, etc.
- Estudio y control de la población de jabalíes.
- Vacunación en caso de que la situación epidemiológica lo haga recomendable.

## 2. MARCO LEGAL.

### 2.1. MARCO NACIONAL

- Enfermedad de declaración obligatoria según el **Real Decreto 526/2014**, de 20 de junio, por el que se establece la lista de las enfermedades de los animales de declaración obligatoria y se regula su notificación.

### 2.2. MARCO COMUNITARIO

- **Reglamento (UE) 2016/429** del Parlamento Europeo y del Consejo, de 9 de marzo de 2016, relativo a las enfermedades transmisibles de los animales y por el que se modifican o derogan algunos actos en materia de sanidad animal («Legislación sobre sanidad animal»). La PPC se incluye en el Anexo II como una de las enfermedades objeto de aplicación del Reglamento.
- **Reglamento de Ejecución (UE) 2018/1882** de la Comisión, de 3 de diciembre de 2018 relativo a la aplicación de determinadas normas de prevención y control a categorías de enfermedades enumeradas en la lista y por el que se establece una lista de especies y grupos de especies que suponen un riesgo considerable para la propagación de dicha enfermedad de la lista. La PPC aparece categorizada como A+D+E, siendo por tanto de aplicación medidas inmediatas para su erradicación ante su detección, medidas de prevención durante los movimientos y medidas de vigilancia.
- **Reglamento Delegado (UE) 2020/687** de la Comisión, de 17 de diciembre de 2019, por el que se completa el Reglamento (UE) 2016/429 del Parlamento Europeo y del Consejo

en lo referente a las normas relativas a la prevención y el control de determinadas enfermedades de la lista.

- **Reglamento Delegado (UE) 2020/688** de la Comisión, de 17 de diciembre de 2019, por el que se completa el Reglamento (UE) 2016/429 del Parlamento Europeo y del Consejo en lo referente a los requisitos zoonosanitarios para los desplazamientos dentro de la Unión de animales terrestres y de huevos para incubar.
- **Reglamento Delegado (UE) 2020/689** de la Comisión, de 17 de diciembre de 2019, por el que se completa el Reglamento (UE) 2016/429 del Parlamento Europeo y del Consejo en lo referente a las normas de vigilancia, los programas de erradicación y el estatus de libre de enfermedad con respecto a determinadas enfermedades de la lista y enfermedades emergentes.
- **Reglamento Delegado (UE) 2020/692** de la Comisión, de 30 de enero de 2020, que contempla el Reglamento (UE) 2016/429 del Parlamento Europeo y del Consejo en lo referente a las normas para la entrada en la Unión, y para el desplazamiento y la manipulación tras la entrada, de las partidas de determinados animales, productos reproductivos y productos de origen animal.
- **Reglamento de Ejecución (UE) 2020/2002** de la Comisión, de 7 de diciembre de 2020, por el que se establecen normas de desarrollo del Reglamento (UE) 2016/429 del Parlamento Europeo y del Consejo relativas a la notificación a la Unión y al envío de informes a la Unión sobre enfermedades de la lista, al sistema informático de información, así como a los formatos y los procedimientos de presentación y envío de informes relacionados con los programas de vigilancia y erradicación de la Unión y con la solicitud de reconocimiento del estatus de libre de enfermedad.

El Laboratorio Europeo de Referencia está en Hannover, Alemania, University of Veterinary Medicine Hannover, Foundation Institute of Virology.

### **3. PROGRAMA NACIONAL DE VIGILANCIA SANITARIA.**

Hay desarrollados dos programas:

#### **3.1 EL PROGRAMA NACIONAL DE VIGILANCIA SANITARIA PORCINA ADAPTADO AL INCREMENTO DE RIEGO DE INCURSIÓN DE PPA EN LA UE PARA 2022.**

El programa de vigilancia estará orientado principalmente hacia la detección temprana de las enfermedades porcinas que tradicionalmente han tenido mayor repercusión en el sector, como son la peste porcina clásica (PPC) y, muy especialmente, la peste porcina africana (PPA), sin menoscabo de cualquier otra enfermedad de declaración obligatoria que pueda afectar al ganado porcino.

El programa rebajó el número de muestras a recoger en relación con la PPC en 2014, dada la situación de estabilidad de los últimos años en toda Centro Europa.

El Programa Nacional de Vigilancia Sanitaria porcina adaptado al incremento de riesgo de incursión de PPA en la UE para 2022 perseguirá demostrar la ausencia de peste porcina clásica y de peste porcina africana. Además, se pretende minimizar el riesgo de entrada de la PPA

mediante el control serológico de un mayor número de partidas de animales que vienen a España de otros socios comunitarios, así como a través del control de las condiciones de limpieza y desinfección de los vehículos de transporte de animales vivos procedentes de países con mayor riesgo sanitario en relación con la posibilidad de entrada del virus de la PPA. También se plantea como instrumento para la detección temprana de enfermedades exóticas o emergentes que permita dar una respuesta rápida a la posible entrada de estas enfermedades en nuestro territorio.

El programa de vigilancia contará con los siguientes componentes principales:

1. Vigilancia pasiva, basada en la notificación de sospechas por parte de ganaderos y veterinarios.

2. Vigilancia activa basada a su vez en:

- a) *Vigilancia serológica de explotaciones*: muestreo serológico periódico de una muestra de la población de manera que sea representativa del censo porcino nacional. Las muestras obtenidas se analizarán en los laboratorios designados por las CCAA mediante la técnica de ELISA para la detección de anticuerpos específicos frente a los virus de PPA y PPC. Las muestras que resulten serológicamente positivas/dudosas mediante la técnica de ELISA de PPC deberán ser remitidas al LCV de Algete (LNR para ambas enfermedades) con objeto de confirmar o descartar la presencia de enfermedad. La técnica serológica de confirmación es la técnica de neutralización del virus con marcado inmunológico (NPLA).
- b) *Vigilancia en movimientos intracomunitarios y de terceros países*: análisis serológico y virológico de partidas de animales procedentes de movimientos intracomunitarios y/o de terceros países. El objetivo es la vigilancia de animales con destino para vida procedentes de otros países, especialmente si proceden de países en los que la enfermedad exista en la población doméstica o silvestre en parte de su territorio.
- c) *Vigilancia en mataderos*. Investigación postmortem de lesiones macroscópicas compatibles con ser PPA y PPC.
- d) *Vigilancia en fauna silvestre (jabalíes)*. Esta vigilancia se desarrolla dentro del **Programa nacional de vigilancia epidemiológica de PPC, PPA y enfermedad de Aujeszky (EA) en poblaciones de jabalíes. Los jabalíes han jugado un papel principal en la diseminación de la PPA en Europa desde su entrada en 2007 desde Georgia**

3. Control de las condiciones de limpieza y desinfección de vehículos provenientes de países de riesgo. Los vehículos de transporte son una vía frecuente de propagación de las enfermedades infecciosas del ganado. Para ello se establecerá una vigilancia específica mediante controles especiales, tanto documentales como físicos, de las condiciones de limpieza y desinfección de los vehículos dedicados al transporte de cerdos vivos que procedan de países considerados de riesgo.

### **3.2 PROGRAMA NACIONAL DE VIGILANCIA EPIDEMIOLÓGICA DE PESTE PORCINA CLÁSICA, PESTE PORCINA AFRICANA Y ENFERMEDAD DE AUJESZKY EN POBLACIONES DE JABALÍES.**

En ciertos países de la Unión Europea está documentada la relación epizootiológica entre la población salvaje de jabalíes y muchos de los focos de PPC. En cuanto a la PPA, el ciclo de infección entre las garrapatas del género *Ornithodoros* spp. y los cerdos salvajes africanos, con transmisión a los cerdos domésticos, permiten mantener la enfermedad de forma endémica en extensas zonas de África Sub-sahariana. Por otro lado, la población de jabalíes ha jugado un papel principal en la diseminación de la PPA en Europa desde su entrada en 2007 desde Georgia.

En lo que respecta a la enfermedad de Aujeszky (EA), el jabalí euroasiático (*Sus scrofa*) tiene un papel importante en la epidemiología de la misma. La situación epidemiológica del virus difiere entre zonas geográficas en paralelo con la demografía y los distintos aprovechamientos de las poblaciones de jabalíes.

El objetivo del programa es determinar la situación sanitaria de las poblaciones de jabalí con respecto a los virus de la PPA y de la PPC, demostrando su ausencia en España según las directrices de la OIE.

En lo que respecta al virus de la EA, el objetivo es realizar un seguimiento de la situación de las poblaciones silvestres de jabalí con la finalidad de monitorizar la distribución geográfica de la enfermedad y la evolución temporal de sus prevalencias en España.

El alcance del programa serán las poblaciones peninsulares de jabalíes silvestres.

El programa de vigilancia se basa en una investigación serológica activa que permita determinar la presencia o ausencia de la enfermedad en la población estudiada. El muestreo se realizará en la temporada de caza.

## **4. DIAGNÓSTICO DE LABORATORIO.**

### **4.1. DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL.**

Hay varias enfermedades que cursan con síndrome hemorrágico en el cerdo y según el agente etiológico las podemos dividir en:

- Bacterianas:
  - Actinobacilosis
  - Salmonelosis
  - Erisipelas: Mal rojo
  - Pasterelosis aguda
  - Estreptococcosis
  
- Víricas:
  - Peste Porcina Africana PPA
  - Circovirus: Síndrome de Dermatitis y Nefropatía Porcina PDNS y PMWS.

○ Enfermedad de Aujeszky

- Intoxicación por cumarinas

Para hacer el diagnóstico diferencial de estas enfermedades son imprescindibles las pruebas de laboratorio.

#### 4.2. CARACTERÍSTICAS MOLECULARES Y SEROLÓGICAS PARA EL DIAGNÓSTICO

La partícula vírica está formada por **4 proteínas estructurales (C, Erns, E1 y E2)**. La proteína C (p14) es componente de la nucleocápside. La proteína E1 (gp33), la proteína E2 (gp55) y la Erns (gp44/48) son glicoproteínas. La proteína Erns está localizada en la superficie del virión como homodímero, y también es secretada al medio extracelular. Las proteínas E1 y E2 están presentes en la envoltura viral como heterodímero E1-E2, aunque la E2 se encuentra también en forma homodimérica. **La proteína E2 es la más inmunogénica del virus y junto con la Erns inducen anticuerpos neutralizantes.**

Se han descrito **al menos 7 proteínas no estructurales**. Existe una marcada variabilidad antigénica entre los distintos aislados de VPPC, probablemente asociada a determinadas regiones situadas en la zona N- terminal de la proteína E2, y también sobre E1.

#### 4.3. CARACTERÍSTICAS PARA EL ENVÍO DE MUESTRAS AL LABORATORIO.

Debido al alto riesgo de difusión de la PPC siempre que se visite una explotación, así como en la propia explotación sospechosa, se deben mantener unas estrictas medidas de bioseguridad.

Algunos aspectos de bioseguridad que son importantes recordar serían los siguientes:

- medidas a tomar para la entrada en la explotación,
- restricción y control de movimientos en la explotación sospechosa,
- limpieza y desinfección fundamental para evitar la diseminación del virus.

La toma de muestras debe realizarse con material estéril y deberán ser enviadas de forma rápida y segura al Laboratorio Nacional de Referencia para la PPC, que es el Laboratorio Central de Veterinaria de Algete.

Las muestras se enviarán refrigeradas (4°C) cuando el tiempo de transporte sea inferior a 72 horas, en caso de que sea superior deberán ir congeladas (-20°C o -70°C). Las muestras irán dentro de un triple envase, en el exterior de este irá localizada la documentación que contendrá toda la información relacionada con las muestras.

Las **muestras que se tomarán para ser enviadas al laboratorio** son las siguientes:

A) Para la realización del **diagnóstico serológico**:

- Suero: sangre completa empleando tubos estériles sin anticoagulante para la detección de anticuerpos frente al virus de la PPC.

B) Para realizar el **diagnóstico virológico**:

- Sangre: sangre completa con EDTA.

- A partir de animales muertos:
  - Tonsilas
  - Ganglios linfáticos retrofaríngeos, parotídeos, mandibulares o mesentéricos.
  - Bazo
  - Riñón
  - Pulmón
  - Íleon (forma crónica)
  
- En caso de cuerpos autolisados, la muestra recomendada será un hueso largo o el esternón

#### **4.4. DIAGNÓSTICO VIROLÓGICO (Identificación del agente)**

##### **4.4.1 Aislamiento del virus.**

El aislamiento del virus se realiza en cultivos celulares de células de riñón porcino (PK-15 y SK-6), Es un método con alta sensibilidad, pero es lento y laborioso, requiere entre una y dos semanas de tiempo para obtener un resultado.

Los Pestivirus en el cultivo no producen efecto citopático, su presencia en el cultivo debe confirmarse mediante inmunotinción y técnicas de RT-PCR.

Las cepas aisladas del virus de la peste porcina clásica son útiles para la caracterización del virus, incluida la tipificación genética molecular.

##### **4.4.2 Detección de antígenos virales.**

Se emplean técnicas de inmunofluorescencia o ELISA de captura. Estas técnicas actualmente han sido sustituidas en la mayoría de los laboratorios por técnicas de detección de ácidos nucleicos, que son más rápidas, más específicas y sensibles.

En cuanto a las técnicas ELISA, la sensibilidad de la prueba de detección del antígeno debe ser suficiente para dar resultado positivo con animales que presenten signos clínicos de Peste porcina clásica, por eso solo se recomienda el uso de ELISA para la detección del antígeno en muestras procedentes de animales con signos clínicos o lesiones patológicas de la enfermedad. Su ventaja más importante es que en un breve período se puede analizar un elevado número de muestras.

##### **4.4.3 Detección de ácido nucleico viral**

La técnica de RT-PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa con transcripción inversa) pone de manifiesto la presencia del virus mediante la detección del genoma viral, por amplificación de un fragmento específico de su ARN, en concreto la región 5' no codificante (5'NTR).

Utilizando técnicas de RT-PCR, pueden detectarse animales infectados al principio del periodo de incubación, o durante un periodo de tiempo más largo en los casos en que los cerdos se recuperan. La RT-PCR solo detecta ácido nucleico del virus y puede dar resultados positivos en

casos en que el aislamiento del virus u otras técnicas han dado resultados negativos. Por lo tanto, la RT-PCR es más sensible que otras técnicas (como el ELISA de captura de antígeno o la técnica de inmunofluorescencia).

#### **4.4.5 Tipificación genética de las cepas aisladas del virus de la PPC**

La tipificación genética de las cepas aisladas del virus de la Peste porcina clásica se consigue determinando la secuencia nucleotídica de porciones del genoma vírico, en concreto de partes específicas de la región 5' no codificadora o del gen de la glucoproteína E2. La similitud de estas secuencias con las ya obtenidas de cepas de virus aisladas anteriormente puede indicar si un brote de la enfermedad se debe a una cepa nueva o a una ya conocida. De esta manera se pueden reforzar o rechazar hipótesis sobre vías de transmisión que hayan sugerido los datos epidemiológicos. La tipificación genética de las cepas aisladas del virus de la Peste porcina clásica reviste una importancia primordial para determinar el origen de la enfermedad.

Las secuencias obtenidas se analizan comparando con la información acumulada en la base de datos publicada por el Laboratorio europeo de Referencia y de la OIE para la Peste porcina clásica.

#### **4.5. DIAGNÓSTICO SEROLÓGICO**

La detección de los anticuerpos específicos contra el virus es particularmente útil en las piaras donde se sospecha una infección por VPPC iniciada al menos 21 días antes, ya que debido al efecto inmunosupresor del VPPC no se pueden detectar anticuerpos con certeza antes de este periodo. Los métodos serológicos son también adecuados para el seguimiento y para estudios de prevalencia, resultan esenciales en el caso de que un país desee el reconocimiento internacional de estar exento de la enfermedad sin vacunación.

Como en los cerdos se observan ocasionalmente anticuerpos contra VPPC que proceden de reacción cruzada con otros pestivirus, las pruebas de cribado deben ir seguidas de pruebas confirmativas que sean específicas del VPPC. Algunos ELISA son relativamente específicos del VPPC, pero el método de elección definitivo para la diferenciación es la neutralización comparativa, que permite comparar el título neutralizante de anticuerpos contra distintas cepas de Pestivirus.

Las pruebas serológicas utilizadas sistemáticamente son:

##### **4.5.1 ELISA**

Mediante este método se puede analizar un gran número de muestras (todas las fases se pueden automatizar) en un relativo corto periodo de tiempo (4 horas), siendo una técnica sensible y específica, que no precisa el empleo de cultivos celulares. Se han desarrollado diversas técnicas ELISA que utilizan anticuerpos monoclonales específicos.

##### **4.5.2 Virusneutralización (VN)**

Las pruebas de neutralización se realizan en cultivos celulares utilizando un método de virus constante/suero variable. Como el VPPC no es citopático, cualquier virus no neutralizado debe detectarse, tras su multiplicación, por un sistema de marcado inmunológico, para ello se utiliza un anticuerpo marcado con peroxidasa que se une de forma específica a alguna proteína vírica presente en la membrana de las células infectadas. Las células infectadas se tiñen así específicamente y se pone en evidencia la replicación del virus en el citoplasma celular.

Es una técnica fácil de leer, en un microscopio de luz invertida, pero tiene el inconveniente de utilizar cultivos celulares y de virus vivo de PPC, con lo que solo puede realizarse en laboratorios que cumplan con los niveles de bioseguridad que establece la legislación.

MATERIAL NO OFICIAL

## **BIBLIOGRAFÍA**

Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. Peste Porcina Clásica

[https://www.mapa.gob.es/es/ganaderia/temas/sanidad-animal-higiene-ganadera/sanidad-animal/enfermedades/peste-porcina-clasica/peste\\_porcina\\_clasica.aspx](https://www.mapa.gob.es/es/ganaderia/temas/sanidad-animal-higiene-ganadera/sanidad-animal/enfermedades/peste-porcina-clasica/peste_porcina_clasica.aspx)

Organización Mundial de Sanidad Animal. Peste porcina clásica (infección por el virus de la peste porcina clásica) (NB: Versión adoptada en mayo de 2019)

<https://www.oie.int/es/que-hacemos/normas/codigos-y-manuales/acceso-en-linea-al-manual-terrestre/>

MATERIAL NO OFICIAL

**MATERIAL PARA LA PREPARACIÓN DEL TEMA 66**

**ENFERMEDAD DE AUJESZKY. MARCO LEGAL. PROGRAMA COORDINADO DE LUCHA, CONTROL Y ERRADICACIÓN. DIAGNÓSTICO DE LABORATORIO**

*Este material no tiene carácter oficial, por lo que en ningún caso vinculará al Tribunal Calificador. Constituye, únicamente, un instrumento complementario que servirá de apoyo al opositor para enfocar cada uno de los epígrafes, pero nunca de forma exclusiva ni excluyente. El Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación no se hace responsable del contenido del mismo.*

*Los materiales no serán objeto de actualización constante.*

## **ÍNDICE**

### **1. ENFERMEDAD DE AUJESZKY**

- 1.1. INTRODUCCIÓN
- 1.2. CARACTERÍSTICAS Y SÍNTOMAS
- 1.3. EPIDEMIOLOGÍA

### **2. MARCO LEGAL**

- 2.1. NORMATIVA COMUNITARIA
- 2.2. NORMATIVA NACIONAL

### **3. PROGRAMA COORDINADO DE LUCHA, CONTROL Y ERRADICACIÓN.**

### **4. DIAGNÓSTICO DE LABORATORIO.**

- 4.1. DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL
- 4.2. REQUERIMIENTOS PARA LA RECOGIDA Y ENVÍO DE MUESTRAS
- 4.3. TÉCNICAS DE LABORATORIO
  - 4.3.1. DIAGNÓSTICO ETIOLÓGICO
  - 4.3.2. DIAGNÓSTICO SEROLÓGICO

## 1. ENFERMEDAD DE AUJESZKY

### 1.1. INTRODUCCIÓN

La enfermedad de Aujeszky está causada por el **Herpesvirus porcino tipo I**, que infecta al sistema nervioso central y a otros órganos, como el tracto respiratorio y reproductivo, dependiendo de la cepa del virus, la edad del animal y la dosis infectiva. Afecta a diversos mamíferos (como los perros, los gatos, el ganado bovino, los conejos, los zorros, los visones, etc.) excepto el hombre y los monos sin cola.

Se asocia inicialmente a los suidos (cerdos y jabalíes), que son las únicas especies que pueden sobrevivir de forma natural a la infección, mientras que el resto de las especies son hospedadores terminales, mueren a las pocas horas de iniciarse la infección.

En los suidos el virus permanece latente después de la recuperación clínica (excepto en los lechones de menos de 2 semanas de edad, que mueren de encefalitis). La enfermedad se controla mediante el aislamiento de las piaras infectadas y mediante el uso de vacunas y/o la eliminación de los animales con la infección latente.

La morbilidad y mortalidad en brotes epidémicos es muy alta, sobre todo en lechones y animales de cebo, causando fallo reproductivo en una alta proporción de hembras que estén gestantes en el momento de la infección. La infección por este virus en mamíferos no suidos (excepto primates superiores y el hombre) resulta en un cuadro nervioso mortal.

El virus de Aujeszky es muy contagioso. Además, es uno de los pocos patógenos animales que puede transmitirse por el aire a varios kilómetros de distancia. La propagación de la infección entre cerdos se puede producir por todas las secreciones o excreciones aunque la forma más habitual de contagio es a través de las secreciones respiratorias y por vía genital, a través del semen infectado tanto en monta natural como en inseminación artificial. Otras formas de transmisión directa son la vía transplacentaria, la perinatal y la galactófora. Puede existir también transmisión en la transferencia de embriones de cerdas donantes infectadas a cerdas sanas.

### 1.2. CARACTERÍSTICAS Y SÍNTOMAS

La enfermedad de Aujeszky, también llamada pseudorabia porcina, está causada por Suid herpesvirus 1 (SHV-1), un miembro de la subfamilia Alphaherpesvirinae y la familia Herpesviridae. El virus debe manipularse aplicando procedimientos de bioseguridad y biocontención adecuados, que vendrán determinados por la realización de un análisis del riesgo biológico.

Está formado por una doble cadena lineal de **ADN central**, rodeada por una cápsula icosaédrica y, más exteriormente, por un tegumento amorfo que contiene proteínas de origen vírico, todo ello envuelto por una cubierta de glicoproteínas (gp) rica en lípidos. Entre estas glicoproteínas destacan la gB y la gE por sus implicaciones en el desarrollo de vacunas marcadas y de técnicas de diagnóstico serológico que permiten diferenciar entre animales infectados o vacunados.

Se asocia inicialmente con los cerdos, que son sus hospedadores naturales, en los que permanece latente después de la recuperación clínica (excepto en los lechones de menos de 2 semanas de edad, que mueren de encefalitis).

El hecho de ser un virus Herpes, le confiere la habilidad de establecer infecciones latentes. Después de sufrir una infección el virus se queda acantonado en el sistema nervioso del cerdo, hasta que se produce un desequilibrio, una situación de estrés, una alteración hormonal, una inmunosupresión u otros procesos patológicos. A consecuencia de ello se multiplica y se elimina al exterior, infectando a otros animales susceptibles. Como consecuencia, el cerdo es la única especie capaz de sobrevivir a una infección productiva y, por tanto, sirve de hospedador reservorio.

En los cerdos, la gravedad de los signos clínicos depende de la edad del cerdo, de la vía de infección, de la virulencia de la cepa infectante y del estado inmunitario del animal. Los lechones de corta edad son muy susceptibles, y las tasas de mortalidad alcanzan el 100% durante las 2 primeras semanas de edad. Estos animales presentan signos de hipertermia y trastornos neurológicos graves: temblores, falta de coordinación, ataxia, nistagmo y opistótonos y crisis epileptiformes intensas.

Cuando los cerdos tienen más de 2 meses (cerdos en engorde-acabado), empiezan a predominar las formas respiratorias, con hipertermia, anorexia y signos respiratorios leves a graves: rinitis con estornudos y secreción nasal que puede avanzar a neumonía. La frecuencia de infecciones bacterianas secundarias es alta, en función del estado sanitario de la pira infectada.

En este grupo de cerdos, la morbilidad puede alcanzar el 100%, pero en casos de ausencia de infecciones secundarias complicadas, la mortalidad oscila entre el 1 y el 2%. Las cerdas y los verracos presentan principalmente signos respiratorios, pero en cerdas gestantes, el virus puede atravesar la placenta, infectar y matar a los fetos induciendo aborto, provocar el retorno al estro y hacer que nazcan fetos muertos. El virus se puede hallar en el esperma de los verracos infectados-

En otras especies susceptibles, la enfermedad es mortal, y el principal signo es un prurito intenso que hace que el animal roa o se rasque parte del cuerpo, normalmente la cabeza o los cuartos traseros, hasta que provoca una gran destrucción de tejido. Por este motivo, la enfermedad se denominaba anteriormente "picor furioso".

### **1.3. EPIDEMIOLOGÍA**

La enfermedad está ampliamente distribuida, con la excepción de África y Australia. En el Continente Americano únicamente Canadá está libre de este virus. En el Continente Europeo países que no pertenecen a la UE como Noruega o Suiza nunca han reportado un caso de la enfermedad. Dentro de la Europa, algunos países como Gran Bretaña (excepto Irlanda del Norte) o Dinamarca han erradicado la enfermedad sin empleo de vacunas, este sistema únicamente es aplicable en áreas o países donde la prevalencia de la enfermedad es baja. Otros países actualmente libres son Finlandia, Suecia, Eslovaquia, Austria, Chipre, República

Checa, Alemania y Luxemburgo. En países como Bélgica, Italia, España, Países Bajos o Francia (que se encuentra en las fases finales de su programa de erradicación) existen programas aprobados de lucha contra la enfermedad.

## 2. MARCO LEGAL

La Enfermedad de Aujeszky conlleva graves repercusiones económicas en un sector, que en España, contribuye de forma notable a la producción final ganadera. Por lo cual, se ha desarrollado una estrategia para manejar menor el riesgo de la enfermedad de Aujeszky, que integra una serie de medidas establecidas tanto a nivel de la Unión Europea como a nivel nacional.

### 2.1. NORMATIVA COMUNITARIA

Desde la **Unión Europea** se ha publicado una normativa de aplicación para el control de la Enfermedad de Aujeszky (EA).

- **Reglamento (UE) 2016/429** del Parlamento Europeo y del Consejo, de 9 de marzo de 2016, relativo a las enfermedades transmisibles de los animales y por el que se modifican o derogan algunos actos en materia de sanidad animal («Legislación sobre sanidad animal»). La EA se incluye en el anexo II como una de las enfermedades objeto de aplicación del Reglamento
- **Reglamento de Ejecución (UE) 2018/1882** de la Comisión, de 3 de diciembre de 2018 relativo a la aplicación de determinadas normas de prevención y control a categorías de enfermedades enumeradas en la lista y por el que se establece una lista de especies y grupos de especies que suponen un riesgo considerable para la propagación de dicha enfermedad de la lista. **La EA aparece categorizada como C+D+E**, siendo por tanto de aplicación medidas para prevenir su difusión hacia otras regiones libres de la UE, medidas de prevención durante los movimientos y medidas de vigilancia.
- **Reglamento Delegado (UE) 2020/687** de la Comisión, de 17 de diciembre de 2019, por el que se completa el Reglamento (UE) 2016/429 del Parlamento Europeo y del Consejo en lo referente a las normas relativas a la **prevención y el control de determinadas enfermedades de la lista**.
- **Reglamento Delegado (UE) 2020/688** de la Comisión, de 17 de diciembre de 2019, por el que se completa el Reglamento (UE) 2016/429 del Parlamento Europeo y del Consejo en lo referente a los requisitos zoonosanitarios para los **desplazamientos dentro de la Unión** de animales terrestres y de huevos para incubar.
- **Reglamento Delegado (UE) 2020/689** de la Comisión, de 17 de diciembre de 2019, por el que se completa el Reglamento (UE) 2016/429 del Parlamento Europeo y del Consejo en lo referente a las **normas de vigilancia, los programas de erradicación y el estatus de libre de enfermedad** con respecto a determinadas enfermedades de la lista y enfermedades emergentes.
- **Reglamento Delegado (UE) 2020/692** de la Comisión, de 30 de enero de 2020, que contempla el Reglamento (UE) 2016/429 del Parlamento Europeo y del Consejo en lo referente a las normas para la **entrada en la Unión**, y para el desplazamiento y la manipulación tras la entrada, de las partidas de determinados animales, productos reproductivos y productos de origen animal.

- **Reglamento de Ejecución(UE) 2020/2002** de la Comisión, de 7 de diciembre de 2020, por el que se establecen normas de desarrollo del Reglamento (UE) 2016/429 del Parlamento Europeo y del Consejo relativas a la **notificación a la Unión y al envío de informes a la Unión sobre enfermedades de la lista**, al sistema informático de información, así como a los formatos y los procedimientos de presentación y envío de informes relacionados con los programas de vigilancia y erradicación de la Unión y con la solicitud de reconocimiento del estatus de libre de enfermedad.

## 2.2. NORMATIVA NACIONAL

- **Ley 8/2003**, de 24 de abril, General de Sanidad Animal.
- **Real Decreto 360/2009** por el que se establecen las bases del **PROGRAMA NACIONAL COORDINADO DE LUCHA, CONTROL Y ERRADICACIÓN DE LA ENFERMEDAD DE AUJESZKY**.

## 3. PROGRAMA COORDINADO DE LUCHA, CONTROL Y ERRADICACIÓN.

En líneas generales, el programa se basa en la vacunación, vigilancia epidemiológica, control de la reposición y en restricciones al movimiento de animales y calificación de las explotaciones

El programa persigue el objetivo último de erradicación la enfermedad de nuestra cabaña porcina en concordancia con nuestro estatus oficial de territorio incluido en **Anexo II (territorio con programa aprobado dentro de la UE) de la Decisión 185/2008/CE** que establece:

- **ANEXO I:** Estados miembros o regiones indemnes de la enfermedad de Aujeszky y en los que está prohibida la vacunación (indemnes).
- **ANEXO II:** Estados miembros o regiones en los que existen programas aprobados de lucha contra la enfermedad de Aujeszky.
- Países sin programa aprobado (fuera de anexos).

Los pilares básicos del programa de lucha son:

### A) La calificación sanitaria de las explotaciones:

- **Explotaciones A0:** aquéllas en las que se desconoce la situación en cuanto a la vacunación o de los controles serológicos en los últimos doce meses, o no se cumple el programa de vacunación o de los controles serológicos.
- **Explotaciones A1:** aquéllas en la que se cumple el programa de vacunación y los controles serológicos, con diagnóstico positivo frente a la glicoproteína gE del virus de la enfermedad de Aujeszky en el último control oficial efectuado.
- **Explotaciones A2:** aquéllas en la que se cumple el programa de vacunación y los controles serológicos, con resultado negativo frente a la glicoproteína gE del virus de la enfermedad de

Aujeszky en el último control oficial efectuado, sin que se haya iniciado aún las actuaciones precisas para su calificación, o habiéndolas iniciado no las hayan finalizado.

- **Explotaciones A3 o A4:** las explotaciones con calificación sanitaria de indemne u oficialmente indemne, respectivamente.

Las Normas relativas a las pruebas serológicas de la enfermedad de Aujeszky incluye aquellos métodos aprobados para el diagnóstico de la enfermedad. Entre ellas incluye: Protocolo sobre las pruebas de inmunoadsorción enzimática (ELISA) para la detección de anticuerpos contra el virus de la enfermedad de Aujeszky (virus completo), contra la glicoproteína B (ADV-gB), la glicoproteína D (ADV-gD) o la glicoproteína E (ADV-gE)

**B)** Comunicación obligatoria de las prevalencias comarcales y clasificación de comarcas ganaderas en CAP (comarcas de alta prevalencia) y CBP (comarcas de baja prevalencia).

**C)** Restricciones de los movimientos en función del estatus de la explotación y la comarca de origen y destino.

**D)** Vacunación obligatoria de todos los animales en explotaciones comerciales con vacuna marcada gE negativa.

**E)** Nombramiento de un veterinario responsable del cumplimiento del programa en todas las explotaciones incluidas en el programa.

### **PROGRAMA NACIONAL DE VIGILANCIA SANITARIA EN JABALÍES**

Los jabalíes constituyen un hospedador natural donde el virus de la EA puede mantenerse en forma latente o multiplicarse y difundirse en el ambiente. La transmisión de este virus entre animales susceptibles puede realizarse de:

- Forma directa (principalmente venérea de jabalí a cerdas domésticas).
- Indirecta a través de fómites contaminados.

Los jabalíes suponen un riesgo que se agrava si tenemos en cuenta la capacidad de estos animales de moverse grandes distancias en el territorio, lo que hace que conocer el grado de difusión de la EA en las poblaciones de jabalíes sea una información muy relevante para el control de esta enfermedad en la fauna doméstica.

El Código Sanitario para los Animales Terrestres de la OIE señala que la declaración de un país o zona como libre o provisionalmente libre de la EA requiere la existencia de un programa de declaración de los casos de Aujeszky en cualquier especie susceptible.

El programa de vigilancia en jabalíes en España realiza una vigilancia de la EA de tal forma que se pueda disponer de información anual sobre la evolución del área de distribución del virus de la EA (VEA) en jabalíes, así como de las tendencias temporales de la seroprevalencia. Ello permitirá además disponer de información complementaria necesaria para el buen desarrollo del programa de erradicación del VEA en cerdos doméstico.

Durante los últimos años la campaña de control y erradicación del virus de la enfermedad de Aujeszky en el porcino doméstico ha visto cumplidos sus objetivos y el virus causante está en la actualidad ausente en la mayor parte del ganado porcino en España, sobre todo en el sector intensivo.

Sin embargo, todos los años se da notificación de focos de enfermedad en explotaciones extensivas donde las investigaciones apuntan a fallos vacunales unido a contacto con jabalíes silvestres como fuente del virus, poblaciones de jabalíes silvestres que mantienen la enfermedad de forma endémica en España y en resto de países de la UE, lo que supone un riesgo por contacto con otros animales: porcino (especialmente extensivo) y otras especies susceptibles (perros) donde la tasa de letalidad es del 100% (Pseudorrabia).

Por lo cual, el objetivo del programa de vigilancia en jabalíes es realizar un seguimiento de la situación de las poblaciones silvestres de jabalí con la finalidad de monitorizar la distribución geográfica de la enfermedad y la evolución temporal de sus prevalencias en España. El alcance del programa serán las poblaciones peninsulares de jabalíes silvestres.

Para poder determinar la ausencia de enfermedad en España en base a las estimaciones de abundancias basadas en bolsas de caza y asumiendo una prevalencia esperada de un 0,2% con un nivel de confianza del 95%, se deben tomar como mínimo un total de 1.497 muestras a nivel nacional que se distribuyen entre las Comunidades Autónomas. El método de muestreo garantizará la correcta cobertura de toda la superficie peninsular.

Hay que indicar, en este sentido, que en los archipiélagos de Las Baleares y de Las Canarias no se ha registrado hasta ahora la presencia de poblaciones de jabalíes por lo que a estos territorios no se les asigna ningún muestreo en el marco del presente programa (2022). El muestreo se realizará en la temporada de caza.

De manera global se puede considerar que la seroprevalencia estimada en base a los resultados del presente programa de la EA en jabalíes silvestres ha permanecido estable o con ligeras variaciones durante los últimos años, en torno al 30,60 %. En general, esta situación es comparable a lo que está ocurriendo en poblaciones de jabalíes del resto de Europa.

### **PLAN NACIONAL DE CONTROL DE LA VACUNACIÓN DE AUJESZKY**

La vacunación con vacuna marcada gE - es uno de los pilares en los que se ha basado desde sus comienzos el Programa nacional coordinado de lucha, control y erradicación de la enfermedad de Aujeszky en nuestro país. Como vimos anteriormente el Real Decreto 360/2009, de 23 de marzo, se establece como obligatoria la vacunación de todas las explotaciones de ganado porcino incluidas en el programa, gracias a ello se ha llegado a la práctica erradicación de la enfermedad en la inmensa mayoría de nuestras comarcas ganaderas.

Es recomendable implementar medidas encaminadas a atajar una de las principales fuentes de riesgo que tenemos en relación a la Enfermedad de Aujeszky como es dejar de vacunar, para lo que se plantea el Plan nacional de controles de la vacunación de Aujeszky y así

garantizar la correcta vacunación de aquellas explotaciones que tienen la obligación de estar vacunadas.

El programa tiene una duración indefinida y unas medidas de control:

- **Control de partes de vacunación** Se establecerá un sistema de control aleatorio de partes vacunales que se llevará a cabo con una periodicidad mínima de dos veces al año. La detección de problema vacunal a través de los partes de vacunación será suficiente por sí solo para poner en marcha las actuaciones necesarias para asegurar la correcta vacunación de la explotación de forma inmediata si así lo estableciera la Autoridad competente.

- **Plan de vigilancia activa para la detección de problemas vacunales** Se utilizarán los sueros recogidos para el control de mantenimiento de gE de las explotaciones de producción, así como los sueros del muestreo que se haga de gE en cebaderos. Las muestras de suero se analizarán para la detección de anticuerpos específicos frente a la **glicoproteína gB** del virus de la enfermedad de Aujeszky mediante la técnica de ELISA.

El muestreo será aleatorio estratificado en dos etapas, primera etapa explotaciones y segunda etapa animales dentro de cada explotación.

**También se establece un protocolo de interpretación de resultados:**

Se considerará que existe un problema vacunal si 4 o más sueros son negativos o dudosos por ELISA gB. Es decir se toleran hasta 3 sueros negativos o dudosos de 16 sueros analizados.

Para explotaciones que no llegan a las 16 muestras por tener un censo menor:

- En muestras de hasta 3 sueros todos los sueros deberán ser positivos para considerar que la explotación está vacunada, no admitiéndose ningún resultado negativo o dudoso.
- Si son 4 o 5 muestras se aceptará como admisible un máximo de 1 suero negativo o dudoso.
- Si son de 6 a 11 muestras se aceptará como admisible un máximo de dos sueros negativos o dudosos.
- Si son de 12 a 16 muestras se aceptará como admisible un máximo de tres sueros negativos o dudosos.

#### **ACTUACIONES EN CASO DE DETECCIÓN DE PROBLEMA VACUNAL**

Las actuaciones a realizar en caso de problema vacunal detectado por superar los límites aceptables establecidos en los controles serológicos del Plan de vigilancia activa por ELISA gB serán las siguientes

- Pérdida de calificación sanitaria de acuerdo con lo que marca el RD 360/2009 (artículo 2, definición de Explotaciones A0: aquéllas en las que se desconoce la situación en cuanto a la vacunación o de los controles serológicos en los últimos doce meses o no se cumple el programa de vacunación o de los controles serológicos).

- Inmovilización de la explotación hasta que corrija la situación (Artículo 9.9, no se autorizará ningún movimiento de animales hacia o desde las explotaciones A0). Los SVO visitarán inmediatamente la explotación, a ser posible sin previo aviso, para llevar a cabo las siguientes actuaciones:

- Vacunación de todo el efectivo.
- Muestreo 95/5% (máximo 60 muestras) que incluya todos los grupos de animales presentes en la explotación.
- Control documental de los registros de vacunación incluidos en los libros de tratamientos.

#### 4. DIAGNÓSTICO DE LABORATORIO

Hoy en día como consecuencia de la carga vacunal a la que sometemos a los cerdos en las explotaciones, los signos clínicos quedan atenuados o limitados a grupos concretos de edad, haciendo difícil el diagnóstico clínico, con lo cual hay que recurrir al laboratorio para establecer el diagnóstico.

##### 4.1. DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL

En los cerdos, el diagnóstico diferencial incluye todas aquellas patologías con cuadro neurológico, respiratorio o de abortos en la explotación:

- polioencefalomielitis,
- peste porcina clásica o africana,
- encefalomielitis hemoaglutinante,
- meningoencefalitis estreptocócica,
- gripe porcina,
- erisipela,
- infección por el virus de Nipah,
- Las enfermedades abortivas también deben ser consideradas.
- En otras especies, se debe considerar la rabia (perros) y el prurito (ovino).

##### 4.2. REQUISITOS PARA LA RECOGIDA Y ENVÍO DE MUESTRAS

En los cerdos vivos, el aislamiento vírico se realiza a partir de hisopos nasales; líquido orofaríngeo o biopsias de las amígdalas. Sin embargo, durante la necropsia, el cerebro y las amígdalas son los órganos preferidos para el aislamiento del virus en los cerdos. A veces se lo puede encontrar en sitios como pulmones, bazo, hígado, riñones ganglios linfáticos y la mucosa faríngea.

El virus de la enfermedad de Aujeszky es difícil de encontrar en los cerdos infectados en forma latente; el aislamiento del virus parece ser más exitoso si se realiza **en el ganglio trigémino** de los cerdos domésticos y en el ganglio sacro de los salvajes.

En otras especies, se deben tomar las muestras en la sección de la médula espinal que inerva el área que sufre prurito; también debería someterse a prueba el área de la piel en la que se manifiesta el prurito junto con los tejidos subcutáneos.

Las muestras para el aislamiento del virus deben enviarse conservadas en frío al laboratorio.

Se debe recolectar **suero para la serología**. Las pruebas serológicas para el seguimiento de la enfermedad también pueden realizarse con el jugo de la carne. Las **muestras de sangre para realización pruebas serológicas** deben recogerse en tubos sin anticoagulante y mantenerse a temperatura ambiente hasta la formación del coágulo, realizando el envío al laboratorio en condiciones de refrigeración (4°C).

Al transportar materiales biológicos, el remitente debe determinar si el material debe clasificarse como mercancía peligrosa o no. En caso de transportar muestras sospechosas de contener el agente etiológico, se deberían clasificar como Sustancia biológica perteneciente a la categoría B (UN3373) y seguir la instrucción de embalaje P650, de acuerdo con la Reglamentación sobre Materiales Peligrosos (DGR) de la Asociación Internacional de Transporte Aéreo (IATA). No obstante, para aquellas muestras para las cuales existe una probabilidad muy baja de que contengan agentes patógenos se pueden transportar clasificadas como muestras exentas, bajo la opinión de un profesional. En este caso, la muestra se transporta en un sistema de embalaje triple que evite toda posible fuga y que esté identificado con la frase “muestras de origen animal exentas”

#### **4.3. TÉCNICAS LABORATORIALES**

El diagnóstico de la enfermedad de Aujeszky se realiza mediante detección del agente (aislamiento del virus, reacción en cadena de la polimerasa [PCR]) y mediante la detección de una respuesta serológica en animales vivos.

##### **4.3.1. DIAGNÓSTICO ETIOLÓGICO**

###### **4.3.1.1. Aislamiento del virus**

Se puede lograr inoculando en una línea celular susceptible, como la de riñón porcino (PK-15 o SK6, Vero), o en células de riñón de cultivo primario o secundario, un extracto de tejido, por ejemplo de cerebro, amígdalas y pulmón o de material recogido de la nariz y la garganta. En los cerdos con la infección latente, el ganglio trigémino es el más apropiado para aislar el virus, aunque el virus latente no es, por lo general, infectante, a no ser que se reactive, en cuyo caso resulta difícil recuperarlo por medio del cultivo.

Produce un efecto citopático (ECP), que suele aparecer en 24-72 horas, pero el cultivo debe incubarse 5-7 días. La monocapa presenta acumulaciones de células refringentes, a las que sigue una separación completa de la placa de toda la capa celular, también aparecen cuerpos de inclusión intranucleares y sincitios. La especificidad del efecto citopático se comprueba mediante las pruebas de inmunofluorescencia, inmunoperoxidasa o la neutralización con un antisuero específico o la PCR. Para examinar el ECP se utiliza un microscopio de imagen invertida (× 100).

#### 4.3.1.2. Métodos moleculares

El ADN vírico se identifica mediante **PCR**. La técnica de la PCR se basa en la amplificación selectiva de una parte determinada del genoma usando dos cebadores localizados en cada uno de los extremos de la secuencia seleccionada. Se han desarrollado PCR en tiempo real que permiten diferenciar los virus vacunales en los que se ha eliminado el gen de la gE, de los virus naturales, mediante la detección concreta de los genes de la gB y la gE.

La principal ventaja de la PCR es su rapidez en comparación con las técnicas convencionales de aislamiento del virus.

#### 4.3.2. DIAGNÓSTICO SEROLÓGICO:

Las pruebas serológicas solo se aplican a los suidos, porque los demás animales (herbívoros o carnívoros) mueren demasiado rápido como para producir anticuerpos.

La neutralización vírica (VN) ha sido reconocida como el método serológico de referencia, pero a efectos del diagnóstico general, se ha sustituido en gran medida por el enzimoinmunoanálisis (ELISA) porque éste es adecuado para realizar análisis a gran escala). Las pruebas pueden realizarse con gran variedad de muestras (como suero, sangre total, leche, exudados musculares y papel de filtro), pero la de elección es el **suero**.

También se ha desarrollado una prueba de aglutinación en látex que puede emplearse para detectar anticuerpos. La Seroneutralización y el ELISA son los más aceptados y utilizados.

- **Seroneutralización (SN) o Virus Neutralización (VN)**. Al igual que para el aislamiento se usan células susceptibles a la infección por el SHV-1; Pueden ser líneas celulares (por ejemplo, PK-15, SK6, MDBK) o cultivos celulares primarios o secundarios (por ejemplo, riñón porcino). En el caso de análisis de muestras para el comercio internacional, el método debe ser validado para que sea lo suficientemente sensible para detectar el Suero Estándar de Referencia de la OIE a una dilución 1/2.

No se puede utilizar la prueba de VN para diferenciar entre los anticuerpos debidos a la vacunación y los debidos a una infección natural. Es una prueba diagnóstica para detectar anticuerpos a virus completo.

Los sueros problema deben de ser de calidad, estar claramente etiquetados, proceder de un origen conocido con historia clínica, almacenarse refrigerados en todo momento, estar libres de contaminación fúngica o bacteriana, no estar hemolizados y en cantidad suficiente. El suero debe ser separado del coágulo sin retraso, para evitar la toxicidad.

Para la prueba de VN hay procedimientos:

- cualitativos se puede obtener un resultado positivo, negativo o no concluyente.
- cuantitativos, en el que cada suero se utiliza tanto sin diluir como en diluciones seriadas. La neutralización se considera positiva a cualquier dilución (incluso sin diluir, equivalente a una dilución final de 1/2).

Para examinar el efecto tóxico, que puede producir los mismos sueros y el ECP en los pocillos después de 3 a 5 días, se utiliza un microscopio de imagen invertida ( $\times 100$ ).

- **ELISA** para detectar anticuerpos, los kits comerciales de ELISA utilizan técnicas indirectas o competitivas permite realizar en pocas horas estudios sobre un gran número de animales de manera rápida, sencilla y económica. Algunos de estos kits comerciales permiten diferenciar el cerdo que está vacunado del cerdo que está infectado con el virus de campo. La ingeniería genética ha permitido disponer de vacunas marcadas, vacunas elaboradas a partir de un virus en el que se ha eliminado (delecionado) un fragmento del genoma, de ahí que las llamemos gE negativas [gE-], es decir que les falta la glicoproteína E. De esta manera los cerdos vacunados con vacunas marcadas gE no producirán Anticuerpos frente al antígeno gE. Por el contrario, los cerdos infectados con el virus campo si producirán anticuerpos frente al antígeno gE.

Cualquier prueba serológica debe ser lo bastante sensible para dar un resultado positivo con el Suero Estándar de Referencia Internacional de la OIE o con un suero secundario calibrado. El suero de referencia se puede obtener del Laboratorio de Referencia de la OIE para la Enfermedad de Aujeszky, ANSES (French Agency for Food, Environmental and Occupational Health & Safety Ploufragan-Francia). A efectos del comercio internacional, la prueba debería de ser lo bastante sensible para detectar el suero estándar diluido a 1/2. Para autorizar el desplazamiento de cerdos de una zona en la que se emplea la vacuna en la que se ha eliminado el gen de la gE a una zona libre de la enfermedad, las pruebas serológicas deben permitir la detección de al menos la dilución de 1/8 en el caso del ELISA para la gE del suero estándar de referencia de la OIE, según indica la Comisión Europea (2008).

En las zonas libres de la enfermedad, en las que no se vacuna a los cerdos, puede llevarse a cabo un estudio epidemiológico activo empleando kits de ELISA para la gB o gE o de aglutinación por látex. Dado que pueden detectarse anticuerpos entre los días 7 y 10 post-infección, estas pruebas serológicas también pueden emplearse en caso de sospecha de brote, para confirmar la infección en cerdos.

En las zonas donde se vacunan los cerdos con vacunas en las que se ha eliminado el gen de la gE, los kits de ELISA para la gE permiten diferenciar entre cerdos infectados y vacunados (DIVA), pero para evaluar el nivel de inmunidad inducida por la vacunación, deben emplearse kits de ELISA para la gB, kits de aglutinación por látex o neutralización vírica.

## **BIBLIOGRAFÍA**

Código Sanitario para los Animales Terrestres de la OIE. Capítulo 8,2 Infección por el virus de la Enfermedad de Aujeszky.

[Acceso en línea al Código Terrestre - OIE - Organización Mundial de Sanidad Animal](#)

Manual de las Pruebas de Diagnóstico y de las Vacunas para los Animales Terrestres de la OIE. Capítulo 3.1.2. Enfermedad de Aujeszky.

[CAPÍTULO 2 \(oie.int\)](#)

EFSA (Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria) dictámenes científicos independientes. Último informe sobre la EA 09/06/2017.

<https://www.efsa.europa.eu>

Reglamentos de Sanidad Animal de la UE y Reglamentos delegados y de ejecución para el desarrollo del Reglamento base.

Página WEB del MAPA (Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación). Enfermedades de los animales. Enfermedad de Aujeszky.

[https://www.mapa.gob.es/es/ganaderia/temas/sanidad-animal-higiene-ganadera/sanidad-animal/enfermedades/aujeszky/enf\\_aujeszky.aspx](https://www.mapa.gob.es/es/ganaderia/temas/sanidad-animal-higiene-ganadera/sanidad-animal/enfermedades/aujeszky/enf_aujeszky.aspx)

Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. Programa de vigilancia en jabalíes.

[https://www.mapa.gob.es/es/ganaderia/temas/sanidad-animal-higiene-ganadera/programanacionaldevigilanciasobrepappcyaujeszkyenjabalies2022\\_tcm30-583841.pdf](https://www.mapa.gob.es/es/ganaderia/temas/sanidad-animal-higiene-ganadera/programanacionaldevigilanciasobrepappcyaujeszkyenjabalies2022_tcm30-583841.pdf)

Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. Plan nacional de control de la vacunación de la enfermedad de Aujeszky.

[https://www.mapa.gob.es/es/ganaderia/temas/sanidad-animal-higiene-ganadera/plandecontroldeLavacunaciondeaujeszky23\\_03\\_2018\\_tcm30-445989.pdf](https://www.mapa.gob.es/es/ganaderia/temas/sanidad-animal-higiene-ganadera/plandecontroldeLavacunaciondeaujeszky23_03_2018_tcm30-445989.pdf)

**MATERIAL PARA LA PREPARACIÓN DEL TEMA 67**

**FIEBRE DEL VALLE DEL RIFT. MARCO LEGAL. PROGRAMA DE VIGILANCIA.  
DIAGNÓSTICO DE LABORATORIO.**

*Este material no tiene carácter oficial, por lo que en ningún caso vinculará al Tribunal Calificador. Constituye, únicamente, un instrumento complementario que servirá de apoyo al opositor para enfocar cada uno de los epígrafes, pero nunca de forma exclusiva ni excluyente. El Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación no se hace responsable del contenido del mismo.*

*Los materiales no serán objeto de actualización constante.*

## **ÍNDICE**

### **1. FIEBRE DEL VALLE DEL RIFT**

- 1.1. INTRODUCCIÓN
- 1.2. ETIOLOGÍA
- 1.3. EPIDEMIOLOGÍA Y TRANSMISIÓN
- 1.4. PATOGENIA Y SIGNOS CLÍNICOS
- 1.5. PROFILAXIS Y CONTROL

### **2. MARCO NORMATIVO**

### **3. PROGRAMA DE VIGILANCIA**

### **4. DIAGNÓSTICO DE LABORATORIO**

- 4.1. DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL
- 4.2. TOMA Y ENVÍO DE MUESTRA
- 4.3. TÉCNICAS DE DIAGNÓSTICO
  - 4.3.1. Identificación del agente
  - 4.3.2. Técnicas serológicas

MATERIAL NO OFICIAL

## **1. FIEBRE DEL VALLE DEL RIFT**

### **1.1. INTRODUCCIÓN**

La fiebre del Valle del Rift (FVR) es una enfermedad zoonótica transmitida por un virus que pertenece a la familia Bunyaviridae género Phlebovirus. Afecta principalmente a rumiantes causando abortos en hembras gestantes y alta mortalidad en animales neonatos. En el hombre, produce síntomas leves que en el 1-2% de los casos evoluciona a hepatitis, encefalitis, fiebre hemorrágica y retinitis, llegando a causar la muerte en el 10-20% de estos casos.

El virus puede transmitirse a través de mosquitos, contacto directo con fluidos de animales virémicos o aerosoles. Los brotes de FVR son cíclicos, y están asociados a fuertes lluvias tras largos períodos de sequías. Estas condiciones favorecen la cría y el establecimiento de las poblaciones de mosquitos que transmiten el virus entre los diversos hospedadores susceptibles. La enfermedad es endémica en el África subsahariana, Egipto y Arabia Saudí, aunque existe riesgo de distribución del virus a zonas libres de enfermedad. Por ello, FVR está considerado como un patógeno zoonótico emergente o reemergente clasificado como un agente de Nivel de Bioseguridad (BSL)-3 en Europa y un agente BSL-3Ag en Estados Unidos, además de ser un agente potencial de bioterrorismo.

La vacunación es la única estrategia efectiva para el control y la prevención de esta enfermedad. Sin embargo, las vacunas disponibles en la actualidad están basadas en virus atenuados y/o inactivados, y presentan diversos efectos adversos como teratogénesis, abortos o baja inmunogenicidad respectivamente, por lo que ninguna de ellas se ha aprobado para su uso en el hombre o en el ganado en países no endémicos.

Por ello, diferentes laboratorios están trabajando en el desarrollo de vacunas de nueva generación basadas en proteínas recombinantes, partículas similares a virus (VLPs), vectores virales recombinantes y vacunas ADN. El objetivo deseable sería obtener vacunas seguras, capaces de inducir una respuesta inmunitaria rápida y duradera idealmente tras la administración de una única dosis. Al mismo tiempo, el empleo de estas vacunas debería permitir diferenciar los animales infectados de los vacunados (DIVA), además de ser estables, económicas, y de uso tanto humano como veterinario.

### **1.2. ETIOLOGÍA**

La Fiebre del Valle del Rift (FVR) es producida por un virus de la familia Bunyaviridae, género Phlebovirus. La familia Bunyaviridae está formada por cuatro géneros de virus que infecta a los animales, género Orthobunyavirus, Nairovirus, Plebovirus y Hantavirus y un quinto que infecta a las plantas, Tospovirus.

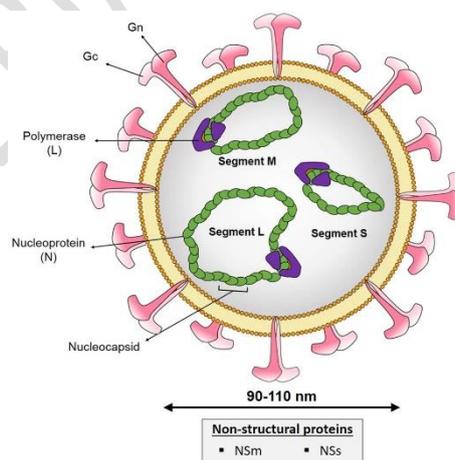
La familia Bunyaviridae incluye un gran grupo de virus que comparte características morfológicas, morfogénicas y antigénicas. El género Phlebovirus debe su nombre a los

Phlebotomine sandflies o “moscas de la arena” que están implicados en la transmisión del virus.

El virus del Valle del Rift es un ARN monocatenario, de polaridad negativa y segmentado, y representa un único serotipo que tiene las propiedades morfológicas y fisicoquímicas típicas de los Bunyavirus. Es un virus con envoltura, esférico y de 90-110 nm de diámetro. Sobre la bicapa lipídica de la envoltura se proyectan unas espículas de glicoproteínas. Esta bicapa lipídica hace al virus sensible a disolventes lipídicos ácidos, por debajo de un pH 6.

El genoma del virus de 12 Kb está formado por tres segmentos de cadena sencilla, denominados L (grande), M (mediano) y S (pequeño), cada uno contenido en una nucleocápsida dentro del virión. El segmento S es una ARN de doble polaridad, es decir, tiene una codificación bidireccional.

El virión está compuesto por cuatro proteínas estructurales: las glicoproteínas Gn y Gc, la nucleoproteína N, y la ARN polimerasa dependiente de ARN (RdRp). En su interior se encuentra la nucleoproteína N y RdRp asociadas al genoma viral dando lugar a las ribonucleoproteínas. La superficie del virus está formada por 112 capsómeros que se ensamblan formando una red con simetría icosaédrica. Las glicoproteínas Gn y Gc son responsables del reconocimiento y unión al receptor celular, presentan capacidad hemaglutinante e inducen una respuesta inmunitaria protectora en el hospedador mediada por anticuerpos neutralizantes mientras que las proteínas no estructurales son dispensables para la maduración, replicación e infección viral. La nucleoproteína N es altamente inmunogénica e induce títulos elevados de anticuerpos tanto en animales infectados de manera natural como experimentalmente. Por ello, es la proteína de elección a la hora de diseñar ensayos de diagnóstico frente al VFR.



Lecturiio.com

Según análisis filogenéticos el único serotipo del virus posee tres linajes principales asociados al lugar del origen de la infección: Oeste de África, Este/Central de África y Egipto.

Debido al carácter segmentado de su genoma, los virus pertenecientes a la familia Bunyaviridae pueden intercambiar segmentos completos entre miembros del mismo género o serogrupo lo que aumenta la heterogeneidad del virus, y así influir en la epidemiología del

mismo. Dentro de los Bunyavirus esta característica es de gran importancia, como se demuestra con el virus Schmallerberg identificado hace algunos años en Europa, originado mediante el intercambio de segmentos entre diferentes virus del serogrupo Simbu, género Orthobunyavirus.

### **1.3. EPIDEMIOLOGÍA Y TRANSMISIÓN**

La fiebre del Valle del Rift fue descrita por primera vez en el año 1931 tras el brote que tuvo lugar en una granja cercana al lago Naivasha en el Valle del Rift en Kenia y que dio nombre al virus. Aunque es probable que éste existiera antes, al describirse brotes de la enfermedad de origen desconocido que causaba muertes en corderos y ovejas desde el año 1912 en esta zona.

La enfermedad estuvo confinada en esta zona hasta la aparición del brote de 1950 en Sudáfrica donde produjo la muerte de 100.000 animales y 500.000 abortos en ovejas, aunque el agente no fue identificado hasta el desarrollo de la enfermedad en el personal expuesto a los animales infectados.

La mayor repercusión zoonótica tuvo lugar en 1977 en el brote de Egipto causando 200.000 infecciones en humanos y al menos 594 muertes y en 1997 en Kenia asociado a graves inundaciones afectando a 89000 personas con 478 muertes.

En el año 2000, la enfermedad apareció por primera vez fuera de África, en Arabia Saudí y Yemen simultáneamente con alta mortalidad en el ganado ovino y caprino.

En los últimos años, es particularmente activa en Mauritania (brotes en 2010, 2012 y 2015) y Senegal (brotes en 2013 y 2014). Estudios serológicos recientes en 2008 y 2014 llevados a cabo en los países del Magreb indican que el virus estaría presente en ciertas regiones de Argelia, Marruecos y Túnez. En 2020 ha sido confirmada por primera vez la presencia de la enfermedad en Libia.

Según la información publicada por la OIE, desde comienzos de 2021 la enfermedad está presente en Kenia, Libia, Madagascar, Mauritania, Ruanda, Senegal, Sudán del Sur, Tanzania y Uganda.

La amplia distribución geográfica en territorios cercanos a la cuenca del Mediterráneo hace que resulte una enfermedad de importante riesgo de introducción para España. Según las recomendaciones de una opinión científica publicada a comienzos del 2020 por la EFSA sobre el riesgo de introducción de la FVR en Europa, la Unión Europea no está en riesgo inminente de FVR, pero los acontecimientos en países vecinos hacen que las autoridades de la UE y los Estados miembros deban fortalecer, mejorar y armonizar su capacidad de vigilancia y respuesta, así como sus conocimientos científicos y técnicos, para estar mejor preparados ante una posible introducción de la enfermedad. La UE también debe continuar colaborando estrechamente con los países del norte de África y Medio Oriente para evaluar la posibilidad de propagación de la FVR desde las áreas actualmente infectadas y para evaluar la evolución de las epidemias en otros países

**Actualmente España está considerada libre de FVR.**

La **transmisión** del VFVR a humanos y animales se realiza mediante **la picadura de mosquitos infectados**. También existe el riesgo de contagio al hombre al **manipular tejidos** procedentes de animales virémicos, así como por la **inhalación de aerosoles y la ingestión** de leche cruda y carne fresca poco cocinada.

El virus ha sido aislado en más de 30 especies de mosquitos en especial mosquitos del **género Aedes** que actúan como reservorio y permiten el mantenimiento del virus en la naturaleza. a. Una vez establecida la enfermedad, diferentes especies del género Culex y de los géneros Anopheles, Eretmapodites, Mansonia, y Coquillettidia se encargan de amplificar y distribuir el virus entre los diferentes hospedadores dando lugar a un brote de la enfermedad.

El 7 de agosto de 2017 se publicó el primer estudio realizado en el que se examina la competencia para actuar como vectores del VFVR de tres especies de mosquitos europeos: Culex pipiens form molestus, Culex pipiens hybrid form y Stegomyia albopicta (= Aedes albopictus). En el estudio se concluye que Cx. pipiens hybrid form y S. albopicta son competentes para actuar como vectores, y su presencia en España hace que un brote de FVR fuera posible si llegara el virus.

Por otra parte, se ha aislado virus en Culicoides, Simulium (moscas negras) y Amblyomma (garrapatas) que permiten una transmisión mecánica del virus. Asimismo, se han realizado estudios de susceptibilidad y transmisión del VFVR en especies de flebotomos (Phlebotomus, moscas de la arena), así como en diferentes especies de garrapatas de los géneros Hyalomma y Rhipicephalus donde se ha observado replicación viral y capacidad de transmisión viral al hospedador.

La aparición de la enfermedad está por tanto relacionada con la presencia de agua y de zonas de cría de mosquitos. De hecho, los brotes más importantes se han producido después de procesos de inundaciones (cuerno de África en 1997) o de construcción de presas (las presas de Aswan en Egipto en 1977 o de Diama en el río Senegal en 1987).

La FVR se manifiesta a menudo por **brotes de epizootias seguido de fases de silencio interepizootico** que pueden durar varios años. Durante los periodos interepizooticos el virus se mantiene en la naturaleza mediante transmisión transovárica en mosquitos. Los huevos de distintas especies de mosquitos son muy resistentes a la sequia y pueden durar durante años en depresiones del terreno hasta su eclosión con una nueva época de lluvias.

En primer lugar, emergen mosquitos del género Aedes infectados con el VFVR. A estas zonas inundadas se acercan los animales a beber, y es aquí donde se produce el contacto entre el mosquito y el animal. A los pocos días, los animales infectados desarrollan altos títulos de viremia en sangre. A continuación, aparecen otras especies de mosquitos, pertenecientes al género Culex entre otros, que se multiplican en las zonas inundadas. Estos mosquitos actúan como vectores amplificando y distribuyendo el virus entre animales y personas, dando lugar a un brote epidémico/epizootico. La probabilidad de transmisión al hombre aumenta al incrementarse la población de mosquitos infectados, además de la posible infección mediante contacto directo y aerosoles durante el manejo de animales virémicos. A lo largo

del ciclo enzoótico, los mosquitos infectan de forma ocasional a animales silvestres y domésticos donde se amplifica el virus.

El rango de hospedadores susceptibles a ser infectados por el virus de la FVR es muy amplio: bovinos, ovinos, caprinos, dromedarios y varios roedores, así como rumiantes salvajes, búfalos, antílopes, ñúes, etc

Los más susceptibles a la infección por el VFVR son el ganado ovino, bovino y caprino junto con el hombre. La mortalidad alcanza el 90%-100% en corderos menores de una semana de edad, y **causa abortos en el 90%-100% de las hembras gestantes**. Sin embargo, las ovejas adultas son menos susceptibles con una mortalidad entre el 10% y el 30%. Los corderos tienen un período corto de incubación de 12 a 24 h con presencia de fiebre alta, y mueren a las 24-72 h tras la infección mientras que en los adultos el periodo de incubación oscila entre 1 y 6 días.

Las personas actúan como fondo de saco epidemiológico, la mayor parte de los casos son asintomáticos o cursan con un síndrome febril de tipo gripal auto limitante, con cefalea y dolor muscular. Sin embargo, un pequeño porcentaje puede sufrir uno o más de los tres síndromes característicos de la enfermedad en personas: la forma ocular, la forma meningoencefálica y la fiebre icterohemorrágica, siendo este último el más grave, con una tasa de letalidad que puede alcanzar hasta un 50%.

#### **1.4. PATOGENIA Y SIGNOS CLÍNICOS**

El virus entra en el organismo invadiendo los linfonódulos del lugar de entrada donde se produce una primera replicación. Posteriormente, a través de las vías linfáticas eferentes, alcanza la circulación sanguínea para dirigirse hacia sus órganos dianas: hígado, bazo y cerebro. En el hígado la infección produce cambios hepatocelulares que progresan rápidamente hacia una necrosis hepática masiva, siendo ésta la principal lesión microscópica observada en animales y en humanos.

Se pueden originar también alteraciones hemostáticas como hemorragias y petequias originadas por la vasculitis y la necrosis hepática. En el cerebro origina encefalitis.

Los animales infectados presentan leucopenia, elevación de las enzimas hepáticas y trombocitopenia.

Podemos considerar que los síntomas son poco específicos haciendo difícil el reconocimiento de casos individuales. **El signo más importante es la presencia de abortos y mortalidad entre animales jóvenes.**

Muy susceptibles >70% mortalidad	Susceptibles Entre 10-70%	Moderadamente susceptibles	Susceptibles (infección inaparente)	Resistentes
Cordero	Terneros	Vacas	Camellos	
Cabritos	Ovejas	Cabras	Caballos	Pájaros
Cachorros		Búfalos	Cerdos	Reptiles
Gatitos		Humanos	Perros	Anfibios
Ratones			Gatos	
Hámsteres			Cobayas	

Tabla 2. Susceptibilidad de los hospedadores vertebrados al FVR.

### 1.5. PROFILAXIS Y CONTROL

En la actualidad no existe ningún tratamiento específico para la FVR por lo que la lucha más eficaz es la aplicación de una vacuna profiláctica.

Existen **vacunas vivas atenuadas** (cepa Smithburn) confiriendo una inmunidad de 3 años con una sola dosis. Sin embargo, puede producir abortos en hembras gestantes. La cepa utilizada para la fabricación de esta vacuna es patógena para el hombre.

También existe una vacuna inactivada que produce una inmunidad menos duradera por lo que se requiere una primovacunación con una diferencia de 21 días y una revacunación anual.

Otras medidas de control recomendadas son:

- Vigilancia serológica, que se llevará a cabo mediante el uso de animales centinela, que permita una detección precoz de la presencia de la enfermedad.
- Uso de animales centinelas previo a la repoblación de explotaciones afectadas por la FVR durante un periodo que puede extenderse hasta un año en el caso de que se haya demostrado transmisión transovárica en los vectores.
- Confinamiento de los animales en las horas del día de mayor actividad del vector.
- Uso de insecticidas y repelentes en animales, naves y medios de transporte.
- Tratamiento de los productos de origen animal presentes en la explotación

## 2. MARCO NORMATIVO

La estrategia para manejar el riesgo de Fiebre del Valle del Rift integra una serie de medidas establecidas tanto a nivel de la Unión Europea como a nivel nacional.

En el marco **internacional**, es fundamental mencionar la inclusión FVR en la **lista de enfermedades de declaración obligatoria inmediata de la OIE**.

A nivel **comunitario**, desde su entrada en vigor en abril de 2021 se debe atender a lo dispuesto en la **Legislación Europea sobre Sanidad Animal donde incluye a esta enfermedad como de declaración obligatoria inmediata en la UE**.

De modo que, desde la *Unión Europea* se ha publicado normativa de aplicación ante la FVR, encontrando:

- **El Reglamento (UE) 2016/429** del Parlamento Europeo y del Consejo, de 9 de marzo de 2016, relativo a las enfermedades transmisibles de los animales y por el que se modifican o derogan algunos actos en materia de sanidad animal («Legislación sobre sanidad animal»). La FVR se incluye en el Anexo II como una de las enfermedades objeto de aplicación del Reglamento.
- **El Reglamento de Ejecución (UE) 2018/1882** de la Comisión, de 3 de diciembre de 2018 relativo a la aplicación de determinadas normas de prevención y control a categorías de enfermedades enumeradas en la lista y por el que se establece una lista de especies y grupos de especies que suponen un riesgo considerable para la propagación de dicha enfermedad de la lista.

La FVR aparece categorizada como A+D+E, siendo por tanto de aplicación medidas inmediatas para su erradicación ante su detección, medidas de prevención durante los movimientos y medidas de vigilancia.

- **El Reglamento Delegado (UE) 2020/687** de la Comisión, de 17 de diciembre de 2019, por el que se completa el Reglamento (UE) 2016/429 del Parlamento Europeo y del Consejo en lo referente a las normas relativas a la prevención y el control de determinadas enfermedades de la lista.
- **El Reglamento Delegado (UE) 2020/688** de la Comisión, de 17 de diciembre de 2019, por el que se completa el Reglamento (UE) 2016/429 del Parlamento Europeo y del Consejo en lo referente a los requisitos zoonosanitarios para los desplazamientos dentro de la Unión de animales terrestres y de huevos para incubar.
- **El Reglamento Delegado (UE) 2020/689** de la Comisión, de 17 de diciembre de 2019, por el que se completa el Reglamento (UE) 2016/429 del Parlamento Europeo y del Consejo en lo referente a las normas de vigilancia, los programas de erradicación y el estatus de libre de enfermedad con respecto a determinadas enfermedades de la lista y enfermedades emergentes.
- **El Reglamento Delegado (UE) 2020/692** de la Comisión, de 30 de enero de 2020, que contempla el Reglamento (UE) 2016/429 del Parlamento Europeo y del Consejo en lo referente a las normas para la entrada en la Unión, y para el desplazamiento y la

manipulación tras la entrada, de las partidas de determinados animales, productos reproductivos y productos de origen animal.

- **El Reglamento de Ejecución (UE) 2020/2002** de la Comisión, de 7 de diciembre de 2020, por el que se establecen normas de desarrollo del Reglamento (UE) 2016/429 del Parlamento Europeo y del Consejo relativas a la notificación a la Unión y al envío de informes a la Unión sobre enfermedades de la lista, al sistema informático de información, así como a los formatos y los procedimientos de presentación y envío de informes relacionados con los programas de vigilancia y erradicación de la Unión y con la solicitud de reconocimiento del estatus de libre de enfermedad.
- **Reglamento Delegado (UE) 2021/2156** de la Comisión de 17 de septiembre de 2021 por el que se completa el Reglamento (UE) 2017/625 del Parlamento Europeo y del Consejo mediante el establecimiento del laboratorio de referencia de la Unión Europea para la fiebre del Valle del Rift

En el ámbito **nacional**, las principales disposiciones a considerar son:

- **Ley 8/2003, de Sanidad Animal**
- **Real Decreto 526/2014**, en el cual se incluye como una enfermedad de declaración obligatoria.
- **Laboratorio nacional de referencia para FVR: LCV (Algete)**

### 3. PROGRAMA DE VIGILANCIA

Hasta la fecha, España está considerada como libre de FVR. Sin embargo, dada la situación epidemiológica en determinados países del norte de África, donde la enfermedad está confirmada y las importantes repercusiones económicas y sanitarias que la aparición de esta enfermedad en nuestro país podría suponer, ha sido necesario la implementación de un programa de vigilancia frente a esta enfermedad.

Este programa tiene un doble componente:

- **Una vigilancia pasiva** basada en la detección de cualquier animal de una especie susceptible (doméstico o salvaje), con sintomatología compatible de la enfermedad y la notificación inmediata a los Servicios Veterinarios Oficiales. Cualquier sospecha en caso de confirmarse dará lugar a la puesta e marcha de las acciones descritas en el manual práctico de operaciones de Fiebre del Valle del Rift.

La **política de lucha contra esta enfermedad** está basada en las siguientes actuaciones:

- Rápida notificación a las autoridades competentes de todos los casos declarados sospechosos.
- Debido a las características epidemiológicas de la enfermedad y su modo de transmisión, el sacrificio total en la explotación como medio de erradicación, sólo está

justificado cuando existen evidencias de que la enfermedad se ha detectado de modo lo suficientemente precoz como para deducir que no ha habido posibilidades importantes de haberse diseminado en la zona.

- Restricción de movimientos de animales procedentes de la explotación o explotaciones afectadas.
  - Establecimiento de un área de protección y de vigilancia alrededor de los focos de 20 y 50 kilómetros respectivamente. El tamaño de dichas áreas puede modificarse de acuerdo con criterios geográficos, climáticos o entomológicos.
  - Confinamiento de los animales durante las horas de máxima actividad de los vectores, así como medidas de control del vector en el medio ambiente, en los alojamientos de los animales y en los propios animales, mediante el uso de desinfectantes y repelentes.
  - Puesta en marcha de investigaciones clínicas, serológicas, epidemiológicas y entomológicas en las áreas de protección y vigilancia establecidas en torno a los focos.
  - Vacunación de las especies sensibles frente a la enfermedad.
  - Uso de animales centinelas previamente a la repoblación de una explotación afectada por la Fiebre del Valle del Rift durante un periodo de tiempo que puede extenderse hasta un año en el caso de que la transmisión transovárica haya sido probada.
- **Una vigilancia activa** basada en un muestreo serológico aleatorio en animales de especies susceptibles en explotaciones centinelas localizadas en el área consolidada de riesgo. Esta vigilancia afecta a animales de la especie bovina y ovina situadas en las provincias de Cádiz, Málaga, Sevilla, Huelva y las Islas Canarias.

**En las provincias andaluzas** el programa de vigilancia se basará en la realización de un muestreo serológico y virológico anual llevado a cabo en la época de menor actividad vectorial (entre noviembre y abril) en explotaciones centinelas de animales de las especies mencionadas de manera que se descarte cualquier evidencia de circulación vírica.

El muestreo deberá permitir la detección de una prevalencia mínima del 5%, con un nivel de confianza del 95%, lo que supone la toma de muestras en 59 animales centinela, que deberán tener una disposición espacial que garantice la cobertura de todo el territorio objeto de la vigilancia. Para ello, se seleccionarán, al menos, seis explotaciones por provincia, debiéndose preferiblemente zonas con alta carga ganadera y con sospecha o presencia conocida de vectores capaces de transmitir el virus. Con objeto de aumentar la sensibilidad de la vigilancia, en la medida de lo posible, los animales seleccionados deberán ser animales adultos que hayan permanecido en la explotación al menos desde el inicio de la época de actividad vectorial ya que será esta cohorte de la población la que tenga un mayor riesgo de haber estado en contacto con el virus de la FVR.

**En las Islas Canarias**, debido a su proximidad con Mauritania que es considerado un país endémico de la enfermedad, se llevará a cabo un muestreo serológico y virológico de bovinos y/u ovinos, de forma que se garantice detectar una prevalencia mínima de la enfermedad del 5% con un nivel de confianza del 95%.

Dicho muestreo se realizará en el mes de diciembre/enero, es decir después de la época de lluvias y desarrollo de mosquitos en Mauritania, que suele ocurrir durante los meses de septiembre y octubre del año anterior. Los animales seleccionados deberán ser prioritariamente animales adultos que hayan estado en la explotación o en las islas al menos durante los últimos 6 meses anteriores al muestreo.

En ambos casos, las muestras se pueden tomar en la propia explotación, aprovechando la realización de otras actuaciones veterinarias en la misma, como la ejecución de las campañas de saneamiento ganadero, o también se pueden tomar en el matadero cuando se trate de animales con destino a sacrificio.

Para esta enfermedad, no se realizará una vigilancia entomológica de los vectores salvo que las circunstancias epidemiológicas indiquen lo contrario. En todo caso, se contará con los resultados obtenidos en la vigilancia entomológica descrita en otros planes de vigilancia, como el de Fiebre del Nilo Occidental, que incluye vectores competentes para la transmisión del virus de la FVR.

Se tomarán muestras de suero y sangre con EDTA que serán remitidas al LNR (Laboratorio Central de Veterinaria del MAPA, con sitio en Algete, Madrid).

#### **4. DIAGNÓSTICO DE LABORATORIO**

##### **4.1. DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL**

La sintomatología y las lesiones de la Fiebre del valle del Rift no es patognomónica de esta enfermedad. Cursa con signos clínicos que pueden ser compatibles a otros procesos morbosos. Por esta razón, es necesario tener en cuenta otras enfermedades de los animales con las que habría que realizar un diagnóstico diferencial de la FVR. Entre estas enfermedades se encuentran:

- Lengua azul
- Enterotoxemia de la oveja
- Brucelosis
- Vibriosis
- Tricomomosis
- Enfermedad de Nairobi
- Aborto enzoótico ovino

- Septicemia bacteriana
- Peste bovina
- Peste de los pequeños rumiantes
- Coudriosis
- Enfermedad de Wesselsbron

#### 4.2. TOMA Y ENVÍO DE MUESTRAS

Las muestras de elección dependerán del **tipo de análisis solicitado y del motivo de la solicitud**:

- **Para la realización de análisis serológico**, se remitirán muestras de suero. Esta muestra se debe enviar refrigerada. Además, se debe considerar que las muestras de suero pueden contener virus vivo por lo que habrá que aplicar métodos de inactivación previa a su manipulación.
- **Para análisis de identificación del agente**:
  - **Sangre completa en tubos con anticoagulante** (preferentemente con EDTA, aunque también se puede emplear heparina) durante la fase febril de la enfermedad.
  - **Plasma** después de centrifugar los tubos de extracción sanguínea con el anticoagulante. El plasma puede enviarse congelado si se prevé la llegada al laboratorio posterior a las 24-48 horas
  - **Vísceras**: los órganos de elección serán el bazo y los ganglios linfáticos, riñón, hígado y restos fetales de los abortos, especialmente el encéfalo. El método elegido para la conservación de las muestras hasta su llegada al laboratorio debe permitir el correcto desarrollo de las técnicas (y por tanto la supervivencia del Bunyavirus), por lo que no se deben enviar en formol (solamente si se va a realizar estudio histopatológico) o en congelación a -20°C.

La toma de muestras se debe realizar garantizando **condiciones de higiene** que minimicen la posibilidad de contaminación, y deben ser identificadas de forma que se asegure su **trazabilidad**.

Para el **envío de muestras** a los laboratorios, se debe cumplir lo dispuesto en la normativa vigente, para lo cual es fundamental tener en cuenta en primer lugar **la evaluación del riesgo** con respecto al agente y al tipo de muestras para poder asignarles la categoría correspondiente.

Así, algunas muestras clínicas **podrán considerarse exentas**, en caso de que se considere que presentan un riesgo mínimo de contener agentes patógenos. Por ejemplo, puede tratarse de las muestras de suero (muestra considerada de bajo riesgo) tomadas en el marco de los programas de vigilancia activa.

El resto de las muestras (por ejemplo, las obtenidas en programas de vigilancia pasiva, o las enviadas al LNR para confirmación de un resultado positivo), deberán marcarse como sustancias infecciosas de **categoría B, con el código UN 3373**.

En el caso de muestras potencialmente infectivas (vísceras o sangre de animales en los que se tenga certeza o sospecha de infección), se deben obtener con los Equipos de Protección Individual adecuados y ya en el laboratorio se recomienda su apertura en un laboratorio de contención biológica de tipo 3.

### 4.3. TÉCNICAS DE DIAGNÓSTICO

Los métodos de diagnóstico de la FVR están basados en la identificación del agente o en la identificación de los anticuerpos.

De forma rutinaria, se suelen combinar las pruebas **de detección molecular (RT-PCR)** y las pruebas **serológicas** para diferenciar sueros positivos y negativos.

Además, se pueden realizar técnicas de aislamiento sobre las muestras positivas a la RT-PCR, no tanto con fines de diagnóstico sino para poder disponer de colecciones de cepas y realizar pruebas posteriores, como la secuenciación del genoma de los aislados.

#### 4.3.1. Identificación del Agente

La identificación del agente puede lograrse mediante **técnicas de aislamiento, neutralización vírica** y las técnicas **moleculares**

- **Aislamiento en cultivo celular.** Para el aislamiento del virus de la FVR se utilizan varias líneas celulares en monocapa, entre las que se encuentran células de riñón de mono verde africano (Vero), de riñón de hámster neonato (BHK) y células de mosquito AP61. En el caso de las líneas celulares de mamífero, el VFVR produce efecto citopático (ECP) por lo que es más utilizada. Estas líneas celulares de mamífero son incubadas a 37°C. En la línea celular de mosquito, el virus es incubado a 27°C sin producir ECP.

**La confirmación del sobrenadante** se realiza mediante reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa (**RT-PCR**)

- El manual terrestre de la OIE describe también el **aislamiento en ratones lactantes de 1-5 días de vida** mediante inoculación intracerebral sin embargo, por motivos de bienestar animal y de bioseguridad no es un método de elección.
- **Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa (RT-PCR).** Es el método de elección para la detección del agente por la rapidez de su realización. Están descritas tanto una PCR convencional como una PCR en tiempo real.
  - **La PCR convencional** consiste en la extracción del ARN molde de la muestra problema seguida de la RT del ARN extraído y finalizando con la amplificación por PCR del

producto de la RT y detección de los productos de la PCR por electroforesis en gel de agarosa. El manual de la OIE describe el método de Sall et al. (2001).

- **La PCR en tiempo real** utiliza los mismos procedimientos de extracción de ARN total seguido de la RT del ARN extraído que la utilizada en la PCR convencional. La lectura de los resultados consiste en asignar un valor de ciclo umbral (Ct) a cada reacción de PCR según los gráficos de amplificación (señal de fluorescencia frente a número de ciclos). Los valores de Ct empleados para clasificar las muestras como positivas o negativas al VFVR debe definirse en cada laboratorio utilizando material de referencia apropiado. El manual terrestre de la OIE en método de Drosten et al. (2002).
- **ELISA de detección de antígeno** mediante el análisis de distintas diluciones con controles positivos y negativos adecuados. Esta prueba se utilizó para muestras humanas y animales durante los brotes de Arabia Saudita y de Kenia (Madani et al., 2003; Munyua et al., 2010). El método consiste en una prueba de captura de tipo sándwich de anticuerpo doble, en la que el antígeno es capturado por un Ac en una fase sólida y a continuación detectado por un segundo Ac.
- **Inmunohistopatología.** El examen histopatológico del hígado de los animales afectados revelará una citopatología característica, y la inmunotinción permitirá la identificación específica del antígeno vírico de la FVR en tejido.

Esta es una herramienta diagnóstica importante, porque el hígado y otros tejidos que se mantienen en formaldehído tamponado neutro en el campo se inactivan (dependiendo del grosor de la muestra y del tiempo de fijación) y no requieren una cadena de frío, lo cual facilita la manipulación y el transporte desde zonas alejadas.

#### 4.3.2. Pruebas serológicas

Existen varias técnicas para detectar anticuerpos anti VFVR en gran variedad de especies animales. Actualmente, la más utilizada es **el ELISA para detectar IgM e IgG. Las pruebas de neutralización del virus (VN)** se han utilizado para detectar anticuerpos contra el VFVR en el suero de gran variedad de especies. Las pruebas de neutralización son las pruebas serológicas de diagnóstico más específicas, pero solo pueden utilizarse con virus vivo y no se recomiendan fuera de las zonas endémicas o de laboratorios con instalaciones de bioseguridad adecuadas y personal vacunado. No obstante, se están desarrollando y validando pruebas alternativas de neutralización que no requieren una manipulación de VFVR altamente virulento y no exigen una contención alta.

El ELISA de captura de IgM permite **el diagnóstico de infecciones recientes**. Se utilizan por rutina en muchos países para el diagnóstico de casos aislados, la gestión de brotes y los programas de vigilancia.

La prueba de neutralización se puede utilizar para determinar la presencia de anticuerpos en los animales infectados por vía natural y en los animales vacunados. La prueba es muy

específica y se puede utilizar para analizar sueros de cualquier especie. Normalmente se utiliza para medir la eficacia de la vacuna.

MATERIAL NO OFICIAL

## BIBLIOGRAFÍA

Review Early Bunyavirus-Host Cell Interactions Amelina Albornoz 1,†, Anja B. Hoffmann 2,†, Pierre-Yves Lozach 2,\* and Nicole D. Tischler 1 <http://www.bunyavirus.org/wp-content/uploads/2017/02/2016-Viruses.pdf>

Estudios de inmunidad y eficacia de la vacunación experimental con ADN y MVA recombinantes que expresan antígenos del virus de la fiebre del Valle del Rift. Elena López Gil.

<https://eprints.ucm.es/id/eprint/29999/1/T36043.pdf>

Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. Informe epidemiológico. [https://www.mapa.gob.es/es/ganaderia/temas/sanidad-animal-higiene-ganadera/informeivr\\_2021-04-29\\_tcm30-111190.pdf](https://www.mapa.gob.es/es/ganaderia/temas/sanidad-animal-higiene-ganadera/informeivr_2021-04-29_tcm30-111190.pdf)

Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. Fiebre del valle del Rift. [https://www.mapa.gob.es/es/ganaderia/temas/sanidad-animal-higiene-ganadera/sanidad-animal/enfermedades/valle-rift/fiebre\\_valle\\_rift.aspx](https://www.mapa.gob.es/es/ganaderia/temas/sanidad-animal-higiene-ganadera/sanidad-animal/enfermedades/valle-rift/fiebre_valle_rift.aspx)

Código Sanitario para los animales terrestres. OIE. Capítulo 8.15 Infección por el virus de la fiebre del Valle del Rift.

[https://www.oie.int/es/que-hacemos/normas/codigos-y-manuales/acceso-en-linea-al-codigo-terrestre/?id=169&L=1&htmfile=chaptre\\_rvf.htm](https://www.oie.int/es/que-hacemos/normas/codigos-y-manuales/acceso-en-linea-al-codigo-terrestre/?id=169&L=1&htmfile=chaptre_rvf.htm)

Manual Sanitario para los animales terrestres. OIE. Capítulo 3.1.18 Infección por el virus de la fiebre del Valle del Rift.

[https://www.oie.int/fileadmin/Home/esp/Health\\_standards/tahm/3.01.18\\_Fiebre\\_Valle\\_Rif.pdf](https://www.oie.int/fileadmin/Home/esp/Health_standards/tahm/3.01.18_Fiebre_Valle_Rif.pdf)

**MATERIAL PARA LA PREPARACIÓN DEL TEMA 68**

**ORBIVIRUS EN DISTINTAS ESPECIES ANIMALES. LENGUA AZUL Y PESTE EQUINA AFRICANA. MARCO LEGAL. PROGRAMAS NACIONALES DE VIGILANCIA Y CONTROL. DIAGNÓSTICO DE LABORATORIO**

*Este material no tiene carácter oficial, por lo que en ningún caso vinculará al Tribunal Calificador. Constituye, únicamente, un instrumento complementario que servirá de apoyo al opositor para enfocar cada uno de los epígrafes, pero nunca de forma exclusiva ni excluyente. El Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación no se hace responsable del contenido del mismo.*

*Los materiales no serán objeto de actualización constante.*

## **ÍNDICE**

### **1. INTRODUCCIÓN**

### **2. LENGUA AZUL**

#### **2.1. LENGUA AZUL: GENERALIDADES**

- 2.1.1. Etiología
- 2.1.2. Transmisión. Epidemiología y Distribución
- 2.1.3. Sintomatología y Lesiones
- 2.1.4. Profilaxis

#### **2.2. MARCO NORMATIVO**

#### **2.3. PROGRAMAS DE VIGILANCIA, CONTROL Y ERRADICACIÓN**

- 2.3.1. Vigilancia Activa
- 2.3.2. Vigilancia Pasiva
- 2.3.3. Vigilancia y Monitorización Entomológica
- 2.3.4. Programa de Vacunación

#### **2.4. DIAGNÓSTICO LABORATORIAL**

- 2.4.1. Diagnóstico Diferencial
- 2.4.2. Características para el Envío de Muestras
- 2.4.3. Técnicas de Diagnóstico
  - 2.4.3.1. Detección del Agente
  - 2.4.3.2. Pruebas Serológicas

### **3. PESTE EQUINA AFRICANA**

#### **3.1. PESTE EQUINA AFRICANA: GENERALIDADES**

- 3.1.1. Etiología
- 3.1.2. Transmisión. Epidemiología y Distribución
- 3.1.3. Sintomatología y Lesiones
- 3.1.4. Profilaxis

#### **3.2. MARCO NORMATIVO**

#### **3.3. PROGRAMAS DE VIGILANCIA, CONTROL Y ERRADICACIÓN**

3.3.1. Vigilancia Activa Serológica

3.3.2. Vigilancia Pasiva

3.4. DIAGNÓSTICO LABORATORIAL

3.4.1. Diagnóstico Diferencial

3.4.2. Características para el Envío de Muestras

3.4.3. Técnicas de Diagnóstico

3.4.3.1. Detección del Agente

3.4.3.2. Pruebas Serológicas

MATERIAL NO OFICIAL

## 1. INTRODUCCIÓN

El género **Orbivirus** es el más extenso de la familia **Reoviridae**. Está conformado por virus ARN, de doble cadena, segmentados, capaces de provocar enfermedad tanto en animales como en humanos. Su principal vía de transmisión es a través de **vectores artrópodos**, en los que además los virus son capaces de replicarse.

Algunos de los Orbivirus que pueden considerarse más relevantes en materia de Sanidad Animal son el Virus de la Lengua Azul, el Virus de la Peste Equina Africana, el virus de la Enfermedad Hemorrágica Epizoótica, o el virus de la Encefalosis Equina.

## 2. LENGUA AZUL

### 2.1. LENGUA AZUL: GENERALIDADES

#### 2.1.1. Etiología

La Lengua Azul (también denominada Fiebre Catarral Ovina) es una enfermedad **infecciosa no contagiosa** que afecta principalmente a **rumiantes** tanto domésticos como silvestres, pero también a **camélidos**. A pesar de no tratarse de una enfermedad zoonótica, resulta de gran importancia por su potencial para acarrear graves consecuencias a nivel económico.

Está causada por el virus de la Lengua Azul (**VLA**), perteneciente al género Orbivirus (Familia *Reoviridae*), considerándose además la principal especie de este género.

Se trata de un virus ARN de doble cadena, cuyo genoma es lineal y está constituido por **10 segmentos**, que codifican para siete proteínas estructurales (denominadas VP1 – VP7) y al menos cuatro proteínas no estructurales (NS1, NS2, NS3/NS3A y NS4), ya que en algunos estudios se propone la existencia de una quinta proteína no estructural.

En cuanto a su conformación, presenta una cápside de morfología **icosaédrica**, en la cual pueden identificarse tres capas. La capa externa de la cápside está compuesta por las proteínas **VP2** (principal inductora de la formación de anticuerpos neutralizantes, y específica de **serotipo**) y, en menor medida, VP5. En la capa intermedia predomina la VP7, mientras que la VP3 conforma la cápside interna, o capa subcentral. El resto de las proteínas estructurales se consideran proteínas menores, y se presentan en el interior de la cápside. La proteína **VP7** es específica de **serogrupo**, es decir, permite **diferenciar entre especies** de Orbivirus, por lo que es el componente empleado en los ensayos de enzoinmunoanálisis de competición (C-ELISA).

Hasta la fecha, se han descrito al menos **29 serotipos del VLA**, que pueden ser identificados mediante el uso de técnicas moleculares y de neutralización.

#### 2.1.2. Transmisión. epidemiología y distribución.

La Lengua Azul se transmite principalmente a través de **vectores artrópodos, mosquitos del género Culicoides**. Estos se infectan al alimentarse de animales vertebrados infectados en

periodo de viremia, y en su interior se da replicación viral, pudiendo infectar a un nuevo hospedador al alimentarse de él. En cualquier caso, también se han descrito otras vías de transmisión:

- Transmisión **directa**:
  - **Vertical** (fundamentalmente descrita para el serotipo 8, tanto en ovejas como en bovino)
  - **Oral**
  - **Venérea** a través de semen y de embriones infectados (descrita principalmente a nivel experimental)
- Transmisión **indirecta** a través de agujas reutilizadas

La importancia epidemiológica de las vías de transmisión independientes del vector sigue sin estar clara. Sin embargo, en los serotipos más recientemente descritos (VLA-25 a VLA-29) parece ser una **vía de transmisión de mayor relevancia** que la vía dependiente del vector, por lo que se consideran serotipos “**atípicos**”.

La presencia del virus en una determinada zona geográfica está condicionada, por tanto, a la **presencia de vectores y de hospedadores vertebrados susceptibles**.

Los hospedadores vertebrados son los **rumiantes**, fundamentalmente ovinos, aunque también bovinos y caprinos. En cualquier caso, la infección se ha descrito asimismo en otras especies de rumiantes, tanto domésticos como silvestres, como búfalos, cérvidos, antílopes y camélidos.

En cuanto a la presencia de vectores, se ha descrito la transmisión del virus de la Lengua Azul por una gran variedad de **especies del género *Culicoides***, que presentan una amplia **distribución a nivel mundial**. Se ha descrito su presencia asociada a la transmisión de la enfermedad en diversas regiones de África, Asia, Europa y Norteamérica, así como en Australia. La transmisión y permanencia del virus es mayor en aquellas áreas geográficas en las que las condiciones climáticas hacen que el virus pueda sobrevivir durante el invierno. Los periodos de mayor actividad vectorial tienen lugar en verano y a principios del otoño, y los *Culicoides* no pueden sobrevivir al invierno si la temperatura media baja de una cierta temperatura (generalmente, en la bibliografía se menciona una temperatura de en torno a los 12-13°C). Así, puede existir cierta estacionalidad en la presentación de la enfermedad, lo cual no elimina completamente la posibilidad de transmisión durante el periodo invernal.

La propagación de los virus se da principalmente por el **movimiento de animales** y por la **dispersión aérea de vectores infectados**. Además, la **adaptación a nuevas áreas geográficas de las especies susceptibles** (tanto de vectores como de hospedadores vertebrados) juega un papel importante en la entrada del virus en zonas previamente libres.

En España, la primera notificación desde la década de los 50 se dio en el año **2000**, con la detección del **serotipo 2** en las Islas Baleares. Tras esta notificación, se puso en marcha un programa de erradicación y vigilancia que consiguió con éxito la erradicación dos años

después, en el 2002. Posteriormente se dio una nueva introducción del virus en el año 2003, con un brote del **serotipo 4** en Menorca, consiguiendo dos años después su erradicación. Cabe destacar la detección en **julio de 2021** del serotipo 4 en la región, que había mantenido su estatus como zona libre desde su consecución en 2005.

En el caso de la Península, la primera incursión del virus tuvo lugar el año **2004** tras la introducción del **serotipo 4** desde el Norte de África. Tras su erradicación, este serotipo fue detectado de nuevo en **2010**.

El **serotipo 1** se detectó por primera vez en **2007**, con origen también en el norte de África. Desde entonces, ambos serotipos han estado en circulación en España, fundamentalmente en el suroeste peninsular, habiéndose declarado libres zonas del norte, este, centro y sur de la península.

El **serotipo 8** se detectó en Cantabria en **2008** tras una rápida expansión por Europa. El estado de libre de este serotipo fue recuperado por España en **2013**, pero en el año **2020** se declaró un nuevo foco en Navarra procedente de Francia. Desde entonces, se han sucedido focos en el norte y noreste peninsular.

### 2.1.3. Sintomatología y lesiones

La sintomatología varía desde infecciones **subclínicas**, siendo esto lo más frecuente en la mayoría de las especies, hasta enfermedad **grave** o incluso **mortal**. Mientras que las **ovejas** son la especie **más susceptible**, en bovino y caprino se suelen dar infecciones subclínicas o asintomáticas, por lo que se consideran hospedadores reservorio que pueden actuar como amplificadores virales.

Dentro de la especie ovina, se ha descrito la diferencia de susceptibilidad entre razas, siendo más susceptibles las ovejas de raza merina.

Para comprender la sintomatología y las lesiones asociadas a la infección, es fundamental atender a su **patogenia**.

Desde la alimentación del mosquito a partir de un animal infectado deben pasar unos 10 días para que el *Culicoides* sea infectivo, siendo este el **periodo extrínseco de incubación**. Tras su entrada en el organismo, el virus tiene una replicación primaria en linfonódulos locales, desde donde se disemina para posteriormente replicarse en las **células endoteliales vasculares**. El virus viaja rápidamente a través de la circulación sanguínea, donde puede permanecer durante prolongados periodos de viremia fijado a la **membrana eritrocitaria**.

Así, las principales **lesiones** se derivan del **daño endotelial**, apareciendo congestión, edemas, hemorragias, ulceraciones de mucosas digestiva y respiratoria, o hipertrofia de los linfonódulos.

A nivel microscópico pueden identificarse vasculitis, edema, trombosis, y en ocasiones necrosis de las zonas afectadas.

La sintomatología aparece tras un periodo de incubación de entre 7 a 10 días, e incluye, en casos graves:

- Fiebre alta (hasta 42°C) de presentación aguda
- Edema subcutáneo en cara, párpados y orejas
- Hemorragia y ulceración de las mucosas, fundamentalmente oral y nasal
- Hiperemia en la banda coronaria de las pezuñas (que puede acompañarse de cojera), las ingles, las axilas y el periné
- Hiperemia y edema de la lengua, con cianosis en casos graves (este signo es poco frecuente, a pesar de conceder su nombre a la enfermedad)
- Salivación excesiva y descarga nasal
- Debilidad, depresión, pérdida de peso, disminución en la producción, abortos
- Otros síntomas, como diarrea, vómitos, pérdida de la lana en ovejas con infección crónica, o neumonías (en casos graves)
- En el caso particular de la transmisión vertical del VLA-8 en bovinos, se ha descrito alteración del sistema nervioso central, pudiendo aparecer el denominado “síndrome del ternero débil”

La morbilidad puede alcanzar el 100% en rebaños de ovejas de razas altamente susceptibles. La mortalidad suele ser baja, de entre el 2% y el 30% de media, pudiendo elevarse hasta el 70% en casos de animales no expuestos al virus previamente.

#### 2.1.4. Profilaxis

En cuanto a la profilaxis, la **vacunación** ha demostrado ser efectiva para el control en regiones endémicas, permitiendo reducir las pérdidas directas asociadas a la enfermedad, reducir la circulación y permitir movimientos seguros de los animales.

Para llevar a cabo la vacunación, es fundamental tener en cuenta que **no existe inmunidad cruzada entre los diferentes serotipos**, por lo que ésta debe ser dirigida al serotipo cuya circulación se haya detectado en cada caso.

En la actualidad, las únicas vacunas autorizadas en España son vacunas **inactivadas**. Éstas, sin embargo, presentan inconvenientes, fundamentalmente que no permiten la distinción entre animales vacunados e infectados. En la actualidad, se está trabajando en el desarrollo de vacunas **DIVA** para solventar este problema.

Además, se deben tener en cuenta las medidas profilácticas de **protección frente a vectores**, que se encuentran recogidas en un Manual Práctico de Operaciones publicado por el MAPA. Las medidas propuestas incluyen la desinsectación eficaz, que debe realizarse empleando insecticidas efectivos aprobados y registrados.

## 2.2. MARCO NORMATIVO

En el marco **internacional**, es fundamental mencionar la inclusión de la Lengua Azul en la **lista de enfermedades de declaración obligatoria de la OIE**.

A nivel **comunitario**, desde su entrada en vigor en abril de 2021 se debe atender a lo dispuesto en la **Legislación Europea sobre Sanidad Animal**. Se considerarán el **Reglamento (UE) 2016/429 del Parlamento y del Consejo**, que incluye en el Anexo II la infección por el virus de la Lengua Azul (serotipos 1-24), así como sus posteriores modificaciones reflejadas en actos delegados y de ejecución:

- Reglamento (UE) 2016/429, del Parlamento y del Consejo.
  - Modificado por el Reglamento (UE) 2018/1629 de la Comisión. Modifica el Anexo II, en el que se recoge la lista de enfermedades objeto de dicha ley.
- Reglamento de Ejecución (UE) 2018/1882 de la Comisión, en el que se establece la categorización de las enfermedades.
- Reglamento Delegado (UE) 2020/687 de la Comisión, sobre las normas relativas a la prevención y control de determinadas enfermedades de la lista.
- Reglamento Delegado (UE) 2020/688 de la Comisión, relativo a requisitos zoonosanitarios para el desplazamiento intracomunitario de animales. De acuerdo con su Artículo 43, en España está vigente un **protocolo** que establece las condiciones de intercambio relativas a la Lengua azul para los bovinos y ovinos con destino a España desde un Estado miembro o una zona no indemne de lengua azul.
- Reglamento Delegado (UE) 2020/689 de la Comisión, que establece normas para la vigilancia, los programas de erradicación y el estatus de libre de enfermedad.
- Reglamento Delegado (UE) 2020/692 de la Comisión, en lo referente a los requisitos para la entrada de animales en la UE desde terceros países.
- Reglamento Delegado (UE) 2020/2002 de la Comisión, que establece las condiciones y frecuencia de notificación de las enfermedades.

En el ámbito **nacional**, las principales disposiciones a considerar son:

- **Ley 8/2003**, de Sanidad Animal
- **Real Decreto 526/2014**, en el cual se incluye como una **enfermedad de declaración obligatoria**
- **Orden APA/1251/2020**, por la que se establecen medidas específicas de protección frente a la lengua azul, y su posterior modificación por la **Resolución** de 15 de diciembre de 2021, de la Dirección General de Sanidad de la Producción Agraria, por la que se modifican las partes A y B del anexo I.

## 2.3. PROGRAMAS DE VIGILANCIA, CONTROL Y ERRADICACIÓN

Mientras que anteriormente la aplicación de programas de erradicación era obligatoria para los Estados Miembros, en la nueva Legislación Europea de Sanidad Animal la Lengua Azul se incluye en las categorías C + D + E.

Así, al pertenecer a la categoría C, la aplicación de **programas de erradicación es voluntaria para los Estados Miembros**, pero en aquéllos en que se desarrollen estos programas, es obligatorio su cumplimiento.

En España existe en marcha un **Programa Nacional de Vigilancia, Control y Erradicación** de la Lengua Azul que se actualiza anualmente en función de la situación epidemiológica.

Estos Programas Nacionales de Vigilancia se fundamentan en cinco líneas de acción:

- Vigilancia **activa** serológica y virológica
- Vigilancia **pasiva** clínica
- Vigilancia **entomológica**
- **Vacunación** obligatoria y voluntaria
- **Control de movimientos**

Además, en ellos se establece la **zonificación de las zonas restringidas**, pudiéndose aplicar así medidas específicas en función de la situación epidemiológica particular de las diferentes áreas geográficas.

De forma general, la zona de restricción **frente al serotipo 1** se concentra en el **sur** de la península, mientras que la zona de restricción **frente al serotipo 4 se extiende por el sur y suroeste peninsular**, y la zona de restricción **frente al serotipo 8** recoge áreas del **norte y noreste**, fundamentalmente zonas fronterizas con Francia.

### 2.3.1. Vigilancia activa

Para la aplicación de medidas de **vigilancia activa**, es fundamental valorar de forma separada las consideradas **zonas de riesgo**, para poder aumentar en estas áreas los esfuerzos de vigilancia. En el Programa Nacional para 2022, se consideran zonas de riesgo las áreas incluidas en las zonas de restricción para los diferentes serotipos, así como las provincias limítrofes con Francia, dada la circulación en este país de los serotipos 1 y 4.

La vigilancia activa se basa en la realización de **pruebas laboratoriales para la detección de anticuerpos y partículas virales** en **animales centinelas**, con el objetivo de **detectar circulación vírica**. Para estos programas, la unidad epidemiológica es la **provincia**, excepto en el caso del País Vasco, en que la unidad epidemiológica es la Comunidad Autónoma.

Para establecer las condiciones de muestreo, se debe tener en cuenta lo dispuesto en el Programa Nacional para el año en curso. Para el Programa de 2022, los criterios mínimos establecidos son:

- Se deberá realizar el muestreo sobre animales **ovinos, bovinos o caprinos** serológicamente negativos, no vacunados y mayores de 4 meses.
- La vigilancia deberá permitir la detección de una **prevalencia mínima del 1% o 5%, con un nivel de confianza del 95%**. Se deberá garantizar la cobertura de todo el territorio objeto de vigilancia, por lo que se tomarán muestras de al menos **6 explotaciones** por unidad epidemiológica.
- Se tomarán muestras de **sangre completa y suero** que serán enviadas al Laboratorio Oficial de Sanidad Animal de la Comunidad Autónoma. Los sueros serán analizados mediante ELISA, y, en caso de resultar positivos, se analizarán por RT-PCR las muestras de sangre. Las muestras positivas se enviarán al Laboratorio Nacional de Referencia (Laboratorio Central de Veterinaria de Algete) para su confirmación.
- Deberán conservarse las muestras de suero de los muestreos anteriores para poder estudiar posibles **seroconversiones**.

Además, se establecen criterios diferenciales para las zonas de riesgo y las zonas no consideradas de riesgo relativos al **tiempo de permanencia en la unidad epidemiológica de los animales** y la **frecuencia de la toma de muestras** (mensual en las zonas de riesgo durante el periodo de actividad del vector, frente a dos muestreos anuales en las zonas de no riesgo).

Para las zonas de riesgo se establecen también criterios mínimos respecto a la **sustitución y reemplazo de los animales centinela**, y se enumeran las **zonas** en que se debe diseñar el programa para detectar una prevalencia mínima del 1%.

### 2.3.2. Vigilancia pasiva

Según lo establecido en la Ley de Sanidad Animal, “toda persona física o jurídica, pública o privada, está obligada a comunicar a la autoridad competente (...) todos los focos y sospechas de enfermedades de las incluidas en la lista de enfermedades de declaración obligatoria”.

Así, tanto los veterinarios como los titulares de las explotaciones deben obligatoriamente **comunicar cualquier sospecha clínica** de lengua azul, tras lo cual se estudiará el caso por las autoridades competentes. En el Manual de Operaciones se establece el protocolo de actuación en caso de sospecha.

### 2.3.3. Vigilancia y monitorización entomológica

Este programa se puso en marcha por primera vez en 2004, con el objetivo de monitorizar la abundancia y distribución de las poblaciones de vectores. Para establecer el número y distribución de las trampas, se consideran cuatro zonas:

- Zona Norte, área principal de distribución de *Culicoides obsoletus*
- Zona Sur, área principal de *Culicoides imicola*
- Zona Centro, correspondiente a la zona sur de presencia de *C. obsoletus* y la zona superior de presencia de *C. imicola*
- Archipiélago Balear y Canario

Se emplean trampas de aspiración, con luz ultravioleta como atrayente y célula fotoeléctrica incorporada. En su interior, los insectos capturados son conducidos a un bote de plástico con alcohol y anticongelante en el que se conservarán.

Las muestras se envían para su análisis a la Facultad de Veterinaria de la Universidad de Zaragoza.

#### 2.3.4. Programa de vacunación

Actualmente, se recoge en la Orden AAA/1251/2020, de medidas específicas de protección frente a la lengua azul.

La vacunación es **obligatoria** para **animales mayores de 3 meses de las especies ovina y bovina** para los serotipos 1, 4 y 8 en sus respectivas zonas de restricción. Además, se establecen zonas de **vacunación voluntaria para los serotipos 4 y 8** en determinadas comarcas del norte y noreste peninsular, así como de los animales que realicen estancias temporales en Francia. También se puede realizar la **vacunación** de forma **voluntaria** frente a los serotipos 1 y 4 en las zonas que han pasado de zona restringida a zona libre en los últimos años.

Se emplearán vacunas **inactivadas** autorizadas, siguiendo la pauta determinada por cada laboratorio. De forma general, para la primovacunación se aplicarán dos dosis separadas 3-4 semanas, mientras que en la revacunación se aplicará una sola dosis.

Se deberán registrar los **datos de la vacunación** en la base de datos del RIIA (Registro de identificación individual de animales), para lo cual deberán notificarse a la autoridad competente en un máximo de 7 días desde la aplicación de cada dosis.

## 2.4. DIAGNÓSTICO LABORATORIAL

### 2.4.1. Diagnóstico diferencial

Las patologías a tener en cuenta en el diagnóstico diferencial dependerán de la **presentación clínica** y la especie o **especies afectadas**.

Estas pueden incluir, en cuanto a enfermedades infecciosas, la enfermedad hemorrágica epizoótica, la fiebre aftosa, la peste de los pequeños rumiantes, la viruela ovina y caprina, la estomatitis vesicular o el ectima contagioso, entre otras. Cuando los animales afectados son

terneros que presentan un cuadro de debilidad general (síndrome del ternero débil), se debe considerar la infección por el virus de la diarrea vírica bovina.

Además, se deben tener en cuenta otras patologías de origen no infeccioso, como la fotosensibilización o ciertas intoxicaciones.

#### 2.4.2. Características para el envío de muestras

Las muestras de elección dependerán del **tipo de análisis solicitado y del motivo de la solicitud**:

- Para la realización de **análisis serológico**, se remitirán muestras **de suero**.
- Para análisis de **detección del agente**:
  - **Sangre completa** en tubos con anticoagulante (EDTA, aunque también se puede emplear heparina).
  - **Coágulos de sangre** tras la separación del suero.
  - **Vísceras**: los órganos de elección serán el **bazo y los ganglios linfáticos**, aunque puede realizarse la detección con éxito a partir de muestras de otros órganos como hígado o pulmón. El método elegido para la conservación de las muestras hasta su llegada al laboratorio debe permitir el correcto desarrollo de las técnicas (y por tanto la supervivencia de los Orbivirus), por lo que no se deben conservar en formol ni en congelación a -20°C.
- Para análisis realizados como parte del programa de vigilancia entomológica, se emplearán **mosquitos enteros** capturados en las trampas.

La toma de muestras se debe realizar garantizando **condiciones de higiene** que minimicen la posibilidad de contaminación, y deben ser identificadas de forma que se asegure su **trazabilidad**. En caso de tomar muestras de animales vivos, es esencial considerar además cuestiones de **bienestar animal**.

Para el envío de muestras a los laboratorios, se debe cumplir lo dispuesto en la normativa vigente, para lo cual es fundamental tener en cuenta en primer lugar la **evaluación del riesgo** con respecto al agente y al tipo de muestras para poder asignarles la categoría correspondiente.

Así, algunas **muestras clínicas** podrán considerarse **exentas, en caso de que se considere que presentan un riesgo mínimo de contener agentes patógenos**. Por ejemplo, puede tratarse de las muestras de suero (muestra considerada de bajo riesgo) tomadas en el marco de los programas de vigilancia activa en zonas no consideradas de riesgo.

El resto de muestras (por ejemplo, las obtenidas en programas de vigilancia pasiva, o las enviadas al LNR para confirmación de un resultado positivo), deberán marcarse como **sustancias infecciosas de categoría B, con el código UN 3373**.

En el caso de muestras potencialmente infectivas (vísceras o sangre de animales en los que se tenga certeza o sospecha de infección), se recomienda su apertura en un laboratorio de nivel de bioseguridad 3 en caso de que se disponga de dichas instalaciones.

### 2.4.3. Técnicas de diagnóstico

De forma rutinaria, se suelen combinar las pruebas **de detección molecular (RT-PCR)** y las pruebas **serológicas (ELISA para diferenciar sueros positivos y negativos, y seroneutralización para determinar el serotipo)**.

Además, se pueden realizar técnicas de aislamiento sobre las muestras positivas a la RT-PCR, no tanto con fines de diagnóstico sino para poder disponer de colecciones de cepas y realizar pruebas posteriores, como la secuenciación del genoma de los aislados.

#### 2.4.3.1. Detección del agente

Estas técnicas se recomiendan para **demostrar ausencia de infección en animales individuales, confirmar casos clínicos y determinar la prevalencia de la infección.**

Se trata fundamentalmente de las **técnicas de aislamiento, neutralización vírica** y las **técnicas moleculares.**

- **Aislamiento de virus.** Se puede realizar a partir de sangre no coagulada, coágulos de sangre tras la separación del suero, vísceras o mosquitos. Tras su realización, se debe emplear alguno de los sistemas de detección descritos posteriormente (fundamentalmente, RT-PCR o virusneutralización) para valorar el éxito del aislamiento:
  - **Aislamiento en huevo embrionado de pollo.** Se trata de una técnica muy sensible, pero con alta dificultad técnica y que puede suscitar reticencias desde el punto de vista ético.  
La inoculación debe realizarse en los huevos por **vía intravenosa**. Los huevos se incuban en cámara húmeda a 32-33,5°C durante 7 días, y se observan diariamente bajo el ovoscopio para valorar la viabilidad embrionaria. Los embriones muertos a partir del segundo día y los que siguen vivos tras 7 días se deben refrigerar toda la noche, tras lo cual se realiza un homogeneizado que se puede emplear para realizar técnicas de detección del virus o su amplificación en cultivo celular.
- **Aislamiento en cultivo celular.** Se pueden emplear líneas de mosquito (KC) o de mamífero (BHK, Vero). La línea celular KC es muy sensible, pero no presenta efecto citopático, por lo que puede ser conveniente realizar un primer pase en la línea de mosquito, y posteriormente realizar los pases sucesivos en líneas de mamífero para valorar la aparición de ECP (Efecto Citopático).
- **Técnicas moleculares:**

- **Detección del ácido nucleico.** Se pueden emplear técnicas de RT-PCR convencional, o bien de RT-PCR a tiempo real. Existen descritas tanto técnicas para la detección de serogrupo (es decir, para diferenciar el VLA de otros Orbivirus) como para la diferenciación a **nivel de serotipo**. El método de RT-PCR a tiempo real recomendado por la OIE es el descrito por Hoffmann *et al.* (2008).
- **Secuenciación** del ácido nucleico. En la actualidad, están tomando importancia las técnicas de **secuenciación masiva o NGS**, aunque también se puede emplear la secuenciación Sanger. Se debe tener en cuenta que la concentración en las muestras clínicas puede no ser suficiente para llevar a cabo estas técnicas, por lo que puede ser necesario el previo crecimiento y multiplicación del virus en cultivo.
- **Virusneutralización.** Es una técnica que no permite únicamente la detección del virus, sino también su tipificación empleando sueros específicos de serotipo. En la actualidad, es más frecuente realizar la detección por técnicas moleculares.
- **Otras técnicas:** en el Manual de la OIE también se describen otras técnicas, como la Inmunofluorescencia, la tinción con inmunoperoxidasa o el ELISA de captura de antígeno, que no se utilizan de rutina.

#### 2.4.3.2. Pruebas serológicas

La producción de anticuerpos comienza a los 7-14 días tras la infección, y se producen tanto anticuerpos **neutralizantes** como **no neutralizantes**. Los anticuerpos son específicos de serotipo, siendo insignificante la protección cruzada frente a otros serotipos. En cualquier caso, se ha descrito que tras las infecciones múltiples con diferentes serotipos se pueden generar anticuerpos neutralizantes frente a otros serotipos sin que el animal haya estado expuesto a estos previamente.

- **Enzimoanálisis:**
  - **ELISA de competición o ELISA de bloqueo.** Se emplean anticuerpos frente a la proteína VP7, por lo que son específicos de serogrupo, pero no permiten la diferenciación entre los distintos serotipos. Existen diversos kits comerciales disponibles y autorizados para su uso en España.
  - **ELISA indirecto.** Se describe en el Manual de la OIE como útil para fines de vigilancia o para el cribado de muestras, pero no se utiliza de rutina. Se ha descrito que puede presentar reactividad cruzada con otros Orbivirus como el virus de la enfermedad hemorrágica epizoótica.
  - **ELISA de doble reconocimiento.** No se recoge en el Manual de la OIE, por lo que no se recomienda su uso como técnica única, pero emplearlo en combinación con los ELISA de competición o bloqueo puede aumentar la sensibilidad de la técnica. En España existe un kit comercial disponible.

- **Seroneutralización.** Permite la detección de anticuerpos neutralizantes, que son específicos de serotipo. Así, se puede emplear tanto para la identificación del serotipo como para valorar la respuesta de anticuerpos neutralizantes ante la vacunación y por tanto su efectividad.
- **Inmunodifusión en gel de agar.** Se describe en el Manual de la OIE, pero no se emplea de rutina, siendo su mayor inconveniente su falta de especificidad.

### 3. PESTE EQUINA AFRICANA

#### 3.1. PESTE EQUINA AFRICANA: GENERALIDADES

##### 3.1.1. Etiología

La Peste Equina Africana es una enfermedad vírica infecciosa no contagiosa, que afecta a todas las especies de **équidos**. Está causada por un Orbivirus, el virus de la peste equina africana (VPE).

Como en el caso del VLA, se trata de un virus ARN de doble cadena, cuyo genoma es linear y está constituido por **10 segmentos**, que codifican para siete proteínas estructurales (denominadas VP1 – VP7) y cuatro proteínas no estructurales (NS1, NS2, NS3 y NS3A). Su conformación, así como la distribución de estas proteínas estructurales en el virión, es muy similar a la descrita para el VLA.

Mediante técnicas de neutralización vírica se han identificado **nueve serotipos del VPE**, pero en este caso sí se ha identificado cierta **reacción cruzada**, particularmente entre los serotipos 1 y 2, 3 y 7, 5 y 8, y 6 y 9.

##### 3.1.2. Transmisión, epidemiología y distribución.

La Peste Equina Africana se transmite a través de **vectores artrópodos, mosquitos del género *Culicoides***, habiéndose identificado al menos dos especies de vectores que intervienen en la transmisión: *C. imicola* y *C. botlinos*. Se ha descrito también la posibilidad de transmisión por otras especies, como *C. pulicaris* y *C. obsoletus*, que podrían ser vectores potenciales para su expansión en Europa.

En cuanto a los hospedadores vertebrados, los principales son los caballos, mulas, burros y cebras, los cuales presentan además diferente susceptibilidad, siendo la tasa de mortalidad mayor en caballos (50-95%) y mulas (50%). Esta susceptibilidad también varía entre regiones, siendo menor en las regiones en las que la enfermedad es endémica. En el continente africano, las cebras actúan como reservorio natural del virus, siendo la especie más resistente y pudiendo presentar viremias de hasta 40 días.

Se ha descrito la infección en otras especies, como perros o camélidos, pero se consideran de nula importancia epidemiológica dados sus cortos periodos de viremia.

Esta enfermedad es endémica en determinadas regiones de África, fundamentalmente en el África Subsahariana y Yemen. En el este y el sur del continente se presentan todos los

serotipos del virus, mientras que en el **norte y el oeste** se han detectado los serotipos **9, 4 y 2**, desde donde ocasionalmente se han transmitido a **países limítrofes en la zona del Mediterráneo**. Así, se han dado brotes fuera de la zona considerada endémica en el norte de África (el último brote en **2007-2010**), Oriente Medio (**1959-1961**), **España** (en 1966, y tras su erradicación de nuevo en **1987-1990**, tras la importación de cebras de Namibia) y **Portugal** (**1989**, introducido desde España).

Presenta una alta patogenicidad y poder de difusión, además de poder alcanzar valores muy altos de mortalidad, por lo que su aparición puede acarrear consecuencias económicas muy graves, además de suponer restricciones al comercio (tanto de animales como de productos germinales) y al desarrollo de actividades deportivas.

Además, la enfermedad presenta una alta estacionalidad y ciclicidad, presentándose al final del verano y en el otoño, dándose la mayor transmisión durante las estaciones calurosas.

### 3.1.3. Sintomatología y lesiones

El periodo de incubación es normalmente de 5 a 7 días.

La patogenia es similar a la del VLA, con una replicación primaria en linfonódulos regionales y la diseminación hematogena adherido a la membrana eritrocitaria.

En cuanto a la sintomatología, se han descrito **cuatro formas clínicas** que pueden diferenciarse claramente:

- Forma **pulmonar**. Es hiperaguda y es de curso corto, pues presenta una alta mortalidad (próxima al 95%) que suele ser temprana. Los signos incluyen fiebre de hasta 41°C, dificultad respiratoria, taquipnea, tos y descarga nasal. Los animales se presentan en posición ortopneica con extensión del cuello, con los ollares dilatados y la boca abierta. A nivel de lesiones, se puede observar edema pulmonar e hidrotórax, además de infartación de los linfonódulos.
- Forma **cardíaca**. La mortalidad es menor, de aproximadamente el 50%, y tiene un curso subagudo. Se caracteriza por la presentación de edemas en cabeza y cuello, así como de las fosas supraorbitales con hinchazón conjuntival y petequias en la conjuntiva y mucosa oral. La fiebre máxima dura entre 3 y 6 días. En la necropsia se observan edemas y lesiones cardíacas con hidropericardio.
- Forma **mixta**. Es una forma **aguda**, con una mortalidad de hasta el 70%, y es la forma de presentación más común. Presenta rasgos de ambas formas clínicas anteriores.
- Forma **febril**. Suele aparecer en animales inmunes a un serotipo cuando se infectan con el serotipo heterólogo, o bien en especies resistentes. Es una forma leve caracterizada por un aumento ligero de la temperatura, que puede pasar desapercibida. Se pueden presentar signos como la pérdida de apetito o ligera disnea.

También se han descrito casos clínicos en perros, en los que suele aparecer disnea aguda o muerte súbita. Presenta una mortalidad alta, por lo que la viremia es corta, considerándose de poca importancia epidemiológica a pesar de haberse descrito que podrían intervenir en la diseminación de la enfermedad.

#### **3.1.4. Profilaxis**

Como en el caso de la Lengua Azul, las vacunas son una herramienta muy importante ante la aparición de focos, para limitar la dispersión del virus y la mortalidad en los animales, reduciendo así las pérdidas.

Actualmente, existen disponibles vacunas **vivas atenuadas mono y polivalentes** para su uso en caballos, mulas y asnos. Existen estudios de evaluación de vacunas **recombinantes de subunidades**, que sin embargo todavía no están disponibles para su uso comercial, y que permitirían implantar estrategias DIVA.

En España, la vacunación el 1 de diciembre de 1992, tras lo cual el país fue declarado libre de la enfermedad en 1993.

Como en el caso de la Lengua Azul, se deben tener también en cuenta las medidas profilácticas de **protección frente a vectores**, recogidas en el Manual Práctico de Operaciones en la lucha frente a la PEA publicado por el MAPA.

### **3.2. MARCO NORMATIVO**

Al igual que la Lengua Azul, la PEA está incluida en **la lista única de la OIE**, por lo que se trata de una enfermedad de notificación obligatoria en el ámbito internacional.

A nivel comunitario, la normativa aplicable en referencia a la PEA es la misma que la mencionada para la Lengua Azul, incluyendo el **Reglamento 2016/429** y sus Reglamentos Delegados y de Ejecución.

En España, se deben considerar la **Ley 8/2003 de Sanidad Animal** y el **Real Decreto 526/2014**, en el que consta como una enfermedad de declaración obligatoria. En el caso particular de la PEA, la normativa específica se recoge en el **Real Decreto 680/1993**, por el que se establecen las normas de control y las medidas de lucha contra la peste equina.

### **3.3. PROGRAMAS DE VIGILANCIA, CONTROL Y ERRADICACIÓN.**

De acuerdo con la Legislación Europea de Sanidad Animal, la Peste Equina Africana se clasifica como una enfermedad de categoría A + D + E, tratándose por tanto de una enfermedad que no está presente normalmente en la Unión, por lo que deberán tomarse medidas de **erradicación inmediatas tan pronto como se detecte su existencia, siendo obligatorio disponer de programas nacionales de vigilancia.**

El Plan Nacional de Vigilancia de la Peste Equina Africana en España se prorroga anualmente de forma automática, y se asienta sobre tres componentes: **vigilancia activa, vigilancia pasiva y vigilancia entomológica** que se realiza de forma **común con la vigilancia entomológica para la Lengua Azul**.

Todo el territorio español es objeto del programa de vigilancia pasiva, mientras que en el caso de la vigilancia activa ésta se realizará en un área específica, que se delimitará teniendo en cuenta su situación geográfica de proximidad a otros lugares de riesgo. Así, en esta área de **zona de vigilancia activa** se distinguen dos zonas:

- En la península, las provincias de Málaga, Cádiz, Huelva, Sevilla y Granada.
- El archipiélago canario en su totalidad.

Todos los equinos censados en España serán objeto del programa.

### 3.3.1. Vigilancia activa serológica

Se basa en la realización de pruebas diagnósticas serológicas sobre una muestra de explotaciones centinelas de animales de las especies sensibles, encaminada a evidenciar la circulación del virus. La **provincia** constituye la unidad epidemiológica del programa.

Se establecen ciertos criterios mínimos que se deben cumplir:

- Los muestreos deben realizarse **sobre équidos mayores de 1 año, no vacunados** y que hayan permanecido en la misma zona los **últimos 12 meses**.
- La serovigilancia deberá diseñarse de tal manera que permita la detección de una **prevalencia mínima del 20% con un nivel de confianza del 95%**, y la disposición de los animales muestreados deberá garantizar la cobertura de todo el territorio.
- Se tomarán muestras de suero que se enviarán al Laboratorio Nacional Referencia (Laboratorio Central de Veterinaria de Algete) para su análisis mediante la técnica de ELISA. En caso de resultado positivo, se empleará la técnica de seroneutralización para la confirmación.

En caso de resultados positivos, se deben seguir las medidas recogidas en el Manual Práctico de Operaciones. Además, se deberá realizar una investigación epidemiológica para determinar si el positivo se debe a la circulación viral en la explotación o si, por el contrario, puede deberse a la introducción de animales vacunados.

### 3.3.2. Vigilancia pasiva

Como en el caso de la Lengua Azul, se establece la **obligación de comunicación** a la autoridad competente de cualquier sospecha de la enfermedad. Existe un protocolo de actuación en casos de sospecha descrito en el Manual Práctico de Operaciones.

### 3.4. DIAGNÓSTICO LABORATORIAL

#### 3.4.1. Diagnóstico diferencial

Las enfermedades que se deben considerar para el diagnóstico diferencial incluyen la encefalosis equina, la infección por virus Hendra, la arteritis viral equina, la piroplasmosis o la púrpura hemorrágica, entre otras.

#### 3.4.2. Características para el envío de muestras

Las muestras de elección diferirán, como en el caso de la Lengua Azul, en función del **objetivo del análisis y las condiciones en las cuales se solicite**:

- Para la realización de **análisis serológico**, muestras **de suero**.
- Para análisis de **detección del agente**:
  - **Sangre completa** en tubos con anticoagulante (EDTA).
  - **Vísceras**: los órganos de elección serán **bazo, pulmón y ganglios linfáticos**. Las muestras deberán conservarse a 4°C durante el transporte y procesarse en el menor tiempo posible.
- Como en el caso de la Lengua Azul, para los análisis realizados como parte del programa de vigilancia entomológica, se emplearán **mosquitos enteros** capturados en las trampas.

De forma idéntica a lo descrito para la Lengua Azul, las condiciones de la toma de muestras deben garantizar **una higiene adecuada, la correcta trazabilidad de las muestras y un nivel óptimo de bienestar animal**.

El envío de muestras a los laboratorios se debe realizar en condiciones similares a las descritas para el envío de muestras para el diagnóstico de Lengua Azul.

Así, se debe cumplir lo dispuesto en la normativa vigente en cuanto al etiquetado y categorización de las muestras, así como en lo referente al **embalaje** de las muestras.

En el caso de la PEA, dada la situación epidemiológica en España, las **muestras** de suero tomadas en los programas de vigilancia activa serológica, o las muestras tomadas para realizar pruebas diagnósticas necesarias para el movimiento de animales, pueden considerarse muestras de **riesgo mínimo** y por tanto tratarse como muestras **exentas**. Otras muestras que no se consideren de riesgo insignificante deberán ir marcadas como **sustancias infecciosas de categoría B con el código UN 3373**.

Dado el potencial de las consecuencias en caso de escape del virus, se recomienda el tratamiento de las muestras sospechosas en laboratorios de nivel de bioseguridad 3, en caso de que se disponga de dichas instalaciones.

### 3.4.3. Técnicas de diagnóstico

Las pruebas empleadas de forma rutinaria son las mismas que las mencionadas para la Lengua Azul, combinándose pruebas **de detección molecular (RT-PCR)** y pruebas **serológicas (ELISA y seroneutralización)**.

Las técnicas de aislamiento son también en este caso una importante herramienta para disponer de cepas aisladas y la realización de pruebas posteriores, pero no se suelen emplear rutinariamente para el diagnóstico.

#### 3.4.3.1. Detección del agente

Estas técnicas se recomiendan en el Manual de la OIE para **demostrar ausencia de infección en animales individuales, confirmar casos clínicos y determinar la prevalencia de la infección**, siendo también útiles las técnicas de PCR, aunque en menor medida, para demostrar la ausencia de infección en la población y para contribuir a las políticas de erradicación.

- **Aislamiento de virus.** Las muestras de elección son la sangre completa no coagulada y secciones de vísceras de animales muertos, como el bazo, los pulmones o los ganglios linfáticos.
  - **Aislamiento en huevo embrionado de pollo.** No se describe en el Manual de la OIE, pero sí se ha descrito su utilización en la bibliografía, y se recomienda por el Laboratorio Europeo de Referencia (LCV Algete).
  - **Aislamiento en cultivo celular.** Se ha realizado con éxito el aislamiento directo en líneas BHK, MS y Vero, así como en líneas celulares de insectos, como la línea KC. Como se ha descrito para la Lengua Azul, las líneas de insecto no presentan efecto citopático, por lo que se recomienda emplearlas para realizar un primer pase, tras el cual se deberán dar pases sucesivos en líneas celulares de mamífero para valorar la presentación de efecto.
- **Técnicas moleculares:**
  - **Detección del ácido nucleico.** Se pueden emplear técnicas de RT-PCR convencional, o bien de RT-PCR a tiempo real. Existen descritas tanto técnicas para la detección de serogrupo como para la diferenciación a **nivel de serotipo**. Los métodos de RT-PCR a tiempo real recomendados por la OIE son el de Agüero *et al.* (2008) y Guthrie *et al.* (2013), mientras que para la RT-PCR convencional en gel de agarosa se recomienda el descrito por Zientara *et al.* (1994).
  - **Secuenciación del ácido nucleico.** No se trata de una técnica incluida en el Manual de la OIE, por lo que no se recomienda su uso para el diagnóstico, pero puede resultar de enorme utilidad para el establecimiento de relaciones

filogenéticas entre cepas, permitiendo la realización de estudios epidemiológicos.

- **Virusneutralización.** Está descrita por la OIE, y permite la detección y tipificación del virus. Sin embargo, en la actualidad se encuentra en desuso por el desarrollo de técnicas de tipificación más rápidas y sencillas, como la RT-PCR.

### 3.4.3.2. Pruebas serológicas

Los ELISAS de bloqueo y de competición, basados en antígeno soluble de VPE o en proteína VP7 recombinante, son los métodos recomendados para la detección de anticuerpos específicos de serogrupo.

- **Enzimoimmunoanálisis:**
  - **ELISA de competición.** Se emplea la VP7, que se caracteriza por estar conservada en los nueve serotipos de VPEA. En la actualidad existe un único kit comercial disponible para su uso.
  - **ELISA indirecto.** Se describe en el Manual de la OIE, pero no se suele utilizar de rutina.
- **Seroneutralización.** Como en el caso de la LA, permite la detección de anticuerpos neutralizantes específicos de serotipo. Se emplea por tanto fundamentalmente para la tipificación del virus.
- **Fijación del complemento.** Es una técnica que se ha empleado ampliamente en el pasado, pero que en la actualidad ha quedado prácticamente sustituida por el ELISA en su totalidad, dada su mayor sensibilidad. Además, se debe tener en cuenta que algunos sueros podían presentar problemas al ser anti-complementarios, fundamentalmente los de burro y cebra.

Como en el caso de la Lengua Azul, la **combinación de técnicas** con diferentes fundamentos permite **aumentar la sensibilidad y especificidad** del diagnóstico, además de permitir **valorar aspectos diferentes**, contribuyendo así a una mayor eficiencia.

## BIBLIOGRAFÍA

Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE). Manual de las Pruebas Diagnósticas y de las Vacunas para los Animales Terrestres. Capítulos 3.1.3. (Infección por el Virus de la Lengua Azul) y 3.5 (Peste Equina). Disponible en: <https://oie.int/es>

Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE). Código Sanitario para los Animales Terrestres. Capítulos 8.3. (Infección por el Virus de la Lengua Azul) y 12.1. (Infección por el Virus de la Peste Equina). Disponible en: <https://oie.int/es>

Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación (Gobierno de España). Lengua Azul. [Internet] Disponible en: <https://www.mapa.gob.es/es/ganaderia/temas/sanidad-animal-higiene-ganadera/sanidad-animal/enfermedades/>

Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación (Gobierno de España). Peste Equina. [Internet] Disponible en: <https://www.mapa.gob.es/es/ganaderia/temas/sanidad-animal-higiene-ganadera/sanidad-animal/enfermedades/>

Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación (Gobierno de España). Página web del Laboratorio Europeo de Referencia para la Peste equina y la Lengua azul (AHS&BT) [Internet] Disponible en: <https://www.mapa.gob.es/es/ganaderia/temas/laboratorios/referencia-union-europea-oie/>

**MATERIAL PARA LA PREPARACIÓN DEL TEMA 69**

**OTRAS ENFERMEDADES DE LOS ÉQUIDOS SUJETAS AL PROGRAMA SANITARIO DE CONTROL OFICIAL O A PROGRAMAS DE VIGILANCIA EPIZOOTIOLÓGICA. MARCO LEGAL. DIAGNÓSTICO DE LABORATORIO.**

*Este material no tiene carácter oficial, por lo que en ningún caso vinculará al Tribunal Calificador. Constituye, únicamente, un instrumento complementario que servirá de apoyo al opositor para enfocar cada uno de los epígrafes, pero nunca de forma exclusiva ni excluyente. El Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación no se hace responsable del contenido del mismo.*

*Los materiales no serán objeto de actualización constante.*

## **ÍNDICE**

- 1. OTRAS ENFERMEDADES DE LOS ÉQUIDOS SUJETAS AL PROGRAMA SANITARIO DE CONTROL OFICIAL O A PROGRAMAS DE VIGILANCIA EPIZOOTIOLÓGICA.**
- 2. MARCO LEGAL.**
- 3. DIAGNÓSTICO DE LABORATORIO.**
  - 3.1. ENFERMEDADES DE ORIGEN VÍRICO.
  - 3.2. ENFERMEDADES DE ORIGEN BACTERIANO.
  - 3.3. ENFERMEDADES DE ORIGEN PROTOZOARIO.

MATERIAL NO OFICIAL

## 1. OTRAS ENFERMEDADES DE LOS ÉQUIDOS SUJETAS AL PROGRAMA SANITARIO DE CONTROL OFICIAL O A PROGRAMAS DE VIGILANCIA EPIZOOTIOLÓGICA.

El Real Decreto 804/2011 (por el que se regula la ordenación zootécnica, sanitaria y de bienestar animal de las explotaciones equinas y se establece el **plan sanitario equino**), en su ANEXO II divide el programa sanitario equino de la siguiente manera:

### A. Enfermedades sujetas a programa sanitario de control oficial.

- Arteritis viral equina.
- Metritis contagiosa equina.
- En estas dos enfermedades el programa sanitario será anual y determinará la calificación sanitaria de los caballos reproductores.

### B. Enfermedades sujetas al programa de vigilancia epizootiológica.

- Peste equina africana.
- Encefalitis del oeste del Nilo.
- Durina (*Trypanosoma equiperdum*).
- Encefalomielitis equina (todas las variedades, incluida la encefalomielitis equina venezolana).
- Anemia infecciosa equina.
- Muermo.
- Gripe equina.
- Piroplasmosis equina.
- Rinoneumonitis equina.
- Surra (*Trypanosoma evansi*).

Las enfermedades de las que se hablará en este tema serán las que no han sido objeto de estudio en otros temas del temario y se dividirán según su origen etiológico de la siguiente manera:

- Origen vírico:
  - Arteritis viral equina
  - Anemia infecciosa equina
  - Rinoneumonitis equina
- Origen bacteriano:
  - Metritis contagiosa equina
  - Muermo
- Origen protozoario:
  - Durina
  - Surra
  - Piroplasmosis

El Laboratorio Nacional de Referencia (LNR) de estas enfermedades es el Laboratorio Central de Veterinaria de Algete, exceptuando la Surra, para la que el LNR es el Laboratorio Central de Sanidad Animal de Sana Fe.

El Laboratorio Europeo de Referencia de enfermedades de équidos, excepto de Peste equina, es el Laboratorio ANSES en Francia y el de Peste equina es el Laboratorio Central de Veterinaria en España. La única enfermedad de la que no hay Laboratorio de Referencia europeo es la Piroplasmosis.

## 2. MARCO LEGAL.

### 2.1. NORMATIVA NACIONAL

- **Real Decreto 526/2014**, de 20 de junio, por el que se establece la lista de las enfermedades de los animales de declaración obligatoria y se regula su notificación.
- **Real Decreto 804/2011**, regula la ordenación zootécnica, sanitaria y de bienestar animal de las explotaciones equinas y se establece el plan sanitario equino.
- **Real Decreto 841/2011**, se establecen las condiciones básicas de recogida, almacenamiento, distribución y comercialización de material genético de las especies bovina, ovina, caprina y porcina, y de los équidos.

En relación con las *exportaciones* a países terceros habrá que tener en cuenta y consultar los requisitos exigidos por el país importador, qué acuerdos sanitarios de exportación (ASES) y qué tipo de certificado es requerido por el país tercero para el producto que se quiere exportar.

### 2.2. NORMATIVA COMUNITARIA

- **Reglamento (UE) 2016/429** del Parlamento Europeo y del Consejo, de 9 de marzo de 2016, relativo a las enfermedades transmisibles de los animales y por el que se modifican o derogan algunos actos en materia de sanidad animal («Legislación sobre sanidad animal»).
- **Reglamento de Ejecución (UE) 2018/1882** de la Comisión, de 3 de diciembre de 2018 relativo a la aplicación de determinadas normas de prevención y control a categorías de enfermedades enumeradas en la lista y por el que se establece una lista de especies y grupos de especies que suponen un riesgo considerable para la propagación de dicha enfermedad de la lista.
- **Reglamento Delegado (UE) 2020/687** de la Comisión, de 17 de diciembre de 2019, por el que se completa el Reglamento (UE) 2016/429 del Parlamento Europeo y del Consejo en lo referente a las normas relativas a la prevención y el control de determinadas enfermedades de la lista.
- **Reglamento Delegado (UE) 2020/688** de la Comisión, de 17 de diciembre de 2019, por el que se completa el Reglamento (UE) 2016/429 del Parlamento Europeo y del Consejo en lo referente a los requisitos zoonosanitarios para los desplazamientos dentro de la Unión de animales terrestres y de huevos para incubar.
- **Reglamento Delegado (UE) 2020/689** de la Comisión, de 17 de diciembre de 2019, por el que se completa el Reglamento (UE) 2016/429 del Parlamento Europeo y del Consejo en lo referente a las normas de vigilancia, los programas de erradicación y el estatus de libre

de enfermedad con respecto a determinadas enfermedades de la lista y enfermedades emergentes.

- **Reglamento Delegado UE) 2020/692** de la Comisión, de 30 de enero de 2020, que contempla el Reglamento (UE) 2016/429 del Parlamento Europeo y del Consejo en lo referente a las normas para la entrada en la Unión, y para el desplazamiento y la manipulación tras la entrada, de las partidas de determinados animales, productos reproductivos y productos de origen animal.
- **Reglamento de Ejecución (UE) 2020/2002** de la Comisión, de 7 de diciembre de 2020, por el que se establecen normas de desarrollo del Reglamento (UE) 2016/429 del Parlamento Europeo y del Consejo relativas a la notificación a la Unión y al envío de informes a la Unión sobre enfermedades de la lista, al sistema informático de información, así como a los formatos y los procedimientos de presentación y envío de informes relacionados con los programas de vigilancia y erradicación de la Unión y con la solicitud de reconocimiento del estatus de libre de enfermedad.
- **Decisión de ejecución (UE) 2018/1143** de la Comisión, de 10 de agosto de 2018, por la que se modifican las Decisiones 92/260/CEE y 93/197/CEE en lo relativo a las pruebas de detección de arteritis viral equina.

### 3. DIAGNÓSTICO DE LABORATORIO.

De cada enfermedad se hará una breve introducción y a continuación se describirá su diagnóstico de laboratorio.

#### 3.1 ENFERMEDADES DE ORIGEN VÍRICO

##### 3.1.1. Arteritis viral equina (AVE):

Se ha categorizado en la lista como D+E.

- *Etiología:*

Causada por el virus ARN monocatenario y con polaridad de mensajero, del género Arterivirus, de la familia Arteriviridae. Hasta ahora solo se ha aislado un serotipo principal del virus.

- *Epidemiología y transmisión:*

El espectro natural de hospedadores de la AVE parece restringido a los équidos, aunque existe alguna evidencia de que también puede incluir los camélidos americanos, como las alpacas y las llamas. Este virus no constituye un riesgo sanitario para los humanos.

La transmisión del AVE puede tener lugar por vía respiratoria, venérea o congénita. La transmisión por vía respiratoria es más importante durante la fase aguda de la infección. Un porcentaje variable de sementales que resultan infectados de forma aguda más adelante se convierten en portadores crónicos en el tracto reproductor y excretan el virus con el semen en cada eyaculación. El estado de portador, que se ha observado que depende de los

andrógenos, se ha hallado en el semental, pero no en la yegua, el caballo castrado ni el potro sexualmente inmaduro.

A nivel nacional hay establecido un programa para el control de la AVE en el que los sementales y yeguas reproductoras se someten a un control analítico con toma de muestras con carácter, al menos, anual para determinar su calificación sanitaria. La calificación sanitaria determina las cubriciones permitidas o permitidas bajo ciertas condiciones. El programa incluye también un protocolo de vacunación.

● Síntomas y lesiones:

Los síntomas son fiebre, depresión, anorexia, edema distal, especialmente en las patas, escroto y prepucio de los sementales, conjuntivitis, secreción oculares, edema supra y periorbital, rinitis, secreción nasal, reacción cutánea local o generalizada de tipo urticario, un periodo de subfertilidad temporal en sementales afectados de forma aguda, aborto, mortinatos y, raramente, neumonía, enteritis o neumo-enteritis fulminante en potros jóvenes. Independientemente de la gravedad de los signos clínicos, los caballos afectados casi siempre se recuperan por completo. La mortalidad solo se presenta en potros muy jóvenes, sobre todo en aquellos con infección congénita del virus.

Las lesiones son vasculares, dando lugar a edema, congestión y hemorragias.

● Profilaxis:

Hay dos vacunas disponibles comercialmente y ambas derivan de cultivos celulares. La primera es una vacuna con virus vivo modificado (MLV) y la segunda, una vacuna adyuvantada inactivada. El objetivo de la vacunación es la prevención de botes de AVE, incluido el aborto en yeguas gestantes y el establecimiento del estado de portador en el semental.

● Diagnóstico de laboratorio:

1. Diagnóstico virológico (Identificación del agente):

a) **Aislamiento del virus en cultivo celular a partir de semen**, sangre, hisopo nasofaríngeo y conjuntival.

b) Técnicas moleculares por **RT-PCR en tiempo real** a partir de las mismas muestras utilizadas para el aislamiento del virus.

2. Diagnóstico serológico: A partir de muestras de suero

a) **Seroneutralización**. Técnica recomendada.

b) **ELISA**.

### 3.1.2. Anemia infecciosa equina (AIE):

Se ha categorizado en la lista como D+E.

#### ● Etiología:

Causada por un virus RNA con envuelta, perteneciente al género *Lentivirus*, familia *Retroviridae*.

#### ● Epidemiología y transmisión:

La AIE está distribuida por todo el mundo. La infección, conocida al principio como fiebre de los pantanos, se limita a los équidos. El último brote en España se produjo en el año 2017 en Ávila.

El virus se transmite principalmente por la sangre. En la naturaleza, las moscas picadoras son vectores mecánicos del virus, pero la infección a menudo se propaga de forma iatrogénica. Los caballos infectados seguirán siendo portadores del virus de por vida.

No se considera un riesgo para la salud humana.

#### ● Síntomas y lesiones:

El período de incubación es de entre 1 y 3 semanas, pero puede prolongarse hasta 3 meses. La enfermedad se caracteriza por episodios febriles recurrentes, trombocitopenia, anemia, pérdida de peso y edema de las partes bajas del cuerpo; si no se produce la muerte en el curso de los ataques clínicos agudos, se produce una fase crónica y la enfermedad tiende a convertirse en latente.

Las lesiones se caracterizan por una hipertrofia e hiperemia de ganglios linfáticos, bazo e hígado.

#### ● Diagnóstico de laboratorio:

##### 1. Diagnóstico virológico (Identificación del agente):

a) **Aislamiento del virus en cultivo de leucocitos** preparados a partir de caballos sanos, a los que se les inocula muestras de sangre de caballos sospechosos.

b) Técnicas moleculares por **RT-PCR**.

2. El Diagnóstico serológico es importante porque la detección serológica de anticuerpos frente al virus de la AIE sirve para confirmar el diagnóstico de la infección por dicho virus. Se realiza a partir de muestras de suero.

a) **Prueba de inmunodifusión en gel de agar (AGID o test de Coggins)**. Es la técnica de confirmación y recomendada por la OIE.

b) **ELISA**.

### 3.1.3. Rinoneumonitis equina (HVE-1, HVE-4):

A nivel nacional es una EDO y está dentro del listado de enfermedades de la OIE, pero no está listada dentro del Reglamento de Ejecución (UE) 2018/1882.

#### ● *Etiología:*

Producida por herpesvirus que pertenecen al género Varicellovirus, dentro de la familia herpesviridae. Es un virus DNA bicatenario. La Rinoneumonitis equina engloba los herpesvirus equinos 1 y 4 (HVE-1 y HVE-4). La infección por el HVE-1 forma parte de la lista de enfermedades de la OIE.

#### ● *Epidemiología y transmisión:*

Los subtipos HVE-1 y HVE-4 son endémicos en poblaciones equinas de todo el mundo. El último brote en España ocurrió en febrero de 2021 originado por el subtipo HVE-1.

Es una enfermedad vírica muy contagiosa. El herpesvirus se transmite a través del aire mediante la inhalación de partículas virales excretadas por las vías respiratorias de los caballos infectados. En las yeguas, el contagio también se puede producir a partir de las placentas o de los fetos infectados. Los caballos pueden quedar como portadores de por vida y transmitir la enfermedad en situaciones de estrés, entre otras.

#### ● *Síntomas y lesiones:*

La infección primaria por el HVE-1 o por el HVE-4 se caracteriza por producir una enfermedad primaria de las vías respiratorias altas, de gravedad variable, que depende de la edad y el estado inmunitario del animal infectado. El HVE-1 también causa complicaciones más graves, como abortos, nacidos muertos en el periodo perinatal, o enfermedades neurológicas parálíticas (mieloencefalopatía por herpesvirus equino). El HEV-4 se ha asociado a casos esporádicos de abortos. Como ocurre con otros herpesvirus, tanto el HVE-1 como el HVE-4 inducen infecciones latentes crónicas y pueden reactivarse en caso de estrés o de gestación. Es probable que la mayoría de los caballos resulten reinfectados varias veces a lo largo de su vida, a menudo de forma leve o subclínica.

El EHV-1 es la causa diagnosticada más frecuente de aborto infeccioso en las yeguas. Una infección previa puede hacer que la yegua quede como portadora del virus, de manera que pueden producirse abortos sin que la yegua presente ningún signo clínico. Los abortos suelen producirse entre el 7º y 11º mes de gestación, afectando a varias hembras del grupo. La enfermedad neurológica causada por el EHV-1 se produce con relativa poca frecuencia. Los animales infectados pueden sufrir parálisis, colapso y tener muy mal pronóstico.

#### ● *Profilaxis:*

Un buen manejo e higiene son factores fundamentales para el control de esta enfermedad. Evitar o reducir las situaciones estresantes para evitar la reactivación de infecciones latentes que favorezcan la diseminación de esta enfermedad, así como reducir el hacinamiento resultarán también de ayuda. Los caballos enfermos, las yeguas que acaben de abortar y los

animales que hayan estado en contacto con ellos, deben ser aislados con el fin de limitar el contagio.

Además, la vacunación preventiva tiene un papel importante.

- *Diagnóstico de laboratorio:*

1. Diagnóstico virológico (Identificación del agente):

a) **Aislamiento del virus en cultivo celular** a partir de la serie blanca de muestras de sangre, hisopo nasofaríngeo y tejidos (placenta y órganos fetales).

b) **Técnicas moleculares por PCR. Es la técnica de confirmación a partir de hisopo nasofaríngeo** que es la muestra de elección.

2. Diagnóstico serológico:

a) **Seroneutralización** de muestras pareadas de suero para estudiar seroconversión.

### **3.2. ENFERMEDADES DE ORIGEN BACTERIANO:**

#### **3.2.1. Metritis contagiosa equina:**

Se ha categorizado en la lista como D+E.

- *Etiología:*

La metritis contagiosa equina (MCE) es una enfermedad bacteriana contagiosa causada por el agente *Taylorella equigenitalis*. *Taylorella equigenitalis* es una bacteria gran negativa, muy sensible a las condiciones ambientales y a los desinfectantes habituales, y difícil de cultivar, lo que complica su aislamiento para diagnosticarla.

- *Epidemiología y transmisión:*

Se describió por primera vez en el Reino Unido (RU) en 1977, y después se diagnosticó en varios países de todo el mundo.

El estado de portador desempeña un papel importante en la diseminación de la bacteria. Las membranas urogenitales del semental se contaminan durante el coito o por contacto con los fómites que se utilicen para la obtención del esperma, y el estado de portador puede persistir durante muchos meses o años.

A nivel nacional hay establecido un programa para el control de metritis en el que los sementales y yeguas reproductoras se someten a un control analítico con toma de muestras a determinados tiempos con antelación a la cubrición para determinar su calificación sanitaria.

Solamente los caballos reproductores con una calificación sanitaria de MCE2 podrán ser utilizados con fines reproductivos. La monta o la cubrición de un caballo reproductor sujeto al programa por un caballo no sujeto al programa implicará la necesidad del primero de repetir los controles analíticos para volver a obtener una calificación sanitaria.

- Síntomas y lesiones:

Se produce una secreción vaginal mucopurulenta causada por una inflamación del endometrio y el cuello del útero que provoca una infertilidad temporal.

- Profilaxis:

El control de la infección se ha basado únicamente en la prevención de la transmisión.

No se dispone de una vacuna eficaz.

- Diagnóstico de laboratorio:

1. Diagnóstico bacteriológico (identificación del agente):

a) **Aislamiento** a partir de hisopos genitales, que deben llevar medio de transporte. Las placas de medio de cultivo con las muestras sembradas se incubarán hasta al menos 7 días para dar un cultivo como negativo

b) **Técnicas moleculares por PCR** a partir directamente de hisopos genitales o a partir de cultivo aislado.

2. Diagnóstico serológico:

No es efectivo en esta enfermedad.

### 3.2.2. Muermo:

Se ha categorizado en la lista como A+D+E.

- Etiología:

Enfermedad contagiosa fatal de los caballos, burros y mulas con potencial zoonótico.

Causada por la *Burkholderia mallei*, bacteria aeróbica, bacilo Gram negativo, no esporulado y no encapsulado e inmóvil. Este microorganismo ha sido conocido durante mucho tiempo como “*Pseudomonas mallei*”, y está estrechamente emparentado con el agente de la meloidosis, *Burkholderia pseudomallei*. El microorganismo no es muy resistente y se le puede destruir con la mayoría de los desinfectantes, muere en pocas semanas en las secreciones y excreciones; sobrevive durante 20 días en el agua y puede llegar a persistir hasta 6 semanas en los establos.

- Epidemiología y transmisión:

Afecta principalmente a la familia equidae. Los burros, aunque menos susceptibles a la enfermedad que los caballos, desarrollan una forma muy aguda de muermo cuando adquieren la infección. En los caballos es más común la forma crónica, mientras que las mulas ocupan una posición intermedia. El período de incubación es usualmente largo, variando de 2 días en burros, a algunas semanas o meses en caballos, con un promedio de 2 meses.

El muermo ha sido conocido durante siglos. La afección estuvo distribuida por todo el mundo, pero ha sido erradicada de muchos países incluyendo a Estados Unidos, Canadá y Europa. Aún persiste en partes de África, Asia y Sudamérica. España es libre de esta enfermedad.

La enfermedad se adquiere usualmente a través de ingestión de alimento y agua contaminada con secreciones y excreciones de los animales infectados. Los bebederos y comederos comunes son particularmente peligrosos en la diseminación de la infección. Los portadores, sobre todo los inaparentes son particularmente importantes en la diseminación de la misma y son más peligrosos epidemiológicamente que los animales con signos clínicos típicos de muermo.

- *Síntomas y lesiones:*

Se caracteriza por nódulos, abscesos y úlceras en vías respiratorias y piel.

*Profilaxis:* No hay vacunas disponibles.

- *Diagnóstico de laboratorio:*

1. Diagnóstico bacteriológico (identificación del agente):

- a) **Estudio de la morfología de la *Burkholderia mallei*:** Frotis de lesiones frescas pueden revelar la presencia de la bacteria mediante tinciones con azul de metileno y tinción de Gram. Son bacilos Gram negativos, no esporulados e inmóviles.

- b) **Aislamiento en medios de cultivo:** Crece lentamente, pero bien en medios de cultivo a 37°C en aerobiosis. El enriquecimiento del medio con glicerol favorece el crecimiento.

- c) **Pruebas bioquímicas para identificación** de la bacteria (reducción de nitratos, uso de arginina, asimilación de glucosa).

- c) **Técnicas moleculares por PCR** en tiempo real para identificación del agente.

2. Diagnóstico serológico:

- a) **Fijación del Complemento** (prescrita por OIE para comercio internacional).

- b) **ELISA.**

### **3.3. ENFERMEDADES DE ORIGEN PROTOZOARIO:**

#### **3.3.1. Durina:**

Se ha categorizado en la lista como D+E.

- *Etiología:*

La durina es una enfermedad contagiosa, aguda o crónica, de los solípedos de cría que se transmite directamente de un animal a otro durante el coito. El organismo causante es *Trypanosoma equiperdum*.

● *Epidemiología y transmisión:*

La durina es la única tripanosomiasis que no se transmite por medio de un vector invertebrado. Trypanosoma equiperdum se distingue de otros tripanosomas en que es fundamentalmente un parásito tisular que rara vez se detecta en sangre. No se conoce la existencia de ningún otro reservorio natural del parásito además de los équidos infectados. La enfermedad está presente en un número limitado de países en Europa, América del Sur, África y Asia. España es libre de esta enfermedad.

La infección se transmite durante la cópula, más frecuentemente del semental a la yegua, aunque también de la yegua al semental. El período de incubación, gravedad y duración de la enfermedad varía considerablemente: la forma crónica, generalmente leve, puede durar varios años; la forma aguda, puede durar 1-2 meses o excepcionalmente 1 semana. Aunque la durina es una enfermedad fatal con una media de mortalidad del 50% (especialmente en los sementales), puede producirse la recuperación espontánea. Se reconoce la existencia de infecciones subclínicas, siendo los burros y los mulos más resistentes que los caballos.

● *Síntomas y lesiones:*

Los síntomas que se detectan con mayor frecuencia son: pirexia, tumefacción y edema local de los genitales y las glándulas mamarias, erupciones edematosas cutáneas, crujido de las articulaciones, falta de coordinación, parálisis facial, lesiones oculares, anemia y demacración. Un signo patognomónico es la placa edematosa, que consiste en una lesión elevada sobre la piel de 5-8 cm. de diámetro y 1 cm. de grosor. Normalmente las placas aparecen en las costillas, aunque pueden presentarse en cualquier parte del cuerpo, y generalmente, persisten durante 3 a 7 días.

Las lesiones que aparecen son: En el semental se encuentran engrosados e infiltrados el escroto, prepucio y cubierta testicular; y en la yegua la vulva, mucosa vaginal, útero, vejiga y glándulas mamarias pueden estar engrosadas con una infiltración gelatinosa. Los nódulos linfáticos se encuentran hipertrofiados y reblandecidos.

● *Profilaxis:*

No existen vacunas disponibles.

● *Diagnóstico de laboratorio:*

El diagnóstico se basa principalmente en los **signos clínicos y la evidencia serológica**.

1. Diagnóstico serológico:

a) **Fijación del Complemento** (prescrita por OIE para comercio internacional). Se emplea para confirmar la evidencia clínica y para detectar infecciones latentes.

b) **Inmunofluorescencia indirecta** puede utilizarse para confirmar la infección o para resolver resultados no concluyentes de la prueba de FC.

c) **ELISA**.

### 3.3.2. Surra:

Se ha categorizado en la lista como D+E.

- *Etiología:*

Enfermedad causada por *Trypanosoma evansi* (subgénero *Trypanozoon*).

- *Epidemiología y transmisión:*

Afecta a un gran número de especies animales salvajes y domésticas de África, Asia, Centroamérica y Sudamérica. La especie hospedadora principal varía según el área geográfica, pero en particular el camello, el caballo, el búfalo y el ganado bovino, resultan ser los más afectados, aunque también hay otros animales susceptibles, incluidos los perros, los gatos y especies salvajes.

Es una enfermedad transmitida por artrópodos; varias especies de moscas hematófagas, como las de la familia Tabanidae o Stomoxidae, intervienen en la transmisión de la infección entre hospedadores, actuando como vectores mecánicos. En Brasil, los vampiros también intervienen y constituyen un tipo peculiar de transmisión biológica. En los carnívoros, la principal vía de transmisión es la oral.

- *Síntomas y lesiones:*

Los síntomas que aparecen son pirexia, directamente asociada a la parasitemia, junto con una anemia progresiva, una pérdida de la condición corporal y lasitud, que no son lo suficientemente patognomónicos como para establecer el diagnóstico. Se han descrito abortos en los búfalos de agua y los camellos. En los caballos y los perros son frecuentes los signos nerviosos. Esta enfermedad causa inmunodeficiencias que podrían tener un gran impacto si interfieren con otras enfermedades o campañas de vacunación (como la fiebre aftosa o la septicemia hemorrágica).

- *Profilaxis:*

No hay disponibles vacunas.

- *Diagnóstico de laboratorio:*

Se sigue trabajando en mejorar las técnicas de diagnóstico porque las existentes varían en sensibilidad y especificidad:

1. Detección del agente:

- a) **Examen microscopio:** tinción de frotis de sangre, examen de gotas gruesas. Los métodos parasitológicos directos clásicos no son muy sensibles.

- b) **Técnicas moleculares** para diferenciación de especies de *Trypanosomas*.

2. Diagnóstico serológico:

- a) **Inmunofluorescencia indirecta** es útil para estudios a pequeña escala.

b) Los métodos de elección son el **ELISA y prueba de la aglutinación en tarjeta (CATT)** porque son técnicas fáciles de estandarizar.

Cuando es necesaria una confirmación definitiva de la ausencia de infección (por ejemplo, para la importación a zonas libres de la enfermedad), se requieren pruebas seriadas, que incluyan un ELISA de detección de anticuerpos y un método sensible de detección del agente patógeno, como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

### **3.3.3. Piroplasmosis:**

Está dentro de la lista de enfermedades de la OIE.

#### **• Etiología:**

Enfermedad producida por protozoos y transmitida por garrapatas. Los agentes etiológicos son los hemoparásitos *Theileria equi* y *Babesia caballi*.

#### **• Epidemiología y transmisión:**

Enfermedad de los caballos, las mulas, los asnos y las cebras. Los animales infectados pueden permanecer como portadores de estos parásitos sanguíneos durante por largos períodos de tiempo y actuar como fuentes de la infección para las garrapatas que actúan como vectores.

Estos parásitos se presentan en el sur de Europa, Asia, países de la Unión de Estados Independientes (Commonwealth), África, Cuba, Sudamérica y América Central, y ciertas partes del sur de los Estados Unidos de América. *Theileria equi* se ha descrito también en Australia (aunque nunca se ha establecido allí) y se cree que tiene una distribución general más amplia que *B. caballi*.

#### **• Síntomas y lesiones:**

Los signos clínicos suelen ser inespecíficos, y la enfermedad puede confundirse fácilmente con otros trastornos. La piroplasmosis se puede presentar en las formas hiperaguda, aguda o crónica. Los casos agudos son los más comunes, y se caracterizan por fiebre, que suele superar los 40°C, disminución del apetito y malestar, aumento de las frecuencias cardíaca y respiratoria, congestión de las mucosas, y deposiciones fecales más pequeñas y secas de lo normal.

#### **• Profilaxis:**

No hay disponibles vacunas.

#### **• Diagnóstico de laboratorio:**

Resulta muy difícil diagnosticar la presencia de los microorganismos en animales portadores mediante un examen microscópico de los frotis de sangre. Además, este sistema no es práctico a gran escala. Por consiguiente, **se recomienda el análisis serológico** de los animales como el método preferido de diagnóstico, en especial cuando los caballos se destinan a la importación a países donde no se presenta la enfermedad, pero en los que está presente el vector.

Los sueros se deben recoger y enviar a los laboratorios de diagnóstico siguiendo las especificaciones de dichos laboratorios. Los caballos para la exportación que hayan sido sometidos a pruebas serológicas y que se demuestre que están libres de la infección deben ser mantenidos libres de garrapatas para evitar infecciones accidentales.

1. Diagnóstico serológico:

a) **Inmunofluorescencia indirecta (IFA):** Se ha aplicado con éxito al diagnóstico diferencial de infecciones por T. equi y B. caballi.

b) **ELISA de competición.**

Las dos técnicas anteriores han ido desplazando a la técnica de Fijación del complemento.

Para finalizar destacar que toda la información expuesta en el tema es importante para todas las actividades comerciales relacionadas con los équidos.

MATERIAL NO OFICIAL

## **BIBLIOGRAFÍA**

Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. Enfermedades de los animales.

<https://www.mapa.gob.es/es/ganaderia/temas/sanidad-animal-higiene-ganadera/sanidad-animal/enfermedades/>

Organización Mundial de Sanidad Animal. Manual de las Pruebas de Diagnóstico y de las Vacunas para los Animales Terrestres 2021.

<https://www.oie.int/es/que-hacemos/normas/codigos-y-manuales/acceso-en-linea-al-manual-terrestre/>

MATERIAL NO OFICIAL

**MATERIAL PARA LA PREPARACIÓN DEL TEMA 70**

**ENFERMEDAD HEMORRÁGICA DEL CONEJO Y MIXOMATOSIS. MARCO LEGAL. VIGILANCIA. DIAGNÓSTICO DE LABORATORIO**

*Este material no tiene carácter oficial, por lo que en ningún caso vinculará al Tribunal Calificador. Constituye, únicamente, un instrumento complementario que servirá de apoyo al opositor para enfocar cada uno de los epígrafes, pero nunca de forma exclusiva ni excluyente. El Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación no se hace responsable del contenido del mismo.*

*Los materiales no serán objeto de actualización constante.*

## **ÍNDICE**

### **1. ENFERMEDAD HEMORRÁGICA DEL CONEJO Y MIXOMATOSIS. MARCO LEGAL. VIGILANCIA. DIAGNÓSTICO DE LABORATORIO.**

#### **1.1 ENFERMEDAD HEMORRÁGICA DEL CONEJO**

1.1.1 Introducción y características

1.1.2 Epidemiología y transmisión

1.1.3 Sintomatología y lesiones

#### **1.2. MIXOMATOSIS.**

1.2.1 Introducción y características

1.2.2 Epidemiología y transmisión

1.2.3 Sintomatología y lesiones

### **2. MARCO LEGAL**

### **3. PROGRAMA COORDINADO DE LUCHA, CONTROL Y ERRADICACIÓN EHC.**

### **4. DIAGNÓSTICO DE LABORATORIO EHC.**

4.1 DIAGNÓSTICO ETIOLÓGICO

4.2 DIAGNÓSTICO SEROLÓGICO

### **5. DIAGNÓSTICO DE LABORATORIO MIXOMATOSIS.**

5.1 DIAGNÓSTICO ETIOLÓGICO

5.2 DIAGNÓSTICO SEROLÓGICO

## 1. ENFERMEDAD HEMORRÁGICA DEL CONEJO Y MIXOMATOSIS. MARCO LEGAL. VIGILANCIA. DIAGNÓSTICO DE LABORATORIO.

La Enfermedad hemorrágica del Conejo (EHC) y la Mixomatosis son las enfermedades virales de mayor importancia que afectan al conejo europeo. Debido a su alta patogenicidad y gran poder de difusión, forman parte de la Lista de Enfermedades de Declaración Obligatoria de la OIE y además, son de notificación obligatoria en España tal y como refleja el Real Decreto 526/2014, por el que se establece la lista de las enfermedades de los animales de declaración obligatoria y se regula su notificación.

### 1.1. ENFERMEDAD HEMORRÁGICA DEL CONEJO

#### 1.1.1 Introducción y características

La **enfermedad hemorrágica del conejo** (EHC) una hepatitis aguda, fatal y muy contagiosa del conejo europeo (*Oryctolagus cuniculus*), causada por un calicivirus (género *Lagovirus*, Familia *Caliciviridae*). Es un virus ARN redondo y pequeño sin envoltura con una sola proteína principal en la cápsida (VP60). El género *Lagovirus* también incluye el virus **del síndrome de la liebre parda europea** (VSLPE), el agente causal de una enfermedad de la liebre parda (*Lepus europaeus*) denominada SLPE. A pesar de la estrecha relación genética (un 70% de similitud entre nucleótidos de las VP60), el VEHC y el VSLPE son dos especies víricas bien diferenciadas.

Hasta 2010, todos los virus de la EHC (VEHC) aislados pertenecían a uno de los seis genotipos identificados anteriormente (G1-G6), entre los cuales, el G6 es un subtipo antigénico (VEHCa). En 2010, emergió en Europa otro VEHC, filogenéticamente y antigénicamente distinto del VEHC y se denominó VEHC2.

#### 1.1.2 Epidemiología y transmisión:

La enfermedad hemorrágica del conejo (RHD o EHC) se detectó en España por vez primera a finales de los años 80 del siglo pasado.

Este proceso infeccioso, pudo controlarse en las explotaciones cunícolas españolas gracias al desarrollo de vacunas inactivadas que mostraron ser muy eficaces para prevenir y combatir los brotes de EHC.

La eficacia de las vacunas y la poca variabilidad antigénica de los virus circulantes permitieron que esta enfermedad tuviese un impacto reducido y controlado en los últimos 20 años.

En 2011 empezaron a detectarse algunos casos “atípicos” de enfermedad hemorrágica (RHD) en granjas de Navarra, Aragón y Cataluña así como en una población experimental de conejos silvestres en Aragón.

En muchas de las granjas afectadas **se realizaba una correcta vacunación** y se observó que **los mayores índices de mortalidad se producían en los gazapos menores de 50 días**, un rango de edad en el que los conejos no son susceptibles al RHDV conocido hasta entonces.

Durante **2012 y 2013** esta nueva variante del virus (que había sido detectada en años anteriores en otros países europeos) se detectó en varias Comunidades Autónomas.

La EHC se caracteriza por una alta morbilidad y una mortalidad de hasta un 90%. La infección puede producirse por vía oral. La transmisión sigue al contacto con conejos infectados o se produce por contacto indirecto con vectores mecánicos (como insectos, aves o humanos) o utensilios y equipo contaminados.

### **1.1.3 Sintomatología y lesiones**

Los principales signos clínicos de la infección aguda son signos nerviosos y respiratorios, apatía y anorexia. En conejos de menos de 4–6 semanas de edad, la infección por el VEHC es subclínica, pero cuando el agente causal es el VEHC2, se observan signos clínicos y mortalidad incluso en animales jóvenes, de 7 a 15 días de edad en adelante.

La aparición de VEHC2 ha modificado drásticamente la situación epidemiológica mundial de la EHC, principalmente porque es un serotipo distinto del VEHC y puede causar enfermedad en conejos jóvenes y liebres.

Las lesiones primarias halladas en conejos muertos consistirán en necrosis del hígado y esplenomegalia. Sin embargo, una coagulopatía masiva es normalmente la causa de hemorragias en diversos órganos y de muerte súbita.

El VEHC nunca se ha descrito en humanos ni en otros mamíferos.

#### **Diferencias entre el virus clásico y la nueva variante (VEHC2)**

- Mayor susceptibilidad de los animales jóvenes (1º gazapos menores de 50 días).
- Los animales adultos también son susceptibles pero con menor mortalidad.
- El **Periodo de Incubación del virus clásico** oscila entre 1 y 3 días y los animales mueren entre 12-36h después de aparición de los síntomas.
- El **Periodo de Incubación de la nueva variante** más largo, 3-5 días y se observa una evolución a crónica o subclínica, dificultando la erradicación.
- Transmisión en ambas cepas: oronasal, contacto directo con las secreciones de otros animales, a través de fómites y de reservorios animales.

## **1.2. MIXOMATOSIS**

### **1.2.1. Introducción y características**

La mixomatosis es una enfermedad vírica importante de los conejos causada por un poxvirus denominado virus mixoma. Afecta a los lagomorfos, es decir conejos y liebres. El conejo americano (*Sylvilagus brasiliensis*) está considerado como el reservorio natural del virus. En

esta especie, la infección cursa generalmente de forma asintomática, mientras que el conejo europeo (*Oryctolagus cuniculus*), tanto doméstico como silvestre, produce la mixomatosis.

No afecta al hombre (no es una zoonosis) y tampoco se ha detectado en otras especies, siendo muy improbable que pueda afectar a perros, zorros y hurones.

Es un virus ADN de doble cadena no segmentado y de gran tamaño con envuelta y perteneciente a la Familia Poxviridae, género *leporipoxvirus*.

Causa una enfermedad muy leve en su huésped original oriundo de Sudamérica, pero en algunas especies de conejos y liebres, en especial los conejos europeos (*Oryctolagus cuniculus*), causa una enfermedad grave con alta mortalidad.

### 1.2.2. Epidemiología y transmisión:

Actualmente, el VMIX tiene una distribución amplia, es endémico en poblaciones de conejo salvaje y también en conejos de producción, de laboratorio o criados como mascota, y en ocasiones en otros lagomorfos. Hasta ahora, la mixomatosis sigue siendo la principal amenaza infecciosa para la cunicultura.

España está considerada como país endémico de mixomatosis en conejo, silvestre y doméstico, rara vez se había descrito en la liebre. Sólo existía constancia de la detección de material genético del virus por PCR en Gran Bretaña en 2014 en liebre europea (*Lepus europaeus*), pero hasta verano de 2018 nunca se había detectado en liebre ibérica (*Lepus granatensis*).

A mediados de julio de 2018, dentro del programa de vigilancia en fauna silvestre, se notificación de mortalidades anormales en **liebres ibéricas** (*Lepus granatensis*) en distintos cotos de caza, hallándose ejemplares en el campo en un estado moribundo, con signos de ceguera, debilidad y desorientación.

La enfermedad se diseminó por el territorio español, confirmándose en el Laboratorio Central de Veterinaria (LCV) de Algete. La enfermedad cursó con elevadas tasas de mortalidad en muchos de los cotos afectados. En la actualidad siguen confirmándose casos.

Desde el MAPA se ha promovido la puesta en marcha desde septiembre de 2018 de un proyecto de colaboración (**Mixolepus**) en el que participan distintos agentes, tanto públicos (IRTA-CReSA, Universidades de Oviedo y Córdoba, IRIAF y Algete) como privados (LABIANA, Fundación Artemisan), con el apoyo del MAPA y de las CCAA afectadas, con los objetivos de conseguir la secuenciación completa de la nueva cepa de virus causante de la epizootia en liebre ibérica, realizar estudios de patogenicidad del virus a través de inoculaciones in vivo, realizar encuestas epidemiológicas en los cotos afectados, así como estudiar la posible eficacia de las vacunas actualmente disponibles frente a la nueva cepa, tanto en liebres como en conejo.

La transmisión de la enfermedad incluye la vía directa, a través del contacto entre animales enfermos y susceptibles, y la vía indirecta por medio de artrópodos hematófagos (pulgas y mosquitos) que actúan como vectores.

### 1.1.3. Sintomatología y lesiones

El curso clínico de la mixomatosis oscila entre cinco días y tres semanas desde la aparición de los síntomas.

Se han identificado dos formas de presentación de la enfermedad:

- **Clásica** (aguda, subaguda y crónica) produce nódulos cutáneos, inflamación alrededor de ojos y genitales. Puede haber una inmunosupresión grave que permita la aparición de enfermedades bacterianas secundarias, por lo que son comunes los signos de neumonía.
- **Amixomatosa o atípica:** respiratoria sin lesiones cutáneas.

Los signos clínicos de la mixomatosis clásica están bastante bien definidos, aunque las infecciones bacterianas de las vías respiratorias altas y la conjuntivitis/queratoconjuntivitis bacteriana pueden causar confusión y errores en el diagnóstico. El virus del fibroma del conejo (VFC, anteriormente denominado virus del fibroma de Shope) causa una lesión local fibromatosa simple que debe diferenciarse del VMIX.

## 2. MARCO LEGAL

- La **Ley 8/2003**, de sanidad animal.

Según la OIE y el RD 526/2014 la EHC y la mixomatosis son Enfermedades de declaración obligatoria de la OIE y de notificación obligatoria en España, siendo obligatorio comunicar a la autoridad competente en cada CCAA las sospechas clínicas que se hayan podido detectar.

- **El RD 1547/2004** establece las normas básicas por las que se regula la aplicación de medidas de ordenación zootécnica y sanitaria de las explotaciones cunícolas, incluidas las condiciones mínimas de ubicación, registro, infraestructura zootécnica, sanitaria y de equipamientos que permitan un eficaz y correcto desarrollo de la actividad ganadera en el sector cunícola dentro del territorio nacional, conforme a la normativa vigente en materia de higiene, sanidad animal, identificación y registro, bienestar de los animales y medio ambiente. El anexo II del RD 1547/2004 establece la calificación sanitaria de las explotaciones respecto a mixomatosis y/o enfermedad hemorrágica del conejo, el mantenimiento y la recuperación de la misma, así como el movimiento de animales permitido para cada categoría

Se clasifican en función de su estado sanitario:

**X1/H1:** Explotación sin calificación (en el último año se han presentado evidencias clínicas de la enfermedad o no están sometidas a un programa de control vacunal)

**X2/H2:** Explotación indemnes (en el último año no se han presentado evidencias clínicas de la enfermedad y se lleva a cabo el programa de control vacunal aprobado por la autoridad competente)

**X3/H3:** Explotación oficialmente indemnes (en el último año no se han presentado evidencias clínicas de la enfermedad y no se ha vacunado a ninguno de los animales en los últimos 12

meses) y pruebas de control sobre la población de reproductoras para detectar la enfermedad con una prevalencia del 2% y un nivel de confianza del 98%.

**Explotaciones de producción:** Ausencia de signos clínicos, no vacunados y se abastecen de animales de explotaciones H3.

### 3. PLAN NACIONAL DE VIGILANCIA DE LA EHC

En octubre de **2013** se puso en marcha el **Plan Nacional de Vigilancia de la EHC** con el fin de conocer la situación epidemiológica respecto a dicha enfermedad, más en concreto sobre la nueva variante, y verificar la hipótesis de que la vacuna comercializada hasta la fecha no proporcionaba inmunidad protectora frente a la nueva variante.

Efectivamente, los resultados obtenidos de dicho programa en 2013 avalaron que la nueva variante de la enfermedad afectaba a explotaciones de todo el país produciendo mortalidades y graves pérdidas económicas en aquellas explotaciones afectadas, y que la vacuna comercializada no produce inmunidad protectora frente a esta variante.

Dicho programa se mantuvo en 2014 y 2015 con el objetivo de establecer un sistema de detección de enfermedades víricas de declaración obligatoria que pueden afectar a las poblaciones cunícolas. Dado que estas enfermedades suelen cursar con elevadas mortalidades en el caso de la EHC o con un cuadro clínico muy característico en el caso de la mixomatosis, la vigilancia estará orientada a la detección de sintomatología clínica compatible y posterior confirmación laboratorial.

El plan de vigilancia específica cuenta con dos componentes:

- **Vigilancia pasiva:** de manera continua a lo largo de todo el año.
- **Vigilancia activa** clínica: 139 visitas entre septiembre y octubre.

En la actualidad prácticamente en todas las CCAA se inmuniza frente a EHCv (nueva variante) aplicándolas en las reproductoras y en los animales de reposición. La vacunación en el caso de mixomatosis se lleva a cabo de forma rutinaria con cepa viva atenuada, a reproductoras y reposición.

El Ministerio también ha establecido un protocolo de **recogida y toma de muestras** ante una sospecha de enfermedad hemorrágica del conejo o mixomatosis en animales silvestres.

En el caso de la EHC se tomarán muestras de hígado de un máximo de 5 animales por zona analizada. Se introducirá una porción de hígado de 5-10 g. en contenedores estériles individuales, identificados con el tipo de muestra y cerrados herméticamente. En el caso de la mixomatosis se recogerán muestras de párpados o de cualquier lesión nodular de un máximo de 5 animales por zona analizada que se introducirán en contenedores estériles individuales, identificados con el tipo de muestra y cerrados herméticamente. Las muestras deberán mantenerse refrigeradas (2-8°C) hasta su envío en un plazo máximo de 24 horas o congeladas si el envío no se va a realizar en este periodo de tiempo.

## **4. DIAGNÓSTICO DE LABORATORIO EHC**

### **4.1. DIAGNÓSTICO ETIOLÓGICO**

El hígado de los conejos afectados por la EHC contiene un título vírico muy alto y es el órgano de elección para la identificación tanto del VEHC como del VSLPE. La cantidad de virus presente en otras partes del cuerpo es directamente proporcional a la vascularización; de modo que el bazo y el suero pueden ser adecuados como material de diagnóstico alternativo.

Un fragmento de órgano se homogeniza mecánicamente en solución salina tamponada con fosfato (PBS) y se clarifica por centrifugación. En esta etapa, el sobrenadante puede examinarse directamente mediante:

#### **Prueba de Hemoaglutinación (HA)**

La HA fue la primera prueba utilizada para el diagnóstico sistemático de laboratorio de la EHC. Dado que la nueva variante EHC2 presenta una actividad HA similar a la del VEHC/VEHCa, este método también podría utilizarse para el diagnóstico del VEHC2. Se realiza con eritrocitos humanos del grupo O, acabados de obtener, conservados durante toda la noche en solución de Alsever y lavados con PBS al 0,85% a pH 6,5 (intervalo de 6-7,2).

La HA es menos evidente o incluso inexistente cuando se utilizan eritrocitos de otras especies.

Dada la dificultad práctica de obtener y conservar eritrocitos humanos, así como el riesgo de trabajar con estas células, y dada la dificultad de obtener resultados coherentes, esta prueba debe sustituirse por otros métodos virológicos, como el ELISA de detección de antígeno o la PCR.

**Enzimoinmunoanálisis (ELISA-DAS)** tipo sándwich basado en el uso de anticuerpos monoclonales (MAbs). Deben escogerse y utilizarse cebadores y MAbs específicos para distinguir entre los distintos lagovirus (clásico y nueva variante).

**Microscopía electrónica** de tinción negativa (nsEM) es aconsejable realizar una segunda centrifugación, antes de la ultracentrifugación final.

#### **Métodos moleculares**

La PCR con transcripción inversa (RT) supone una prueba de diagnóstico de la EHC rápida y adecuada. Se puede extraer ARN vírico de las muestras directamente de los tejidos (hígado fundamentalmente, también de pulmón y bazo). Teniendo en cuenta la alta carga vírica de las muestras positivas para el VEHC y la alta sensibilidad analítica de los métodos basados en PCR, en la fase pre-analítica de la preparación de la muestra deben procederse con sumo cuidado para evitar problemas de contaminación cruzada entre muestras.

El ARN vírico se puede amplificar directamente con una RT-PCR de un solo paso o retrotranscribirse primero a ADNc y después amplificarse mediante PCR. Para visualizar el producto de la PCR, el ADN amplificado se somete a electroforesis en gel de agarosa. Si es necesario, la especificidad de la PCR se puede determinar mediante secuenciación.

Se ha desarrollado una RT-PCR múltiple en tiempo real con control interno en la que se utilizan sondas fluorógenas y estándares externos para la cuantificación absoluta de ARN, a modo de herramienta diagnóstica para la detección del VEHC.

El diagnóstico de EHC puede complicarse por la presencia de títulos altos de anticuerpos anti-VEHC en las muestras, que darán lugar a posibles falsos negativos en el ELISA y, sobre todo, en la HA.

#### **Inmunoelectrotransferencia.**

La transferencia Western o inmunoelectrotransferencia es una técnica analítica establecida para detectar, analizar y cuantificar proteínas. Este método se utiliza para detectar moléculas proteicas específicas en muestras complejas como homogeneizados de tejidos y lisados celulares. La transferencia Western implica normalmente la separación de proteínas mediante electroforesis en gel seguida de la transferencia a una membrana de nitrocelulosa o de difluoruro de polivinilideno (PVDF). Una vez transferidas las proteínas, pueden teñirse para su visualización e identificarse directamente mediante secuenciación N-terminal, espectrometría de masas o inmunodetección. Podrían detectarse proteínas del VEHC con anticuerpos policlonales o MAbs. Si se utilizan MAbs, deben reconocer epítopos continuos

**Test inmunocromatográfico** es un ensayo de cribado sencillo y alta sensibilidad para la detección cualitativa simultánea de ambas variantes del virus en un solo paso. Permite realizar un diagnóstico presuntivo de infección a partir de muestras de tejido (hígado) o de exudado de la cavidad abdominal del conejo sobre una membrana con un Ac sobre el que reacciona la muestra.

## **4.2. DIAGNÓSTICO SEROLÓGICO**

La inmunidad humoral es la principal defensa contra la EHC, de tal forma que incluso niveles bajos de anticuerpos específicos y homólogos contra el VEHC confieren protección frente a la enfermedad. Para el diagnóstico serológico del VEHC tenemos tres técnicas básicas:

### **Prueba de inhibición de la hemoaglutinación (IH)**

Fue la primera prueba utilizada para el diagnóstico sistemático de laboratorio. Se realiza con glóbulos rojos humanos de grupo "O". Como ocurre con la prueba de HA, la dificultad de obtener eritrocitos humanos del grupo O y de trabajar con ellos ha hecho que esta prueba se está sustituyendo por el ELISA de detección de anticuerpos.

### **Enzimoanálisis- ELISA**

Tenemos el ELISA indirecto (iELISA) y ELISA de competición (cELISA). Cada uno de estos métodos tiene ventajas e inconvenientes. Respecto a la disponibilidad de reactivos y a la complejidad técnica de la realización de la prueba, la IH es el método más cómodo, seguido del iELISA y del cELISA, respectivamente. Por otra parte, ambos ELISA son más rápidos y fáciles que la IH, en concreto cuando se analiza una gran cantidad de muestras. La especificidad del cELISA es destacadamente mayor que las logradas con los otros dos métodos (Capucci et al.,

1991). Se ha descrito un método cELISA alternativo. Para mejorar la interpretación serológica y para clasificar correctamente el estado inmunitario de los conejos, también existe una combinación de técnicas ELISA que permite distinguir las respuestas de anticuerpos IgA, IgM.

## **5. DIAGNÓSTICO DE LABORATORIO MIXOMATOSIS**

### **5.1. DIAGNÓSTICO ETIOLÓGICO**

En el caso de la forma clásica de la enfermedad, la identificación del VMIX puede intentarse con muestras de lesiones cutáneas (mixomas), de párpados, de la mucosa genital o de órganos internos (pulmones, hígado, bazo, riñón, etc.). Los mixomas se extirpan con tijeras y se separan de la epidermis y de la dermis superficial. Las muestras de tejido (tejidos nodular y cutáneo, partes de órganos y raspados de mucosa), se lavan con solución salina tamponada con fosfato (PBS) con antibióticos y se tritura o se homogeniza por medios mecánicos a una dilución 1 g de tejido/4.5–9,0 ml de PBS o de agua destilada estéril (dH<sub>2</sub>O). Las células se lisan con dos ciclos de congelación-descongelación, o por ultrasonificación para liberar los viriones y los antígenos víricos. Esta suspensión se centrifuga a 1.500 g durante 5–10 minutos. El sobrenadante líquido es el material utilizado en las pruebas.

En el caso de la forma respiratoria amixomatosa de la enfermedad, pueden utilizarse hisopos nasales y conjuntivales y tejido respiratorio para la identificación del virus.

#### **Microscopía electrónica**

Puede aplicarse la microscopía electrónica de tinción negativa (nsEM) a una porción de lesión cutánea (mixomas), o a muestras de párpados, mucosa genital o hisopos conjuntivales y nasales, así como a muestras de pulmón. Es una técnica sencilla (método de la gota) y rápida de realizar, y los resultados se obtienen en 1 hora. Para la tinción, puede utilizarse una solución acuosa al 2% de molibdato de amonio, pH 7,0, o ácido fosfotúngstico al 2% (PTA), pH 7,0.

#### **Examen histopatológico de lesiones cutáneas**

Las muestras se fijan en formalina tamponada al 10% y se incluyen en parafina. El examen histológico muestra que los grandes bultos de la piel principalmente se deben a una acumulación de material mucínico con destrucción de la estructura del tejido conjuntivo de la dermis, y no a una intensa proliferación celular. La dermis y la epidermis resultan invadidas por granulocitos y células reticuloendoteliales aumentadas de tamaño y en forma de estrella, con un núcleo grande y citoplasma abundante, denominadas “células de mixoma”.

Los tejidos fijados pueden teñirse mediante inmunotinción empleando el método del complejo avidina-biotina (ABC) peroxidasa.

#### **Cultivo celular**

El aislamiento del virus en cultivo celular se realiza utilizando cultivos primarios de células de riñón de conejo (RK), o líneas celulares establecidas, como la RK-13 o la SIRC (córnea de conejo del Statens Serum Institut) o bien otras líneas celulares de mamífero, como Vero (riñón de mono verde africano). El inóculo es el sobrenadante de lesiones, órganos internos (pulmones,

hígado, bazo, riñón, etc) o una secreción óculo-respiratoria homogeneizados en medio MEM con un 2% se suero de ternero y antibióticos.

El efecto citopático (ECP) característico de los poxvirus se desarrolla por lo general en 24–48 horas, pero con algunas cepas, según su virulencia, se tarda hasta 7 días en observar el ECP. Dependiendo de la cepa del VMIX, los grupos de células con un citoplasma confluyente forman sincitios cuyo tamaño varía de 2 a 50, o incluso a 100, núcleos juntos. Los núcleos de algunas células cambian, y la cromatina forma agrupaciones basófilas que varían en número y tamaño y dan al cultivo un aspecto de piel de leopardo. Si se presentan inclusiones intracitoplásmicas eosinófilas, estas son escasas. Las células afectadas se redondean, se contraen y se vuelven picnóticas. Se lisan y llegan a desprenderse del soporte de vidrio o de plástico. Más tarde, todas las células están afectadas y la monocapa celular se desprende por completo. El VFC produce al principio masas voluminosas y bien definidas de células redondeadas, que se multiplican y amontonan (Joubert, 1973). Por el borde, las células recién infectadas presentan alteraciones nucleares bien definidas e inclusiones citoplásmicas eosinófilas que son muy numerosas en los primeros estadios. La capa celular resulta destruida al cabo de varios días. Además de la observación del ECP, para confirmar el aislamiento del virus en cultivo celular pueden utilizarse otros métodos, como la microscopía electrónica de tinción negativa (nsEM), la prueba de inmunofluorescencia (FAT), el test de AGID, la prueba de inmunoperoxidasa en monocapa (IPMA) y la PCR.

El VMIX pueden cultivarse en la membrana corioalantoidea de huevos de gallina embrionados. Se inoculan por vía corioalantoidea huevos de 11 días de vida y se incuban a 35°C durante 3 días. En caso de crecimiento vírico, tras extraer y lavar la membrana se observarán unas marcas específicas al microscopio.

### **Métodos moleculares**

Para amplificar fragmentos genómicos del VMIX puede utilizarse la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) o la PCR en tiempo real a partir de material de diagnóstico, como mixomas palpebrales, óticos y nasales, costras y/o lesiones pulmonares, así como hisopos nasales y conjuntivales o semen. Todos estos métodos también permiten detectar la cepa recombinante MYXV Toledo/ha-MYXV hallada en liebres ibéricas (García-Bocanegra et al., 2019). Dalton et al. (2019) desarrollaron una PCR específica para detectar este agente. Para detectar cepas vacunales, también pueden utilizarse la PCR y la PCR-RFLP (polimorfismos en la longitud de los fragmentos de restricción) (cepa Borghi y cepa SG33) (Camus-Bouclainville et al., 2011; Cavadini et al., 2010).

## **5.2. DIAGNÓSTICO SEROLÓGICO**

La infección de conejos con cepas del VMIX induce una respuesta inmunitaria fuerte y adaptativa que consiste en la producción de anticuerpos de tipo IgM e IgG. Es algo que también ocurre en los casos de vacunación con vacuna viva o de infección por cepas del VMIX levemente patógenas, aunque los títulos de anticuerpos en estos casos son más bajos que los que inducen las cepas altamente patógenas. La IgM aparece 5-6 días post-infección y suele

persistir 30-40 días, mientras que el pico de la IgG tiene lugar a los 20–30 días, y esta inmunoglobulina se sigue detectando durante al menos 2 años en conejos infectados de forma natural.

En cuanto al valor del título de la dosis, pueden hallarse anticuerpos maternos IgG contra el VMIX en conejos de corta edad hasta aproximadamente los 2 meses de edad.

No obstante, es importante tener en cuenta que la protección de los conejos frente a la mixomatosis depende más de la respuesta inmunitaria celular que de la humoral. Por ello, los títulos de anticuerpos anti-VMIX no constituyen un indicador directo del nivel de protección frente a la enfermedad.

Por último, teniendo en cuenta el bajísimo grado de variación genética de las proteínas inmunodominantes, no pueden utilizarse pruebas serológicas para tipificar las distintas cepas naturales del VMIX.

Se han utilizado muchos métodos para detectar anticuerpos anti-VMIX en el suero, desde la inmunodifusión en gel de agar tradicional hasta los enzimoanálisis (ELISA) más recientes. Hasta ahora, los ELISA son la prueba preferida, por su simplicidad, rapidez, bajo coste y la alta sensibilidad y especificidad. La prueba de la fijación del complemento (CF) ya no se recomienda, debido a su baja sensibilidad.

#### **Enzimoanálisis-ELISA**

- Indirecto: existen kits comerciales disponibles. Útil solo para análisis de sueros de conejos.
- Competición: no hay kits comerciales disponibles, el laboratorio de referencia de la OIE suministra los reactivos para preparar el ELISA. Se utiliza para sueros de conejos y liebres.
- Enzimoanálisis de detección de isotipos (iso ELISA): los isoELISA permiten detectar y titular isotipos de las inmunoglobulinas IgA, IgM e IgG. Los títulos de los isotipos son críticos para la interpretación serológica de campo en cuatro áreas principales:
  - anticuerpos de reacción cruzada,
  - resistencia natural de conejos jóvenes,
  - anticuerpos maternos y
  - anticuerpos en conejos infectados previamente

De hecho, en el caso de los anticuerpos pasivos, solo se detectan las IgG; en animales vacunados, normalmente no se detectan IgA, y en conejos infectados recientemente, primero se detectan las IgM y a continuación las IgA y las IgG.

El laboratorio de referencia tanto para EHC como para mixomatosis es el Istituto Zooprofilattico Sperimentale Della Lombardia e Dell'emilia. Brescia.

## BIBLIOGRAFÍA

Código Sanitario para los Animales Terrestres de la OIE. [Mixomatosis - OIE - Organización Mundial de Sanidad Animal](#)

Manual de las Pruebas de Diagnóstico y de las Vacunas para los Animales Terrestres de la OIE, 2018. Capítulo 3.6.1. [SECCION 2 \(oie.int\)](#)

Código Sanitario para los Animales Terrestres de la OIE. Capítulo 3.6.2. Enfermedad Hemorrágica del conejo. [fmd with viaa test incl. \(oie.int\)](#)

Página WEB del MAPA (Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación). Enfermedades de los animales. Mixomatosis.  
<https://www.mapa.gob.es/es/ganaderia/temas/sanidad-animal-higiene-ganadera/sanidad-animal/enfermedades/mixomatosis/Mixomatosis.aspx>

Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. Enfermedades de los animales. Enfermedad Hemorrágica del Conejo.  
[https://www.mapa.gob.es/es/ganaderia/temas/sanidad-animal-higiene-ganadera/sanidad-animal/enfermedades/hemorragica-conejo/Enf\\_Hem\\_Conejo.aspx](https://www.mapa.gob.es/es/ganaderia/temas/sanidad-animal-higiene-ganadera/sanidad-animal/enfermedades/hemorragica-conejo/Enf_Hem_Conejo.aspx)

Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. Enfermedades de los animales. Protocolo de recogida y toma de muestras.  
[https://www.mapa.gob.es/es/ganaderia/temas/sanidad-animal-higiene-ganadera/protocrecogidamuestrasehc\\_tcm30-111092.pdf](https://www.mapa.gob.es/es/ganaderia/temas/sanidad-animal-higiene-ganadera/protocrecogidamuestrasehc_tcm30-111092.pdf)

Istituto Zooprofilattico Sperimentale Della Lombardia e Dell'emilia. Brescia. [www.izsler.it](http://www.izsler.it)

**MATERIAL PARA LA PREPARACIÓN DEL TEMA 71**

**ENFERMEDADES DE LOS PECES. MARCO LEGAL. SISTEMA NACIONAL DE VIGILANCIA. DIAGNÓSTICO DE LABORATORIO.**

*Este material no tiene carácter oficial, por lo que en ningún caso vinculará al Tribunal Calificador. Constituye, únicamente, un instrumento complementario que servirá de apoyo al opositor para enfocar cada uno de los epígrafes, pero nunca de forma exclusiva ni excluyente. El Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación no se hace responsable del contenido del mismo.*

*Los materiales no serán objeto de actualización constante.*

## ÍNDICE

### 1. ENFERMEDADES DE LOS PECES

#### 1.1. PRINCIPALES ENFERMEDADES DE RELEVANCIA EN LA SANIDAD ANIMAL

#### 1.2. ENFERMEDADES CAUSADAS POR VIRUS

- 1.2.1. Necrosis Hematopoyética Epizoótica
- 1.2.2. Necrosis Hematopoyética Infecciosa
- 1.2.3. Septicemia Hemorrágica Viral
- 1.2.4. Anemia Infecciosa del Salmón
- 1.2.5. Herpesvirosis de la carpa Koi
- 1.2.6. Iridovirosis de la dorada japonesa
- 1.2.7. Viremia Primaveral de la Carpa
- 1.2.8. Alfavirus de los salmónidos

#### 1.3. OTRAS ENFERMEDADES

- 1.3.1. Síndrome Ulcerante Epizoótico (*Aphanomyces invadans*)
- 1.3.2. Infección por *Gyodactylus salaris*

### 2. MARCO LEGAL

#### 2.1. ENF. OBJETO DE CONTROL, NOTIFICACIÓN Y DECLARACIÓN OBLIGATORIA

- 2.1.1. Internacional
- 2.1.2. Europeo
- 2.1.3. Nacional

### 3. SISTEMA NACIONAL DE VIGILANCIA

#### 3.1. DIRECTRICES A NIVEL EUROPEO

#### 3.2. SISTEMA DE VIGILANCIA NACIONAL

#### 3.3. SISTEMA DE VIGILANCIA EN LAS CC.AA

#### 3.4. SITUACIÓN DE LAS ENFERMEDADES Y CATEGORIZACIÓN SANITARIA

### 4. DIAGNÓSTICO DE LABORATORIO

#### 4.1. MUESTRAS DE ELECCIÓN

#### 4.2 MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO

## 1. ENFERMEDADES DE LOS PECES

### 1.1. PRINCIPALES ENFERMEDADES DE PECES DE RELEVANCIA EN LA SANIDAD ANIMAL

Los avances y la expansión de la acuicultura en los últimos años, tanto en los países desarrollados como en los países en vías de desarrollo, han puesto de manifiesto la importancia de la sanidad en las especies de peces cultivadas. Las enfermedades que afectan a los animales de interés en acuicultura pueden deberse a **diferentes patógenos (virus, bacterias, hongos, parásitos) o a otras causas como una nutrición deficiente, factores ambientales adversos, o a factores genéticos (enfermedades genéticas o neoplásicas)**. A continuación se describen aquellas enfermedades de interés para la acuicultura. (Tabla 1).

### 1.2. ENFERMEDADES CAUSADAS POR VIRUS

#### 1.2.1. Necrosis Hematopoyética Epizoótica

**Etiología:** El virus de la necrosis hematopoyética epizoótica pertenece a la familia *Iridoviridae* y al género *Ranavirus*. Los ranavirus tienen un genoma con **ADN bicatenario**.

**Distribución geográfica:** Desde el reconocimiento en 1986 de esta enfermedad en Australia, se han descrito síntomas similares en peces de piscifactorías en Europa.

**Epidemiología:** Es una enfermedad viral altamente infecciosa de la **perca (*Perca fluviatilis*)** y de la **trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*)**. Muchas otras especies son también susceptibles.

**Transmisión:** El virus se propaga rápidamente en el agua, pero la infección puede ser transmitida en los establecimientos de acuicultura debido a los movimientos y transporte de peces así como por los equipos utilizados en las faenas. Las aves son posibles vectores ya que lo portan en el intestino, las plumas, el alimento y el pico.

**Sintomatología y lesiones:** No existen signos clínicos específicos. Los peces son encontrados muertos. Los peces moribundos pueden presentar pérdida del equilibrio, opérculos brillantes y un color oscuro. Los órganos diana y los tejidos infectados son los riñones, bazo e hígado.

**Profilaxis:** No existen vacunas ni tratamientos con sustancias químicas para la enfermedad.

#### 1.2.2. Necrosis Hematopoyética Infecciosa

**Etiología:** El agente patógeno pertenece al género *Novirhabdovirus*, de la familia *Rhabdoviridae*. Consiste en una partícula en forma de bala que encapsula un **ARN monocatenario**. Han sido descritas cinco cepas: U, M, L, E y J, según la ubicación geográfica en lugar de la especie hospedadora.

**Distribución geográfica:** La enfermedad, que se describió por primera vez en el salmón rojo del Pacífico (*Oncorhynchus nerka*) en 1944, es endémica en Estados Unidos, Canadá y Japón.

En Europa la enfermedad no existía hasta hace algunos años. También se han descrito casos de infección en Asia-Pacífico, África y las Américas.

**Epidemiología:** Se ha descrito tanto en especies de agua dulce como salada, afecta a salmónidos, especialmente a la **Trucha Arco Iris** (*Oncorhynchus mykiss*) así como a **la mayoría de las especies de salmones: Salmón Atlántico** (*Salmo salar*) o a las diversas variedades del **Salmón del Pacífico**. El lucio (*Esox lucius*), parece ser también susceptible aunque de forma leve.

Afecta a jóvenes y adultos, si bien la mayor letalidad se observa en jóvenes, con especial gravedad en animales de 3 semanas a 6 meses de vida, debido posiblemente a que no han sido capaces de desarrollar todavía una respuesta inmune adecuada.

**Transmisión:** La transmisión del virus entre peces es principalmente horizontal a través del contacto directo con agua contaminada con virus o por la cohabitación con peces infectados puesto que todos ellos actúan como portadores de los virus.

**Sintomatología y lesiones:** Los peces con infección aguda pueden presentar letargo intercalado con episodios de actividad frenética y anormal. Las lesiones se producen en el tejido hematopoyético, capilares sanguíneos y células del riñón, siendo las más características las hemorragias y los edemas. La muerte de los animales se produce por la alteración del equilibrio osmótico.

**Profilaxis:** Existen vacunas de ADN plasmídico. Se han identificado quimioterápicos, incluidos compuestos naturales, que tienen propiedades anti-VNHI; sin embargo, estos no han hallado un uso comercial en la acuicultura contra el virus.

### 1.2.3. Septicemia Hemorrágica Viral

**Etiología:** El agente patógeno de la SHV es un rabdovirus que pertenece al **género Novirhabdovirus, de la familia Rhabdoviridae**. El virión es una partícula con forma de bala, que contiene un genoma de **ARN monocatenario**.

Las secuencias de nucleótidos del gen G se han utilizado para clasificar las cepas en cuatro genotipos principales (I, II, III y IV) y nueve subtipos (Ia-Ie y IVa-IVd) con diversas distribuciones geográficas.

**Distribución geográfica:** Se han notificado casos de infección en países de Europa, América del Norte y Asia del Norte.

**Epidemiología:** Es una enfermedad viral altamente infecciosa que afecta principalmente a las **truchas arco iris** (*Oncorhynchus mykiss*) en acuicultura; también en rodaballos y otras especies tanto de agua dulce como salada.

**Transmisión:** En general, las infecciones naturales se producen por medio de la transmisión horizontal del virus propagado por las aguas o por un contacto directo con las secreciones (orina) procedentes de peces infectados.

Las aves piscívoras (sobre todo las garzas) pueden actuar como vectores mecánicos de un establecimiento de acuicultura a otro.

**Sintomatología y lesiones:** Los peces enfermos pueden presentar signos clínicos inespecíficos en las primeras fases de la infección, como una aparición rápida de mortalidad, letargia, oscurecimiento de la piel, exoftalmia, anemia (branquias pálidas), hemorragias en la base de las aletas, las branquias, los ojos y la piel.

Los signos anatomopatológicos macroscópicos consisten en hemorragias petequiales generalizadas en la piel, el tejido muscular (especialmente los músculos dorsales) y los órganos internos.

**Profilaxis:** Todavía no se dispone de una vacuna comercial. Actualmente no se dispone de ningún tratamiento con sustancias químicas. No se dispone de ningún inmunostimulante dirigido específicamente a mejorar la resistencia a la infección por el virus.

#### 1.2.4. Anemia Infecciosa del Salmón

**Etiología:** Causada por el virus de la anemia infecciosa del salmón (VAIS) **con supresión de la región altamente polimórfica (HPR) (patógeno), o bien por el VAIS HPR0, sin supresión de HPR, (no patógeno)**, perteneciente al **género *Isavirus*, de la familia *Orthomyxoviridae***. El VAIS es un virus con envoltura, formado por ocho segmentos de **ARN monocatenario**.

Los dos linajes principales del VAIS son los genotipos europeos (o genotipo I) y el genotipo norteamericano (o genotipo II). Existen varias clases dentro de estos genotipos. Se puede utilizar una pequeña **región altamente polimórfica** (highly polymorphic region, HPR) de la **hemaglutinina esterasa viral (HE) (una glicoproteína superficial codificada por el segmento genómico 6) para clasificar las cepas** en grupos numerados. HPR0 y HPR00.

Se ha sugerido que un gen de longitud total (HPR0) constituye un precursor a partir del cual se originan todas las variantes patógenas del VAIS con supresión de HPR (patógenas).

**Distribución geográfica:** Desde que se describió inicialmente, hacia mediados de los 1980s en Noruega, se ha descrito en Canadá, el Reino Unido (Escocia y en las islas Shetland), las islas Feroe y EE.UU. En todos los países en que ha tenido lugar la infección por VAIS con supresión de HPR se ha documentado la presencia de la variante HPR0, con la excepción de Islandia.

**Epidemiología:** Las especies susceptibles a la infección son: **salmón del Atlántico (*Salmo salar*), trucha común (*Salmo trutta*) y trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*).**

**Transmisión:** Las vías de transmisión del VAIS sugeridas son el agua de mar, el envío de peces vivos, la transmisión por piojos de mar, y por los salmónidos salvajes infectados.

**Sintomatología y lesiones:** En los salmones del Atlántico criados en granjas, los signos clínicos pueden incluir letargo, anemia, leucopenia, ascitis, exoftalmia, oscurecimiento de la piel y mortalidad alta. En el caso de los peces que han desarrollado VAIS con supresión de HPR, resultan infectadas células endoteliales de todos los órganos (branquias, corazón, hígado,

riñón, bazo y otros). El VAIS HPRO parece tener por diana principalmente células epiteliales de las branquias, pero también se ha detectado en el riñón y en el corazón.

**Profilaxis:** Existen vacunas disponibles en el mercado así como tratamientos antivíricos de amplio espectro (ribavirina).

### 1.2.5. Herpesvirosis de la carpa Koi

**Etiología:** Es una infección por un herpesvirus que pertenece al **género *Cyprinivirus* y a la familia *Alloherpesviridae***. También es denominado como herpesvirus de los ciprínidos tipo 3 (HVCy-3), siguiendo la nomenclatura de otros herpesvirus de ciprínidos. El genoma vírico es un **ADN de doble cadena, lineal**.

**Distribución geográfica:** Tras los primeros informes en Israel y Alemania en 1998 y en el Reino Unido, la enfermedad se ha extendido a muchos países de todo el mundo, sobre todo a través del comercio en la carpa koi.

**Epidemiología:** es una infección capaz de inducir una viremia contagiosa y aguda en la **carpa común (*Cyprinus carpio*) y en variedades como la carpa koi o la carpa goi**.

**Transmisión:** El mecanismo de transmisión es horizontal, pero actualmente no se puede descartar la transmisión “asociada a huevos” (transmisión vertical). La transmisión horizontal puede ser directa (de pez a pez) o vectorial, en la cual el agua es el principal vector abiótico. Sin embargo, también pueden intervenir vectores vivos (como otras especies de peces, invertebrados parásitos y aves y mamíferos piscívoros) y fómites.

**Sintomatología y lesiones:** El signo más evidente es la letargia. Los peces se separan del cardumen y mueren en el fondo del estanque o flotan con la cabeza hacia abajo. Algunos peces presentan pérdida de equilibrio, desorientación o hiperactividad. Las branquias, el riñón y el bazo son los órganos en los que el virus es más abundante durante el curso de una infección manifiesta.

**Profilaxis:** Actualmente no se dispone de ninguna vacuna inocua y eficaz. Ni tratamientos con sustancias químicas, ni inmunoestimulantes.

### 1.2.6. Iridovirosis de la dorada japonesa

**Etiología:** Es un virus de **ADN de doble** cadena y está causada principalmente por **la cepa Ehime-1 del iridovirus** de la dorada japonesa (IDJ) la enfermedad está causada no solo por el virus de IDJ sino también por el virus de la necrosis infecciosa del bazo y el riñón (VNIBR).

**Distribución geográfica:** El primer brote se documentó en dorada japonesa de piscifactoría en la isla de Shikoku, Japón, en 1990, también se encuentra muy extendida en países del este y el sureste asiático.

**Epidemiología:** Es una causa importante de mortalidad en la **dorada japonesa (*Pagrus major*)** de piscifactoría, desde juveniles a adultos, y en más de otras 30 especies de peces marinos cuando viven en piscifactorías pertenecientes a los órdenes Perciformes y Pleuronectiformes.

**Transmisión:** El principal mecanismo de transmisión del es horizontal, por el agua.

**Sintomatología y lesiones:** Los peces afectados quedaron letárgicos, presentaron anemia intensa, petequias en las branquias y esplenomegalia. Se observan células infectadas en el bazo, el riñón, el corazón, el intestino y las branquias.

**Proxilaxis:** Actualmente se dispone de una vacuna comercial eficaz inactivada por formalina contra el RSIV. No se dispone de tratamientos con sustancias químicas ni inmunoestimulación.

### 2.2.7. Viremia Primavera de la Carpa

**Etiología:** La infección es causada por el agente patógeno ***Carp sprivirus***, conocido como virus de la viremia primaveral de la carpa, del género ***Sprivirus***, en la familia ***Rhabdoviridae***. El genoma del virus es un **ARN** no segmentado, levógiro y monocatenario.

Según el análisis del gen G, las cepas del virus se clasifican en cuatro genogrupos distintos y a todas las cepas se asignan al genogrupo I, compartiendo <61% de identidad de nucleótidos con los virus de los otros tres genogrupos. El reanálisis de los datos de la secuencia generada para los virus asignados al genogrupo I identificó cuatro subgrupos (Ia-d). Los virus originarios de Asia se asignaron al subgrupo Ia, los de Moldavia, Ucrania y Rusia a los subgrupos Ib e Ic, y los del Reino Unido al subgrupo Id.

**Distribución geográfica:** La enfermedad se ha registrado en la mayoría de los países europeos. Sin embargo, en 1998 se registró en Sudamérica y en 2002 en Norteamérica. El virus se detectó por primera vez en Asia en 2004.

**Epidemiología:** las especies principalmente afectadas pertenecen a las familias de ***Cyprinidae*** (carpas) y ***Siluridae*** (Rutilo y Siluro).

**Transmisión:** La transmisión es horizontal, puede ser directa o a través del agua, fómites o vectores. No se puede descartar la transmisión vertical y "asociada a los huevos"

En condiciones experimentales, los invertebrados parásitos *Argulus foliaceus* (Crustacea, Branchiura) y *Piscicola geometra* (Annelida, Hirudinea) transfieren el virus de los peces enfermos a los sanos. Así mismo, el virus ha sido aislado de los tejidos de peces regurgitados por garzas reales (*Ardea cinerea*), lo cual sugiere una posible vía de transmisión, pero no se sabe si dicha transmisión ha ocurrido en la naturaleza.

**Sintomatología y lesiones:** los peces jóvenes, de hasta un año de edad, son los más propensos a presentar signos clínicos de la enfermedad, pero todos los grupos de edad pueden verse afectados.

Los peces afectados pueden volverse letárgicos, y algunos pueden experimentar una pérdida de equilibrio. Los signos clínicos de la infección son inespecíficos y no todos los peces presentan todos los signos.

No hay lesiones macroscópicas patognomónicas, pueden estar ausentes en los casos de mortalidad repentina.

**Profilaxis:** Actualmente no se dispone de una vacuna inocua y eficaz; sin embargo, sí se ha investigado la eficacia de una vacuna experimental de ADN.

El metisoprinol inhibe la replicación del VVPC *in vitro*, pero no ha sido probado en condiciones de cultivo de carpas.

La inyección en la carpa de ARN monocatenario y bicatenario (que es un inductor del interferón) protegió a la carpa durante más de 3 semanas, pero el tratamiento no es eficaz mediante la administración de baños.

### 2.2.8. Alfavirus de los salmónidos

**Etiología:** Designa la infección por cualquier genotipo del agente patógeno, perteneciente al género *Alphavirus* y a la familia *Togaviridae*. Es un virus de **ARN monocatenario**. Existen seis genotipos (AVS 1-AVS 6) en base a las secuencias de ácido nucleico de las proteínas E2 y nsP3.

**Distribución geográfica:** Se sabe que hay infección por el virus en salmónidos de piscifactoría de Europa y Norteamérica.

**Epidemiología:** El **salmón del Atlántico** y la **trucha arco iris** son las especies con mayor probabilidad de infección. Los estudios experimentales han demostrado que todas las etapas de la vida son susceptibles. Los genotipos AVS 1 y AVS 2 causan enfermedad en peces tanto de agua dulce como de agua de mar, mientras que los cuatro genotipos AVS 3 - AVS 6 solo se han notificado en brotes de la enfermedad en agua de mar.

**Transmisión:** La transmisión horizontal se realiza entre peces que cohabitan, entre sitios de cultivo, estudios en el agua de mar, la propagación a través de las corrientes de agua y al desplazamiento de peces infectados. Aunque la mayoría de los alfavirus se transmiten por vectores artrópodos, aún no se ha demostrado la transmisión vectorial del virus.

**Sintomatología y lesiones:** Puede observarse una disminución repentina del apetito entre 1 y 2 semanas antes de la detección de una mortalidad elevada. Los peces clínicamente enfermos pueden observarse nadando lentamente en la superficie del agua. En algunos casos, pueden encontrarse peces extremadamente débiles ("dormidos") en el fondo de los tanques o en las jaulas de red. También puede observarse un mayor número de deposiciones **fecales**. **Sin embargo, es importante señalar que los signos clínicos no son patognomónicos.**

El corazón y el páncreas son los principales órganos diana de la infección. La necrosis y la pérdida de tejido pancreático exocrino, la miocarditis y la miositis esquelética son hallazgos histopatológicos característicos.

**Profilaxis:** Se comercializan vacunas de virus inactivado basadas tanto de ADN como en cultivo celular. No se dispone de tratamientos con sustancias químicas ni de inmuoestimulación.

### 1.3. OTRAS ENFERMEDADES

#### 1.3.1. Síndrome Ulcerante Epizoótico (*Aphanomyces invadans*)

**Etiología:** Se considera una infección por un **oomiceto** conocido como ***Aphanomyces invadans***. Se caracteriza por hifas penetrantes envueltas por inflamación granulomatosa. El género *Aphanomyces* forma parte de un grupo de organismos comúnmente conocidos como hongos acuáticos. Aunque durante mucho tiempo se ha visto como un hongo debido a su característico crecimiento filamentosos, este grupo, el de los **Oomicetida**, no forma parte de los Eumycota, sino que se **clasifican con las diatomeas y las algas marrones** en un grupo denominado Stramenopiles o Chromista.

**Distribución geográfica:** Se notificó por primera vez en Japón en 1971, posteriormente, se ha detectado en más de 20 países de cuatro continentes. Los desplazamientos de peces ornamentales vivos procedentes de países infectados por el virus podrían extender la enfermedad.

**Epidemiología:** Es una condición epizoótica estacional de los **peces silvestres y de piscifactoría** de todo el mundo. Algunos peces, como la carpa común (*Cyprinus carpio*), la tilapia del Nilo (*Oreochromis niloticus*) y el sabalote (*Chanos chanos*), se han considerado resistentes naturales al virus.

**Transmisión:** Se transmite de forma horizontal. Las zoosporas de *Aphanomyces* pueden transmitirse horizontalmente de un pez a otro a través del suministro de agua. Las zoosporas son capaces de adherirse a la piel dañada de pez y de transformarse en hifas. Si las zoosporas no encuentran una especie susceptible o se topan con circunstancias desfavorables, pueden formar zoosporas secundarias. Las zoosporas secundarias pueden enquistarse en el entorno del agua o el estanque a la espera de condiciones que favorezcan la activación de las esporas.

**Sintomatología y lesiones:** Clínicamente se caracteriza por lesiones ulcerantes necrotizantes, que suelen con llevar una respuesta granulomatosa. Una vez la espora móvil se adhiere a la piel del pez, germina en condiciones estables y sus hifas invaden la piel del pez y el tejido muscular, hasta llegar a los órganos internos. El músculo esquelético es el órgano diana y presenta signos clínicos con granulomas micóticos.

**Profilaxis:** No se dispone de ninguna vacuna protectora, No existe ningún tratamiento eficaz para los peces infectados en la naturaleza o en estanques de piscifactoría.

En pruebas preliminares se ha observado que la inyección intraperitoneal del inmuoestimulante, Salar-bec, en peces ofiocéfalos puede aumentar la inhibición sérica tanto de la germinación como del crecimiento de la zoospora *in vitro*.

### 1.3.2. Infección por *Gyrodactylus salaris*

**Etiología:** Es una infección causada por un **ectoparásito** vivíparo denominado ***Gyrodactylus salaris***, de la familia ***Gyrodactylidae***, en la Clase ***Monogenea***.

**Distribución geográfica:** Fue primeramente detectado en las partes orientales de la zona del Báltico. Desde estas áreas, el parásito se ha propagado y se ha notificado en varios países de Europa tanto en poblaciones silvestres como en piscifactorías. El parásito se ha encontrado en salmónidos salvajes, principalmente alevines del salmón del Atlántico, y en ríos de Finlandia, Noruega, Rusia y Suecia.

**Epidemiología:** Afecta principalmente a **salmónidos** entre los que se encuentran las especies: sigüientes: salvelino (*Salvelinus alpinus*), salmón del Atlántico (*Salmo salar*), tímalo común (*Thymallus thymallus*), trucha de manantial (*Salvelinus fontinalis*) y trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*).

**Transmisión:** *Gyrodactylus salaris* se ha propagado entre ríos y explotaciones principalmente por la translocación de peces vivos, puede transferirse a un nuevo hospedador a través del contacto con hospedadores vivos, hospederos muertos, parásitos desprendidos que se desplazan en la columna de agua o parásitos adheridos al sustrato.

**Sintomatología y lesiones:** El salmón salvaje del Atlántico con bajas intensidades de infección (una o hasta unas pocas decenas) de parásitos *G. salaris* generalmente no presenta ningún signo clínico. El aumento de la intensidad media del parásito a lo largo del tiempo a menudo conduce a un aumento del parpadeo (los peces se rascan la piel en el sustrato), una mayor producción de moco (que le da al pez un aspecto grisáceo) y la erosión de las aletas.

*Gyrodactylus salaris* suele aparecer en las aletas de ejemplares de salmón del Atlántico infectados, pero la distribución del parásito en el hospedador puede variar en función de la intensidad de la infección

**Profilaxis:** No se dispone de vacunas, de tratamientos con sustancias químicas ni de inmuoestimulación.

**Tabla 1. Enfermedades de peces de relevancia en la Sanidad Animal**

Enfermedad	Agente etiológico	Género	Familia	Acido nucléico	Distribución geográfica	Especies Susceptibles	Transmisión		Síntomatología y Lesiones		Tratamiento		
							Tipo Transmisión	vectores	Sintomatología	Lesiones (organos)	Vacunas	Sustancias químicas	Inmunoestimulación
Necrosis Hematopoyética Epizoótica	virus ADN	<i>Ranavirus</i>	<i>Iridoviridae</i>	ADN bicatenario	Australia y Europa	Perca, trucha arcoiris	Horizontal: agua, transporte de peces	aves	No específica. moribundos, pérdida del equilibrio	riñón, bazo, hígado	no	no	no
Necrosis Hematopoyética Infecciosa	virus ARN	<i>Novirhabdovirus</i>	<i>Rhabdoviridae</i>	ARN monocatenario	endémica: EE.UU, Canadá, Japón. Resto: Europa, Asia-Pacífico, África, América	Salmónidos: Trucha arco iris, Salmón Atlántico y Salmón del Pacífico.	horizontal: agua, peces infectados	-	letargo, actividad anormal	tejido hematopoyético, riñón, hemorragias, edema.	ADN plasmídico	Quimioterápicos	no
Septicemia Hemorrágica viral	virus ARN	<i>Novirhabdovirus</i>	<i>Rhabdoviridae</i>	ARN monocatenario	Europa, América del Norte y Asia del Norte	Trucha arco iris, rodaballos	Horizontal: agua y secreciones	aves	letargo, oscurecimiento de piel, exoftalmia, branquias pálidas	petequias en piel, músculo y órganos internos.	no	no	no
Anemia Infecciosa del Salmón	virus ARN	<i>Orthomyxoviridae</i>	<i>Isavirus</i>	ARN monocatenario	Noruega, Canadá, Reino Unido, Islas Feroe	Salmón Atlántico, trucha común, trucha arco iris	Horizontal: agua, movimiento de peces	piojos de mar	letargia, anemia, leucopenia	células endoteliales de órganos	si	Ribavirina	no
Herpesvirosis de la carpa Koi	virus ADN	<i>Cyprinivirus</i>	<i>Alloherpesviridae</i>	ADN bicatenario	Mundial	Cyprinidos (carpa común, carpa koi, carpa gol)	Horizontal: agua, de pez a pez	invertebrados parásitos, aves y mamíferos piscívoros	letargia	branquia, riñón, bazo	no	no	no
Iridovirosis de la dorada japonesa	virus ADN	<i>Quinto género</i>	<i>Iridoviridae</i>	cepa Ehime-1	Japón, Países del Este y Sureste Asiático	Dorada japonesa y Perciformes y Pleuronectiformes	Horizontal: agua	-	letargia, amnesia	bazo (esplenomegalia), riñón, corazón, intestino y branquias (petequias)	si	no	no
Viremia Primaveral de la Carpa	virus ARN	<i>Sprivivirus</i>	<i>Rhabdoviridae</i>	ARN monocatenario	Europa, Asia, Sudamérica y Norteamérica	Cyprinidae (carpas) y Siluridae (Rutilo y Siluro).	Horizontal: agua, fómites	parásitos invertebrados. Aves	letargia, pérdida de equilibrio	No patognómicas	ADN experimental	Metisoprinol	no
Alfavirus de los salmónidos	virus ARN	<i>Alphavirus</i>	<i>Togaviridae</i>	ARN monocatenario	Europa y Norteamérica	Salmón del Atlántico, Trucha arco iris	Horizontal: agua, cohabitación, movimiento de peces	artrópodos (no demostrada)	disminución del apetito, natación lenta, "dormidos"	Corazón y páncreas	ADN	no	no
Síndrome Ulcerante Epizoótico (Aphanomyces invadans)	Oomiceto	<i>Aphanomyces</i>	<i>Diatomeas y las algas marrones (Stramenopiles o Chromista)</i>	-	Mundial	peces silvestres y de piscifactoría	Horizontal: zoosporas	-	con lesiones ulcerantes o puntos rojos en el cuerpo	lesiones ulcerantes necrotizantes, granulomas micóticos	no	no	Salar-bec
Infección por Gyrodactylus salaris	Ectoparásito	<i>Clase Monogenea</i>	<i>Gyrodactylidae</i>	-	Báltico y resto de Europa	Salmónidos (Salmón del Atlántico)	Horizontal: contacto con el hospedador	-	Sin síntomas o rascado de piel, producción de moco,	erosión aletas	no	no	no

## 2. MARCO LEGAL

Existe un marco reglamentario a nivel internacional, europeo y nacional que aplica a las enfermedades de los peces en lo que concierne al establecimiento de sistemas de vigilancia, al control y a la obligación de la notificación de determinadas enfermedades (Tabla 2).

### 2.1. LEGISLACIÓN REFERENTE A ENFERMEDADES OBJETO DE CONTROL, NOTIFICACIÓN Y DECLARACIÓN OBLIGATORIA

#### 2.1.1. Internacional

Las enfermedades de los peces están inscritas en la **lista del Código Sanitario para los Animales Acuáticos de la Organización Mundial de la Sanidad Animal (OIE)** y los Países y Territorios Miembros tienen la **obligación de notificar** los brotes conforme al *Código Sanitario para los Animales Terrestres* de la OIE, a **través del Sistema mundial de información zoonosanitaria (WAHIS)** o por fax o correo electrónico en el plazo de 24 horas.

#### 2.1.2 Unión Europea

La legislación europea que aplica a las enfermedades de los peces es (Tabla 2):

- **En material de control de las enfermedades:**

**El Reglamento (UE) 2016/429** establece normas para la prevención y el control de las enfermedades transmisibles a los animales o a las personas, incluidas normas de priorización y **categorización de enfermedades incluidas en la lista que son motivo de preocupación en toda la Unión.**

**El Reglamento Delegado (UE) 2018/1629** que modifica la lista de enfermedades recogidas en el anexo II del Reglamento (UE) 2016/429, **y se suprime de la lista el Síndrome ulcerante epizoótico.**

**El Reglamento de Ejecución (UE) 2018/1882** de la Comisión de 3 de diciembre de 2018 relativo a la aplicación de determinadas normas de prevención y control **a categorías de enfermedades enumeradas en la lista y por el que se establece una lista de especies y grupos de especies que suponen un riesgo considerable para la propagación de dichas enfermedades de la lista así como la categorización (A, B, C, D, E) a la que pertenecen.**

- **En materia de notificación y declaración obligatoria:**

**El Reglamento de Ejecución (UE) 2020/2002** de la Comisión de 7 de diciembre de 2020 por el que se establecen normas de desarrollo del Reglamento (UE) 2016/429 del Parlamento Europeo y del Consejo **relativas a la notificación a la Unión y al envío de informes a la Unión sobre la detección de enfermedades de la lista, que serán presentados electrónicamente a través del sistema ADIS.**

### 2.1.3. Nacional

La norma de mayor rango en materia de sanidad animal la constituye la **Ley 8/2003**, de 24 de abril, de Sanidad Animal, existiendo normativa de menor rango constituida por Reales Decretos que tratan sobre la declaración obligatoria de las enfermedades o la creación del Sistema de Alerta de Sanidad Veterinaria, así como normativa específica para diferentes enfermedades. En aquello que concierne a las enfermedades de los peces, se encuentra:

La normativa nacional básica es el Real Decreto 1614/2008, que es la trasposición de la Directiva 2006/88/CE por la que se establecen los requisitos zoonosanitarios de los animales acuáticos y de los productos de la acuicultura, y la prevención y el control de determinadas enfermedades de los animales acuáticos.

**ACTUALMENTE la normativa de aplicación es la normativa comunitaria** ya que la Directiva 2006/88/CE está derogada por el Reglamento (UE) 2016/429, por lo que el RD 1614/2008 está en REVISIÓN para adaptarse a esta nueva normativa.

Por otro lado, es imprescindible citar el **Real Decreto 526/2014, de 20 de junio**, por el que se establece la lista de las enfermedades de los animales **de declaración obligatoria y se regula su notificación**.

**Tabla 2. Enfermedades de los peces objeto de declaración y notificación**

LEGISLACIÓN	INTER NACIONAL	UNIÓN EUROPEA				NACIONAL
	OIE	Reglamento (UE) 429/2016	Reglamento Delegado (UE) 2018/1629	Reglamento Ejecución (UE) 2018/1882	Reglamento Ejecución (UE) 2020/2002	Real Decreto 526/2014 EDO Anexo 1
Síndrome ulcerante epizootico ( <i>Aphanomyces invadans</i> )	X	X	-	-	-	X
Alfavirus de los salmónidos	X	-	-	-	-	X
Herpesvirosis de la carpa koi	X	X	X	X (E)	-	X
Necrosis Hematopoyética Epizootica	X	X	X	X (A+D+E)	X	X
Necrosis Hematopoyética Infecciosa	X	X	X	X (C+D+E)	X	X
Septicemia Hemorrágica Viral	X	X	X	X (C+D+E)	X	X
Anemia infecciosa del salmón	X	X	X	X (C+D+E)	X	X
Iridovirosis de la dorada japonesa	X	-	-	-	-	X
Viremia primaveral de la carpa	X	-	-	-	-	X
Infección por <i>Gyrodactylus salaris</i>	X	-	-	-	-	X

### 2.1.4. Autonómico

Cada CC.AA. podrá establecer dentro de su ámbito de competencia la normativa adecuada para la transposición y cumplimiento de la normativa europea y nacional.

### 3. SISTEMA NACIONAL DE VIGILANCIA

#### 3.1. DIRECTRICES A NIVEL EUROPEO

La implementación de un sistema de vigilancia y control de las enfermedades de los peces está basada en las directrices establecidas en la normativa europea la cual establece en el **Reglamento (UE) 2016/429**, que debe llevarse a cabo la siguiente vigilancia:

- **Vigilancia pasiva**

Sobre la base de la **notificación inmediata** a la autoridad competente en caso de **mortalidades anormales** en animales de acuicultura, cualquier motivo para **sospechar la presencia de una enfermedad de la lista** o la presencia de dicha enfermedad **se confirma** en animales acuáticos.

- **Vigilancia basada en el riesgo**

Una vigilancia zoonosaria **basada en el riesgo** en establecimientos de acuicultura y grupos de establecimientos de acuicultura podrá combinarse **con visitas sanitarias y toma de muestras** que se lleven a cabo como parte de los **programas de erradicación obligatorios u opcionales de una o más enfermedades de la lista**; o para demostrar y mantener el **estado libre de enfermedad para una o más enfermedades enumeradas**; o **como parte de un programa de vigilancia para una o más enfermedades de categoría C**.

En base a esto, han sido desarrollados varios reglamentos que complementan al 2016/429:

- **El Reglamento Delegado (UE) 2020/689** de la Comisión, de 17 de diciembre de 2019, referente a **las normas de vigilancia, los programas de erradicación y el estatus de libre de enfermedad con respecto a determinadas enfermedades de la lista y enfermedades emergentes**.

Concretamente **el ANEXO VI** establece los Requisitos específicos relativos a las enfermedades de animales acuáticos y los métodos de diagnóstico para la **Septicemia Hemorrágica Viral, la Necrosis Hematopoyética Infecciosa, para la infección por el virus de la anemia infecciosa del salmón (VAIS) con supresión en la región altamente polimórfica (HPR)**.

- **El Reglamento (UE) 2017/625 relativo a los controles y otras actividades oficiales** realizados para garantizar la aplicación de la legislación sobre alimentos y piensos, y de las normas sobre salud y bienestar de los animales, sanidad vegetal y productos fitosanitarios, donde se establecen las directrices para:
  - La realización de los **controles oficiales** y otras actividades oficiales por parte de las autoridades competentes de los Estados miembros.
  - Los métodos utilizados para el muestreo, los análisis, los ensayos y los diagnósticos.

### 3.2. NACIONAL

A nivel nacional, el MAPA a través de la Subdirección General de Sanidad, Higiene Animal y Trazabilidad (SGSHAT) de la Producción Agraria, tiene establecido un **Programa Nacional para verificar el cumplimiento de la normativa en materia de sanidad de los animales y productos de la acuicultura** cuyo objeto es:

**El objetivo es la planificación y la organización de las actividades de control oficial para:**

- Velar por la sanidad de los animales de la acuicultura.
- Evitar la difusión de las enfermedades que le afectan.
- Proteger el normal funcionamiento de los mercados.
- Evitar que las enfermedades de los animales de la acuicultura puedan suponer un riesgo para la sanidad de las poblaciones silvestres y viceversa.

### 3.3. AUTONÓMICO

**El Programa Nacional anteriormente citado será ejecutado** por parte de las autoridades competentes de las Comunidades Autónomas (CCAA) en materia **de sanidad**, realizando.

- La elaboración, ejecución y desarrollo del Plan de controles de carácter autonómico.
- La coordinación, seguimiento, verificación y supervisión en sus respectivos ámbitos territoriales de la ejecución del Plan autonómico correspondiente.
- La aprobación y ejecución de las medidas correctoras de carácter autonómico.

Además, para algunas enfermedades, **la Septicemia Hemorrágica Viral y la Necrosis Hematopoyética Infecciosa**, y debido a la importancia que pueden tener sobre el sector, están sometidas a un **Programa de Vigilancia** para la determinación de zonas y compartimentos libres de dichas enfermedades que es llevado a cabo por las CC.AA.

### 3.4. SITUACIÓN DE LA ENFERMEDAD Y CATEGORIZACIÓN SANITARIA

Las explotaciones se clasifican en función de su situación sanitaria en las siguientes categorías (Tabla 3):

- **Categoría libre de enfermedad:** Explotación calificada como libre de determinadas enfermedades. A su vez estas explotaciones se podrán diferenciar por la existencia o ausencia de las especies sensibles para una determinada enfermedad.
- **Categoría Programa de erradicación:** Explotación no calificada como libre de enfermedades pero con programa de erradicación aprobado.
- **Categoría No declarado libre pero no infectado:** Explotación sin infección conocida pero no sometida a un programa de erradicación para alcanzar la calificación de Libre de enfermedades.

- **Categoría Infectado:** Explotación declarada infectada, sujeta a medidas de control.

**Tabla 3. Categorización sanitaria para las enfermedades de los peces.  
 (Reglamento Delegado (UE) 2020/689. Anexo VI. Parte 1. Capítulo 1. Punto 1.4)**

Enfermedades de los peces	Categorización Sanitaria			
	Categoría Libre de enfermedad	Categoría Programa de erradicación	Categoría No declarada libre pero no infectada	Categoría Infectada
Anemia Infecciosa del salmón	X	-	-	-
Enfermedad por el Herpesvirus Koi*	-	-	X	-
Necrosis Hematopoyética Infecciosa**	X	-	-	-
Septicemia Hemorrágica viral**	X	-	-	-

\*Enfermedad no presente en España  
 \*\*Enfermedad con zonas y compartimentos libres y bajo programa de vigilancia

## 4. DIAGNÓSTICO DE LABORATORIO

### 4.1. MUESTRAS DE ELECCIÓN

Las muestras recomendadas para llevar a cabo el diagnóstico de las enfermedades de los peces, serán **a partir de animales acuáticos vivos, o a partir de animales recién muertos o moribundos**, si los peces muestreados son inferiores a 6 cm. de longitud se pueden enviar enteros. Si los peces son mayores de 6 cm. de longitud se extraerán con material estéril partes de los órganos, abriendo el pez ventralmente los órganos a muestrear en cada animal dependen del patógeno pero por norma general son: bazo, branquias, cerebro, corazón, fluidos, hígado, intestino, músculo, riñón y sangre, así como ovario y fluido seminal. La toma de muestras y procesado se llevará a cabo según el análisis o técnica correspondiente (tabla 4).

**Tabla 4. Toma de muestras para las enfermedades de los peces**

Tipo de Análisis	Toma y procesado de la muestras
Análisis histológicos	Peces recién muertos que presenten signos clínicos o hallazgos postmortem consecuentes con la presencia de la enfermedad. Se muestreará cualquier lesión interna o externa, y en cualquier caso, de cada pez se recogerán muestras de tejido usando un bisturí y transfiriéndolo a una solución salina tampón con formol al 4%.
	Frotis o improntas: El tejido de elección será desangrado en papel absorbente para eliminar el exceso de sangre, luego se presionará de manera repetida contra un porta objetos. Las impresiones individuales deben de estar colocadas adyacentes, pero nunca superpuestas, para conseguir una monocapa de células continua. Las improntas deben dejarse secar al aire y luego conservarlas en lugar fresco y seco si no se van a fijar inmediatamente. La fijación de las improntas ha de realizarse dentro de las 72 horas de la toma de muestra. Alternativamente, las improntas pueden ser congeladas después del secado y almacenadas a -20º C hasta un mes antes de la fijación.
	En el caso de la infección por <i>Gyrodactylus salaris</i> los peces deberán ser conservados en etanol 70-80º para la identificación del parásito.
Análisis virológicos	Fragmentos de tejidos usando bisturí esteril que serán transferidos a tubos de plástico conteniendo medio de transporte, (medio de cultivo celular con antibióticos).
	Se pueden hacer pools de tejidos de hasta 5 peces.
Análisis Moleculares	Se recogerá del pez un fragmento de tejido utilizando un bisturí esteril e introducirlo en un microtubo con solución conservante, ej: RNA later.
Análisis hematológicos	Los peces que muestran síntomas de anemia pueden ser anestesiados y se toman inmediatamente muestras de sangre con heparina o EDTA para exámenes hematológicos como la medida del hematocrito.

## 4.2. DIAGNÓSTICO DE LABORATORIO

Para aquellas enfermedades objeto de vigilancia de vigilancia, control y notificación, el diagnóstico se realiza siguiendo las directrices establecidas por:

- **La normativa de la Unión Europea (Reglamento (UE) 2017/625 relativo a los controles y otras actividades oficiales (art.34))**
- **Protocolos pertinentes internacionalmente reconocidos** como El Manual de las Pruebas de Diagnóstico y de las Vacunas para los Animales Acuáticos de la OIE y los aceptados por el Comité Europeo de Normalización (CEN).
- **Los protocolos y métodos del Laboratorio Europeo de Referencia (EURL).**
- **Los protocolos y métodos de los Laboratorios Nacionales de Referencia en caso de no existir las normas o protocolos pertinentes mencionados.**

El diagnóstico se realiza mediante técnicas **histológicas, inmunológicas, moleculares, bacteriológicas (cultivos celulares) y análisis hematológicos** (tabla 5), así por ejemplo podemos destacar:

- **Técnicas histológicas**

Sobre tejido fijado en formol e incluido en parafina, o en improntas o frotis de los tejidos se realiza la técnica de hematoxilina & eosina (H&E) para observar al microscopio las lesiones patognomónicas.

En el caso de **Síndrome Ulcerante Epizoótico (*Aphanomyces invadans*)** se puede realizar la identificación la hifas y de granulomas micóticos, en los raspados de lesiones del cuerpo del pez o de las úlceras mediante la observación directa al microscopio óptico o empleando técnicas histológicas: de hematoxilina & eosina (H&E) o de Grocott.

En la **Anemia Infecciosa del salmón**, mediante la H&E, se puede observar necrosis hemorrágica en el hígado. Los cambios macroscópicos son oscurecimiento, sangrado, especialmente en el abdomen y branquias anémicas. Al abrir el pez, las observaciones típicas son hígado oscuro, corazón pálido y branquias pálidas.

En el **Herpesvirus de la Carpa Koi**, se observa necrosis blanca en las branquias, a menudo seguida de una infección bacteriana secundaria, es uno de los personajes principales. La histopatología es inespecífica y variable, pero la inflamación y la necrosis de las branquias son características fiables.

En la **Necrosis Hematopoyética Infecciosa**, no hay lesiones patognomónicas. Se puede observar bazo e hígado inflamados, aumento del líquido peritoneal serosanginoso y múltiples focos necróticos en el hígado.

- **Técnicas inmunológicas**

Entre las que se encuentran las técnicas de inmunohistoquímica (IHQ) o inmunofluorescencia indirecta (IFI) sobre el tejido fijado en formol e incluido en parafina, ELISAS o IFIs sobre sobrenadantes de cultivos celulares.

Todas ellas emplean anticuerpos monoclonales específicos para cada enfermedad, así por ejemplo en el caso de la Necrosis Hematopoyética infecciosa se emplea el anticuerpo MAb IP5B11 y para la Septicemia Hemorrágica viral Hyb 11.

- **Técnicas moleculares**

Se emplean las técnicas de PCR convencional, PCR en tiempo real (RT-PCR) y PCR cuantitativa en tiempo real (RT-qPCR) empleando primers específicos para cada enfermedad; posteriormente los productos de las PCRs deben ser secuenciados para su confirmación.

En la **Anemia infecciosa del salmón (VAIS)** se deben emplear primers para detectar tanto el VAIS con supresión de HRP y HRP0, en los casos de aparición de ISAV-HPR0, **es obligatorio realizar un seguimiento de los casos positivos mediante secuenciación del segmento 6 para determinar si la cepa es HPR0, HPR con supresión o una mezcla de ambas.**

- **Técnicas bacteriológicas (Cultivos celulares)**

Los cultivos celulares se emplean para el aislamiento e identificación del agente mediante la observación del efecto citopático (ECP) del virus. Los órganos o muestras de tejido deben ser homogeneizadas (stomacher) y centrifugadas, los sobrenadantes antes de su inoculación en la correspondiente línea celular deben ser mezclados con un pool de antisuero característico de la enfermedad objeto de estudio.

Algunas de las líneas celulares empleadas son:

- **ASK o SHK-1** para la anemia Infecciosa del salmón.
- **BF-2** (línea celular de alevines Bluegill -2) y /o **RTG-2** (línea celular de gónada de trucha arcoíris -2) para la Necrosis Hematopoyética infecciosa, la Septicemia Hemorrágica viral.

Si no se ha desarrollado ECP después de la incubación primaria durante 7 a 10 días, el subcultivo, se realizará en cultivos celulares frescos utilizando un área celular similar a la del cultivo primario. Si no se produce CPE, la prueba puede declararse negativa.

**Si se ha observado evidencia de CPE en un cultivo celular**, el medio (sobrenadante) debe ser recolectado y examinado por una o más de las siguientes técnicas: inmunoenzimáticas (ELISA), inmunofluorescencia indirecta (IFI) moleculares RT-PCR o RT-qPCR.

- **Análisis hematológicos**

En la **anemia infecciosa del salmón (VAIS)** se emplean pruebas hematológicas, en los casos de salmón del Atlántico criado en agua de mar con un **hematocrito <10** se considera que tiene la enfermedad, aunque **siempre se deben realizar pruebas para descartar la infección por el VAIS con supresión de HPR.**

**Tabla 5. Métodos de diagnóstico para las enfermedades de los peces**

Enfermedad	Agente	muestra	Método de laboratorio				Método de Diagnóstico
			Histológicos	Inmunológicos	Molecular	Bacteriológico	
Necrosis Hematopoyética Epizoótica	virus ADN	Hígado, riñón anterior, bazo	H&E., Frotis. Necrosis	IFAT, ELISA	PCR convencional, secuenciación	Cultivo celular	OIE
Necrosis Hematopoyética Infecciosa	virus ARN	riñón anterior, bazo, corazón, encéfalo	H&E., Frotis. No lesiones patognomónicas	IFI, ELISA	RT-PCR, RT-qPCR, PCR convencional, secuenciación	Cultivo celular: células BF-2 o RTG-2	OIE / validado EURL
Septicemia Hemorrágica Viral	virus ARN	riñón anterior, bazo, corazón	H&E., Frotis. Hemorragias	IFI, ELISA	RT-PCR, RT-qPCR, PCR convencional, secuenciación	Cultivo celular: células BF-2 o RTG-2	OIE / validado EURL
Anemia infecciosa del salmón	virus ARN	branquias, corazón, hígado, riñón, bazo	H&E., Frotis. Necrosis hemorrágica en hígado	IHQ, IFI	RT-PCR, RT-qPCR, secuenciación región HRP	Cultivo celular: células ASK o SHK-1	OIE / validado EURL
Herpesvirosis de la carpa koi	virus ADN	branquias, riñón bazo	H&E., Frotis. Inflamación y necrosis de las branquias	ELISA	PCR	Cultivo celular	OIE
Iridovirosis de la dorada japonesa	virus ADN	bazo, riñón	H&E., Frotis. células anormalmente aumentadas de tamaño en tejidos	IFI, ELISA, seoneutralización	RT-PCR, PCR convencional, secuenciación	Culivo celular	OIE
Viremia primaveral de la carpa	virus ARN	riñón, bazo, branquias, encéfalo	H&E., Frotis. Alteraciones no específicas en todos los órganos principales	IFI,-ELISA, seoneutralización	RT-PCR, PCR convencional, secuenciación	Culivo celular	OIE
Alfavirus de los salmónidos	virus ARN	corazón, riñón medio	H&E., Frotis. Necrosis e inflamación cardiomiocítica	IHQ, seroneutralización	RT-PCR, PCR convencional	Cultivo celular	OIE
Síndrome ulcerante epizoótico ( <i>Aphanomyces invadans</i> )	Oomiceto	músculo	H&E. Granulomas micóticos e hifas	-	FISH, PCR, secuenciación	aislamiento del oomiceto	OIE
Infección por <i>Gyrodactylus salaris</i>	Ectoparásito	cuerpo entero, aletas	H&E., Frotis. Identificación del parásito	-	RT-PCR, PCR convencional	-	OIE

## **BIBLIOGRAFÍA**

Manual de las Pruebas de Diagnóstico para los Animales Acuáticos.

[Acceso en línea al Manual Acuático - OMSA - Organisation Mondiale de la Santé Animale \(woah.org\)](http://www.woah.org)

RASVE Red de Aleta Sanitaria Veterinaria

<https://www.mapa.gob.es/es/ganaderia/temas/sanidad-animal-higiene-ganadera/sanidad-animal/enfermedades/>

Guía Gesac 4. Técnicas Diagnósticas para las enfermedades relevantes: Gestión Sanitaria de la Acuicultura. Jacumar.

[https://www.mapa.gob.es/app/jacumar/recursos\\_informacion/Documentos/Publicaciones/232\\_guia\\_gesac\\_4\\_tecnicas\\_diagnosticas.pdf](https://www.mapa.gob.es/app/jacumar/recursos_informacion/Documentos/Publicaciones/232_guia_gesac_4_tecnicas_diagnosticas.pdf)

Patología en Acuicultura, J. Espinosa de los Monteros U. Labarta (editores). Plan de Formación de Técnicos Superiores en Acuicultura (FEUGA) 1988

MATERIAL NO OFICIAL

**MATERIAL PARA LA PREPARACIÓN DEL TEMA 72**

**PREVENCIÓN Y CONTROL DE ENFERMEDADES EN CRUSTÁCEOS Y  
MOLUSCOS. MARCO LEGAL. DIAGNÓSTICO DE LABORATORIO.**

*Este material no tiene carácter oficial, por lo que en ningún caso vinculará al Tribunal Calificador. Constituye, únicamente, un instrumento complementario que servirá de apoyo al opositor para enfocar cada uno de los epígrafes, pero nunca de forma exclusiva ni excluyente. El Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación no se hace responsable del contenido del mismo.*

*Los materiales no serán objeto de actualización constante.*

## ÍNDICE

### 1. PREVENCIÓN Y CONTROL DE ENFERMEDADES DE CRUSTÁCEOS Y MOLUSCOS

#### 1.1. INTRODUCCIÓN

#### 1.2. ENFERMEDADES DE CRUSTÁCEOS DE RELEVANCIA PARA LA SANIDAD ANIMAL

1.2.1. Enfermedad de las Manchas Blancas

1.2.2. Síndrome de Taura

1.2.3. Enfermedad de la Cabeza Amarilla

#### 1.3. ENFERMEDADES DE MOLUSCOS DE RELEVANCIA PARA LA SANIDAD ANIMAL

1.4.1. Infección por *Mikrocytos mackini*

1.4.2. *Perkinsosis* (Infección por *Perkinsus olseni*/ *Perkinsus marinus*)

1.4.3. *Bonamiosis* (Infección por Infección por *Bonamia exitosa* / *Bonamia ostreae*)

1.4.4. *Marteiliosis* (Infección por *Marteilia refringes*)

### 2. MARCO LEGAL

#### 2.1. ENF. OBJETO DE CONTROL, NOTIFICACIÓN Y DECLARACIÓN OBLIGATORIA

2.1.1. Internacional

2.1.2. Europeo

2.1.3. Nacional

#### 2.2. PROGRAMAS DE VIGILANCIA

#### 2.3. SITUACIÓN DE LA ENFERMEDAD Y CATEGORIZACIÓN SANITARIA

### 3. DIAGNÓSTICO DE LABORATORIO

3.1. MUESTRAS DE ELECCIÓN

3.2. MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO

## 1. PREVENCIÓN Y CONTROL DE ENFERMEDADES DE CRUSTÁCEOS Y MOLUSCOS

### 1.1. INTRODUCCIÓN

La producción de la acuicultura mundial ha alcanzado recientemente cifras muy elevadas y gran parte de esta producción pertenece al cultivo de moluscos bivalvos.

Uno de los principales retos a los que se enfrenta acuicultura es la prevención y el control de las enfermedades; aunque los cultivos extensivos, aquellos que mantienen una baja densidad de organismos en el cultivo, son menos susceptibles a las enfermedades, en ocasiones éstas se producen, pero sobre todo son los cultivos intensivos, con elevadas densidades de organismos, que en principio están orientados a generar un mayor beneficio económico, están mucho más expuestos a la aparición y desarrollo de diferentes enfermedades como consecuencia del aumento en las densidades y el estrés generado que facilita la transmisión del agente patógeno.

La vía habitual de entrada de las enfermedades infecciosas es la introducción de individuos portadores del agente patógeno, por lo que para minimizar los riesgos de introducir una enfermedad infecciosa en una zona libre de dicha enfermedad es aconsejable limitar las introducciones de individuos de otras zonas a los casos en que sea estrictamente necesario y, en caso de realizarlas, ha de hacerse con un control riguroso para impedir la entrada de individuos portadores del agente infeccioso.

**Los crustáceos** (del latín *costra* que significa “corteza”) **son artrópodos que poseen un exoesqueleto articulado**, como todos los artrópodos, los crustáceos son animales invertebrados. **La mayoría son especies acuáticas** y pueden vivir en agua salada (como el krill), en agua dulce (como el cangrejo de río) o incluso pueden vivir en ambos tipos de agua (como el camarón). En menor escala, se encuentran los crustáceos terrestres como la cochinilla.

**Los moluscos son un grupo de invertebrados** que constituyen uno de los filos más importantes y con mayor número de especies dentro del **reino animal**. Dentro de los diferentes tipos son **los moluscos bivalvos los** que concentran el mayor interés para la acuicultura.

Las enfermedades de crustáceos y moluscos pueden ser causadas por una gran variedad de agentes patógenos como virus, bacterias como las vibriosis, parásitos, metazoos etc. (Tabla1); por otro lado también pueden desarrollar enfermedades neoplásicas y ser susceptibles a diferentes biotoxinas, contaminantes ambientales o factores ambientales (variaciones en temperatura del agua y salinidad).

**Tabla 1. Agentes patógenos de las enfermedades de crustáceos y moluscos**

Agente patógeno	Enfermedades de crustáceos	Enfermedades de moluscos
Virus	Enfermedad de la Mancha Blanca	Birnavirus, Reovirus
	Enfermedad de la Cabeza Amarilla	Picornavirus, Retrovirus
	Síndrome de Taura...	Herpesvirus, Iridovirus.....
Bacterias	Vibriosis Sistémica	Vibriosis
	Erosión bacteriana del caparazón	Enfermedad del anillo marrón
	Síndrome de Zoea II....	Nocardiosis.....
Parásitos	Gregarinas, Microsporidios	Protozoos, Coccidios
	Haplosporidios, Metazoos, Protozoos....	Haplosporidios.....
Hongos	Micosis larvaria,	Enfermedad del micelio
	Fusariosis (enfermedad de las branquias negras)....	Enfermedad de la concha.....

## 1.2. ENFERMEDADES DE CRUSTÁCEOS DE RELEVANCIA PARA SANIDAD ANIMAL

Dentro de los crustáceos, las enfermedades de los camarones/langostinos, empleadas para cultivo, la **enfermedad de la Mancha Blanca**, **El Síndrome de Taura** y la **Enfermedad de la cabeza Amarilla**, son las que más extensamente han sido estudiadas y sobre las cuáles se ejerce una mayor vigilancia y control (Tabla 2).

### 1.2.1. Enfermedad de las Manchas Blancas

Es una infección causada por un el **virus de doble cadena de ADN**, el virus del síndrome de las manchas blancas (VSMB), que pertenece al **género *Whispovirus*, familia *Nimaviridae***.

Se ha notificado la infección por el VSMB en crustáceos de China, Japón, Corea, el sudeste asiático, el sur de Asia, el continente indio, el Mediterráneo, Oriente Medio y América.

El virus puede infectar a gran variedad de crustáceos acuáticos, sobre todo **decápodos**, como camarones marinos, de aguas salobres y de aguas dulces, así como a cangrejos y cangrejos de río y langostas.

El virus se puede transmitir de forma directa entre hospedadores todos los estadios de vida pueden llegar a ser susceptibles, desde los huevos a los reproductores desembocando a menudo en una alta mortalidad.

El signo clínico más frecuente son unas manchas blancas incluidas en el exoesqueleto.

Los principales tejidos diana son de origen embrionario ectodérmico y mesodérmico, especialmente el epitelio cuticular y los tejidos conjuntivos.

### 1.2.2. Síndrome de Taura (VTS)

Es una infección causada por un virus de **ARN monocatenario**, que pertenece a la familia ***Dicistroviridae*** y al género ***Aparavirus***.

Se han documentado al menos cuatro genotipos (cepas) en base a la secuencia génica que codifica la VP1, la proteína estructural más grande y presuntamente dominante de entre las tres principales proteínas del virus. Según las variaciones en la secuencia de la VP1, estos grupos genotípicos son los siguientes: el grupo de las Américas; el grupo del sureste asiático; el grupo de Belice; y el grupo de Venezuela.

El virus está ampliamente distribuido en las regiones de cultivo de camarón de las Américas y el sudeste asiático.

Todos los estadios de vida postlarvarios de *Penaeus vannamei* y poblaciones de otras especies que se sabe que son susceptibles: camarón resbaloso (*Metapenaeus ensis*), camarón blanco (*P. aztecus*), langostino jumbo (*P. monodon*), camarón blanco norteño (*P. setiferus*), camarón azul (*P. stylirostris*).

El virus infecta tejidos de origen ectodérmico y mesodérmico. El principal tejido afectado en la fase aguda de la infección es el epitelio de la cutícula. En las infecciones crónicas, el principal tejido afectado es el órgano Linfoide.

Consta de tres fases distintas:

- **Fase Aguda:** los camarones tienen una **coloración rojiza pálida general con el abanico de la cola y pleópodos que aparecen hiperpigmentados (rojos)** debido a la expansión de cromatóforos. Por lo general, la cutícula es suave y el intestino está vacío e infectado. Los camarones moribundos se acumulan en el estanque superficies y bordes. Durante los brotes, se pueden ver aves alimentándose de moribundos camarón.
- **Fase de Transición (recuperación):** los camarones exhiben formas aleatorias, multifocales e irregulares **presentan lesiones cuticulares melanizadas**. Estas manchas son agregaciones hemocíticas. Estos camarones pueden o no tener cutícula suave y expansión del cromatóforo rojo, y pueden alimentarse y comportarse normalmente.
- **Fase Crónica:** después de mudar con éxito, los camarones pasan a la fase crónica en el que los animales **no muestran signos evidentes de enfermedad**. Camarones crónicamente infectados Sin embargo, puede ser menos resistente a los factores estresantes ambientales normales que los no infectados camarones y parecen convertirse en portadores persistentes.

### 1.2.3. Enfermedad de la Cabeza Amarilla

La enfermedad causada por el agente patógeno **genotipo 1 del virus** monocatenario de **ARN** de la enfermedad de la cabeza amarilla (VECA1), que pertenece **al género *Okavirus* y a la Familia *Roniviridae***.

El VECA1 se ha notificado en Taipei chino, Indonesia, Malasia, Filipinas, Sri Lanka, Tailandia, Vietnam y México.

Las especies que cumplen los criterios para ser consideradas susceptibles a la infección por el son: el camarón azul (*P. stylirostris*), el camarón carpintero (*Palaemonetes pugio*), el langostino jumbo (*P. monodon*), el camarón jinga (*Metapenaeus affinis*) y el camarón patiblanco (*P. vannamei*).

Los camarones moribundos pueden exhibir una apariencia general blanqueada y un color amarillento, decoloración del cefalotórax causada por el hepatopáncreas amarillo subyacente, que puede ser excepcionalmente suave en comparación con el hepatopáncreas marrón de camarones normales.

Los tejidos diana del VECA1, que son de origen ectodérmico y mesodérmico, son el órgano linfóide, los hemocitos, y branquias.

**Tabla 2. Principales enfermedades de crustáceos objeto de vigilancia y control**

Enfermedades de crustáceos	Agente etiológico	Genoma	Familia	Género	especies susceptibles	Distribución geográfica	Transmisión	Sintomatología	Órganos diana
Enfermedad de la Mancha Blanca	virus	ADN	Nimaviridae	Whispovirus	Todos los Decápodos	China, Japón, sudeste asiático, India, Mediterráneo, Oriente Medio, América	Horizontal	manchas blancas incluidas en el exoesqueleto	epitelio cuticular y tejidos conjuntivos
Síndrome de Taura	virus	ARN	Dicistroviridae	Aparavirus	camarón resbaloso ( <i>Metapenaeus ensis</i> ) camarón blanco ( <i>Penaeus aztecus</i> ) langostino jumbo ( <i>P. monodon</i> ) camarón blanco norteño ( <i>P. setiferus</i> ) camarón azul ( <i>P. stylirostris</i> ) camarón patiblanco ( <i>P. vannamei</i> )	América, Sudeste asiático	Horizontal	Fase aguda Fase de transición Fase Crónica	Tejido ectodérmico y mesodérmico. Epitelio cuticular. Órgano linfóide
Enfermedad de la Cabeza Amarilla	virus	ARN	Roniviridae	Okavirus	camarón azul ( <i>P. stylirostris</i> ) camarón carpintero ( <i>Palaemonetes pugio</i> ) langostino jumbo ( <i>P. monodon</i> ) camarón jinga ( <i>Metapenaeus affinis</i> ) camarón patiblanco ( <i>P. vannamei</i> ).	Taipei chino, Indonesia, Malasia, Filipinas, Sri Lanka, Tailandia, Vietnam, México.	Horizontal	coloración blanquecina y amarillenta	órgano linfóide, los hemocitos, y branquias

### 1.3. ENFERMEDADES DE MOLUSCOS DE RELEVANCIA PARA SANIDAD ANIMAL

A continuación se describen las principales enfermedades objeto de vigilancia y control en la Unión Europea (Tabla 3).

#### 1.4.1. Mikrocitosis (Infección por *Mikrocytos mackini*)

Está causada por un protozoo, *Mikrocytos mackini* es un parásito intracelular unicelular que infecta a varias especies de ostras. Provoca la enfermedad de la isla Denman en las ostras. Este parásito fue detectado por primera vez en 1960 en asociación con eventos de mortalidad en ostras del Pacífico (*Crassostrea gigas*) en la costa del Pacífico de Canadá (Isla Denman). Este parásito no ha sido detectado en Europa.

La susceptibilidad a esta enfermedad aumenta con la edad de la ostra. La prevalencia de la infección parece estar relacionada con una temperatura del agua inferior a 10°C. Este parásito se transmite directamente entre ostras a través del agua de mar.

Las principales especies susceptibles de ostras son: ostra oriental, ostra Olympia, ostra Kumamoto, ostra europea plana, ostra del Pacífico.

Los signos clínicos son inespecíficos, con pústulas, abscesos o variación en la coloración de los órganos es observada en individuos gravemente afectados. Los parásitos intracelulares están presentes en las células del tejido conjuntivo.

#### **1.4.2. Perkinsosis (Infección *Perkinsus olseni*/*Perkinsus marinus*)**

La infección por *Perkinsus spp.*, constituye una de las más importantes enfermedades conocidas de moluscos bivalvos marinos. El género está presente en América, África, Europa, Asia y Oceanía y algunas de sus especies ocasionan mortandades masivas. Ha sido detectado en varias especies de moluscos como abulón, ostras, almejas, vieiras.

Se trata de un **protozoo** que provoca una intensa reacción hemocitaria que altera la estructura tisular y afecta a la funcionalidad de órganos como las branquias.

La proliferación del parásito en los tejidos del hospedador, es a través de un tipo celular trofozoito; al morir el hospedador, los trofozoítos se transforman en hipnoesporas y estas, cuando se transfieren al agua de mar, entran en un proceso de zoosporulación que conduce a la liberación de zoosporas móviles. Trofozoítos, hipnoesporas y zoosporas son capaces de iniciar una infección en un hospedador sano.

Existen varias especies dentro del género las que presentan especial relevancia son:

##### ***P. marinus* y *P. olseni*:**

##### ***Perkinsus marinus*:**

Es un parásito unicelular parcialmente intracelular que infecta a varias especies **de ostras (*Crassostrea virginica*, *C. gigas*, *C. ariakensis*)**. Este parásito, detectado en Estados Unidos de América por primera vez en 1946, se ha asociado con eventos de mortalidad masiva en la ostra oriental (*Crassostrea virginica*). Esta especie, *P. marinus*, no ha sido detectada en Europa.

La prevalencia de la infección parece depender de la temperatura del agua y salinidad. Este parásito se transmite directamente entre ostras a través del agua de mar.

Los signos clínicos son inespecíficos, con glándula digestiva pálida, encogimiento del manto, presencia ocasional de bolsas de pus.

##### ***Perkinsus olseni*:**

Por su distribución y prevalencia uno de los principales agentes patógenos de **las almejas de litoral suratlántico (*Ruditapes decussatus* y *R. philippinarum*)**, ha sido detectado en Australia, Nueva Zelanda, Corea, China, Japón, Francia, Portugal, España, Italia.

Parásito presente en el tejido conjuntivo y células epiteliales, produce nódulos en el manto, músculo, branquias, glándula digestiva.

### 1.4.3. Bonamiosis

El agente patógeno es un **protozoo Bonamia spp., parásito unicelular** de células sanguíneas, aunque también se puede encontrar en estado libre. Los signos clínicos son generalmente inespecíficos, pero pueden ocurrir lesiones en las branquias y tejidos cardiacos. Este parásito se transmite directamente entre ostras a través del agua de mar.

Existen dos especies de importancia: ***Bonamia ostreae* y *Bonamia exitosa***.

#### Infección por *Bonamia ostreae*

Es responsable de mortalidades en la **ostra plana (*Ostrea edulis*)** en toda Europa desde 1980. Este parásito se puede observar en todas las etapas de vida de la ostra plana, incluyendo larvas, larvas y adultos mayores de 1 año; sin embargo, las ostras adultas son más susceptibles a esta enfermedad. La prevalencia de la bonamiosis puede alcanzar su punto máximo al final del invierno.

#### Infección por *Bonamia exitosa*

Este parásito fue primero detectado en 1985 en Nueva Zelanda en asociación con la mortalidad masiva de la **Ostra plana chilena (*Ostrea chilensis*)**. Este parásito fue detectado por primera vez en Europa (España) en 2007 ostra plana (*Ostrea edulis*), y posteriormente en otros países europeos.

### 1.4.4. Marteiliosis (Infección por *Marteilia refringens*)

Es un **protozoo parásito unicelular** que infecta principalmente el epitelio del tracto digestivo en moluscos bivalvos. La primera detección de éste parásito (Francia 1967) se asoció con la mortalidad masiva de la **ostra plana (*Ostrea edulis*)** en Bretaña (noroeste de Francia).

La marteiliosis es una enfermedad estacional cuya transmisión parece depender sobre la temperatura.

Este parásito no puede transmitirse directamente entre moluscos bivalvos. La transmisión de la enfermedad parece requerir la infección de un huésped intermedio: se sospecha que un copépodo planctónico (*Paracartia grani*), puede albergar las etapas intermedias de desarrollo de *Marteilia refringens*.

Hay dos tipos de *Marteilia refringens*: **el tipo O**, detectado con mayor frecuencia **en las ostras**, y **el tipo M**, detectado con más frecuencia **en los mejillones**. Estudios recientes sugieren que esos dos tipos corresponden a especies distintas.

**Tabla 3. Principales enfermedades de moluscos objeto de vigilancia y control**

Enfermedades de moluscos	Agente etiológico	Género	Especie	especies susceptibles	Distribución geográfica	Transmisión	Sintomatología	Órganos diana
Mycrocitosis	Protozoo	<i>Mikrocytos spp.</i>	<i>Mikrocytos mackini</i>	<b>Ostras</b> ( <i>Crassostrea gigas</i> , <i>C. virginica</i> , <i>Ostrea edulis</i> , <i>Ostrea conchaphila</i> )	Canadá y USA	Directa	inespecíficos	Pústulas, abscesos, variación en la coloración de los órganos, células del tejido conjuntivo.
Perkinsosis	Protozoo	<i>Perkinsus spp.</i>	<i>Perkinsus marinus</i>	<b>Ostras</b> ( <i>Crassostrea virginica</i> , <i>C. gigas</i> , <i>C. ariakensis</i> )	USA	Directa	inespecíficos	Glándula digestiva pálida, encogimiento del manto, bolsas de pus
			<i>Perkinsus olseni</i> (=P. atlanticus)	<b>Almejas</b> ( <i>Ruditapes decussatus</i> y <i>R. philippinarum</i> ),	Australia, Nueva Zelanda, Corea, China, Japón, Francia, Portugal, España, Italia	Directa	inespecíficos	Tejido conjuntivo y células epiteliales, nódulos en el manto, músculo, branquias, glándula digestiva.
Bonamiosis	Protozoo	<i>Bonamia spp.</i>	<i>Bonamia ostreae</i>	<b>Ostrea edulis</b> , <i>O. Conchaphila</i> , <i>O. Angasi</i> , <i>O. Puelchana</i> , <i>Tiostrea chilensis</i>	Dinamarca, Holanda, Francia, Gran Bretaña, Italia, España, USA	Directa	inespecíficos	hemocitos de ostra (=> todos los tejidos pueden ser invadidos)
			<i>Bonamia exitiosa</i>	<i>Ostrea angasi</i> , <b>Ostrea chilensis</b> , <i>Ostrea edulis</i>	Australia, Nueva Zelanda, Tasmania, España (en 2007)	Desconocida	inespecíficos	hemocitos de ostra (=> todos los tejidos pueden ser invadidos)
Marteiliosis	Protozoo	<i>Marteilia spp.</i>	<i>Marteilia refringens</i>	<i>Ostrea edulis</i> , <i>Tiostrea chilensis</i> , <i>O. angasi</i> , <i>Mytilus edulis</i> (mejillón)	Francia, Portugal, España	copépodo ( <i>Paracartia granito</i> )	inespecíficos	Glándula digestiva

## 2. MARCO LEGAL

Existe un marco reglamentario a nivel internacional, en la Unión Europea y nacional que aplica a las enfermedades de los crustáceos y moluscos en lo que concierne al establecimiento de sistemas de vigilancia, control y a la obligación de la notificación de determinadas enfermedades (Tabla 4).

### 2.1. ENFERMEDADES OBJETO DE CONTROL, NOTIFICACIÓN Y DECLARACIÓN OBLIGATORIA

#### 2.1.1. Internacional

Las enfermedades de los crustáceos y moluscos están inscritas en la **lista del Código Sanitario para los Animales Acuáticos de la Organización Mundial de la Sanidad Animal (OIE)** y los Países y Territorios Miembros tienen la **obligación de notificar** los brotes conforme al **Código Sanitario para los Animales Terrestres** de la OIE, a **través del Sistema mundial de información zoonosanitaria (WAHIS)** o por fax o correo electrónico en el plazo de 24 horas.

#### 2.1.2. Unión Europea

La legislación europea que aplica a las enfermedades de los crustáceos y moluscos es:

- **En material de control de las enfermedades:**

**El Reglamento (UE) 2016/429** establece normas para la prevención y el control de las enfermedades transmisibles a los animales o a las personas, incluidas normas de priorización y **categorización de enfermedades incluidas en la lista que son motivo de preocupación en toda la Unión.**

**El Reglamento de Ejecución (UE) 2018/1882** de la Comisión de 3 de diciembre de 2018 relativo a la aplicación de determinadas normas de prevención y control **a categorías de enfermedades enumeradas en la lista y por el que se establece una lista de especies y grupos de especies que suponen un riesgo considerable para la propagación de dichas enfermedades de la lista así como la categorización (A, B, C, D, E) a la que pertenecen.**

- **En materia de notificación y declaración obligatoria:**

**El Reglamento de Ejecución (UE) 2020/2002 de la Comisión de 7 de diciembre de 2020** por el que se establecen normas de desarrollo del Reglamento (UE) 2016/429 del Parlamento Europeo y del Consejo **relativas a la notificación a la Unión y al envío de informes a la Unión sobre enfermedades que serán presentados electrónicamente a través del sistema ADIS.**

### **2.1.3. Nacional**

La norma de mayor rango en materia de sanidad animal la constituye **la Ley 8/2003**, de 24 de abril, de Sanidad Animal, existiendo normativa de menor rango constituida por Reales Decretos que tratan sobre la declaración obligatoria de las enfermedades o la creación del Sistema de Alerta de Sanidad Veterinaria, así como normativa específica para diferentes enfermedades. En aquello que concierne a las enfermedades de los peces, se encuentra:

La normativa nacional básica es el Real Decreto 1614/2008, que es la trasposición de la Directiva 2006/88/CE por la que se establecen los requisitos zoonos sanitarios de los animales acuáticos y de los productos de la acuicultura, y la prevención y el control de determinadas enfermedades de los animales acuáticos.

**ACTUALMENTE la normativa de aplicación es la normativa comunitaria** ya que la Directiva 2006/88/CE está derogada por el Reglamento (UE) 2016/429, por lo que el RD 1614/2008 está en REVISIÓN para adaptarse a esta nueva normativa.

**Real Decreto 526/2014, de 20 de junio**, por el que se establece la lista de las enfermedades de los animales **de declaración obligatoria y se regula su notificación.**

### **2.4. Autonómico**

Cada CC.AA. podrá establecer dentro de su ámbito de competencia la normativa adecuada para la transposición y cumplimiento de la normativa europea y nacional.

**Tabla 4. Enfermedades de crustáceos y moluscos objeto de control declaración y notificación**

Enfermedades de los moluscos y crustáceos	INTER NACIONAL	UNIÓN EUROPEA			NACIONAL
	OIE	Reglamento (UE) 429/2016	Reglamento Ejecución (UE) 2018/1882	Reglamento Ejecución (UE) 2020/2002	Real Decreto 526/2014 EDO Anexo 1 (lista A1 y lista B OIE)
<b>Enfermedades de los moluscos</b>					
Infección por <i>Mikrocytos mackini</i>	-	X	X (A+D+E)	X	X
Infección por <i>Perkinsus marinus</i>	X	X	X (A+D+E)	X	X
Infección por <i>Perkinsus olseni</i>	X	-	-	-	X
Infección por <i>Bonamia exitiosa</i>	X	X	X (C+D+E)	X	X
Infección por <i>Bonamia ostreae</i>	X	X	X (C+D+E)	X	X
Infección por <i>Martelia refringens</i>	X	X	X (C+D+E)	X	X
Herpesvirus del abalón	X	-	-	-	X
Síndrome del marchitamiento de las orejas de mar ( <i>Xenohaliotis californiensis</i> )	X	-	-	-	X
<b>Enfermedades de los crustáceos</b>					
Síndrome de Taura	X	X	X (A+D+E)	X	X
Enfermedad de la cabeza amarilla (genotipo 1 )	X	X	X (A+D+E)	X	X
Enfermedad de las manchas blancas	X	X	X (C+D+E)	X	X
Necrosis Hepatopancreática Aguda	X	-	-	-	X
Aphanomyces astaci (plaga del cangrejo de río)	X	-	-	-	X
<i>Nodavirus (Macrobrachium rosenbergii)</i> (enfermedad de la cola blanca)	X	-	-	-	X
Mionecrosis Infecciosa	X	-	-	-	X
Necrosis Hipodérmica y Hematopoyética Infecciosa	X	-	-	-	X
Virus Iridiscente de los Decápodos tipo 1	X	-	-	-	X
Hepatopancreatitis necrotizante ( <i>Hepatobacter penaei</i> )	X	-	-	-	X

## 2.2. PROGRAMAS DE VIGILANCIA

### 2.2.1 EUROPEO

En el Reglamento (UE) 2016/429, se establece que debe llevarse a cabo la siguiente vigilancia:

- **Vigilancia pasiva**

Sobre la base de la **notificación inmediata** a la autoridad competente en caso de **mortalidades anormales** en animales de acuicultura, cualquier motivo para **sospechar la presencia de una enfermedad de la lista** o la presencia de dicha enfermedad **se confirma** en animales acuáticos.

- **Vigilancia basada en el riesgo**

Una vigilancia zoonositaria **basada en el riesgo** en establecimientos de acuicultura y grupos de establecimientos de acuicultura podrá combinarse con **visitas sanitarias y toma de muestras** que se lleven a cabo como parte de los **programas de erradicación obligatorios u opcionales** de una o más **enfermedades de la lista**; o para demostrar y **mantener el estado libre de enfermedad** para una o más enfermedades enumeradas; o **como parte de un programa de vigilancia para una o más enfermedades de categoría C**.

En base a esto, han sido desarrollados varios reglamentos que complementan al 2016/429:

- **El Reglamento Delegado (UE) 2020/689** de la Comisión, de 17 de diciembre de 2019, referente a **las normas de vigilancia, los programas de erradicación y el estatus de libre de enfermedad con respecto a determinadas enfermedades de la lista y enfermedades emergentes.**

Concretamente el **ANEXO VI** establece los Requisitos específicos relativos a las enfermedades de animales acuáticos y los métodos de diagnóstico para la infección por ***Marteilia refringes*, por *Bonamia ostreae* y *exitiosa* y para la infección por el virus de las manchas blancas.**

- **El Reglamento (UE) 2017/625 relativo a los controles y otras actividades oficiales** realizados para garantizar la aplicación de la legislación sobre alimentos y piensos, y de las normas sobre salud y bienestar de los animales, sanidad vegetal y productos fitosanitarios, donde se establecen las directrices para:
  - La realización de los controles oficiales y otras actividades oficiales por parte de las autoridades competentes de los Estados miembros.
  - Los métodos utilizados para el muestreo, los análisis, los ensayos y los diagnósticos.

### 2.2.2. NACIONAL

A nivel nacional, el MAPA a través de la Subdirección General de Sanidad, Higiene Animal y Trazabilidad (SGSHAT) de la Producción Agraria, tiene establecido un **Programa Nacional para verificar el cumplimiento de la normativa en materia de sanidad de los animales y productos de la acuicultura** cuyo objeto es:

**El objetivo es la planificación y la organización de las actividades de control oficial para:**

- Velar por la sanidad de los animales de la acuicultura.
- Evitar la difusión de las enfermedades que le afectan.
- Proteger el normal funcionamiento de los mercados.
- Evitar que las enfermedades de los animales de la acuicultura puedan suponer un riesgo para la sanidad de las poblaciones silvestres y viceversa.

### 2.2.3. AUTONÓMICO

**El Programa Nacional anteriormente citado será ejecutado** por parte de las autoridades competentes (AACC) de las Comunidades Autónomas (CCAA) en materia **de sanidad**, realizando.

- La elaboración, ejecución y desarrollo del Plan de controles de carácter autonómico.

- La coordinación, seguimiento, verificación y supervisión en sus respectivos ámbitos territoriales de la ejecución del Plan autonómico correspondiente.
- La aprobación y ejecución de las medidas correctoras de carácter autonómico.

### 2.3. SITUACIÓN DE LA ENFERMEDAD Y CATEGORIZACIÓN SANITARIA

Las explotaciones y zonas de cría de moluscos y crustáceos se clasifican en función de su situación sanitaria en las siguientes categorías (Tabla 5.):

- **Categoría libre de enfermedad:** Explotación calificada como libre de determinadas enfermedades. A su vez estas explotaciones se podrán diferenciar por la existencia o ausencia de las especies sensibles para una determinada enfermedad.
- **Categoría Programa de erradicación:** Explotación no calificada como libre de enfermedades pero con programa de erradicación aprobado.
- **Categoría No declarado libre pero no infectado:** Explotación sin infección conocida pero no sometida a un programa de erradicación para alcanzar la calificación de Libre de enfermedades.
- **Categoría Infectado:** Explotación declarada infectada, sujeta a medidas de control.

**Tabla 5. Categorización sanitaria para las enfermedades de los crustáceos y moluscos**

Enfermedades de animales acuáticos	Categorización Sanitaria			
	Categoría Libre de enfermedad	Categoría Programa de erradicación	Categoría No declarada libre pero no infectada	Categoría Infectada
<b>enfermedades de crustáceos</b>				
Enfermedad de la Mancha Blanca*	-	-	X	-
Enfermedad de la Cabeza Amarilla**	-	-	-	-
Síndrome de Taura**	-	-	-	-
<b>enfermedades de moluscos</b>				
<i>Mykrocitis mackini</i> **	-	-	-	-
<i>Perkinsus marinus</i> **	-	-	-	-
<i>Bonamia exitiosa</i>	-	-	X	-
<i>Bonamia ostreae</i>	-	-	X	-
<i>Marteilia refringes</i>	-	-	X	-
*Enfermedad no detectada en España en los últimos 10 años				
**Enfermedad no presente en España				

### 3. DIAGNÓSTICO DE LABORATORIO

#### 3.1. MUESTRAS DE ELECCIÓN

##### 3.1.1. Muestras de elección en las enfermedades de crustáceos

Se deben seleccionar aquellos **especímenes moribundos y dentro de los vivos los que muestren con lesiones representativas**. Los ejemplares deben ser representativos e incluir larvas, post-larvas, juveniles y adultos. Se pueden llevar a cabo pools de como máximo 5 ejemplares.

Se procederá la toma de muestras de cada individuo que incluirán **todos o los tejidos más representativos, incluyendo branquias, hepatopáncreas, órgano linfoide y pleópodos así como hemolinfa**. En el caso de individuos de pequeño tamaño, se podrán hacer pools de los mismos y procesar el animal entero.

##### 3.1.2. Muestra de elección en las enfermedades de moluscos

Para optimizar la posibilidad de detectar patógenos, es recomendable seleccionar aquellos individuos que:

- **Todavía vivos**, pero con dificultades para cerrar sus caparazones.
- Los animales que tengan una **tendencia a subir a la superficie**.

Se deben recolectar al menos 30 individuos. Si los animales muestreados tienen un tamaño < 1,5 cm, el tamaño de la muestra debe incrementarse a por lo menos 70 individuos.

Una vez muestreados, los moluscos deben mantenerse a 0-8 °C, idealmente no más de 24 horas, y en cualquier caso no más de 72 horas antes del análisis.

Se procederá la toma de muestras de cada individuo que incluirán **todos o los tejidos más representativos, incluyendo branquias, manto, músculo aductor y glándula digestiva así como hemolinfa**. En el caso de individuos de pequeño tamaño, se podrán hacer pools de los mismos y procesar el animal entero.

#### 3.2. MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO

Para aquellas enfermedades objeto de vigilancia de vigilancia, control y notificación, el diagnóstico se realiza siguiendo las directrices establecidas por:

- **La normativa de la Unión Europea (Reglamento (UE) 2017/625 relativo a los controles y otras actividades oficiales (art.34)**
- **Protocolos pertinentes internacionalmente reconocidos** como *El Manual de las Pruebas de Diagnóstico y de las Vacunas para los Animales Acuáticos* de la OIE y los aceptados por el Comité Europeo de Normalización (CEN).
- **Los protocolos y métodos del Laboratorio Europeo de Referencia (EURL).**

- **Los protocolos y métodos de los Laboratorios Nacionales de Referencia en caso de no existir las normas o protocolos pertinentes mencionados.**

El diagnóstico de las enfermedades de crustáceos y moluscos se lleva a cabo mediante técnicas **histológicas, inmunológicas, moleculares, hibridación in-situ, bacteriológicas, bioanálisis;** así por ejemplo podemos citar (Tabla 6):

- **Técnicas histológicas**

Para ello el tejido deber ser fijado previamente (fijador de Davidson's) e incluido en parafina y sobre cortes histológicos, se lleva a cabo la técnica de **Hematoxilina & eosina (H&E)** o **Hematoxilina & eosina de Mayer Bennett:**

- **Enfermedades de crustáceos** anteriormente citadas, para la identificación de las lesiones patognomónicas característica de cada enfermedad como por ejemplo:
  - En la **Enfermedad de la Mancha Blanca:** la presencia de cuerpos de inclusión desde eosinófilos a basófilos en núcleos hipertrofiados.
  - En el **Síndrome de Taura:** aumento del órgano linfoide con múltiples esferoides así como necrosis multifocal.
- **Enfermedades de moluscos** anteriormente citadas, para la **identificación morfológica del parásito** o posibles lesiones en los órganos, así como la reacción hemocitaria causada.
  - En el caso de la infección **por *Perkinsus spp.*, en moluscos,** se puede identificar la especie debido al **tamaño de los trofozoitos:**
    - **Los trofozoitos de *Perkinsus olseni*** varían de 2 a 40  $\mu\text{m}$  (generalmente de 3 a 15  $\mu\text{m}$ ) y se pueden visualizar fácilmente mediante histología como una célula redondeada con una gran vacuola y un núcleo desplazado excéntricamente (aspecto de "anillo de sello"). las células están con frecuencia encapsuladas por una capa gruesa de material eosinófilo procedente de la desgranulación de los hemocitos.
    - **Los trofozoitos de *Perkinsus marinus*** son células esféricas, de 2-10  $\mu\text{m}$  de diámetro (más pequeñas que *P. olseni*), con una vacuola grande y un núcleo desplazado excéntricamente.

La realización de **extensiones, citologías en fresco o preparaciones húmedas** de fragmentos de tejidos, con o sin el empleo de colorantes como azul Trypan, eosina Y, Giemsa, ayuda a un diagnóstico rápido en aquellos casos donde las lesiones son visibles (como pústulas) o en caso de sospecha de parásitos de moluscos, la identificación del mismo así como la identificación de las inclusiones o cuerpos de inclusión en las enfermedades de crustáceos.

**La técnica de Feulguen**, sirve de apoyo al diagnóstico histológico de las enfermedades de crustáceos, para la identificación al microscopio de las **inclusiones virales** presentes en el tejido, usada en histología para teñir selectivamente el **DNA** de las células que es hidrolizado mediante con ácido clorhídrico 1N, y posterior tinción con el reactivo de Schiff.

- **Técnicas inmunológicas**

Entre las que se encuentran las técnicas inmunoenzimáticas de Inmunohistoquímica, sobre el tejido fijado e incluido en parafina o sobre frotis mediante inmunofluorescencia y con el empleo de anticuerpos monoclonales específicas para cada enfermedad. En el caso del síndrome de Taura mediante el Ac MAb 1A1.

- **Técnicas moleculares**

Para la identificación del agente patógeno mediante el empleo de:

- **La PCR** (convencional o RT-PCR) para la identificación del genoma del agente patógeno. Las muestras objeto de estudio deben ser conservadas en etanol 95-100%
  - **En las enfermedades de crustáceos** anteriormente descritas, permiten la identificación del virus.
  - **En el caso de las enfermedades de moluscos anteriormente descritas**, permiten para la **identificación a nivel de especie del parásito** en cuestión así como la posterior **secuenciación parcial de su genoma, principalmente se emplean cebadores dirigidos a la región ITS (espaciador transcrito interno) del complejo génico de ARN ribosómico.**
- **Secuenciación**, los productos de la PCR deben ser secuenciados para confirmar e identificar la presencia del agente patógeno
- **Hibridación in Situ**, permite la identificación del parásito o virus en los tejidos del hospedador mediante el empleo de sondas específicas del genoma del parásito a identificar.

- **Bacteriológicas**

- **En las enfermedades de moluscos**, en concreto para la cuantificación de la infección por *Perkinsus spp.*: se lleva a cabo mediante la incubación de tejidos del hospedador **en caldo de tioglicolato, (Ray's Fluid Thioglycolate Medium (RFTM), método de referencia establecido por el laboratorio europeo de referencia.**

El cultivo de los tejidos hace que las células de *Perkinsus* se hinchen, posteriormente, tras la incubación se recogen fragmentos de tejidos y se trituran con un bisturí y se depositan en un portaobjetos, las secciones histológicas de tejidos cultivados con RFTM se tiñen con una solución acuosa de yodo (Lugol), se cubren con un cubre-objeto y se observan al microscopio óptico, **Las células de *Perkinsus spp.*, son esféricas y las paredes se tiñen de azul o de negro azulado. Las células de *Perkinsus*, pueden ser contados pero no se puede determinar la especie.**

- **En las enfermedades de crustáceos**, aunque se han ensayado varias, no hay disponibles líneas celulares de crustáceos que garanticen su efectiva aplicabilidad por su alto grado de contaminación

- **Método del Bioanálisis**

En las enfermedades de crustáceos se emplea para la **confirmación de la infección por el virus** mediante el bioanálisis de individuos SFP mediante la alimentación oral con fragmentos de tejidos crustáceos o por inyección intramuscular para posteriormente ser analizados para la detección de la enfermedad.

**Tabla 6. Métodos de diagnóstico de las enfermedades de crustáceos y moluscos**

Enfermedad	Agente etiológico	muestra	Método de laboratorio					Método de Diagnóstico	
			Histológicos	Inmunológicos	Moleculares	Bacteriológico	Bioanálisis		
CRUSTÁCEOS	Enfermedad de la Mancha Blanca	virus ADN	epitelio cuticular, tejido conjuntivo	Frotis, preparación húmeda. H&E Mayer Bennet. Felguen. Observación lesiones y cuerpos de inclusión	IHQ, IFI	PCR convencional, PCR en tiempo real, PCR nested. Hibridación <i>in-situ</i> . Secuenciación	no aplica	Confirmación de la infección por alimentación oral o inyección IM	OIE / Validado EURL
	Síndrome de Taura	virus ARN	Tejido ectodérmico y mesodérmico. Etpitelio cuticular. Órgano linfoide	Frotis, preparación húmeda. H&E Mayer Bennet. Observación lesiones y cuerpos de inclusión	IHQ, IFI	RT-PCR, Hibridación- <i>in situ</i> . Secuenciación	no aplica	Confirmación de la infección por alimentación oral o inyección IM	OIE
	Enfermedad de la Cabeza Amarilla	virus ARN	órgano linfoide, hemocitos, y branquias	Frotis, preparación húmeda. H&E Mayer Bennet. Observación lesiones y cuerpos de inclusión	inmunolectrofor esis	RT-PCR, Hibridación- <i>in situ</i> . Secuenciación	no aplica	Confirmación de la infección por alimentación oral o inyección IM	OIE
MOLUSCOS	Mycrocitosis	<i>M. mackini</i>	manto, músculo aductor y tejido con pústulas de color amarillo verdoso	<b>Frotis, H&amp;E:</b> pequeños organismos esféricos u ovoides intra o extraelular	No empleados para diagnóstico	PCR convencional, RT-PCR. Hibridación <i>in-situ</i>	no aplica	no aplica	Validado EURL
	Perkinsosis	<i>P. marinus</i> , <i>P. olseni</i>	glándula digestiva, branquia, manto y recto	<b>H&amp;E (<i>P. marinus</i>):</b> observación de lesiones y de células uninucleadas esféricas con una vacuola grande y un núcleo desplazado de forma excéntrica <b>H&amp;E (<i>P. olseni</i>):</b> observación de lesiones y de células esféricas y encapsuladas por una capa gruesa de material eosinófilo	No específicos: reacción cruzada con algunas especies de dinoflagelados No específicos: reacción cruzada con <i>P. marinus</i>	RT-PCR, Hibridación- <i>in situ</i> . Secuenciación	cultivo de tioglicolato líquido de Ray (RFTM)	no aplica	OIE / Validado EURL
	Bonamiosis	<i>B. ostreae</i> , <i>B. exitiosa</i>	branquias, el manto, la gónada, corazón y glándula digestiva	<b>Frotis, H&amp;E:</b> microorganismos esféricos u ovoides intra o extraelular	No empleados para diagnóstico	RT-PCR, PCR taqMan, PCR-RLP, Hibridación- <i>in situ</i> . Secuenciación	no aplica	no aplica	OIE / Validado EURL
	Martelliosis	<i>M. refringens</i>	Glándula digestiva	<b>Frotis, preparaciones húmedas, H&amp;E:</b> esporangios con gránulos refringentes	No empleados para diagnóstico	RT-PCR, PCR-RFLP, Hibridación- <i>in situ</i> . Secuenciación	no aplica	no aplica	OIE / Validado EURL

## **BIBLIOGRAFÍA**

Manual de las Pruebas de Diagnóstico para los Animales Acuáticos.

[Acceso en línea al Manual Acuático - OMSA - Organisation Mondiale de la Santé Animale \(woah.org\)](http://woah.org)

Red de Alerta sanitaria en Sanidad Animal. RASVE. Enfermedades de los animales. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación (MAPA).

<https://www.mapa.gob.es/es/ganaderia/temas/sanidad-animal-higiene-ganadera/sanidad-animal/enfermedades/>

Guía Técnica. Patología e Inmunología de Camarones Penaeidos. Morales, V. y J. Cuéllar-Anjel (eds.). 2008. Programa CYTED Red II-D Vannamei, Panamá

Enfermedades de moluscos bivalvos de interés en acuicultura. Figueras A y Novoa B. Fundación Observatorio Español de Acuicultura. Consejo Superior de Investigaciones Científicas. CSIC. 2011.

**MATERIAL PARA LA PREPARACIÓN DEL TEMA 73**

**ENFERMEDADES DE LAS ABEJAS. MARCO LEGAL. SISTEMA DE VIGILANCIA. DIAGNÓSTICO DE LABORATORIO.**

*Este material no tiene carácter oficial, por lo que en ningún caso vinculará al Tribunal Calificador. Constituye, únicamente, un instrumento complementario que servirá de apoyo al opositor para enfocar cada uno de los epígrafes, pero nunca de forma exclusiva ni excluyente. El Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación no se hace responsable del contenido del mismo.*

*Los materiales no serán objeto de actualización constante.*

## ÍNDICE

### 1. ENFERMEDADES DE LAS ABEJAS

#### 1.1. INTRODUCCIÓN

#### 1.2. ENFERMEDADES CAUSADAS POR BACTERIAS

1.2.1. Loque americana (*Paenibacillus larvae*)

1.2.2. Loque europea (*Melissococcus plutonius*)

#### 1.3. ENFERMEDADES CAUSADAS POR HONGOS (Microsporidios)

1.3.2. Nosemiosis (*Nosema apis* y *N. cerenae*)

#### 1.3. ENFERMEDADES CAUSADAS POR PARÁSITOS

1.3.1. Acarapisosis (*Acarapis woodi*)

1.3.2. Infestación por *Aethina tumida* (escarabajo de las colmenas)

1.3.3. Infestación por *Tropilaelaps* spp.

1.3.4. Varroosis (infestación por *Varroa* spp.)

#### 1.4. ENFERMEDADES CAUSADAS POR VIRUS

1.4.1. Virus de las alas deformadas (DWV)

1.4.2. Virus de la parálisis aguda (ABPV)

1.4.3. Virus de la parálisis crónica (CBPV)

### 2. MARCO LEGAL

#### 2.1. INTERNACIONAL

#### 2.2. EUROPEO

#### 2.3. NACIONAL

### 3. SISTEMA DE VIGILANCIA

#### 3.1. SISTEMA DE VIGILANCIA EUROPEO

#### 3.2. SISTEMA DE VIGILANCIA NACIONAL

#### 3.3. SISTEMA DE VIGILANCIA EN LAS CC.AA

### 4. DIAGNÓSTICO DE LABORATORIO

#### 4.1. MUESTRA DE ELECCIÓN

#### 4.2. MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO

## 1. ENFERMEDADES DE LAS ABEJAS

### 1.1. INTRODUCCIÓN

La apicultura reviste una gran importancia en el mundo, entre las diferentes de abejas que existen, las dos más importantes para la apicultura son la **abeja melífera occidental, *Apis mellifera***, y la **abeja melífera oriental, *Apis cerana***; su actividad polinizadora resulta fundamental para la reproducción de las plantas y los cultivos.

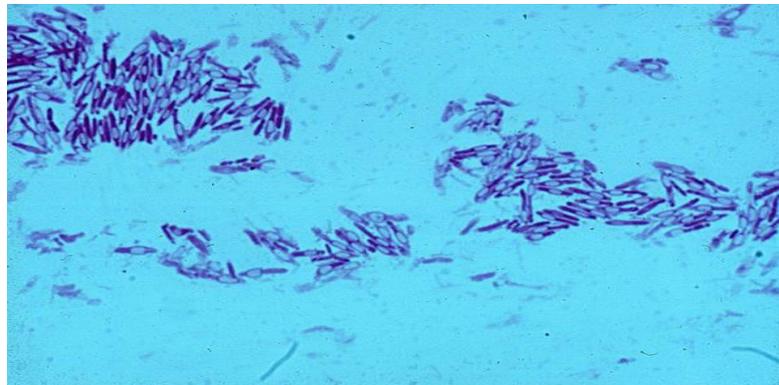
Las abejas, al igual que los animales, son sensibles a las bacterias, virus y parásitos. Aunque ninguna enfermedad de las abejas es zoonótica para el ser humano. Muchas de las enfermedades que afectan a las abejas, han sido relacionadas con pérdidas de colmenas en todo el mundo con el consiguiente impacto a nivel económico en el sector productivo. A continuación se describen las principales enfermedades de las abejas melíferas objeto de vigilancia y control (Tabla 1).

### 1.2. ENFERMEDADES CAUSADAS POR BACTERIAS

#### 1.2.1. Loque americana

Enfermedad que afecta a la larva de la abeja de miel *Apis mellifera* y de otras especies de *Apis*, está distribuida en todas las zonas del mundo donde se crían tales abejas. El agente causante, *Paenibacillus larvae*, es una bacteria gram positiva que puede producir más de mil millones de esporas en cada larva infectada. La bacteria mata las larvas en las celdillas de cría. Se transmite por las esporas bacterianas que se forman en las larvas infectadas. Las esporas, extremadamente termoestables y resistentes a las sustancias químicas, diseminan la enfermedad por traslado de la cera, de las reinas, intercambio de panales o de miel contaminada.

Se han identificado cuatro genotipos distintos (ERIC I, II, III and IV) que difieren en la morfología de la colonia y de las esporas, en el metabolismo de las fuentes de carbono y en su virulencia.



### 1.2.2. Loque europea

Causada por la bacteria *Melissococcus plutonius*, ha sido detectada en Norteamérica, Sudamérica, Oriente Medio y Asia. Al igual que la Loque americana, las bacterias de la Loque europea **matan las larvas dejando** vacías las celdillas del panal. Las larvas de las abejas afectadas por esta enfermedad normalmente mueren 1–2 días antes de ser operculadas en sus celdas, o poco tiempo después, y siempre antes de transformarse en crisálidas. La enfermedad se transmite por contaminación mecánica de los panales y tiende, por tanto, a persistir año tras año. También puede ser transmitida por las abejas que sobreviven a una infección en la fase larval y diseminan las bacterias en las deyecciones.

## 1.3. ENFERMEDADES CAUSADAS POR HONGOS (Microsporidios)

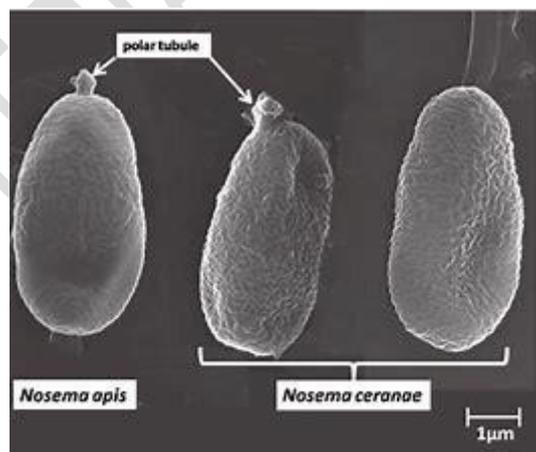
### 1.3.2. Nosemiosis

Los microsporidios *Nosema apis* y *N. ceranae*, invaden las células epiteliales del ventrículo de las **abejas adultas**, con una amplia distribución en todo el mundo. Gracias a las pruebas moleculares, se ha podido incluir a los microsporidios en el grupo de los Hongos.

***Nosema apis* es un parásito de la abeja europea (*Apis mellifera*) y *Nosema ceranae* lo es de la abeja asiática (*Apis cerana*) y de la abeja europea.**

Ambos causan infección cruzada entre las especies hospedadoras. *Nosema ceranae* se ha detectado recientemente en varias poblaciones de abejas europeas geográficamente separadas en Europa, Sudamérica, Norteamérica y Asia.

La infección se produce por la entrada de las esporas durante la alimentación, por la trofalaxis o la limpieza. Las esporas son expulsadas con las heces, aunque la importancia relativa de las heces, la miel y los cadáveres como reservorios de las esporas infectivas no se conoce del todo.



## 1.3. ENFERMEDADES CAUSADAS POR PARÁSITOS

### 1.3.1. Acarapisosis

La acarapisosis, acariosis o enfermedad acarina es una enfermedad de la **abeja adulta** de la miel *Apis mellifera* y de otras especies de *Apis*. Está causada por el ácaro Tarsonémido ***Acarapis woodi*** (Rennie), conocido como ácaro traqueal. Es un parásito interno del sistema

respiratorio, que vive y se reproduce sobre todo en la tráquea protorácica de la abeja y se alimenta de la hemolinfa de su hospedador.

La acarapisosis, descubierta en Gran Bretaña, fue confundida con la enfermedad de la isla de Wight, hasta que en el año 1921 Rennie precisó su etiología.

La enfermedad fue diagnosticada en el continente europeo en los años 20, en centroeuropa y años más tarde en España, hoy está extendida por todo el mundo.

Su tasa de mortalidad varía, pero una infestación masiva causa alta mortalidad. La infección se extiende por contacto directo. En general, solo son sensibles las abejas recién salidas del huevo con menos de 10 días de edad.

Los efectos patológicos en las abejas infectadas dependen del número de parásitos en la tráquea y se deben tanto a los daños mecánicos como a las disfunciones fisiológicas derivadas de la obstrucción de los conductos aéreos, las lesiones en las paredes traqueales y el descenso de la hemolinfa. A medida que aumenta la población de parásitos, las paredes traqueales, que normalmente son blancas y traslúcidas, se vuelven opacas y descoloridas con manchas eruptivas negras, probablemente debidas a incrustaciones de melanina.

### 1.3.2. Infestación por *Aethina tumida* (escarabajo de las colmenas)

El pequeño escarabajo de las colmenas, *Aethina tumida*, (orden *Coleoptera*: familia *Nitidulidae*), es un parásito depredador de las colonias de abejas melíferas.

Los adultos y las larvas se alimentan de las crías de las abejas melíferas, de la miel y el polen; al alimentarse de reservas de alimento, la miel restante fermenta y el panal se destruye.

Es oriundo del África subsahariana, considerado como una plaga menor en su territorio original, la infestación en las colonias de abejas europeas provoca graves daños. *Aethina tumida* ha sido también detectado en los Estados Unidos, propagándose a Canadá y a varios países de Sudamérica y de Centroamérica así como en Australia, Egipto, Italia, Corea y las Filipinas.

La hembra adulta pone sus huevos en la colmena. Cuando eclosionan, salen las larvas que se alimentan de las crías de las abejas, polen y miel, después dejan la colmena para entrar en la fase de pupa en el suelo. Una vez en estadio adulto, vuelan en busca de nuevas colmenas. Por consiguiente, la propagación puede ser rápida, ya que los adultos tienen un alcance de varios kilómetros. Si la infestación es masiva, las abejas pueden desertar la colmena. Hasta la fecha se considera un parásito exótico debido a que no ha sido detectado en España.



<https://www.latiendadelapicultor.com/blog/escarabajo-de-la-colmena/>

### 1.3.3. Infestación por *Tropilaelaps* spp.

Existen por lo menos cuatro especies de ácaros del género *Tropilaelaps* (familia *Laelapidae*). Cada especie está estrechamente relacionada con una abeja melífera gigante de Asia (*Apis dorsata*) y cada especie tiene un ámbito geográfico distinto, aunque todas se encuentran en Asia.



Hembra

Macho

Dos especies (*Tropilaelaps clareae* y *Tropilaelaps mercedesae*) constituyen plagas dañinas para *Apis mellifera*. Las otras dos especies (*Tropilaelaps koenigerum* y *Tropilaelaps thaii*) no parecen ser dañinas para *Apis mellifera*.

Estos ácaros, son parásitos externos, la mayor parte del ciclo de *Tropilaelaps* spp. se desarrolla en el interior de la celda operculada, donde su descendencia **se alimenta de las crías de abejas melíferas (larvas o ninfas)** y causando malformaciones en ellas, con un patrón irregular de crías operculadas y sin opercular, mortalidad y un declive gradual de las colonias de abejas. Se diseminan por contacto directo de abeja a abeja o por el movimiento de la cría. Hasta la fecha se considera un parásito exótico debido a que no ha sido detectado en España.



[https://www.mapa.gob.es/es/ganaderia/temas/sanidad-animal-higiene-ganadera/sanidad-animal/enfermedades/tropilaeosis/tropilaelaps.aspx#prettyPhoto\[pp\\_gall\]/9/](https://www.mapa.gob.es/es/ganaderia/temas/sanidad-animal-higiene-ganadera/sanidad-animal/enfermedades/tropilaeosis/tropilaelaps.aspx#prettyPhoto[pp_gall]/9/)

#### 1.3.4. Varroosis (infestación por *Varroa spp.*)

Los ácaros *Varroa* son parásitos de las abejas melíferas adultas y de sus crías (especies del género *Apis*). Se encuentra en todo el mundo salvo en Australia y Nueva Zelanda.

Se han descrito cuatro especies: *V. jacobsoni*, *V. underwoodi*, *V. rindereri* y *V. destructor*. **Dos haplotipos de la especie *V. destructor*, el haplotipo coreano y el japonés/tailandés, parasitan a *Apis mellifera*.** El haplotipo coreano se ha extendido por todo el mundo, mientras que la distribución del haplotipo japonés/tailandés es más restringida y solo se ha descrito en Japón, Tailandia y América.

El ciclo completo del ácaro ocurre dentro de las colmenas e implica su alimentación tanto de **las abejas adultas (fase forética) como de la cría (fase reproductiva)**. Durante todo el ciclo las hembras adultas del ácaro **succionan gran cantidad de hemolinfa** tanto de las abejas adultas como de las larvas, produciendo daños en ambas y pudiendo llevar al colapso de la colonia.

Mientras se alimenta, *V. destructor* puede transmitir distintos virus: el virus de las alas deformadas, el virus de la parálisis aguda de las abejas, el virus de la parálisis aguda israelí y el virus de Cachemira, entre otros.

Sin un tratamiento de la colonia de abejas melíferas, el número de parásitos aumenta constantemente con el crecimiento de la población de abejas y su creciente actividad de cría, lo que lleva al colapso de la colonia en 1–4 años.



[Galería de imágenes de Varroosis \(mapa.gob.es\)](http://mapa.gob.es)

#### 1.4. ENFERMEDADES CAUSADAS POR VIRUS

Hay más de 20 virus conocidos identificados en las abejas melíferas, la mayoría de los virus son **de ARN y pertenecen al orden *Picornavirales*** y a las familias *Iflaviridae* y *Dicistriviridae*. La replicación de los virus ocurre en el citoplasma de las células hospedadoras. Codifican

proteínas estructurales (VP1, VP2, VP3 y VP4) y no estructurales (helicasa, proteasa y RdRp RNA polimerasa dependiente de ARN que es la encargada de realizar la copia del genoma viral).

La transmisión de los virus por lo general ocurre en horizontal (por ejemplo, a través de las heces de abeja, jalea real, saliva de la varroa, apicultor...), pero la transmisión de los principales virus de abejas se produce verticalmente (de la reina a la cría).

El ácaro **Varroa**, es un **portador pasivo de los virus de las abejas** y desempeña un rol fundamental en la diseminación de las virosis. Además, la *Varroa* debilita el sistema inmunológico de las abejas, que puede permitir la reactivación de infecciones virales latentes que ya están presentes en el cuerpo de las abejas.

#### 1.4.1. Virus de las alas deformadas (DWV)

Pertenece al **orden Picornavirales** y a la familia **Iflaviridae**, es transmitido por algunos ácaros del género **Varroa**. En combinación con la *Varroa*, este virus puede **causar la muerte de la cría y de las abejas adultas**, fue descubierto en 1982 en abejas adultas en Japón procedentes de colonias infestadas por *Varroa destructor*, actualmente, se encuentra ampliamente distribuido y es frecuente encontrarlo en las colonias infestadas por el ácaro.

Como su propio nombre indica, afecta a las **alas de las abejas**. No solo las deforma, sino que también las paraliza, por lo que algunos llegan a perder la capacidad de volar. Además, las abejas infectadas muestran el abdomen acortado e hinchado, así como una pérdida de coloración.

Se caracteriza por un ciclo de replicación muy lento, en general, permitiendo a las abejas a volar a pesar de las graves deformaciones de las alas, el tamaño corporal reducido y la esperanza de vida muy corta.



[Galería de imágenes de Varroosis \(mapa.gob.es\)](http://mapa.gob.es)

#### 1.4.2. Virus de la parálisis aguda (ABPV)

Virus hexagonal, tipo ARN, de 28 nm de diámetro. Pertenece al orden *Picornavirales* y a la familia *Dicistriviridae*; normalmente se puede encontrar en el tejido graso de la abeja y no causa síntomas.

Se distribuye prácticamente de manera mundial, aunque se ha descrito mayor presencia en Europa y Sudamérica.

Combinada con la *Varroa*, la infección se vuelve especialmente grave, causando la mortalidad tanto en la **cría que en las abejas adultas**.

Este virus se combina generalmente con el virus de la parálisis crónica (CBPV), sin embargo, en caso de infestación de *Varroa* masiva, el ABPV prevalece sobre el CBPV debido a su actividad de replicación rápida.

#### 1.4.3. Virus de la parálisis crónica de la abeja (CBPV)

Virus irregular, tipo ARN de 65 a 90 nm de diámetro. Pertenece al orden *Picornavirales* y afecta a las abejas adultas. El CBPV se distribuye mundialmente y se encuentra con mayor frecuencia en las colonias infestadas con *Varroa*, pudiendo causar efectos devastadores y tomar forma epidémica.

El virus se transmite a **las larvas** por la jalea real y por las **abejas** cuando van a limpiar las celdas infectadas de larvas muertas y **de la reina a la cría** (es decir, transmisión vertical).

Las abejas enfermas mueren a pocos días del inicio de los síntomas. Las abejas afectadas se vuelven casi sin pelo, oscuro en apariencia y sufren ataques mordaces de las abejas sanas de su colonia. Se convierten en inestables y no voladores en la parte superior del panal, arrastrándose por el suelo y en los tallos de hierba, donde mueren. Algunas abejas presentan el abdomen agrandado debido a la acumulación de líquido en el saco de la miel y las alas se extienden en forma de "K".



[https://es.wikipedia.org/wiki/Par%C3%A1lisis\\_de\\_la\\_abeja#/media/Archivo:Krolewo\\_Bienen\\_Bees\\_1.jpg](https://es.wikipedia.org/wiki/Par%C3%A1lisis_de_la_abeja#/media/Archivo:Krolewo_Bienen_Bees_1.jpg)

**Tabla 1. Enfermedades de las abejas melíferas objeto de vigilancia y control**

Enfermedad	Agente	Patógeno	Estadio	Distribución Geográfica	Transmisión	Efectos
Loque americana	Bacteria	<i>Paenibacillus larvae</i>	larvas	Mundial	esporas bacterianas	muerte de larvas en celdillas de cría
Loque europea	Bacteria	<i>Melissococcus plutonius</i>	larvas	Norteamérica, Sudamérica, Oriente Medio y Asia	Horizontal y continuación mecánica	muerte antes de ser operculadas, o poco tiempo después, antes de transformarse en crisálidas
Nosemosis	Hongo (Microsporidio)	<i>Nosema spp. (N. apis y N. cerenae)</i>	adultas	Mundial	esporas	invaden células epitelias del ventrículo
Acarapisosis	Parásito (ácaro)	<i>Acarapis woodi</i>	adultas	Mundial	Contacto directo	tráquea, daños mecánicos, obstrucción de conductos aéreos, lesiones en paredes traqueales, descenso de la hemolinfa.
Aethinosis (escarabajo de las colmenas)	Parásito	<i>Aethina tumida</i>	crías	África subsahariana Sudamérica, Centroamérica, Australia, Egipto, Italia, Corea y las Filipinas.	huevos y larvas de la hembra	destrucción del panal
Tropilaelapsosis	Parásito (ácaro)	<i>Tropilaelaps spp.</i>	crías	Asia	contacto directo, movimiento de la cría	malformaciones en ellas, con un patrón irregular de crías operculadas y sin opercular,
Varroosis	Parásito (ácaro)	<i>Varroa spp. (V. destructor)</i>	crías y adultas	Mundial (excepto Australia y Nueva Zelanda)	contacto directo	succión de hemolinfa, colapso de la colonia.
Virus de las Alas Deformadas	Virus	ARN	crías y adultas	Mundial	Horizontal y Vertical (de la reina a la cría). Varroa (portador pasivo)	alas deformadas, paralización, pérdida capacidad de volar
Virus de la Parálisis Aguda	Virus	ARN	crías y adultas	Mundial	Horizontal Vertical (de la reina a la cría) Varroa (portador pasivo)	Asintomático (sólo virus). Mortal en combinación con Varroa
Virus de la Parálisis Crónica	Virus	ARN	crías y adultas	Mundial	Horizontal y Vertical (de la reina a la cría). Varroa (portador pasivo)	inestables y no voladores. Abdomen agrandado. Alas en forma de "K".

## 2. MARCO LEGAL

Existe un marco reglamentario a nivel internacional, en la Unión Europea y nacional que aplica a las enfermedades de las abejas en lo que concierne a la obligación de la notificación de determinadas enfermedades como al establecimiento de sistemas de vigilancia. Las enfermedades objeto de notificación se citan en la tabla 1.

### 2.1. INTERNACIONAL

Las enfermedades de las abejas están inscritas en la lista del Código Sanitario para los Animales Terrestres de la Organización Mundial de la Sanidad Animal (OIE) y los Países y Territorios Miembros tienen la **obligación de notificar** los brotes conforme al *Código Sanitario para los Animales Terrestres* de la OIE, a través del Sistema mundial de información zoonosanitaria (WAHIS) o por fax o correo electrónico en el plazo de 24 horas.

### 2.2. UNIÓN EUROPEA

Con respecto a la legislación europea que afecta a las enfermedades de las abejas se pueden establecer dos criterios:

#### 2.2.1. Legislación de enfermedades objeto de control

El **Reglamento (UE) 2016/429** establece normas para la prevención y el control de las enfermedades transmisibles a los animales o a las personas, **incluidas normas de priorización**

y categorización de enfermedades incluidas en la lista que son motivo de preocupación en toda la Unión. Inicialmente este reglamento, no incluye las enfermedades que afectan a las abejas, pero posteriormente ha sido posteriormente modificado y desarrollado mediante:

**Reglamento Delegado (UE) 2018/1629 de la Comisión** de 25 de julio de 2018, modifica la lista de enfermedades recogidas en el anexo II del Reglamento (UE) 2016/429 del Parlamento Europeo y del Consejo, relativo a las enfermedades transmisibles de los animales. En este reglamento se incluyó en la lista de enfermedades objeto de control, varias enfermedades que afectan a las abejas (Tabla 2).

**Reglamento de Ejecución (UE) 2018/1882 de la Comisión** de 3 de diciembre de 2018 relativo a la aplicación de determinadas normas de prevención y control a categorías de enfermedades enumeradas en la lista y por el que se establece una lista de especies y grupos de especies que suponen un riesgo considerable para la propagación de dichas enfermedades de la lista así como la categorización (A, B, C, D, E) a la que pertenecen.

### 2.2.2. Legislación en materia de notificación y declaración obligatoria

La declaración oficial de las diferentes enfermedades que afectan a las abejas se efectúa de conformidad con lo dispuesto en el **Reglamento de Ejecución (UE) 2020/2002 de la Comisión de 7 de diciembre de 2020** por el que se establecen normas de desarrollo del Reglamento (UE) 2016/429 del Parlamento Europeo y del Consejo relativas a la notificación a la Unión y al envío de informes a la Unión sobre enfermedades que serán presentados electrónicamente a través del sistema ADIS.

**Tabla 2. Enfermedades de las abejas objeto de declaración y notificación**

Enfermedades de las abejas melíferas	INTER NACIONAL	UNIÓN EUROPEA			NACIONAL	
	OIE	Reglamento Delegado (UE) 2018/1629	Reglamento Ejecución (UE) 2018/1882	Reglamento Ejecución (UE) 2020/2002	Real Decreto 608/2006	Real Decreto 526/2014 EDO Anexo 1
Acaraposis (Acarapis woodi)	X	-	-	-	-	X
Varroosis (Varroa spp.)	X	X	X (C+D+E)	X	X	X
Nosemiosis (nosema spp.)	-	-	-	-	-	-
Loque Americana (Paenibacillus larvae)	X	X	X (D+E)	-	-	X
Loque Europea (Melissococcus plutonius)	X	-	-	-	-	X
virus de las parálisis crónica CBPV	-	-	-	-	-	-
virus de las alas deformadas DWV,	-	-	-	-	-	-
virus de la parálisis aguda ABPV	-	-	-	-	-	-
Aethina tumida (pequeño escarabajo de la colmena)	X	X	X (D+E)	X	-	X
Tropilaelaps spp.	X	X	X (D+E)	X	-	X

### 2.2.3. Situación de la enfermedad y categorización sanitaria

**El Reglamento Delegado (UE) 2020/689 de la Comisión**, de 17 de diciembre de 2019, por el que se completa el Reglamento (UE) 2016/429 del Parlamento Europeo y del Consejo en lo referente a las normas de vigilancia, los programas de erradicación y el estatus de libre de

**enfermedad con respecto a determinadas enfermedades de la lista y enfermedades emergentes.**

Concretamente el **ANEXO VI. Parte III**, establece los Requisitos específicos relativos para la concesión y el mantenimiento del estatus de libre enfermedad en Estados miembros o zona para la infestación por *Varroa Spp.*

### 2.3. NACIONAL

La norma de mayor rango en materia de sanidad animal la constituye la **Ley 8/2003**, de 24 de abril, de Sanidad Animal, existiendo normativa de menor rango constituida por Reales Decretos que tratan sobre la declaración obligatoria de las enfermedades o la creación del Sistema de Alerta de Sanidad Veterinaria, así como normativa específica para diferentes enfermedades. En aquello que concierne a las enfermedades de las abejas, se encuentra:

**Real Decreto 608/2006 de 19 de mayo**, por el que:

- Se establece y regula, con carácter básico, un Programa nacional de lucha y control de las enfermedades de las abejas de la miel, (*Apis mellifera*)
- Recoge actuaciones específicas para la lucha contra la Varroosis.

**Real Decreto 526/2014, de 20 de junio**, por el que se establece la lista de las enfermedades de los animales de declaración obligatoria y se regula su notificación.

### 3. SISTEMA DE VIGILANCIA

En los últimos años, a nivel mundial, se ha constatado, el debilitamiento y mortalidades muy elevadas de colonias de abejas, conocido como “Síndrome de Despoblamiento de Colmenas” (SDC). Para llevar poder conocer el estatus sanitario de las **abejas melíferas (*Apis mellifera*) o abejas de la miel** varias iniciativas han sido establecidas tanto a nivel europeo como nacional mediante el desarrollo de los siguientes **programas de vigilancia** (Tabla 3.):

**Tabla 3. Programas de vigilancia establecidos para las enfermedades de las abejas**

Enfermedad	Agente patógeno	EPILOOBEE Europeo	PNV Nacional	PNV CC.AA
Loque Americana ( <i>Paenibacillus larvae</i> )	Bacterias	X	X	X
Loque Europea ( <i>Melissococcus plutonius</i> )	Bacterias	X	X	-
Nosemiosis ( <i>Nosema apis</i> y <i>Nosema ceranae</i> )	Hongos	X	X	-
Acarapisosis ( <i>Acarapis woodi</i> )	Parásitos	-	-	-
Varoosis ( <i>Varroa destructor</i> )	Parásitos	X	X	-
<i>Aethina tumida</i> (pequeño escarabajo de la colmena)	Parásitos	X	X	X
<i>Tropilaelaps spp.</i>	Parásitos	X	X	X
virus de las parálisis crónica (CBPV)	Virus	X	X	-
virus de las alas deformadas (DWV)	Virus	X	X	-
virus de la parálisis aguda (ABPV)	Virus	X	X	-
Intoxicaciones/Sospechas por residuos de pesticidas	-	X	X	-

### 3.1. SISTEMA DE VIGILANCIA EUROPEO (EPILOBEE)

A nivel Europeo, en el 2012 se desarrolló el **Programa de vigilancia piloto sobre las pérdidas de colonias de abejas (EPILOBEE)** (2012-2014), cofundado por la Comisión Europea y en base a las directrices elaboradas por el Laboratorio de Referencia de la UE para las enfermedades de las abejas (Sofia-Antipolis ANSES. Francia). En este programa, de **carácter voluntario** participaron España y otros 17 Estados Miembros. Los objetivos del programa son:

- Armonización de los sistemas de vigilancia activa a nivel nacional y de la UE.
- Implementación de estudios de prevalencia de las principales enfermedades apícolas.
- Estimación de las pérdidas de colonias de abejas durante el 6 invierno y la primavera.
- Vigilancia sistemática de residuos de pesticidas para la evaluación de sus posibles riesgos para la salud de las abejas e investigación de las sospechas clínicas de intoxicación.

### 3.2. SISTEMA DE VIGILANCIA NACIONAL

Una vez finalizado el programa de vigilancia europeo (EPILOBEE), España a través del MAPA, se decidió darle **continuidad de forma voluntaria** y con financiación propia, dada la relevancia que tiene el sector apícola en nuestro país, así estableció el **Programa de Vigilancia sobre las pérdidas de colonias de abejas (2021-2022)** para:

- **Armonizar los procedimientos de vigilancia activa** para conseguir una **estimación apropiada de las pérdidas de colonias de abejas a nivel nacional**.
- **Apoyar la implementación de los estudios de prevalencia** sobre las enfermedades prioritarias de las abejas con el objetivo de **estimar la incidencia** siguiendo procedimientos armonizados que utilicen indicadores epidemiológicos comunes a nivel nacional.

La finalidad es la realización y seguimiento por un periodo más amplio que EPILOBEE para dilucidar y vigilar la evolución y tendencias de la mortalidad y de la prevalencia de las principales enfermedades que afectan a la salud de las abejas. Además se decidió ampliar los objetivos incluyendo:

- Estudio sistemático en todas las colonias de la **carga parasitaria por *Nosema spp.*** durante el otoño.
- Presencia del **virus CBPV** durante el verano.
- Vigilancia de **residuos de pesticidas y otros contaminantes**.
- Estudio sintomático a lo largo de todas las campañas posteriores.

### 3.3. SISTEMA DE VIGILANCIA EN LAS CC.AA.

Las CCAA o las Ciudades de Ceuta y Melilla pueden establecer programas de erradicación contra determinadas enfermedades exóticas o de alta patogenicidad como: Loque americana (*Paenibacillus larvae*), Tropialepsosis (*Tropilaelaps spp*) y Aethinosis (*Aethina tumida*).

A nivel nacional en los últimos años también se han desarrollado diversos programas de investigación que han permitido implantar en algunas CCAA sistemas de vigilancia.

Según lo establecido en el PNV nacional, los análisis de laboratorio serán llevados a cabo por:

- **Laboratorio Central de Veterinaria (Algete. Madrid. MAPA).** A este laboratorio se enviarán todas las demás muestras para la investigación sistemáticas de *Nosema spp.* y muestras clínicas. En este laboratorio se llevarán a cabo:
  - Todos los análisis de las muestras sistemáticas para el análisis *Nosema spp* (recuento de esporos y caracterización molecular).
  - Los análisis de todas las muestras clínicas que se recojan a lo largo del programa.
  - Análisis de confirmación de *Aethina tumida* y *Tropilaelaps spp.*
- **Los laboratorios de las CC.AA.** En estos laboratorios se llevará a cabo el análisis de las muestras sistemáticas que se recojan para la evaluación:
  - Tasas de infestación por *Varroa destructor*.
  - Búsqueda de la presencia de parásitos sospechosos.
  - Análisis para *Aethina tumida* y *Tropilaelaps spp.*
- **Laboratorio Arbrital Agroalimentario (Aravaca. Madrid).** Se enviarán todas las muestras para los análisis para la investigación de sospechas de intoxicación por residuos de pesticidas.
- **EURL para el análisis de residuos de pesticidas en frutas y hortalizas (Universidad de Almería).** Realizarán el análisis de residuos de pesticidas.

## 4. DIAGNÓSTICO DE LABORATORIO

### 4.1. MUESTRAS DE ELECCIÓN

Para la a toma de muestras (Tabla 4), es decir, la selección de las abejas objeto de análisis, se recomienda, según lo establecido en el Programa Nacional de Vigilancia, realizar dos muestreos al año, en otoño y primavera, durante las visitas a los apiarios. Se llevará mediante la realización de 2 tipos de muestreo:

- **Muestras sistemáticas: (al azar)**
  - Apiarios seleccionados y dentro de éstos,
  - Todas las colonias seleccionadas al azar (como máximo 13).
- **Muestras sintomáticas: (presencia de sintomatología)**
  - Cualquier colonia de las seleccionadas al azar que presente síntomas dentro de los apiarios del programa nacional de vigilancia.
  - Muestras de cualquier colonia fuera de las seleccionadas al azar si presentan síntomas.

Además, cuando el veterinario inspector lo considere necesario (obsevación de síntomas) aun estando **fuera de lo establecido en el Programa Nacional de Vigilancia**, se podrán seleccionar muestras de cualquier colonia (perteneciente o no al programa) cuando el veterinario inspector lo considere necesario (síntomas).

**Tabla 4. Muestra de elección para el diagnóstico de las enfermedades de las abejas**

Enfermedad	Patógeno	Muestra de elección	Comentarios
Varroosis	<i>V. destructor</i>	MUESTRAS SINTOMÁTICAS: Panal de cría operculado (10x10 cm) Larvas enfermas Abejas vivas internas (nido de cría no operculado) >100	Diagnóstico diferencial <i>Tropilaelaps spp.</i> Tasa de parasitación = nº varroas/100 abejas
Loque americana	<i>P. larvae</i>	Panal de cría con síntomas y larvas enfermas	
Loque europea	<i>M. plutonius</i>	Panal de cría con síntomas y larvas enfermas	
Nosemosis	<i>Nosema spp.</i>	MUESTRAS SISTEMÁTICAS: Muestra elección: internas (cuadros periféricos) Cantidad: >60 MUESTRAS SINTOMÁTICAS: Muestra elección: externas (piquera) Cantidad: >30.	Diagnóstico diferencial Virus de la Parálisis Crónica Resultados: nº esporas / abeja
Virus de la Parálisis Crónica	CBP virus	abejas vivas externas /internas. Cantidad: >30	
Virus de las Alas Deformadas	DWV virus		
Virus de la Parálisis Aguda	ABPV virus		
Aethinosis	<i>A. tumida</i> *	Abejas, Panal de cría, Escarabajos, larvas y huevos o ácaros sospechosos	
Tropilaelapsosis	<i>Tropilaelaps spp.</i> *	Abejas, Panal de cría, Escarabajos, larvas y huevos o ácaros sospechosos	Diagnóstico diferencial <i>Varroa destructor</i>
Acaraposis	<i>Acarapis woodi</i>	Abejas adultas	

\* No presentes a nivel nacional

## 4.2. MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO

Para aquellas enfermedades objeto de vigilancia de vigilancia, control y notificación, el diagnóstico se realiza siguiendo las directrices establecidas por:

- **La normativa de la Unión Europea (Reglamento (UE) 2017/625 relativo a los controles y otras actividades oficiales (art.34)**
- **Protocolos pertinentes internacionalmente reconocidos** como El Manual de las Pruebas de Diagnóstico y de las Vacunas para los Animales Acuáticos de la OIE y los aceptados por el Comité Europeo de Normalización (CEN).
- **Los protocolos y métodos del Laboratorio Europeo de Referencia.**

- **Los protocolos y métodos de los Laboratorios Nacionales de Referencia en caso de no existir las normas o protocolos anteriormente mencionados.**

Los métodos de diagnóstico para las enfermedades de las abejas (tabla 5), se pueden clasificar en:

**Tabla 5. Métodos de diagnóstico para las enfermedades de las abejas (OIE / EURL)**

Enfermedad	Patógeno	Método de laboratorio	Método de diagnóstico
Varroosis	<i>V. destructor</i>	Detección de la presencia del parásito. Observación de síntomas, Observación macroscópica y recuento	OIE
		Lavado de abejas	Recomendaciones de EURL
Loque americana	<i>P. larvae</i>	Diagnóstico bacteriológico	OIE (validado por el EURL)
		identificación molecular por PCR	OIE (validado por el EURL)
Loque europea	<i>M. plutonius</i>	Diagnóstico bacteriológico	OIE (validado por el EURL)
		identificación molecular por PCR	OIE (validado por el EURL)
Nosemosis	<i>Nosema spp.</i>	Detección y cuantificación de esporas de <i>Nosema spp.</i> por microscopía óptica	OIE
		Diferenciación molecular de especies de <i>N. apis</i> y <i>N. cerenae</i> por PCR	EURL adaptadas de las recomendaciones de la OIE
Virus de la Parálisis Crónica	CBPV virus	Diagnóstico molecular: detección y cuantificación (RT-qPCR)(PCR en tiempo real cuantitativa)	EURL
Virus de las Alas Deformadas	DWV virus	Diagnóstico molecular: detección (RT-PCR)	EURL
Virus de la Parálisis Aguda	ABPV virus	Diagnóstico molecular: detección (RT-PCR) (PCR en tiempo real)	EURL
Aethinosis	<i>A. tumida</i>	Detección durante el lavado de las abejas	OIE / EURL
		Detección durante el examen de las muestras sintomáticas	
		Identificación del escarabajo adulto, larva por examen morfológico	
		Identificación molecular por PCR del escarabajo adulto, larva o huevo	
Tropilaelapsosis	<i>Tropilaelaps spp.</i>	Detección durante el lavado de las abejas	OIE/ EURL
		Detección durante el examen de muestras sintomáticas	
		Identificación por examen morfológico directo de los ácaros	
Acarapisosis	Acarapis woodi	Detección por microscopía óptica	OIE
		Detección por digestión enzimática	
		Identificación del parásito por microscopía óptica	

#### 4.2.1. Técnicas microscópicas:

que permiten:

- **Identificación morfológica del parásito**

Si los especímenes llegan vivos al laboratorio, deben ser sometidos a congelación al menos a -70°C durante 1h. Este procedimiento inmoviliza el especímenes para evitar su liberación al medio ambiente. Posteriormente, los individuos se deben depositar en un tubo con etanol al 70%, para su sacrificio.

A continuación, se lleva a cabo la cuantificación del número de individuos presentes, así como la identificación morfológica del parásito en cuestión mediante el empleo de un esteromicroscopio y/o microscopio óptico.

No deben confundirse *Tropilaelaps spp* con el ácaro *V. destructor*, que es miembro de la misma familia y un parásito que está bien establecido en Europa. Utilizando una lupa de  $\times 10$ . *Tropilaelaps* es más pequeño que *V. destructor*; el cuerpo del ácaro *Varroa* es más ancho que largo y se mueve lentamente, mientras que el cuerpo del *Tropilaelaps* es alargado, con un escudo holoventral o similar muy esclerotizado se desliza con rapidez.

- **Identificación y recuento de esporas:**

En el caso de la identificación de *Nosema ssp.*, se lleva a cabo mediante la **identificación y el recuento de esporas.**

- **Identificación de las esporas:** el abdomen es sometido a un macerado con agua destilada y con un asa de inoculación, se deposita 10  $\mu$ l, aproximadamente de la suspensión en un portaobjetos cubierto con un cubreobjetos y se procede a examinar bajo el microscopio con aumento de 400x. **En caso de resultado positivo, proceder al examen cuantitativo para el conteo de esporas.**
- **Recuento de esporas:** el macerado anterior del abdomen por centrifugación y tras resuspender el pellet, se deposita aproximadamente entre 20 y 30  $\mu$ l de solución en un hemocitómetro Malassez. Las esporas tienen forma ovalada (*N. ceranae* es ligeramente más pequeña que *N. apis*, pero la diferenciación de especies es difícil usando microscopía óptica).

Las esporas de *Nosema* deben diferenciarse de otros hongos microscópicos (presentes, por ejemplo, en caso de mohos), levaduras u otras partículas, que también pueden estar presentes en las abejas analizadas.

En el caso de *Acarapis Woodi*, el macerado se realiza con el torax de las abejas. Los ácaros y la tráquea se pueden teñir con una solución de azul de metileno al 1% y ser así fácilmente visibles al microscopio óptico.

- **Identificación de bacterias**

**Loque americana:** *Paenibacillus larvae* es gram positiva por lo que la tinción de Gram se utiliza frecuentemente con frotis de bacterias procedentes de colonias bacterianas aisladas.

También se puede emplear la tinción con carbol-fucsina, se aplica a los frotis larvales y puede servir para confirmar la enfermedad clínica basándose en la morfología de las esporas.

**Loque europea:** Las larvas son la muestra de elección para el diagnóstico, mediante un frotis directo en porta de la larva o transferencia con un asa de siembra de parte del contenido del intestino de la larva en una solución acuosa y con el empleo de con una pequeña cantidad de nigrosina acuosa al 5% o carbol fucsina al 0,2%. La presencia de numerosos estafilococos lanceolados, que se presentan individualmente o en grupos, dispuestos en pares o en cadenas cortas, es suficiente para dar un diagnóstico casi seguro de la Loque europea.

#### 4.2.2. Técnicas moleculares

Mediante el empleo de la PCR o RT-PCR para la identificación del genoma en aquellas enfermedades causadas por virus y para la identificación a nivel de especie como en el caso de *N. apis* y *N. ceranae*, donde se amplifican los fragmentos génicos de 16S siendo de 143 pb para *N. ceranae* y de 224 pb para *N. apis*.

#### 4.2.3. Técnicas bacteriológicas

Empleadas para el aislamiento e identificación de aquellas enfermedades causadas por bacterias como **Loque americana (*Paenibacillus larvae*)** y **Loque europea (*Melisococcus plutonius*)**.

- **Cultivo de *P. larvae*:** Se han descrito varios medios de cultivo: PLA (agar *Paenibacillus larvae*), agar MYPGP (la abreviatura inglesa se refiere a los constituyentes del agar: caldo Mueller-Hinton, extracto de levadura, fosfato potásico, glucosa y piruvato), agar J y y CSA (agar Columbia sangre de oveja).

Se transfiere una porción de la muestra a la superficie del medio sólido con un hisopo de algodón estéril. Se incuban las placas a 37+1 °C durante 2–4 días en una atmósfera del 5–10% de CO<sub>2</sub>, aunque la incubación aeróbica también produce los mismos resultados.

- **Morfología de la colonia:** Las muestras de larvas con enfermedad clínica darán lugar a placas con crecimiento confluyente después de 2–4 días, y seguirá una fase de subcultivo a fin de aislar las colonias.

En el medio de cultivo PLA, Las colonias de *P. larvae* son pequeñas, de verde claro a amarillo (= el mismo color que el medio) con una superficie ligeramente opaca y áspera, algunas veces con el centro elevado.

En el MYPGP y el J-agar, las colonias son pequeñas, regulares, principalmente rugosas, planas o elevadas y de color entre blanquecino y beige.

En el agar CSA, las colonias son pequeñas, regulares, rugosas, mantecosas y grisáceas, algo transparentes y de aspecto ligeramente brillante.

**La morfología de la colonia no es concluyente, pero podría servir para escoger las colonias bacterianas para una posterior identificación mediante PCR.**

- **Cultivo de (*Melisococcus plutonius*):** se puede utilizar agar M110, las placas se siembran con suspensiones acuosas diluidas de larvas muertas, o preferiblemente, de los intestinos medios de larvas muertas que deben incubarse anaeróbicamente, en una atmósfera con aproximadamente un 5-10% de dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) a 35°C.
- **Morfología de la colonia:** Generalmente aparecen pequeñas colonias de *M. plutonius* de un color blanco opaco a los 4 días. Esta bacteria es en cierto modo pleomórfica in vitro, apareciendo con frecuencia en forma de bacilo

Un cierto número de otras bacterias se asocian con frecuencia a *M. plutonius* y pueden confundirse con ella (*Achromobacter eurydice* *Paenibacillus alvei* y *Enterococcus faecalis*).

MATERIAL NO OFICIAL

## **BIBLIOGRAFÍA**

Manual de las Pruebas de Diagnóstico y de las Vacunas para los Animales Terrestres (OIE).

<https://www.oie.int/es/que-hacemos/normas/codigos-y-manuales/acceso-en-linea-al-manual-terrestre/>

Reynaldi, FL. Larsen, A. Sguazza, H. (2019). Virus que afectan a las abejas (*Apis mellifera*). Capítulo 10. Patogenicidad microbiana en Medicina Veterinaria: Volumen. Virología Universidad. Nacional de la Plata. Facultad Ciencias Veterinarias (2019)

[https://ri.conicet.gov.ar/bitstream/handle/11336/126961/CONICET\\_Digital\\_Nro.e945a1b3-d8ba-42df-ac86-ee5e172939f\\_A.pdf?sequence=2&isAllowed=y](https://ri.conicet.gov.ar/bitstream/handle/11336/126961/CONICET_Digital_Nro.e945a1b3-d8ba-42df-ac86-ee5e172939f_A.pdf?sequence=2&isAllowed=y)

RASVE Red de Aleta Sanitaria Veterinaria

<https://www.mapa.gob.es/es/ganaderia/temas/sanidad-animal-higiene-ganadera/sanidad-animal/enfermedades/>

MATERIAL NO OFICIAL

**MATERIAL PARA LA PREPARACIÓN DEL TEMA 74**

**ENCEFALOPATÍAS ESPONGIFORMES TRANSMISIBLES. MARCO LEGAL.  
PROGRAMAS NACIONALES DE CONTROL Y ERRADICACIÓN.  
DIAGNÓSTICO DE LABORATORIO.**

*Este material no tiene carácter oficial, por lo que en ningún caso vinculará al Tribunal Calificador. Constituye, únicamente, un instrumento complementario que servirá de apoyo al opositor para enfocar cada uno de los epígrafes, pero nunca de forma exclusiva ni excluyente. El Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación no se hace responsable del contenido del mismo.*

*Los materiales no serán objeto de actualización constante.*

## **ÍNDICE**

### **1. INTRODUCCIÓN:**

### **2. TEMBLADERA O SCRAPIE**

2.1. ETIOLOGÍA

2.2. EPIDEMIOLOGÍA

2.3. SIGNOS Y LESIONES

2.4. EVOLUCIÓN DE LA SITUACIÓN EPIDEMIOLÓGICA

### **3. ENCEFALOPATÍA ESPONGIFORME BOVINA**

3.1. ETIOLOGÍA

3.2. EPIDEMIOLOGÍA

3.3. SIGNOS Y LESIONES

3.4. EVOLUCIÓN DE LA SITUACIÓN EPIDEMIOLÓGICA

### **4. MARCO LEGAL.**

4.1. PROGRAMA INTEGRAL COORDINADO DE VIGILANCIA Y CONTROL DE LAS EETs.

4.2. PROGRAMA NACIONAL DE VIGILANCIA, CONTROL Y ERRADICACIÓN DE LA TEMBLADERA

4.2.1. Programa de vigilancia activa

4.2.2. Programa de vigilancia pasiva

4.2.3. Análisis del genotipo

4.2.4. Erradicación

4.3. PROGRAMA NACIONAL DE VIGILANCIA, CONTROL Y ERRADICACIÓN DE LA EEB

4.3.1. Programa de vigilancia activa

4.3.2. Programa de vigilancia pasiva

4.3.3. Erradicación

### **5. DIAGNÓSTICO DE LABORATORIO**

5.1. TÉCNICAS MOLECULARES

5.2. TÉCNICAS HISTOLÓGICAS

5.3. OTRAS TÉCNICAS

## 1. INTRODUCCIÓN

Las encefalopatías espongiformes transmisibles (EET) pertenecen a un grupo de enfermedades caracterizadas por largos períodos de incubación (4 a 5 años) y curso progresivo, que determinan la degeneración del sistema nervioso central ocasionando cambios neurodegenerativos que llevan a la muerte en los animales y el hombre.

El agente etiológico de estas enfermedades era en la mayoría de los casos desconocido. En 1982 Stanley Prusiner propuso el nombre de "**prion**" para referirse al agente causante de la enfermedad, que es transmisible y relacionado con proteínas, pudiendo adquirirse por herencia o por una infección, por ejemplo por la ingestión de órganos contaminados.

Los síntomas de estas enfermedades están motivados por la acumulación del prión en las células neuronales, originando la muerte celular. Un análisis microscópico revela lesiones como vacuolas que dan al tejido nervioso un aspecto de esponja.

A este grupo de enfermedades pertenecen encefalopatías que afectan animales como cabras y ovejas (Scrapie); visones (TME); mulas, ciervos y alces (CWD); bovinos (EEB) y gatos (FSE). Las que afectan a humanos son de distinto tipo e incluyen el Kuru, la Enfermedad de Creutzfeldt-Jakob (CJD) y el Síndrome de Gerstman-Straussler (GSS).

La observación en Reino Unido de los primeros casos de transmisión de la enfermedad del ganado bovino al hombre en la década de los 90 supuso un salto cualitativo para una enfermedad que se había diagnosticado por primera vez en los años 80 en las vacas, presumiblemente, debido a un salto de especie desde los pequeños rumiantes, en la que la enfermedad se conocía desde hacía 200 años. En España el primer caso en personas de la Encefalopatía Espongiforme Bovina fue diagnosticado y confirmado en noviembre del año 2000.

A partir de ese momento fue preciso rediseñar los sistemas de protección de la salud pública en toda la Unión Europea para poder tener en cuenta todos y cada uno de los eslabones que conforman la cadena alimentaria. Este cambio se consagró con la publicación del **Libro Blanco de la Seguridad Alimentaria** y que dio lugar al conocido **Paquete de Higiene** en 2004, hoy en día sustituido y simplificado en un único **Reglamento de Controles Oficiales** (Reglamento 2017/625). A raíz de esta crisis y de los cambios normativos, la Unión Europea estipuló como obligatorio que cada país miembro desarrollara un **Programa Integral Coordinado de vigilancia y control de las EET**.

## 2. TEMBLADERA O SCRAPIE

La tembladera, scrapie o prurigo lumbar es una enfermedad que afecta a las ovejas y a las cabras que se conoce en Europa occidental desde hace más de 300 años y posteriormente ha sido descrita prácticamente en todo el mundo.

Inicialmente se sospechó que el agente causal era un virus debido a que se confirmó la transmisibilidad del agente. Pero, a principios de los años 50 se comenzó a pensar en la naturaleza atípica del supuesto patógeno por su extraordinaria resistencia a agentes fisicoquímicos que normalmente inactivan a los virus. A partir de 1965 se propuso la asociación del scrapie con una pequeña proteína básica y finalmente, en 1982 se propuso la hipótesis del prion como una partícula infecciosa de naturaleza proteica responsable del scrapie.

### **2.1. ETIOLOGÍA**

El agente etiológico de la tembladera o scrapie es la isoforma patógena del prion (PrP<sup>sc</sup>) que afecta a pequeños rumiantes domésticos. De esta enfermedad se conocen dos formas: la clásica y la atípica, si bien hoy en día están descritas distintas cepas que provocan el scrapie clásico. En cualquier caso, la manipulación de este agente debe realizarse bajo condiciones de bioseguridad de tipo 2 dado que no representa un peligro para la salud de las personas.

### **2.2. EPIDEMIOLOGÍA**

Se piensa que el agente causante del scrapie se puede transmitir tanto a la propia descendencia de la oveja afectada como a otros corderos de un mismo rebaño a través del contacto con la placenta y otros fluidos de la gestación.

Los síntomas de la enfermedad aparecen normalmente entre los 2 y 5 años. Las ovejas pueden vivir entre 1 y 6 meses tras la aparición de los síntomas clínicos pero la muerte es inevitable. Ciertas variaciones genéticas entre las distintas razas de ovejas pueden determinar si el animal contraerá la enfermedad y la rapidez con que aparecerán los primeros síntomas. Se ha identificado un gen que controla los tiempos de incubación de scrapie en ovejas y más, recientemente, también de cabras. Aquellos individuos con alelos determinantes de tiempos de incubación cortos desarrollan scrapie entre los dos y cinco años de edad mientras los que poseen alelos de tiempo prolongado mueren antes por causas naturales que por scrapie.

Por su parte, las formas atípicas de scrapie muestran un comportamiento diferente al del scrapie clásico (prurito lumbar) por su epidemiología y patología.

### **2.3. SIGNOS Y LESIONES**

Los signos clínicos más tempranos incluyen cambios en el comportamiento y en el temperamento de los animales afectados. Estos cambios son seguidos por la tendencia del animal a rascarse y frotarse contra objetos fijos, aparentemente con el objetivo de aliviar el picor. Otros signos son la pérdida de coordinación, excesiva ingesta de líquido (polidipsia), pérdida de peso (a pesar de la retención del apetito), mordeduras en las

patas, chasqueo de labios, y anomalías en el movimiento acompañadas de temblores y convulsiones.

Macroscópicamente los cerebros de los animales infectados aparecen normales, mientras que microscópicamente se detecta astrogliosis, vacuolización intracelular y pérdida neuronal.

## **2.4. EVOLUCIÓN DE LA SITUACIÓN EPIDEMIOLÓGICA**

En España, en el año 2000 se notificó por primera vez esta enfermedad. Desde entonces, se han notificado **556** focos (2019) con un promedio de 30 focos anuales

Según los datos aportados en RASVE por el MAPA, la comparación de los focos de los últimos años pone de manifiesto que es prematuro argumentar una tendencia a la disminución del número total de focos, ya que, aunque el pico de animales positivos se produjo en 2006, la tendencia decreciente no se ha mantenido en los últimos años. No obstante, si se analizan los datos según el tipo de tembladera diagnosticado, el número de focos de tembladera clásica ha disminuido significativamente aumentando los casos de tembladera atípica

## **3. ENCEFALOPATÍA ESPONGIFORME BOVINA**

En abril de 1985 se observó por primera vez en una granja del sur de Inglaterra, una vaca frisona adulta con un síndrome neurológico que fue descrito como "hipersensibilidad crónica con síndrome de descoordinación". En este animal se describió un cambio de carácter acompañado de comportamientos agresivos. Siete meses después en el mismo rebaño se dieron nueve casos más con la misma sintomatología. El análisis histopatológico del cerebro de estos animales mostró una gran similitud existente con los cerebros de animales infectados por scrapie.

Posteriormente, en la segunda mitad de los 90, el proceso se empieza a diagnosticar en Portugal, Suiza, Alemania o Francia y, en noviembre de 2000, llega a España.

Hasta la actualidad se han contabilizado más de 170.000 casos de EEB en todo el mundo.

La importancia de la EEB, aparte de las consecuencias económicas para la industria derivada de la explotación de ganado vacuno, aumentó al considerarse el riesgo potencial que constituía para el hombre. Este riesgo se vio confirmado en 1995 cuando dos adolescentes murieron en Inglaterra con síntomas de la enfermedad de Creutzfeld-Jakob (CJD).

### **3.1. ETIOLOGÍA**

El agente causante de la encefalopatía espongiforme bovina que primero fue descrito y hoy es conocido como EEB clásica, afecta típicamente al ganado bovino, aunque se conoce que

en personas provoca la variante de la enfermedad de Creutzfeldt-Jakob (ECJv), descrita en Reino Unido por primera vez en 1995 y asociada a la ingesta de tejido contaminado del ganado vacuno. Por ello, dado su carácter zoonótico y la ausencia de un tratamiento eficaz, la manipulación en el laboratorio de tejidos que contengan o que se sospeche contengan este agente ha de realizarse con un nivel de bioseguridad 3. Este nivel puede flexibilizarse a lo que se denomina un nivel de seguridad 3 derogado considerando que la transmisión de este agente solo puede producirse por vía parenteral o digestiva.

Por otra parte, además de la forma clásica, el ganado bovino también puede desarrollar dos formas atípicas de EEB. La EEB tipo H y la de tipo L, que igualmente deben ser tratadas bajo un nivel de bioseguridad 3 derogado. Es importante resaltar que estudios experimentales han demostrado que estas dos cepas se transmiten en modelos de ratones silvestres y transgénicos para ovino, bovino y humanos.

Asimismo, la EEB clásica también puede llegar a afectar al ganado ovino y caprino, como así se ha demostrado a nivel experimental, si bien su riesgo real es muy limitado puesto que su descripción a nivel de campo es anecdótica.

### **3.2. EPIDEMIOLOGÍA**

La EEB se originó por la transmisión del agente de scrapie desde la oveja hasta la vaca mediante el empleo de piensos suplementados con harinas de carne que contenían proteínas de origen ovino cuyo proceso de fabricación había experimentado ciertos errores desde el punto de vista tecnológico haciendo que no alcanzaran las condiciones necesarias para destruir el agente infeccioso.

Tras la transmisión inicial entre especies, el alimento contaminado por el agente causante de la EEB (harinas de carne) pudo contribuir al desarrollo de la epidemia. En 1988 Gran Bretaña y, posteriormente, otros países prohibieron la alimentación de rumiantes con piensos suplementados con proteína de rumiante. Actualmente se desconoce si existen mecanismos de transmisión horizontal de la EEB aunque sí que se sabe que no es posible una transmisión vertical.

### **3.3. SIGNOS Y LESIONES**

Los signos clínicos de la BSE aparecen típicamente entre los 4 y 5 años de edad como una aprehensión progresiva, hiperestesia y descoordinación del paso con una duración de 1 a 6 meses antes de la muerte.

La patología de la EEB es muy parecida a la del scrapie de la oveja. Los cambios más notorios consisten en astrogliosis, vacuolización intracelular, pérdida de neuronas y formación de placas amiloides ocasionales. La ausencia de variación observada en los patrones de vacuolización del tejido encefálico en el ganado afectado, tanto procedente de casos naturales como de infecciones experimentales, sugiere la posibilidad de que una única cepa de príon pudiera ser la causante de la epidemia de EEB.

### 3.4. EVOLUCIÓN DE LA SITUACIÓN EPIDEMIOLÓGICA

El primer animal positivo detectado en España se confirmó a finales de noviembre de 2000. Desde entonces y hasta diciembre de 2019 se han detectado un total de **819** animales afectados.

No obstante, desde 2014 España no confirma ningún caso de EEB clásica, siendo desde entonces únicamente confirmados casos de EEB atípica, de origen desconocido y considerados como espontáneos. Por ello, en la 84ª Sesión General de la Asamblea Mundial de la OIE celebrada en mayo de 2016, la Organización Mundial de Sanidad Animal reconoció oficialmente a España como país cuyo riesgo de EEB es insignificante, lo que supuso un importante logro desde el punto de vista comercial y ha abierto el mercado para la exportación a numerosos países.

Las CCAA con un mayor número de animales positivos son: Galicia, Castilla y León y Cataluña. Por provincias la incidencia es mayor en Lugo, Coruña, Pontevedra y Salamanca.

## 4. MARCO LEGAL.

### 4.1. PROGRAMA INTEGRAL COORDINADO DE VIGILANCIA Y CONTROL DE LAS EETs.

El plan de actuación frente a las EETs que se está aplicando en la actualidad en España, al igual que en toda Europa, persigue evitar cualquier mínimo riesgo de transmisión de la enfermedad a la cadena alimentaria, controlar la enfermedad en las poblaciones animales y establecer medidas que permitan recuperar la confianza del consumidor en relación a las EETs.

La base del programa la constituye el **Real Decreto 3454/2000**, que aprueba el **Programa Integral Coordinado de Vigilancia y Control de las EET**.

Dentro de este programa, son comunes tanto al Scrapie como a la EEB los siguientes aspectos:

Autoridades competentes incluidas en el programa.

La **Subdirección General de Sanidad e Higiene Animal y Trazabilidad** es la encargada de la coordinación del Programa y quien informa a la Comisión Europea de la evolución de esta enfermedad.

La toma de decisiones se realiza en el marco del **Comité Nacional del Sistema de Alerta Sanitaria Veterinaria** en el cual están representadas todas las comunidades autónomas.

Los Servicios Veterinarios de Sanidad Animal y Producción, así como de Salud Pública y de Control de la Calidad Agroalimentaria de las Comunidades Autónomas son los encargados de la ejecución del programa, de la recopilación de datos y la

evaluación e informatización de los datos obtenidos en su territorio y de su remisión a las autoridades centrales.

#### Laboratorios.

El **Laboratorio Central de Veterinaria** de Algete (Madrid) del MAPA es el Laboratorio Nacional de Referencia para el diagnóstico de las Encefalopatías Espongiformes Transmisibles en animales.

El **Laboratorio Arbitral Agroalimentario** del MAPA es el Laboratorio Nacional de Referencia para el control de la presencia de restos o productos animales, incluidas harinas de carne y huesos en sustancias destinadas a la alimentación de animales de producción.

Los órganos competentes de las Comunidades Autónomas designarán, en su ámbito territorial, los laboratorios responsables del control analítico de las EETs, incluidas las pruebas rápidas definidas en el manual de diagnóstico de la OIE.

#### Medidas en vigor para la notificación de la enfermedad.

La declaración oficial de la enfermedad se efectuará de conformidad con lo dispuesto en el **Real Decreto 526/2014**, por el que se establece la lista de las enfermedades de los animales de declaración obligatoria y se da la normativa para su comunicación.

Se sospechará la existencia de EEB, en el caso de bovinos, en animales de más de veinte meses de edad que presenten síntomas neurológicos y de comportamiento, cuando la enfermedad no pueda excluirse basándose en la respuesta al tratamiento o bien tras un examen de laboratorio.

Si los órganos competentes de las CCAA no pudiesen descartar la existencia de la enfermedad, se procederá a:

- Sacrificio del animal sospechoso.
- Toma de muestras. En caso de muerte del animal en la propia explotación, se realizará la toma de muestras in situ, o, siempre que se garanticen las condiciones óptimas de obtención de la muestra,
- Remisión de las muestras al laboratorio

Todas las partes del cuerpo del animal sospechoso, incluida la piel se conservarán bajo vigilancia oficial.

Cuando se confirme la enfermedad por el Laboratorio Nacional de Referencia de las EETs, la Subdirección General SHAT notificará a la autoridad competente de la CC.AA. de donde fuera originario el animal, al objeto de que esta efectúe la declaración oficial de la enfermedad y proceda a realizar la investigación epidemiológica y a aplicar las medidas de erradicación de foco.

## **4.2. PROGRAMA NACIONAL DE VIGILANCIA, CONTROL Y ERRADICACIÓN DE LA TEMBLADERA**

En el caso particular del Scrapie, la base legal es también el RD 3454/2000 pero junto con dicha norma se aplica el **Reglamento 36/2005**, que incluye la realización rutinaria de pruebas discriminatorias entre EEB y Tembladera.

Los campos específicos del Scrapie incluyen un programa de vigilancia activa, de vigilancia pasiva, de genotipado y medidas específicas de erradicación.

### **4.2.1. Programa de vigilancia activa**

En primer lugar, el programa de vigilancia activo está destinado a la búsqueda activa de la enfermedad mediante un muestreo aleatorio y representativo de un determinado número de animales, clasificado en distintos grupos, denominados "subpoblaciones".

- Animales destinados a consumo humano y no sacrificados para consumo humano, mayores de 18 meses, o en cuya encía hayan hecho erupción dos incisivos definitivos (muertos en explotación y sacrificados, pero no para consumo humano).
- Animales procedentes de rebaños infectados (rebaños sometidos a las medidas de control y erradicación).
- Animales procedentes de rebaños sometidos a seguimiento (análisis de ovinos, durante 2 años, tras la aplicación de las medidas).
- Todas las explotaciones que realicen comercio intracomunitario. El muestreo dependerá del estatus de riesgo frente a la tembladera clásica de cada explotación de origen, del estatus de la explotación o país de destino los animales y de la orientación productiva.

### **4.2.2. Programa de vigilancia pasiva**

Por otra parte, todo animal que presente sintomatología clínica compatible con la tembladera será sacrificado y se procederá al envío de tejido al Laboratorio Nacional de Referencia donde será sometido a pruebas de confirmación.

### **4.2.3. Análisis del genotipo**

Asimismo, debe determinarse el genotipo del gen que codifica la proteína del prión en ovinos y caprinos bajo las siguientes circunstancias:

- Todos los animales positivos que aparezcan.
- Una muestra representativa, y aleatoria de toda la población ovina de un mínimo de 600 animales ovinos de cualquiera de las siguientes subpoblaciones:
  - Animales sacrificados para consumo humano,
  - Animales muertos en explotación o bien,
  - Animales vivos.

### **4.2.4. Erradicación**

Una vez confirmada la enfermedad, se fijan las siguientes opciones de erradicación tras la realización de una investigación epidemiológica:

#### *Tembladera Clásica:*

- Opción 1: sacrificio inmediato y destrucción completa de los animales identificados en la investigación.
- Opción 2: sacrificio selectivo: sacrificio inmediato o diferido y destrucción de los animales susceptibles
- Opción 3: No sacrificar cuando sea difícil reemplazar los ovinos de un determinado genotipo.

En cualquiera de las opciones es obligatorio aplicar una vigilancia intensificada hasta que se obtenga en todos los animales de la explotación el genotipo más resistente o que trascurren dos años desde el último animal positivo detectado.

En el caso de la *tembladera atípica*, debido a las últimas investigaciones que indican la naturaleza esporádica de la misma, no es necesario realizar una vigilancia intensificada de las explotaciones afectadas.

### **4.3. PROGRAMA NACIONAL DE VIGILANCIA, CONTROL Y ERRADICACIÓN DE LA EEB**

Por su parte, el ganado bovino cuenta también con un programa específico para la vigilancia, control y erradicación de la encefalopatía espongiforme bovina que está compuesto por los elementos comunes, además de las peculiaridades de la vigilancia activa y pasiva.

#### **4.3.1. Programa de vigilancia activa**

Así, el programa de vigilancia activa va encaminado a la búsqueda efectiva de la enfermedad mediante el control de determinadas poblaciones de animales de consumo y animales de riesgo. La orientación del programa establece controles en las siguientes subpoblaciones de bovinos:

##### Animales sacrificados para consumo humano

- Mayores de 30 meses si procedan de países no autorizados a revisar su programa de seguimiento, siempre que sean animales sanos sacrificados para consumo humano o animales sacrificados en campañas de erradicación sin síntomas de enfermedad. En España, los animales nacidos con anterioridad al 1 de enero de 2001 si proceden de explotaciones en las que se hayan diagnosticado casos de EEB.
- Mayores de 48 meses, si se trata de animales de países autorizados a revisar su programa o mayores de 24 meses si se trata de animales de países no autorizados a revisar su programa, si son animales sacrificados de urgencia o animales que presentan alguna sintomatología de enfermedad distinta a EETs, en la inspección *ante mortem*.

##### Animales muertos o sacrificados no para consumo humano.

Se realizarán pruebas a todos los bovinos sacrificados por un foco de EEB en aplicación de las medidas de erradicación y a los mayores de 48 o de 24 meses de edad, según

procedan de países autorizados o no a revisar su programa respectivamente, muertos o sacrificados para no consumo.

#### **4.3.2. Programa de vigilancia pasiva**

La vigilancia pasiva de la enfermedad consiste, básicamente, en la detección de animales positivos debido a la comunicación por parte de veterinarios o ganaderos/responsables de los animales o de la aparición de animales con sintomatología clínica compatible con EETs.

Todos los animales sospechosos por sintomatología se someterán a control mediante **pruebas de confirmación** y, por tanto, deberán ser remitidos directamente al LNR.

#### **4.3.3. Erradicación**

Tras la confirmación de un animal con EEB se procederá a realizar un sacrificio de erradicación total o selectiva de las poblaciones indicadas a continuación.

- Todos los demás bovinos presentes en la explotación en que se halle el animal en el que se haya confirmado la enfermedad.
- En los casos en que se haya confirmado la enfermedad en una hembra, todos sus descendientes, que hayan nacido en los dos años anteriores o tras la aparición clínica de la enfermedad.
- Todos los animales del mismo grupo de edad del animal en que se haya confirmado la enfermedad.

No obstante, respecto al sacrificio de todos los bovinos presentes en la explotación en que se halle el animal confirmado, la autoridad competente podrá eximir del sacrificio a los siguientes animales:

- Todos los que se hayan incorporado a la explotación en los doce últimos meses anteriores a la aparición del caso, siempre que procedieran de otra explotación, así como su posible descendencia en dicho período.
- En aquellas explotaciones en las que el animal afectado hubiese entrado en la misma durante los doce últimos meses, no se procederá al sacrificio total del efectivo de ganado bovino presente en la explotación. En este caso, se deberá proceder al sacrificio y destrucción completa de, al menos, los bovinos descendientes y del mismo grupo de edad, así como de aquellos animales de los que, al no existir trazabilidad perfecta, no se pueda descartar su pertenencia a estos grupos.

La autoridad competente podrá eximir del sacrificio de todos los bovinos presentes en la explotación en que se halle el animal confirmado, procediendo a la erradicación por sacrificio selectivo. En este caso y siempre que esté garantizada la identificación y trazabilidad mediante sistemas informáticos o registros de nacimiento, se procederá al sacrificio de las poblaciones de riesgo definidas por la Organización Mundial de Sanidad Animal (el grupo de edad definido en el Reglamento (CE) 999/2001, así como toda la descendencia nacida en los dos últimos años). Asimismo, se procederá al sacrificio de todos

aquellos bovinos en los que no se pueda garantizar una trazabilidad perfecta mediante sistemas informáticos o registros de nacimiento.

La reintroducción de animales en la explotación se efectuará previa autorización de los órganos competentes de las Comunidades Autónomas.

## **5. DIAGNÓSTICO DE LABORATORIO**

La importancia de las encefalopatías espongiformes transmisibles en la configuración legal de la Unión Europea en materia de sanidad animal y seguridad alimentaria ha sido tal que es la propia normativa la que ha desarrollado los métodos específicos para el diagnóstico, confirmación y discriminación de las mismas, incluyendo una lista de kits comerciales autorizados.

En este sentido, el anexo X del **Reglamento (CE) nº 999/2001**, por el que se establecen disposiciones para la prevención, el control y la erradicación de determinadas encefalopatías espongiformes transmisibles regula los aspectos relacionados con el análisis laboratorial.

No obstante, estas disposiciones quedan reguladas de manera específica por el **Reglamento 1148/2014**, que modifica los anexos II, VII, VIII, IX y X del Reglamento (CE) nº 999/2001 del Parlamento Europeo y del Consejo, por el que se establecen disposiciones para la prevención, el control y la erradicación de determinadas encefalopatías espongiformes transmisibles.

Lógicamente, todas estas técnicas se han desarrollado por parte del **Laboratorio de Referencia de la Unión Europea**, quien asesora y guía a los LNR, en consonancia con el **Manual Terrestre de la OIE**.

En términos generales, las técnicas de laboratorio para la detección de priones pueden ser de diagnóstico, de confirmación o de discriminación.

Las **técnicas de diagnóstico** son llevadas a cabo por parte de los laboratorios oficiales de las CC.AA. a partir de muestras procedentes de la vigilancia activa y consisten en pruebas rápidas del tipo ELISA. Un resultado positivo o dudoso requiere la confirmación por parte del laboratorio nacional de referencia.

Para la **confirmación**, se llevan a cabo técnicas moleculares o histológicas. Las técnicas moleculares se basan en una prueba del tipo Western Blot o inmunotransferencia y las histológicas consisten en la identificación de zonas afectadas sobre el tejido nervioso a nivel microscópico.

El último paso es la **discriminación** de cepas que puede ser realizada mediante técnicas también de inmunotransferencia o bien mediante otro tipo de técnicas.

No obstante, desde el punto de vista de la naturaleza de las técnicas analíticas, podemos clasificar las técnicas de detección de priones en dos grandes grupos: técnicas moleculares y técnicas histológicas.

## **5.1. TÉCNICAS MOLECULARES**

Por una parte, las técnicas moleculares incluyen las pruebas rápidas y las de inmunotransferencia.

Las **pruebas rápidas** son de tipo ELISA y se basan en la identificación de la proteína priónica patógena a partir de tejido nervioso mediante su captura con dos anticuerpos específicos que son visualizados gracias a la presencia de una enzima (peroxidasa o fosfatasa alcalina) que puede ser puesta en evidencia mediante la adición de su sustrato, haciendo que emita color y cuantificado por medio de un espectrofotómetro.

De la misma forma, las pruebas de **inmunotransferencia** detectan la proteína priónica anormal gracias a su resistencia parcial a una digestión con proteinasa K que resulta en la fragmentación en tres regiones (diglicosilada, monoglicosilada y no glicosilada) que se observan tras una purificación de la muestra, separación electroforética, transferencia a una membrana de PVDF e inmunodetección con un anticuerpo específico por una reacción de quimioluminiscencia.

La inmunotransferencia puede llevarse a cabo modificando las condiciones de digestión con la proteinasa K y empleando diferentes tipos de anticuerpos, lo cual, además de la confirmación, hace posible la discriminación de diferentes cepas como sucede en la EEB, que se distingue entre EEB clásica, EEB atípica tipo H y EEB atípica tipo L.

## **5.2. TÉCNICAS HISTOLÓGICAS**

Por su parte, las técnicas histológicas persiguen identificar, directa o indirectamente, la presencia del prion patógeno sobre el tejido nervioso central.

La presencia de priones puede manifestarse, indirectamente, mediante la visualización de tejido dañado (presencia de vacuolas o tejido nervioso fragmentado con muerte neuronal). Esta identificación se lleva a cabo mediante técnicas de **histopatología** que se fundamentan en una tinción básica del tejido nervioso con hematoxilina/eosina.

Sin embargo, también es posible la identificación directa del prion sobre el tejido nervioso mediante **técnicas inmunohistoquímicas**. Estas técnicas se basan en el uso de anticuerpos específicos que, de igual modo que en un ELISA, se unen específicamente al prion situado en el tejido y su presencia se manifiesta gracias a una enzima cuya actividad puede ser evidenciada mediante la adición de un sustrato que es visualizada al microscopio mediante la emisión de color.

### 5.3 OTRAS TÉCNICAS

Finalmente, se han desarrollado otro tipo de técnicas en el ámbito de la investigación que pueden resultar de interés para la discriminación de cepas de priones tanto de Scrapie como de EEB.

En este sentido, cabe destacar las **técnicas de amplificación cíclica de proteínas anormalmente plegadas (PMCA, *protein misfolding cyclic amplification*)** y los bioensayos **con ratones transgénicos** que permiten predecir el comportamiento de diferentes cepas en especies no estudiadas por medio de la generación de animales que contengan el prion de la especie de estudio.

MATERIAL NO OFICIAL

## BIBLIOGRAFÍA

Scrapie o Tembladera. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación.  
[https://www.mapa.gob.es/en/ganaderia/temas/sanidad-animal-higiene-ganadera/sanidad-animal/enfermedades/scrapie-tembladera/scrapie\\_tembladera.aspx](https://www.mapa.gob.es/en/ganaderia/temas/sanidad-animal-higiene-ganadera/sanidad-animal/enfermedades/scrapie-tembladera/scrapie_tembladera.aspx)

Programa Plurianual Nacional de Vigilancia, Control y Erradicación de la Encefalopatías Espongiforme de los Pequeños Rumiantes (Tembladera). Año 2021.  
[https://www.mapa.gob.es/es/ganaderia/temas/sanidad-animal-higiene-ganadera/programatembladera2021abril\\_tcm30-553688.pdf](https://www.mapa.gob.es/es/ganaderia/temas/sanidad-animal-higiene-ganadera/programatembladera2021abril_tcm30-553688.pdf)

Encefalopatía Espongiforme Bovina (EEB). Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación.  
<https://www.mapa.gob.es/es/ganaderia/temas/sanidad-animal-higiene-ganadera/sanidad-animal/enfermedades/eeb/eeb.aspx>

Programa Plurianual Nacional de Vigilancia, Control y Erradicación de la Encefalopatías Espongiforme Bovina. Año 2021.  
[https://www.mapa.gob.es/es/ganaderia/temas/sanidad-animal-higiene-ganadera/programaeeb2021\\_tcm30-579745.pdf](https://www.mapa.gob.es/es/ganaderia/temas/sanidad-animal-higiene-ganadera/programaeeb2021_tcm30-579745.pdf)

Reglamento (CE) nº 999/2001, por el que se establecen disposiciones para la prevención, el control y la erradicación de determinadas encefalopatías espongiformes transmisibles.  
<https://eur-lex.europa.eu/legal-content/ES/ALL/?uri=celex:32001R0999>

Reglamento 1148/2014, que modifica que modifica los anexos II, VII, VIII, IX y X del Reglamento (CE) n ° 999/2001 del Parlamento Europeo y del Consejo, por el que se establecen disposiciones para la prevención, el control y la erradicación de determinadas encefalopatías espongiformes transmisibles  
<https://eur-lex.europa.eu/legal-content/ES/TXT/?uri=CELEX%3A32014R1148>

Manual Práctico de Pruebas Diagnósticas y de las Vacunas para los Animales Terrestres. OIE.  
<https://www.oie.int/es/que-hacemos/normas/codigos-y-manuales/acceso-en-linea-al-manual-terrestre/>

**MATERIAL PARA LA PREPARACIÓN DEL TEMA 75**

**ENFERMEDADES DE LA FAUNA SILVESTRE. MARCO LEGAL. PLAN NACIONAL DE VIGILANCIA EN FAUNA SILVESTRE Y PLAN DE ACTUACIÓN SOBRE TUBERCULOSIS EN ESPECIES SILVESTRES (PATUBES). DIAGNÓSTICO DE LABORATORIO.**

*Este material no tiene carácter oficial, por lo que en ningún caso vinculará al Tribunal Calificador. Constituye, únicamente, un instrumento complementario que servirá de apoyo al opositor para enfocar cada uno de los epígrafes, pero nunca de forma exclusiva ni excluyente. El Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación no se hace responsable del contenido del mismo.*

*Los materiales no serán objeto de actualización constante.*

## **ÍNDICE**

### **1. ENFERMEDADES DE LA FAUNA SILVESTRE. MARCO LEGAL**

### **2. PLAN NACIONAL DE VIGILANCIA EN FAUNA SILVESTRE**

2.1. POBLACIONES INVOLUCRADAS

2.2. UNIDADES DE MUESTREO

2.3. CONTROL DE ENFERMEDADES

### **3. PLAN DE ACTUACIÓN SOBRE TUBERCULOSIS EN ESPECIES SILVESTRES (PATUBES)**

3.1. ZONIFICACIÓN DEL TERRITORIO NACIONAL

3.2. CONTROLES Y OBLIGACIONES DEL PLAN

### **4. DIAGNOSTICO DE LABORATORIO**

MATERIAL NO OFICIAL

## **1. ENFERMEDADES DE LA FAUNA SILVESTRE. MARCO LEGAL**

La sanidad animal tiene un enorme impacto en la salud pública, la producción de alimentos, la economía y el medio ambiente. La producción ganadera se ha visto afectada negativamente por la mortalidad directa de animales y por las medidas aplicadas para garantizar la sanidad y seguridad del comercio internacional con el objeto de limitar la expansión de las enfermedades. Los animales, y muy particularmente la fauna silvestre, se consideran la fuente de más del 70% de todas las enfermedades emergentes. En consecuencia, la vigilancia sanitaria de la fauna es crítica para el control de esas enfermedades.

Las enfermedades de la fauna silvestre pueden derivar en enfermedades zoonóticas, afectar a la sanidad ganadera, comprometer la producción cinegética o por sus efectos en la conservación de la fauna silvestre.

Actualmente en España, las poblaciones de animales silvestres son frecuentemente manejadas mediante cercados, alimentación y traslados, lo que las convierte en especies pseudo-ganaderas con cuidados sanitarios limitados. En este contexto, se deben tener en consideración las conexiones entre patógenos, animales silvestres y domésticos, medio ambiente y actividades humanas. Esta red de factores forma un entramado dinámico donde emergen nuevos patógenos o nuevos hospedadores, donde los cambios en la densidad de población o en el comportamiento del hospedador afectan a la prevalencia, y donde los agentes patógenos pueden modificar su virulencia y aumentar su rango de hospedadores.

El ámbito legal que define todas las actuaciones de lucha frente a las enfermedades de la fauna silvestre con relevancia en sanidad animal se halla recogido en la siguiente normativa:

- **Ley 8/2003**, de 24 de abril, de Sanidad Animal
- **Real Decreto 526/2014**, de 20 de junio, por el que se establece la lista de las enfermedades de los animales de declaración obligatoria y se regula su notificación.
- **Real Decreto 1082/2009**, de 3 de julio, por el que se establecen los requisitos de sanidad animal para el movimiento de animales de explotaciones cinegéticas, de acuicultura continental y de núcleos zoológicos, así como de animales de fauna silvestre.
- **Real Decreto 50/2018**, de 2 de febrero, por el que se desarrollan las normas de control de subproductos animales no destinados al consumo humano y de sanidad animal, en la práctica cinegética de caza mayor.
- **Ley 42/2007**, de 13 de diciembre, del Patrimonio Natural y de la Biodiversidad
- **Real Decreto 138/2020**, de 28 de enero, por el que se establece a normativa básica en materia de actuaciones sanitarias en especies cinegéticas que actúan como reservorio de la tuberculosis (complejo *Mycobacterium tuberculosis*).
- **Reglamento 2016/429** “Legislación sobre sanidad animal”

Las enfermedades que tienen mayor interés en la sanidad de la fauna silvestre son aquellas en las cuales la fauna tiene una alta probabilidad de afectar sustancialmente al estatus sanitario de una región, o aquellas enfermedades con un elevado impacto sobre la salud y bienestar humanos, la economía, el manejo y la conservación de la propia fauna silvestre.

La **fauna silvestre** es un conjunto muy heterogéneo, que incluye:

- Animales asilvestrados: animales domésticos que campean libres o incluso se han incorporado a la fauna salvaje (por ejemplo, los perros o los cerdos asilvestrados).
- Fauna silvestre alóctona: especies de animales salvajes, no originarias de España, que han sido introducidos (por ejemplo, el mapache).
- Fauna silvestre autóctona: fauna que comprende las especies animales originarias de España, incluidas las que invernan o están de paso.

Otra clasificación importante de la fauna silvestre es la que se refiere a su protección y aprovechamiento:

- Especies cinegéticas: las especies susceptibles de aprovechamiento cinegético son en general las más importantes para la sanidad animal (por su abundancia y proximidad filogenética al ganado) y las más accesibles para la toma de muestras durante la temporada de caza. Dentro de las especies cinegéticas pueden distinguirse los animales silvestres de aquellos otros que son objeto de producción intensiva, normalmente con fines de repoblación para caza. Estos últimos son animales puramente ganaderos y por tanto susceptibles de controles estrictos en el marco de la legislación ganadera y del Real Decreto por el que se establecen los requisitos de sanidad animal para el movimiento de animales silvestres (RD 1082/2009). Por lo tanto, las granjas cinegéticas son, a todos los efectos, explotaciones.
- Especies protegidas: son con frecuencia víctimas de enfermedades mantenidas por especies domésticas o cinegéticas más abundantes. La diferencia entre especies cinegéticas y especies protegidas también afecta a las posibilidades para su control e incluso para su estudio desde el punto de vista sanitario.

La última peculiaridad reseñable en relación con la fauna silvestre se refiere a las dificultades para la toma de muestras y la realización de pruebas diagnósticas. Es importante considerar qué especie y qué enfermedad se pretende estudiar, ya que los órganos diana y las técnicas de diagnóstico variarán caso por caso.

## **2. PLAN NACIONAL DE VIGILANCIA EN FAUNA SILVESTRE**

### **2.1. POBLACIONES INVOLUCRADAS**

El plan nacional de vigilancia en fauna silvestre del año 2022 hace referencia principalmente a la fauna silvestre terrestre española de las clases aves y mamíferos. Las especies clave en este plan de vigilancia son:

- **Aves:** Los animales incluidos en este grupo tienen mucha importancia debido a las rutas migratorias, la acogida de aves en invierno, y al ser el último reducto de muchas especies amenazadas a escala europea. En cuanto al riesgo que representan para la sanidad animal, destacan las aves acuáticas o migratorias como potenciales vehículos de determinados agentes infecciosos (como el virus de la influenza), su afinidad a especies ganaderas, o su proximidad al hombre y al ganado, con su consiguiente relevancia en el campo de la bioseguridad ganadera.
- **Carnívoros:** En este grupo destaca el zorro, que comparte muchas enfermedades con el perro, está muy ampliamente distribuido y en contacto con carroñas o numerosas fuentes de infección.
- **Suidos:** En este grupo destaca el jabalí, con el que el cerdo comparte todas las enfermedades infecciosas y parasitarias, por lo que participa en la epidemiología de numerosas enfermedades (Peste Porcina Africana, Peste Porcina Clásica, Aujeszky...). Se le considera el principal reservorio de la tuberculosis bovina en España, y está provocando la expansión de la peste porcina africana en los países del este europeo.
- **Lagomorfos:** Los conejos y las liebres tienen importancia por ser objeto de consumo, y por compartir enfermedades con la cunicultura industrial y zoonosis importantes como la Tularemia.
- **Rumiantes silvestres:** En este grupo destacan los cérvidos, que pueden tener importancia epidemiológica en la epidemiología de la tuberculosis bovina; y los bóvidos silvestres, los cuales están poco extendidos, por lo que su relevancia sanitaria es limitada.

## **2.2. UNIDADES DE MUESTREO**

En España hay una gran biodiversidad de ambientes, por lo que el muestreo y análisis de la fauna silvestre se puede clasificar según sus características paisajísticas en 6 unidades de muestreo:

**1.- España atlántica:** caracterizada por precipitaciones elevadas. Faunísticamente este paisaje se aproxima más a los países europeos cercanos, como Francia o Reino Unido, y alberga algunas especies que se encuentran en el límite de su distribución en Eurasia, como la liebre europea o norteña. Diversidad de ungulados (ciervo, corzo, rebeco, jabalí) en densidades localmente altas sin manejo artificial. Densidades relativamente altas y diversidad de carnívoros. Bajas densidades de lagomorfos y galliformes. Los humedales atlánticos tienen importancia durante las migraciones.

**2.- Llanuras cerealísticas:** con dominio de agrosistemas de secano. Abundancia de especies propias de terrenos abiertos, incluyendo lagomorfos como conejo y liebre ibérica, y aves esteparias como perdiz roja. Corzo y jabalí se encuentran en expansión, siendo muy abundante el segundo en áreas del Prepirineo. Escaso manejo artificial de la fauna.

**3.- Ecosistemas mediterráneos continentales:** En función de la vegetación y los usos agrícolas, las comunidades faunísticas pueden ser más afines a las de las mesetas, con lagomorfos y aves

esteparias, o a los ecosistemas forestales mediterráneos, con los ungulados silvestres, principalmente ciervo y jabalí, como elementos más importantes desde el punto de vista faunístico-sanitario. Densidades de ciervo y jabalí medias a altas, con frecuencia con manejo artificial. Fuerte interacción con ganadería extensiva.

**4.- Montañas interiores:** de clima mediterráneo muy continental. Diversidad de ungulados pero densidades generalmente moderadas. Bajas densidades de lagomorfos y galliformes. Escasa producción cinegética manejada.

**5.- Costa sur y oriental:** Clima templado localmente árido. La ausencia de heladas y la proximidad a rutas migratorias de aves favorece la aparición de nuevas enfermedades. Esta unidad alberga algunos de los humedales más importantes de la Península, tanto para migración como durante la invernada. En cambio, son bajas las densidades de mamíferos a excepción del conejo, y localmente de algunos ungulados como la cabra montés. El jabalí es localmente abundante.

**6.- Islas Canarias:** Su situación geográfica aislada permite considerarlas una unidad. Al tratarse de islas, cuentan con numerosas especies amenazadas que son especialmente vulnerables a las enfermedades. Bajas densidades de mamíferos silvestres a excepción del conejo, especie introducida y localmente abundante.



### 3. CONTROL DE ENFERMEDADES

El objetivo del Plan de Vigilancia en fauna silvestre es conocer su situación sanitaria, prevenir la diseminación de enfermedades entre la fauna silvestre y la doméstica, y proteger la salud pública. Para ello, este plan debe enlazarse con los programas de los organismos internacionales (UE, OIE), con los programas nacionales del Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, y con los planes Regionales de las distintas Comunidades Autónomas.

Al igual que en el resto de Programas Nacionales de Vigilancia de enfermedades animales, la coordinación general del Plan corresponde al Ministerio de Agricultura, a través de la Subdirección General de Sanidad e Higiene animal y Trazabilidad, mientras que las autoridades competentes de las comunidades autónomas son las encargadas de llevar a cabo la ejecución del mismo.

En el caso de que los Programas Nacionales de Vigilancia de determinadas enfermedades recojan la obligación de analizar la presencia de dicha enfermedad en la fauna silvestre, no será necesario realizar el análisis bajo el **Plan de Vigilancia de la Fauna Silvestre**. Este es el caso de enfermedades como la Influenza, la Fiebre del Nilo, Aujeszky, Peste Porcina Clásica, Peste Porcina Africana, Triquina, Rabia o Hidatidosis. En estos casos hay que lograr una buena coordinación entre el plan de vigilancia de la fauna silvestre y los respectivos programas de vigilancia sanitaria.

La **vigilancia** puede realizarse de forma **activa o pasiva**. La vigilancia **pasiva** se lleva a cabo para cualquier tipo de enfermedad, localización y especie. Para la vigilancia **activa**, es necesario centrarse en las enfermedades con mayor impacto, en las especies más conflictivas desde el punto de vista sanitario, y realizar un muestreo dirigido a aquellas especies que por su abundancia o aprovechamiento cinegético resulten convenientes.

Las muestras de fauna silvestre son costosas de obtener, por lo que es imprescindible reducir al mínimo el volumen de muestreo, y procurar disponer de información suficiente de cada especie. Se ha establecido obtener como mínimo un número de muestras para detectar con un 95% de confianza enfermedades con prevalencia igual o superior al 5% (bóvidos silvestres) o al 10% (resto de taxones) en cualquiera de las unidades de muestreo, y concentrar el esfuerzo en las unidades y taxones más relevantes desde el punto de vista sanitario. Estas muestras serán conservadas en bancos de muestras. Su análisis será realizado por laboratorios autorizados, y las muestras positivas se enviarán al laboratorio nacional de referencia correspondiente.

En la siguiente tabla (tabla 1) se detallan las enfermedades consideradas relevantes para este plan, así como las especies en las que se lleva a cabo la vigilancia y los muestreos y análisis a realizar.

Grupo taxonómico	Enfermedad	Programa	Muestras	Análisis	Observaciones
Aves (principalmente acuáticas, pero también galliformes, columbiformes,...)	Influenza aviar*	Propio dependiente del MAPA	Para monitorización de IABP (por su interés para IAAP) hisopos cloacales o heces frescas y sueros. Para IAAP: Hisopos orofaringe, suero	PCR, ELISA de competición	
	Fiebre del Nilo Occidental*	Propio dependiente del MAPA	Hisopos de orofaringe, suero	PCR, ELISA	-
Lagomorfos	Mixomatosis	PVFS	Tumores	PCR	Vigilancia pasiva
	Enfermedad Hemorrágica Virica	PVFS	Hígado	PCR, ELISA de antígeno	Vigilancia pasiva
	Tularemia	PVFS	Bazo, suero	Cultivo o PCR, aglutinación	
Jabalí y cerdo asilvestrado	Peste porcina clásica*	Propio dependiente del MAPA	Tejido linfoide. Suero	PCR. ELISA	-
	Peste porcina africana*	Propio dependiente del MAPA	Tejido linfoide. Suero	PCR. ELISA	-
	Enfermedad de Aujeszky*	Propio dependiente del MAPA	Tejido linfoide. Suero	PCR. ELISA	-
	Enfermedad Vesicular Porcina	Propio dependiente del MAPA	Tejido vesículas. Suero	PCR. ELISA	-
	Tuberculosis bovina	PVFS con monitorización acorde al PATUBES	Linfonódulos mandibulares y otros craneales-cervicales,, suero, vísceras con lesiones	ELISA y examen de lesiones, cultivo, PCR	
	Brucelosis ( <i>B. suis</i> )	PVFS	Linfonódulos inguinales, bazo, suero	Rosa de Bengala en suero, ELISA, cultivo	Confirmación de serología positiva por cultivo/PCR
	Triquinosis*	Propio dependiente del MSCBS			
Cérvidos (principalmente ciervo)	Tuberculosis bovina	PVFS con monitorización acorde al PATUBES	LN retrofaringeos, bronquiales y mesentéricos, suero, vísceras con lesiones	Examen de lesiones, cultivo y PCR,	
	Brucelosis ( <i>B abortus</i> y <i>melitensis</i> )	PVFS	LN inguinales, suero, bazo	Rosa de Bengala , ELISA, cultivo o PCR	Confirmación de serología positiva por cultivo/PCR
Bóvidos (rebeco, cabra montés, muflón, arruí)	Pestivirus (rebeco)	PVFS	Suero, bazo	Serología, PCR	
	Brucelosis ( <i>B abortus</i> y <i>melitensis</i> )	PVFS	LN inguinales, suero, bazo	Rosa de Bengala, ELISA, cultivo o PCR	Confirmación de serología positiva por cultivo/PCR
	Sarna sarcóptica	PVFS	Piel, suero	Examen parasitológico directo, PCR, serología	
Carnívoros (zorro, lobo, tejón)	Rabia*	Propio dependiente del MSCBS			
	Moquillo	PVFS	Suero, tejidos	Serología o PCR	
	Tuberculosis bovina (tejón)	PVFS con monitorización acorde al PATUBES	LN retrofaringeos, mandibulares, traqueobronquiales, mediastínicos u otrosuero	Examen de lesiones, cultivo, PCR, y, G-IFN	
	Sarna sarcóptica	PVFS	Piel, suero	Examen parasitológico directo, PCR, serología	
	Equinocosis/Hidatidosis*	Propio dependiente de las CCAA	Intestino, heces, suero	Examen macro/microscópico, PCR, ELISA	
Roedores (micrótidios)	Tularemia	PVFS	Animal entero	Cultivo o PCR, aglutinación	

Tabla1. Enfermedades relevantes Plan de Vigilancia

## **2. PLAN DE ACTUACIÓN SOBRE TUBERCULOSIS EN ESPECIES SILVESTRES (PATUBES)**

La tuberculosis es una de las enfermedades compartidas entre el ganado, la fauna silvestre y, esporádicamente, la especie humana, en la que en los últimos años se ha evidenciado el importante papel que en la transmisión y mantenimiento de la enfermedad están jugando ciertos reservorios silvestres como los jabalíes.

Las importantes repercusiones económicas negativas que la tuberculosis animal tiene en el sector ganadero y cinegético, los efectos sobre la sanidad y el bienestar de los animales, tanto domésticos como silvestres, así como en especies cinegéticas, y el estancamiento en el progreso hacia su erradicación en el ganado bovino, sin olvidar el riesgo para la salud pública al actuar el ser humano como otra especie susceptible a la infección, son razones de peso que obligan a reconsiderar todos los factores implicados en la prevención, lucha, control y erradicación de la tuberculosis. Se ha considerado necesario realizar una evaluación exhaustiva de la situación epidemiológica que incluya la presencia de reservorios silvestres infectados con tuberculosis, así como diseñar un enfoque activo para eliminar la infección por tuberculosis en las especies silvestres implicadas.

Esta normativa básica queda recogida en el RD 138/2020. Este plan de actuación afecta a las siguientes especies: jabalí y otros suidos silvestres (*Sus scrofa*), ciervo (*Cervus elaphus*) y gamo (Dama dama).

Las medidas de actuación en especies silvestres deben ser proporcionales al riesgo de transmisión o mantenimiento de la infección que éstas supongan para otras especies silvestres o domésticas, teniendo en cuenta la situación epidemiológica de la enfermedad en el ganado doméstico, la presencia de las especies silvestres reservorio y los resultados de la vigilancia sanitaria, análisis epidemiológico y molecular de las mismas.

### **2.1. ZONIFICACIÓN DEL TERRITORIO NACIONAL**

Para llevar a cabo el plan de actuación sobre la tuberculosis en especies silvestres se realiza una clasificación del territorio atendiendo a tres niveles diferentes:

#### Primer nivel: Regiones PATUBES:

Se clasifica el territorio en cuatro regiones de riesgo (1-4) según el riesgo de aparición de la enfermedad, en base a la prevalencia histórica del territorio.

#### Segundo nivel: Unidades o comarcas veterinarias:

Estas unidades se clasifican dentro de las regiones PATUBES, y hacen referencia al riesgo concreto de aparición de la tuberculosis, según la prevalencia de la enfermedad detectada en los rebaños de bovinos en los dos años anteriores, y la detección de casos positivos en la fauna silvestre. Se clasifican en comarcas de bajo riesgo, riesgo moderado o especial riesgo según el anexo II del RD 138/2020.

#### Tercer nivel: Espacios cinegéticos:

Los espacios cinegéticos se clasifican según las características de vallado que presenten:

- Los espacios de categoría I: incluyen granjas cinegéticas y núcleos zoológicos que disponen de instalaciones adecuadas para el manejo de los animales y la realización de pruebas sanitarias. Se excluyen aquellos núcleos zoológicos cuya finalidad no es la reproducción de las especies cinegéticas que habitan en ellos.
- Espacios de categoría II: constituyen terrenos cinegéticos que disponen de una cerca impermeable perimetral, según lo establecido en el artículo 65.3.f) de la Ley 42/2007, de 13 de diciembre, del Patrimonio Natural y de la Biodiversidad, y/o interna si así lo contempla la normativa autonómica correspondiente, para las especies cinegéticas existentes en su interior, con aporte sistemático de alimento o de agua.
- Espacios de categoría III: son terrenos cinegéticos que disponen de una cerca perimetral impermeable según lo establecido en el artículo 65.3.f) de la Ley 42/2007, de 13 de diciembre (si así lo contempla la normativa autonómica correspondiente), para las especies cinegéticas existentes en su interior, sin aporte sistemático de alimento o de agua.
- Espacios de categoría IV: terrenos cinegéticos no incluidos en las categorías I, II y III, así como los Parques Nacionales donde sus gestores aplican un programa de control de ungulados, o término equivalente establecido por la comunidad autónoma, aprobado por la autoridad competente.

## 2.2. CONTROLES Y OBLIGACIONES DEL PLAN

En todas las regiones PATUBES se realizará la vigilancia anual de la tuberculosis en especies cinegéticas que actúen como reservorio de la tuberculosis. Los datos obtenidos anualmente servirán para reevaluar periódicamente la situación de riesgo de las diferentes provincias y comarcas.

En todas las regiones PATUBES no será compatible el uso de un mismo terreno para especies domésticas y para las especies cinegéticas. Los espacios de categoría I y II deberán estar registrados según el Registro General de Explotaciones Ganaderas (RD 479/2004), y disponer del correspondiente libro de registro. Los espacios de categoría III y IV tan solo deberán estar registrados si pretenden realizar traslados in vivo.

Las técnicas analíticas empleadas serán la Intradermotuberculinización en el caso de los ciervos y gamos, y la técnica ELISA en los jabalíes. Según la categoría del espacio cinegético se realizarán mayor o menor número de pruebas.

**En los espacios de categoría I** se realiza una prueba anual a todos los ciervos o gamos mayores de 6 semanas, y a todos los jabalíes mayores de 12 meses. Todos aquellos animales que resulten positivos en los análisis serán sacrificados.

**En los espacios de categoría II** se realizan pruebas anuales a un número representativo de animales, con el objetivo de detectar la enfermedad para una prevalencia esperada del 5% con un grado de confianza del 95%. Estos espacios además deben disponer de un plan sanitario aprobado por la autoridad competente.

**En los espacios de riesgo moderado y alto de categoría III y IV** se reforzarán las condiciones de bioseguridad de las explotaciones de ganado bovino, en especial en lo relativo a sus

cerramientos, limpieza y desinfección de instalaciones., comederos, bebedores y limitación de acceso de los animales silvestres a las instalaciones. En los espacios de especial riesgo se realizarán auditorías de bioseguridad en las explotaciones de ganado bovino.

### **3. DIAGNOSTICO DE LABORATORIO**

Las principales opciones para el diagnóstico de las distintas enfermedades en especies silvestres son las mismas que existen para el diagnóstico en los animales de explotación.

La vigilancia pasiva implica el conocimiento y detección de lesiones producidas por cada una de las enfermedades, así como el análisis histopatológico en muestras de estos animales, el cultivo de dichas muestras en los medios adecuados para detectar el crecimiento o no de los agentes infecciosos causantes de la enfermedad, o la detección de dichos agentes a través de técnicas como la PCR o ELISA. Cada enfermedad tiene un tipo de técnicas recomendadas de diagnóstico, descritas en los programas nacionales de cada una de las enfermedades o los manuales de la OIE, e indicadas en la tabla del punto 2.3.

En el caso de la tuberculosis, se ha indicado anteriormente que la vigilancia activa se lleva a cabo a través de la técnica **intradermotuberculinización** en el caso de **ciervos y gamos**, y la **técnica ELISA en el caso de jabalíes**.

La técnica de la intradermotuberculinización consiste en medir el espesor de la piel, inyectar un derivado proteico purificado de tuberculina por vía intradérmica en la zona medida, y volver a medir el posible hinchazón en el punto de inyección 72 horas después. El resultado se considera positivo si se observa un aumento de espesor del pliegue de la piel de 4 milímetros o superior en el punto de inyección, negativo si es menor de 2 milímetros y dudosa si se encuentra entre 2 y 4 milímetros. Esta prueba puede llevarse a cabo utilizando solo tuberculina bovina, o como prueba comparativa utilizando tuberculinas aviar y bovina.

La técnica ELISA se emplea para detectar la presencia de anticuerpos causantes de la infección en los animales muestreados. Se pueden emplean kits comerciales de ELISA indirectos o de competición.

Por último, la **detección del agente y confirmación** de la enfermedad se lleva a cabo por técnicas como el **cultivo o la PCR**.

El cultivo de mycobacterium es costoso y lento, requiere medios sólidos basados en huevo como el de Lowenstein-Jensen, y puede tardar un mínimo de 8 semanas en crecer. Posteriormente se puede analizar el crecimiento del agente infeccioso mediante la técnica de Ziehl-Neelsen. La técnica de PCR permite amplificar e identificar regiones específicas presentes en bacterias del género mycobacterium. También se pueden diferenciar diferentes cepas de mycobacterium a través de la espigotipificación (amplificación in vitro de espaciadores altamente polimórficos, que separan las regiones repetitivas que flanquean la secuencia de inserción IS6110 del cromosoma bacteriano del complejo de micobacterias).

## **BIBLIOGRAFÍA**

Informe sobre resultados del programa nacional de vigilancia en fauna silvestre 2018.

Ley 8/2003, de 24 de abril, de sanidad animal.

Manual práctico de operaciones en el control de las enfermedades de la fauna silvestre. Enero 2019

Plan de Actuación sobre Tuberculosis en Especies Silvestres

Plan Nacional de Vigilancia Sanitaria en Fauna Silvestre. Enero 2022

Reglamento (UE) 2016/429 “Legislación sobre sanidad animal”

RD 138/2020, de 28 de enero, por el que se establece la normativa básica en materia de actuaciones sanitarias en especies cinegéticas que actúan como reservorio de la tuberculosis (complejo *Mycobacterium tuberculosis*).

RD2611/1996, de 20 de diciembre, por el que se regulan los programas nacionales de erradicación de enfermedades animales.

Manual Terrestre de la OIE 2018. Tuberculosis Bovina. Capítulo 3.4.6.

**MATERIAL PARA LA PREPARACIÓN DEL TEMA 76**

**FUNDAMENTOS DE EPIDEMIOLOGÍA. EPIDEMIOLOGÍA MOLECULAR  
APLICADA A SANIDAD ANIMAL**

*Este material no tiene carácter oficial, por lo que en ningún caso vinculará al Tribunal Calificador. Constituye, únicamente, un instrumento complementario que servirá de apoyo al opositor para enfocar cada uno de los epígrafes, pero nunca de forma exclusiva ni excluyente. El Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación no se hace responsable del contenido del mismo.*

*Los materiales no serán objeto de actualización constante.*

## **ÍNDICE**

### **1. FUNDAMENTOS DE EPIDEMIOLOGÍA**

#### 1.1. INTRODUCCIÓN Y DEFINICIONES

#### 1.2. MEDIDAS DE FRECUENCIA

1.2.1. Prevalencia

1.2.2. Incidencia

1.2.3. Otras medidas de frecuencia

#### 1.3. MEDIDAS DE EFECTO

1.3.1. Riesgo atribuible

1.3.2. Riesgo relativo

1.3.3. Medidas del efecto en estudios de casos y controles

#### 1.4. CLASIFICACIÓN DE ESTUDIOS EPIDEMIOLOGICOS

1.4.1. Según la finalidad

1.4.2. Según la unidad de análisis

1.4.3. Según la direccionalidad

1.4.4. Según la selección de la muestra

1.4.5. Según la relación temporal

1.4.6. Según el control de la asignación del factor de estudio

### **2. EPIDEMIOLOGÍA MOLECULAR APLICADA A SANIDAD ANIMAL**

#### 2.1. EPIDEMIOLOGÍA EN SANIDAD ANIMAL

#### 2.2. EPIDEMIOLOGÍA MOLECULAR

2.2.1. Tipos de marcadores moleculares

2.2.2. Aplicaciones

## 1. FUNDAMENTOS DE EPIDEMIOLOGÍA

### 1.1. INTRODUCCIÓN Y DEFINICIONES

La **epidemiología** es la disciplina científica que estudia la frecuencia y distribución de fenómenos relacionados con la salud y sus determinantes en poblaciones específicas, y la aplicación de este estudio al control de problemas de salud.

El término disciplina alude a un cuerpo de conocimientos que han sido recogidos en libros. El término científico se refiere a que dichos conocimientos fueron obtenidos a través de un camino sistemático o método, que pretende garantizar cierta validez y fiabilidad. El estudio incluye las investigaciones caracterizadas por la simple vigilancia y observación de fenómenos para medir su magnitud y sugerir hipótesis sobre su origen. Este tipo de investigaciones reciben el calificativo de descriptivas. Pero también incluye las investigaciones dirigidas a contrastar estas hipótesis mediante estudios observacionales y experimentales. Estas investigaciones reciben el nombre de analíticas. Distribución significa la medida de la frecuencia y variación de un fenómeno en grupos de población a lo largo del tiempo, en diferentes lugares o formados por diferentes tipos de individuos.

La epidemiología estudia todo tipo de fenómenos relacionados con la salud, no solo enfermedades (hábitos de consumo, dieta, causa de muerte...). Los determinantes de estos fenómenos son todos los factores físicos, biológicos, sociales, culturales o de comportamiento que influyen en la salud.

La disciplina epidemiológica se aplica al control de problemas de salud. Según la porción de la historia natural de la enfermedad que estudia, se puede clasificar en epidemiología de salud pública, aquella que estudia la primera parte de la cadena de sucesos, desde que el individuo se expone a la primera causa de la enfermedad hasta que la desarrolla, por lo que se analizan individuos sanos y se observa cómo enferman; mientras que la epidemiología clínica analiza individuos enfermos en los que mide posibles factores pronósticos y observa en ellos la evolución de la enfermedad.

El rasgo que más diferencia a la epidemiología de otras disciplinas científicas es que el estudio de la frecuencia de fenómenos se realiza en grupos de individuos, poblaciones definidas, y se centra en relaciones probabilísticas.

### 1.2. MEDIDAS DE FRECUENCIA.

#### 1.2.1 Prevalencia

La prevalencia se define como la proporción de sujetos de una población con una determinada característica, en un momento o período concreto. Por ejemplo:

$$P = \frac{N^{\circ} \text{ individuos enfermos}}{N^{\circ} \text{ total de individuos}}$$

La prevalencia es una medida de carácter estático. Es una fotografía donde se refleja la magnitud de un problema en una población y un momento determinado. Normalmente se

utiliza la prevalencia puntual para hacer referencia a un momento concreto, y la prevalencia de período hace referencia a los individuos que en algún momento de dicho periodo estuvieron enfermos.

### 1.2.2. Incidencia

La incidencia indica el número de casos nuevos de individuos con una determinada característica en una población.

Existen dos tipos de incidencias:

- **Incidencia acumulada** (IA o proporción de incidencia): relaciona el número de casos nuevos, con el tamaño de la población al comienzo del periodo de tiempo.

$$IA = \frac{N^{\circ} \text{ de casos nuevos en } \Delta t}{N^{\circ} \text{ individuos al inicio del periodo } (t_0)}$$

Al ser una proporción sus valores se encuentran entre 0 y 1, y puede interpretarse en términos de probabilidad. La probabilidad de desarrollar una determinada característica en un periodo de tiempo.

- **Tasa de incidencia** (I): incluye en el denominador el valor individuo-tiempo, lo que permite analizar poblaciones dinámicas (permiten entradas y salidas). Este valor se consigue sumando los tiempos en observación que cada individuo de estudio se encuentra en riesgo de ocurrencia del evento a medir.

$$I = \frac{N^{\circ} \text{ de casos nuevos}}{N^{\circ} \text{ individuos en el tiempo de observación}}$$

La tasa de incidencia tiene unidades (tiempo<sup>-1</sup>), mientras que la prevalencia y la incidencia son adimensionales. La tasa de incidencia tiene un rango de valores que varía entre 0 e infinito, y su inversa se interpreta como el tiempo medio hasta la ocurrencia de la característica o enfermedad.

### 1.2.3. Otras medidas de frecuencia

**Odds:** Es la razón entre una proporción y su complementaria. Expresa cuánto más probable es la ocurrencia de un fenómeno en relación con la no-ocurrencia.

**Tasa de mortalidad:** relación entre el número de individuos fallecidos, respecto al total de individuos que forman parte de una población concreta.

**Tasa de letalidad:** Proporción de muertes entre los individuos enfermos. Es la incidencia acumulada de muerte en un grupo de enfermos.

## 1.3. MEDIDAS DE EFECTO

Este tipo de medidas se emplea para analizar el “efecto” que tiene la exposición a un determinado factor de riesgo, en la ocurrencia de una enfermedad. Para ello, es necesario conocer la parte de la tasa de incidencia en una población expuesta, que no se debe a la

exposición de dicho factor. Las medidas de efecto se emplean en métodos epidemiológicos analíticos, en los que se estudian dos poblaciones teóricamente idénticas, con la excepción de la exposición o no al factor en estudio. En este caso, la diferencia en las tasas de incidencia podría atribuirse a la exposición de dicho factor.

### **1.3.1. Riesgo atribuible**

Se trata de una medida del efecto absoluto atribuible al factor de riesgo, obtenido al realizar la diferencia de tasas de incidencia entre las dos poblaciones en estudio.

### **1.3.2. Riesgo relativo**

Se trata de una medida de efecto relativo, que indica cuántas veces es más probable la aparición de la enfermedad en el grupo expuesto al factor de riesgo, respecto al efecto en el grupo no expuesto. Este valor se puede calcular realizando el cociente entre la tasa de incidencia de la población expuesta, respecto a la tasa de incidencia de la población no expuesta.

### **1.3.3. Medidas del efecto en estudios de casos y controles**

En este caso no es posible realizar una medición directa de las tasas de incidencias, por lo que la estrategia consiste en comparar el nivel de exposición en los casos, con el equivalente en un grupo de control. Una medida que relaciona el grado de exposición en ambos grupos es la razón de odds. Este valor se utiliza del mismo modo que el riesgo relativo, y se considera una buena aproximación al mismo.

## **1.4. CLASIFICACIÓN DE ESTUDIOS EPIDEMIOLOGICOS.**

Los estudios epidemiológicos se realizan para profundizar en el conocimiento de temas relacionados con la salud. Su principal objetivo es aportar información que sirva de apoyo a la toma de decisiones en la planificación o gestión de actividades relacionadas con la salud. Los estudios epidemiológicos pueden definirse como **los sistemas seguidos para analizar y comparar varias poblaciones o muestras de ellas, detectar la existencia o no de un determinado fenómeno de salud-enfermedad, las causas que la determinan, las consecuencias que comportan y la forma de actuar sobre ellos.**

El método de investigación epidemiológico es una variante del método científico, por lo que consta de las mismas etapas:

- observación y descripción de una situación
- elaboración de una hipótesis
- verificación de dicha hipótesis
- resolución e inferencia causal

Para comenzar un estudio epidemiológico es imprescindible conocer cuál es el objetivo de este, realizar su planificación y diseño de manera adecuada, y llevar a cabo un seguimiento de las actividades realizadas.

Los estudios epidemiológicos se pueden clasificar de diversos modos según los criterios utilizados en su definición:

#### **1.4.1. Según la finalidad**

Los estudios epidemiológicos se pueden clasificar en estudios descriptivos o analíticos. Los estudios descriptivos analizan la frecuencia y distribución de los fenómenos de salud y enfermedad. Este tipo de estudios es el primer paso en cualquier tipo de análisis epidemiológico. Por otro lado, los estudios analíticos evalúan presuntas relaciones causa-efecto entre determinados factores de riesgo y la aparición o no de la enfermedad.

#### **1.4.2. Según la unidad de análisis**

Todos los estudios epidemiológicos analizan una población concreta, pero la unidad de análisis puede ser a nivel individuo, cuando se analizan los datos disgregados de cada sujeto, o a nivel poblacional, cuando se analizan datos agregados en grupos de individuos.

#### **1.4.3. Según la direccionalidad**

Este tipo de clasificación atiende al orden en el que se investiga la asociación entre la causa y el efecto. Los estudios hacia adelante (desde la causa al efecto) seleccionan los individuos pertenecientes a cada grupo en función de su exposición, y analizan en ambos grupos la aparición del efecto. Esta es la característica principal de los estudios de cohortes. Los estudios hacia atrás (desde el efecto a la causa) seleccionan individuos según el efecto que presentan y evalúan en ellos la presencia de la exposición a determinados factores. Un ejemplo de ello sería los estudios de casos y controles. Por último, los estudios transversales no presentan direccionalidad, y evalúan al mismo tiempo la exposición a un determinado factor y el efecto que produce.

#### **1.4.4. Según la selección de la muestra**

En cualquier tipo de estudio epidemiológico es básico establecer cuáles son las condiciones para seleccionar la muestra que se va a incluir en el mismo. Al no ser posible analizar todos los individuos presentes en una población, será necesario realizar una selección de aquellos que se consideren adecuados para llevar a cabo el estudio epidemiológico. Un muestreo representativo trata de seleccionar individuos de forma que todas las posibles variables presentes en la población estén representadas en la muestra a analizar. Un muestreo de conveniencia suele emplearse cuando se quieren estudiar efectos poco frecuentes en la población, por lo que se seleccionan estos individuos de la población.

#### **1.4.5. Según la relación temporal**

El tiempo transcurrido desde que suceden los hechos hasta que se realiza el estudio puede influir sobre la validez de la información, por lo que se considera un factor a tener en cuenta en los estudios epidemiológicos. Los estudios retrospectivos estudian hechos ocurridos antes del comienzo del estudio, mientras que en los estudios prospectivos tan solo se consideran los eventos producidos a partir del inicio del estudio. Los estudios mixtos son los que incluirían ambos tipos de datos.

#### 1.4.6. Según el control de la asignación del factor de estudio

En los estudios observacionales no se controla ningún factor que afecte a la exposición o no de los individuos, mientras que en los estudios experimentales el investigador controla la asignación de la exposición del factor en estudio sobre los individuos.

Los estudios **observacionales** pueden ser:

- Descriptivos: cuyo objetivo es observar y describir la realidad, según las variables en estudio, y ofrecen una fuente de hipótesis para la investigación epidemiológica. Son los tipos de estudio epidemiológicos más habituales. Pueden usarse para describir un caso o una serie de casos, describir datos agregados (frecuencia de un evento), estudios de prevalencia...
- Analíticos observacionales: en este tipo de ensayo se trata de evaluar una hipótesis. Un ejemplo se produce al comparar los individuos en función de su exposición a un factor objeto de estudio, el cual no ha sido asignado por el investigador. Dentro de este tipo de estudios podemos encontrar estudios de casos y controles, cohortes o estudios transversales.

Los **estudios experimentales** son aquellos en los que el investigador asigna la exposición a un determinado factor según el protocolo establecido previamente. Este tipo de estudios evalúan el efecto de exposiciones terapéuticas o preventivas sobre los individuos en estudio.

No todos los estudios epidemiológicos aportan el mismo grado de evidencia, y rara vez se atribuye a un solo estudio la evidencia científica definitiva respecto a un tema. Es importante establecer las características deseables de un estudio epidemiológico antes de llevarlo a cabo para alcanzar la mayor validez posible en sus resultados.

## 2. EPIDEMIOLOGÍA MOLECULAR APLICADA A SANIDAD ANIMAL

La epidemiología molecular no difiere en los fundamentos de la epidemiología tradicional. Cumple los mismos objetivos, y requiere la misma planificación y seguimiento del método. La única diferencia radica en la información que se analiza en esta rama de la epidemiología.

El desarrollo de técnicas moleculares ha abierto un nuevo campo de conocimientos. Anteriormente tan solo se podían analizar determinados fenómenos relacionados con la salud analizando sus consecuencias finales. Pero las técnicas moleculares permiten analizar factores y efectos antes de que las características fenotípicas se expresen.

### 2.1. EPIDEMIOLOGÍA EN SANIDAD ANIMAL

La ley 8/2003 de Sanidad Animal, y el Reglamento 429/2016 de Sanidad Animal Europeo, así como todos los reales decretos y reglamentos delegados y de ejecución derivados a partir de los mismos cumplen varios objetivos entre los que destaca la prevención de enfermedades, y una rápida detección de las enfermedades en caso de aparición; para tomar medidas con la mayor celeridad posible, y evitar las fatídicas consecuencias que puedan tener a nivel sanitario, económico o social. Los sistemas de alerta sanitaria veterinaria nacional, europeo o internacional cumplen este objetivo, alertando a las regiones colindantes a la aparición de un brote según su gravedad.

Los estudios epidemiológicos permiten ampliar los conocimientos sobre la historia natural de las enfermedades: analizando factores de riesgo y su efecto, tiempo de inducción de dichos factores, evolución de las enfermedades, identificar factores pronósticos y medir su efecto, o evaluar la efectividad de los abordajes diagnósticos o terapéuticos. También aporta conocimiento para el control de los problemas de salud, con el objetivo de establecer cuál es el mejor abordaje en la planificación sanitaria: establecer objetivos cuantificables, uso de recursos disponibles, prioridades de actuación, evaluación del progreso en el control de la enfermedad... Y por último también aporta conocimiento para mejorar el manejo clínico de los individuos enfermos, o sanos con mayor riesgo.

El estudio epidemiológico es básico en la programación de los planes de vigilancia de cada una de las enfermedades establecidas en la legislación.

La legislación establece la priorización en el control de cada una de las enfermedades según la gravedad, la prevalencia de la enfermedad, el estado sanitario de la cabaña, el riesgo de entrada, su capacidad zoonótica o de dispersión... Muchos son los factores que afectan a la estrategia de control de cada una de las enfermedades, y según dichos factores se establece la obligatoriedad o no de los programas de vigilancia. Los procedimientos de cada programa de vigilancia establecen el método de análisis, muestreos, técnicas de control, o actuaciones tras la obtención de los resultados. Todo debidamente coordinado y supervisado por la autoridad competente, así como actualizado con la periodicidad establecida según la situación sanitaria.

## **2.2. EPIDEMIOLOGÍA MOLECULAR**

La epidemiología molecular incluye variables moleculares al estudio epidemiológico. Los marcadores moleculares permiten caracterizar individuos portadores de la enfermedad antes de la aparición de la sintomatología, detectar efectos tempranos de factores de riesgo, identificar susceptibilidades o resistencias a la enfermedad, o pronosticar el avance de la enfermedad. Todos estos datos mejoran la eficacia en el control de las enfermedades.

### **2.2.1. Tipos de marcadores moleculares**

Los marcadores moleculares pueden clasificarse según el objetivo que persigan en:

- **Marcadores de exposición:** incluyen todas aquellas moléculas capaces de indicar que el individuo en estudio se ha visto expuesto al agente causal de la enfermedad. Pueden ser anticuerpos frente a un agente biológico, citoquinas...
- **Marcadores de enfermedad:** incluyen todas aquellas moléculas indicadoras de que la enfermedad está presente en dicho individuo: enzimas, material genético...
- **Marcadores de susceptibilidad:** incluyen todas aquellas moléculas cuya presencia se asocia a una mayor probabilidad de padecer una determinada enfermedad, como determinadas mutaciones o secuencias genéticas; o también a una mayor resistencia a la enfermedad.

### **2.2.2. Aplicaciones**

Los marcadores moleculares son moléculas cuya presencia ha sido verificada y validada a través de diversas técnicas para asegurar que su detección es sinónimo de identificar una característica de interés (agente patógeno, contaminación, enfermedad...). Estas moléculas son el resultado de numerosos estudios de investigación realizados con las mayores garantías para conseguir la fiabilidad, reproducibilidad, repetibilidad, sensibilidad y especificidad necesaria.

El mejor ejemplo se encuentra en los planes de vigilancia de las enfermedades. Estos planes son diseñados conociendo el funcionamiento de la enfermedad en cuestión, y con esa base se diseñan estrategias para el muestreo y seguimiento de su presencia en una población concreta. El número de muestras que es necesario analizar varía para cada enfermedad según su prevalencia en la población en estudio. En un programa de vigilancia obligatorio como la Influenza se busca conseguir detectar una prevalencia del 5% con una confianza del 95% ya que la enfermedad está más controlada, mientras que en un programa de vigilancia voluntario como la IBR el objetivo de prevalencia se sitúa en 50% con una confianza del 95%. En estos programas de vigilancia se establecen cuáles son las técnicas de análisis a las cuales se someterán las muestras, tanto para el cribado inicial, como para la confirmación de la enfermedad. El objetivo de estas técnicas de análisis es detectar la presencia de marcadores moleculares que nos permitan hacer un seguimiento en la población de la situación sanitaria con respecto a una determinada enfermedad. Así por ejemplo, se emplean técnicas de cribado cuyo objetivo es detectar la presencia de antígenos de un agente infeccioso, o las inmunoglobulinas generadas por el sistema inmune del propio individuo como respuesta a la presencia de dicho agente infeccioso, o diferenciar las inmunoglobulinas generadas por el contacto con el agente infeccioso, de las generadas por la inoculación de una vacuna. De manera general en las técnicas de cribado se caracterizan por tener mayor sensibilidad, por lo que pueden permitir detectar un mayor porcentaje de falsos positivos; los cuales son descartados en las técnicas de confirmación, que presentan una mayor especificidad. Un ejemplo de técnica de confirmación es la detección del material genético del agente infeccioso causante de la enfermedad.

Los estudios epidemiológicos fueron los que establecieron la utilidad de aplicar vacunas sobre la población en riesgo para evitar la dispersión de la enfermedad, o controlar sus consecuencias a nivel sanitario o económico. Actualmente se establece una diferenciación entre las regiones libres de una determinada enfermedad con o sin programa de vacunación establecido, potenciando estas últimas.

Cada vez que surge un brote de cualquier enfermedad en una región declarada libre, se comienza un análisis epidemiológico con la intención de determinar el origen del brote, controlar su expansión y tomar las medidas adecuadas para que un brote con las mismas características no vuelva a producirse. En este caso los muestreos no deben estar centrados tan solo en individuos de la población afectada, sino también en piensos, agua, lechos... puede ser necesario analizar la presencia de los marcadores moleculares en cualquier tipo de muestra, y poder detectar reservorios del agente infeccioso a descontaminar.

Los marcadores moleculares no solo identifican la presencia de la enfermedad o del agente infeccioso, sino que también permiten tipificar dicho agente, y caracterizarlo según la presencia de moléculas antigénicas o secuencias genéticas que sirven para analizar su evolución y adaptación a las condiciones cambiantes del medio, diversidad de especies huéspedes, virulencia.... Esta caracterización del agente infeccioso permite establecer cuáles son las mejores técnicas diagnósticas o terapéuticas para tratar a los individuos afectados, tratando de poner el foco en aquellos agentes infecciosos con resistencia a determinados tratamientos, por el enorme peligro que suponen para la salud pública.

Los estudios de epidemiología molecular permiten también caracterizar la diversidad de factores presentes en las razas o individuos que componen una población concreta. Estudios como GWAS (Estudios de Asociación a Genoma Completo) o las técnicas de Secuenciación de Genomas están permitiendo profundizar en el conocimiento de los individuos, las razas, especies o agentes infecciosos; y aplicar dichos conocimientos para poder potenciar en un futuro aquellas características que más nos interesen (producción agrícola, resistencia a enfermedades...). Estas tecnologías generan una base de conocimiento que será fundamental para las necesidades que se planteen en un futuro.

MATERIAL NO OFICIAL

## **BIBLIOGRAFÍA**

Ley 8/2003, de 24 de abril, de sanidad animal.

Miguel Ángel Royo Bordonada, Javier Damián Moreno (2009). Método epidemiológico. Madrid: ENS - Instituto de Salud Carlos III. Escuela Nacional de Sanidad (ENS) - Ministerio de Ciencia e Innovación, Octubre de 2009.

Plan Nacional de Control Oficial de la Cadena Alimentaria 2021-2025.

Página web del Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación:  
<https://www.mapa.gob.es/es/ganaderia/temas/sanidad-animal-higiene-ganadera/sanidad-animal/enfermedades/>

RD1440/2001, de 21 de diciembre, por el que se establece el sistema de alerta sanitaria veterinaria.

RD2210/1995, de 28 de diciembre, por el que se crea la red nacional de vigilancia epidemiológica.

Reglamento (UE) 2016/429 “Legislación sobre sanidad animal”

**MATERIAL PARA LA PREPARACIÓN DEL TEMA 77**

**VACUNAS DE USO VETERINARIO.TIPOS. MARCO LEGAL**

*Este material no tiene carácter oficial, por lo que en ningún caso vinculará al Tribunal Calificador. Constituye, únicamente, un instrumento complementario que servirá de apoyo al opositor para enfocar cada uno de los epígrafes, pero nunca de forma exclusiva ni excluyente. El Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación no se hace responsable del contenido del mismo.*

*Los materiales no serán objeto de actualización constante.*

## **ÍNDICE**

### **1. INTRODUCCIÓN**

### **2. DEFINICIÓN DE VACUNAS**

### **3. HISTORIA DE LAS VACUNAS**

### **4. TIPO DE VACUNAS**

#### **4.1. VACUNAS CONVENCIONALES**

4.1.1. Vacunas vivas atenuadas

4.1.2. Vacunas muertas atenuadas

4.1.3. Autovacunas

#### **4.2. VACUNAS DE NUEVA GENERACIÓN**

4.2.1. Vacunas de subunidades

4.2.2. Vacunas de proteínas sintéticas

4.2.3. Vacunas de deleción

4.2.4. Vacunas recombinantes

4.2.5. Vacunas de ácido nucleico

4.2.6. Vacunas de plantas

4.2.7. Vacunas de reversión génica

### **5. PRINCIPIOS DE LA PRODUCCIÓN DE VACUNAS. CONTROL DE CALIDAD**

### **6. MARCO LEGAL.**

## **1. INTRODUCCIÓN**

Hoy en día, la Sanidad Animal, la Salud Pública, el Medio Ambiente, así como la Biomedicina, Producción Animal y Seguridad Alimentaria están íntimamente relacionadas. Así nace la actual iniciativa “One World, One Health”, cuya intención es la de aglutinar el conocimiento y la investigación biológica, a todos los niveles (medicina humana, veterinaria y ciencias ambientales), a fin de conseguir mejorar la vida de todas las especies que compartimos el planeta. Trabajando juntos, se puede lograr más para mejorar la salud en todo el mundo y la profesión veterinaria tiene la responsabilidad de asumir un papel de liderazgo importante en ese esfuerzo.

Los últimos estudios epidemiológicos, muestran que el 60% de los patógenos humanos son de origen animal y que el 75% de las enfermedades animales emergentes pueden transmitirse a humanos, es decir, son de carácter zoonótico.

La intensificación de la producción ganadera y agrícola durante el siglo XX, provocó la necesidad de la utilización masiva de agentes bactericidas y bacteriostáticos, especialmente antibióticos, a fin de mantener las condiciones sanitarias y los niveles productivos. Sin embargo, la tendencia actual trata de reducir el uso de antibióticos y se dirige hacia la prevención, control y erradicación de los procesos infecciosos en veterinaria, mediante estudios epidemiológicos, el diagnóstico y la vacunación, siendo los elementos clave para el control de la salud animal y en consecuencia de la salud humana.

Para mantener la salud de los animales y lograr un funcionamiento satisfactorio de los programas de sanidad animal es imprescindible administrar de manera fiable vacunas puras, inocuas, potentes y eficaces.

La inmunización de los animales con vacunas de gran calidad es el principal medio de control de muchas de sus enfermedades. En otros casos, las vacunas se emplean conjuntamente con los programas nacionales de control o erradicación de enfermedades.

La decisión de recomendar la vacunación como parte de la estrategia de control de enfermedades requiere un conocimiento profundo de las características del agente infeccioso y de su epidemiología, así como de las características de las diferentes vacunas disponibles.

## **2. DEFINICIÓN DE VACUNAS.**

Se puede definir vacuna como toda aquella sustancia compuesta por una suspensión de microorganismos completos vivos o muertos o alguna de sus proteínas o toxinas que son capaces de inducir una respuesta inmune protectora y duradera, frente al mismo microorganismo virulento sin producir efectos secundarios. Mediante la vacunación se consigue una respuesta adquirida, tanto humoral como celular, y el desarrollo de la memoria inmune.

Algunas vacunas pueden ser de gran eficacia induciendo una inmunidad que no solo previene los signos de la enfermedad, sino que también puede prevenir la infección y reducir la multiplicación y diseminación del agente causal. En otros casos la inmunización es ineficaz y solo reduce la gravedad de los casos.

### 3. HISTORIA DE LAS VACUNAS.

La historia de las vacunas se remonta a la Antigua China donde existen escritos del s. IX en los que se hace referencia a una forma primitiva de vacuna, denominada “variolización”. Se trata de la inoculación del pus de la viruela para provocar la enfermedad de forma atenuada e inmunizar así al paciente. Poseía riesgos porque un cierto número de enfermos contraían la enfermedad y morían.

**La historia de la vacunación en Occidente comenzó con la introducción de la variolización en Europa occidental y América del Norte.** En 1721, Lady Mary Wortley Montagu importó la variolación en Gran Bretaña después de haberla observado en Constantinopla.

**Los peligros de la variolización condujeron al descubrimiento de la vacunación por parte de Jenner y los intentos de aplicarla a otras enfermedades animales, como la peste bovina.** Edward Jenner fue un médico rural inglés que vivió entre los años 1749 y 1823. Desarrollo precisamente también la vacuna de la viruela humana e inoculó linfa de viruela vacuna a un paciente. Esto se denominó vacuna heteróloga.

Después de él fue **Louis Pasteur** (1822-1895) quien demostró que, al administrar una forma atenuada o debilitada de un organismo, se conseguían unas defensas más puras que con el método Jenner. A esto se lo denominó vacuna homóloga.

Louis Pasteur descubrió también cómo aplicar la vacuna contra el cólera de aves, la erisipela porcina y la rabia. Siguió el desarrollo de muchas vacunas contra enfermedades animales.

En el s. XIX se crearon además las vacunas de la diarrea crónica intestinal severa, el antrax, el tétanos y la difteria. Seis vacunas que mejoraron considerablemente el estado sanitario de la población.

A principios de s.XX se desarrollaron vacunas mediante el procedimiento de la inactivación química de toxinas. Se consiguieron los primeros toxoides del tétanos y la difteria. En 1909 la vacuna contra la tuberculosis, en el 1935 la vacuna contra la Fiebre Amarilla y en 1936 la de la Influenza Aviar.

También se desarrollaron vacunas inactivadas como la de la poliomielitis, la encefalitis o la hepatitis A.

En la década de los 70 y los 80 comenzaron a desarrollarse vacunas formuladas con proteínas purificadas o polisacáridos capsulares que no aportaban células o microorganismos completos como la vacuna antineumocócica.

Posteriormente vinieron las vacunas conjugadas en las que el antígeno es un polisacárido químicamente unido a una molécula de proteína para mejorar la inmunogenicidad del polisacárido. Por ejemplo: influenza tipo B o el *Streptococcus pneumoniae*,

Y más adelante se utilizó la ingeniería genética para la fórmula de vacunas de ADN recombinante, como en la Hepatitis B.

A medida que se desarrolló la tecnología de la vacuna humana, también lo hicieron las vacunas animales, lo que resultó en el control de muchas, pero no todas, las enfermedades infecciosas de los animales. El triunfo más reciente y significativo de la vacunación animal aplicada ha sido la erradicación mundial de la peste bovina.

#### **4. TIPOS DE VACUNAS.**

La gran mayoría de las vacunas veterinarias actualmente en uso, frente a un gran número de enfermedades bacterianas y víricas, todavía pertenecen a las denominadas vacunas convencionales.

Se puede hacer un gran número de clasificaciones de las vacunas, según el patógeno, según la tecnología utilizada, según la composición, etc. De entre ellas las más usada y por la que se va a guiar este tema es la división en: **vacunas convencionales y las vacunas de nueva generación**

##### **4.1 VACUNAS CONVENCIONALES**

Las vacunas clásicas, también conocidas como convencionales, pueden ser vacunas inactivadas, formadas por bacterias, virus o partes de ellos, y vacunas vivas atenuadas, formadas por bacterias o virus cuya virulencia ha sido reducida.

##### **4.1.1. VACUNAS VIVAS ATENUADAS**

Una vacuna atenuada consiste en utilizar un agente infeccioso (vacunas monovalentes) o varios (vacunas polivalentes) vivo y homólogo al que produce la enfermedad, pero cuya virulencia haya sido atenuada, de manera que sin producir ninguna lesión secundaria al animal, induzca inmunidad duradera frente al agente homólogo virulento.

Las vacunas vivas atenuadas inducen una respuesta inmune superior a las vacunas inactivadas o muertas.

Generalmente, este tipo de vacunas se realizan a partir, o bien de cepas homólogas a las virulentas, pero que se han atenuado de forma natural, o bien a partir de aislados virulentos, a los que mediante distintos métodos se consigue atenuarlos de forma estable.

En general, los métodos para atenuar la virulencia de los microorganismos pueden ser los siguientes:

- a) Conseguir la adaptación a un hospedador alternativo: el microorganismo se adapta a un hospedador distinto mediante pases repetidos en el mismo, como es el caso de la vacuna para la viruela.
- b) Obtención de mutantes termosensibles: el microorganismo disminuye su patogenicidad al adaptarse a una temperatura de replicación que no es la óptima para él. Un ejemplo de este método es el de la vacuna desarrollada frente a la Rinotraqueitis Infecciosa Bovina.
- c) Variante natural por pases: se basa en realizar un gran número de pases del patógeno en condiciones adversas para él, de tal forma que debe adaptarse de manera forzada. Mantiene su capacidad de multiplicación en el animal pero su virulencia disminuye considerablemente. Un ejemplo de este tipo de vacunas sería la de la Tuberculosis.
- d) Atenuación por métodos químicos: atenuación mediante agentes mutagénicos químicos (nitroso-guanidina)
- e) Atenuación por reabsorción o recombinación: es la infección simultánea de dos virus con información genética diferente para formar un único virus con la información genética de ambos, es decir, un virus recombinado. El virus resultante estará formado mayoritariamente por genes del virus no patógeno para el animal y genes inmunizantes del virus patógeno, que expresan proteínas frente a las cuales se sintetizan anticuerpos, como es el caso de las nuevas vacunas frente a rotavirus

#### 4.1.2. VACUNAS MUERTAS O INACTIVADAS

Las vacunas muertas o inactivadas están formadas por los microorganismos completos pero inactivados por algún método físico o químico. Estas vacunas, comparadas con las vacunas atenuadas, presentan como principales ventajas su estabilidad y seguridad, y su conservación inalterada durante más tiempo. Sin embargo, suelen inducir una respuesta inmunitaria menor que las vacunas atenuadas.

Las vacunas inactivadas o muertas también se han producido a partir de exotoxinas bacterianas inactivadas, como es el caso del tétanos, mediante el empleo de toxina tetánica inactivada, con notable éxito. A estos componentes vacunales se les denomina **toxoides**.

Al contrario que las vacunas vivas atenuadas no requieren refrigeración y pueden transportarse a lugares donde no puedan permitirse este proceso. Confieren una mayor seguridad, pues no existe la amenaza de reconversión a la forma virulenta.

El principal inconveniente es que su respuesta inmunitaria es menor que en las vacunas atenuadas. Para paliar esta "desventaja" se añaden **adyuvantes** que potencian la respuesta inmune.

La palabra adyuvante viene del latín "*adjuvare*", que significa ayudar, asistir. Los adyuvantes inmunológicos se empezaron a desarrollar a principios del siglo pasado, cuando Ramón Gastón y colaboradores observaron que los caballos que desarrollaban abscesos en

el sitio de inyección del toxoide diftérico, generaban mayores títulos de anticuerpos específicos que aquellos que no los tenían. Posteriormente, se llegó a la conclusión de que los abscesos provocados por la inyección de sustancias extrañas junto con el toxoide, aumentaban la respuesta antitoxina en caballos. Así, a estas sustancias que aumentaban la producción de anticuerpos y de la memoria de la respuesta inmune en los animales vacunados, se les denominó adyuvantes. Además, se vio que los adyuvantes actuaban favoreciendo la presentación de los antígenos del sistema inmune, mediante el secuestro de antígenos vacunales y la posterior liberación de manera lenta y prolongada, produciendo una ligera inflamación que activa la atracción de las células presentadoras de antígeno, y por tanto favoreciendo la quimiotaxis de las mismas al foco de infección

Los adyuvantes más utilizados en un principio fueron las sales de aluminio, como el hidróxido de aluminio y el fosfato de aluminio que aún se utiliza en una gran parte de las vacunas utilizadas en Sanidad Animal, ej; vacuna de Parvovirus Porcina.

Otros adyuvantes utilizados, mezclan el antígeno en una emulsión de aceite minerales y agua, conocida como adyuvante incompleto de Freund, o incorporando también porciones proteicas del Mycobacterium Tuberculoso muerto, conocida como adyuvante completo de Freund. Estos adyuvantes, ampliamente utilizados en experimentación animal para la obtención de sueros hiperinmunes están siendo sustituidos por otros a causa de los efectos adversos que comprometen el bienestar de los animales utilizados.

Un inconveniente específico de las vacunas inactivadas de virus, es que no se replican en el animal, lo cual significa que se necesita más cantidad de antígeno y dosis de refuerzo para que la respuesta inmune sea duradera. Por contra, como ventajas, son menos sensibles a los cambios de temperatura que las vacunas víricas atenuadas

Los métodos, tanto físicos como químicos, utilizados para inactivar las vacunas tienen el objetivo de no modificar las proteínas del microorganismo en su capacidad inmunógena, lo cual podría provocar una alteración de la respuesta inmune del animal.

Los productos químicos que más se utilizan son el formol y agentes quelantes como el óxido de etileno, propiolactona, etc.

Entre los agentes físicos, el más empleado es el calor. Ejemplo de este tipo de vacunas son aquellas frente a: **Actinobacillus pleuropneumoniae**, enfermedad de Aujeszky, enfermedad de Glässer, enterotoxemias, fiebre aftosa, influenza porcina, mal rojo, rinitis atrófica, parvovirus, Peste Porcina Clásica (PPC), Síndrome Respiratorio y Reproductivo Porcino (PRRS), **Mycoplasma hyopneumoniae**, **Pasterella multocida** y **Serpulina**.

#### 4.1.3 AUTOVACUNAS

En veterinaria reciben este nombre los preparados elaborados a partir de cepas aisladas de uno o varios individuos enfermos y que son aplicados a animales de una explotación o área geográfica concreta. Pueden estar compuestas por uno o más microorganismos. Solo se elaboran cuando o bien no existe vacuna comercial, o habiendo vacuna hay diferencias

antigénicas de serotipo entre el/los microorganismos que provocan la infección en los animales y los serotipos vacunales, y se pueden emplear hasta que los animales se inmunicen y cese la enfermedad.

En España, sólo está permitido realizar autovacunas de bacterias, también denominadas bacterinas, y siempre inactivadas y no tóxicas. En otros países como EE.UU también pueden fabricarse autovacunas a partir de virus, micoplasmas o cualquier otro tipo de microorganismo.

	Ventajas	Inconvenientes
<b>Vacunas atenuadas</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>-Estimulación de inmunidad humoral y celular</li> <li>-Infección similar a natural (multiplicación)</li> <li>-Inmunidad duradera y efectiva</li> <li>-Necesidad de pocas inoculaciones y dosis</li> <li>-Coste de producción relativamente bajo</li> <li>-Adyuvantes no tan necesarios</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>-Virulencia residual y reversión a tipo virulento</li> <li>-Diseminación en la población</li> <li>-Enfermedad asociada a la vacuna</li> <li>-Presencia de microorganismos contaminantes</li> <li>-Problemas de almacenamiento</li> </ul>
<b>Vacunas inactivadas</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>-No virulencia residual</li> <li>-Más seguras</li> <li>-Menos efectos secundarios</li> <li>-Estables en almacenamiento</li> <li>-Coste de producción relativamente bajo</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>-Estimulación de inmunidad humoral, no celular</li> <li>-Menor inmunidad (no hay multiplicación)</li> <li>-Mejor para infecciones sistémicas que en mucosas</li> <li>-Necesidad de inoculaciones repetidas y más dosis</li> <li>-Adyuvantes muy necesarios (reacciones locales y de hipersensibilidad)</li> </ul>

TABLA 1. Ventajas e inconvenientes de vacunas vivas atenuadas y muertas inactivadas ("Vacunas veterinarias" Grande Preciado, 2016)

#### 4.2. VACUNAS DE NUEVA GENERACIÓN (NUEVAS ESTRATEGIA EN LA ELABORACIÓN DE VACUNAS)

Los avances en el conocimiento de la respuesta inmune y en las técnicas de biología molecular conseguidos en los últimos años, han permitido identificar, en un gran número de agentes infecciosos, las proteínas de interés inmunológico y expresarlas en diferentes vectores de amplificación; o bien eliminar aquellas proteínas que no representan interés

inmunológico y/o puedan estar relacionadas con la virulencia. De esta manera, se han desarrollado nuevas vacunas que no están formadas por el agente infeccioso completo, y que permiten, entre otras ventajas, la diferenciación serológica de los animales vacunados frente a los enfermos.

La tecnología de nuevas vacunas ha derivado en la elaboración de inmunopreparados basados en subunidades de proteínas o la transferencia de éstas mediante vectores, como plásmidos u hongos, procedentes del microorganismo en cuestión.

Recientes e importantes avances en los campos de la inmunología, genómica, genómica funcional, inmunogenética, inmunogenómica, bioinformática, microbiología, ingeniería genética, biología de sistemas, bioquímica sintética, proteómica, metabolómica y nanotecnología, entre otros, facilitan nuevos enfoques en el desarrollo de vacunas.

Las características de estas vacunas son:

- Son más seguras que las convencionales ya que no necesitan ser inactivadas al estar formadas por solamente proteínas o no presentan posibilidad de revertir su virulencia.
- Cadena de frío: presentan menos requisitos de frío que las convencionales
- Diferenciación de animales enfermos de vacunados: es su mayor ventaja

#### **4.2.1. VACUNAS DE SUBUNIDADES**

Los elementos como polisacáridos, proteínas o péptidos, que poseen los microorganismos patógenos en su superficie pueden intervenir negativamente en la respuesta inmune que se genera al entrar en contacto con el individuo, causando problemas de hipersensibilidad. Este fue el motivo inicial para el diseño de vacunas formadas por proteínas purificadas a las que se denominó vacunas de subunidades. Estas vacunas pueden estar formadas por una parte concreta del microorganismo o por las sustancias que excretan.

Estas vacunas de subunidades se basan en técnica del ADN recombinante, que consiste en la producción de una proteína o proteínas de un agente infeccioso sin necesidad del propio microorganismo, mediante técnicas de ingeniería genética que fragmentan el ADN correspondiente, y lo expresan en diferentes vectores de expresión *in vitro*. Así, se producen grandes cantidades de una única proteína (subunidad) o de varias proteínas de un agente infeccioso, que pueden ser utilizadas como vacuna de subunidades.

Uno de los hitos más destacados de las vacunas de subunidades en veterinaria es que gracias a ellas se consiguió diseñar una vacuna frente a la fiebre aftosa así como frente a la Peste Porcina Clásica (PPC), pero solo de manera experimental.

#### 4.2.2 VACUNA DE PROTEÍNAS SINTÉTICAS.

Si se logra identificar en la compleja estructura de una proteína los **epítomos o determinantes antigénicos** de interés inmunológico, se puede reproducir su secuencia mediante la síntesis química y obtener un péptido de síntesis idéntico al del virus.

Un **epítomo o determinante antigénico** es la porción de una macromolécula que es reconocida por el sistema inmunitario, específicamente la secuencia a la que se unen los anticuerpos, los receptores de las células B o los receptores de las células T. Aunque se piensa que los epítomos provienen de proteínas no propias, las secuencias que se obtienen del huésped que pueden ser reconocidas son también clasificadas como epítomos.

No todos los epítomos dan lugar a una respuesta inmune eficaz, así que mediante técnicas de ingeniería genética y anticuerpos monoclonales se seleccionan las que sí tengan una buena respuesta y se sintetizan.

Uno de los casos en los que estas vacunas han resultado exitosas ha sido contra el **parvovirus canino**.

#### 4.2.3. VACUNAS DE DELECIÓN

La elaboración de estas vacunas se basa en eliminar ciertos genes que codifican para proteínas que no son necesarias para que se produzca la respuesta inmune protectora en el organismo vacunado, de manera que no generará anticuerpos frente a estas proteínas delecionadas, pero sí frente a las proteínas de genes no delecionados.

Un ejemplo de vacunas de deleción sería la obtenida contra el virus de la enfermedad de Aujeszky, en la cual ha sido delecionado del gen que codifica la glicoproteína E.

El que los microorganismos vacunales carezcan de ciertas estructuras o no, y la respuesta que podemos observar en cada caso, es una particularidad muy útil para diferenciar entre animales vacunados y animales infectados, pues unos producirán anticuerpos y otros no frente a la proteína delecionada. Por este motivo, a las vacunas que tienen estas proteínas delecionadas se las denomina "vacunas marcadas". El mismo principio ha sido usado para la preparación de vacunas contra la Rinotraqueitis Infecciosa Bovina causada también por un virus herpes (VHB-1).

#### 4.2.4. VACUNAS RECOMBINANTES

Las vacunas recombinantes están basadas en la utilización de un microorganismo (virus o bacteria) que actuaría como vector para expresar genes de otro microorganismo diferente. De esta forma, este nuevo microorganismo recombinante podría utilizarse como vacuna frente a ambos, pero lo normal es su utilización sólo frente al microorganismo recombinado.

El microorganismo que más se ha utilizado como vehículo ha sido el **poxvirus** vacunal, pues su gran genoma permite insertar genes ajenos sin alterar su replicación. Este **poxvirus** por

ejemplo, ha permitido que vehiculemos en él la **glicoproteína G** del virus de la rabia, siendo reconocida por el hospedador y generando inmunidad protectora. El problema de este virus es que puede afectar a muchas especies animales, incluido el hombre, y su efecto no ha sido bien estudiado. Actualmente también se están utilizando otros virus como vectores, entre ellos el **adenovirus** y el **canarypox** (virus de la viruela del canario), o plásmidos de ADN, que han conducido al desarrollo de varias vacunas nuevas.

Otros ejemplos de estas vacunas son las conseguidas frente a la mixomatosis, la enfermedad hemorrágica del conejo y la enfermedad de Aujeszky.

Lo que la tecnología recombinante pone sobre la mesa, que las vacunas convencionales no hacen, se puede describir como una respuesta inmune dirigida, eficaz y con una seguridad sin precedentes, que evita la necesidad de inyectar al paciente microorganismos completos, muertos o modificados.

**Las Vacunas DIVA (Differentiate Infected from Vaccinated Animals)** surgen por la necesidad de establecer medidas de control sólidas para erradicar enfermedades en sanidad animal, evitando el sacrificio de animales no infectados, así como para controlar la posible entrada de estas enfermedades en aquellos países donde las mismas están erradicadas hace tiempo.

Este tipo de vacunas deben inducir una respuesta protectora eficaz, ser más seguras que las vacunas clásicas y permitir la discriminación serológica entre los animales vacunados y aquellos infectados. Por lo tanto, se puede considerar como una vacuna marcada. Este carácter marcador viene dado por el hecho de que estas vacunas tienen como mínimo, una proteína antigénica o epítipo menos que el agente infeccioso en cuestión. De esta forma la vacuna induce una respuesta inmune solo frente a los antígenos que contiene. Por el contrario, los animales no vacunados, pero si infectados por el agente, desarrollarán una respuesta frente a todos los epítopos del agente infeccioso.

Para poder obtener una vacuna DIVA es necesario utilizar técnicas recombinantes. Cabe destacar entre ellas la vacuna de la enfermedad de Aujeszky o la Rinotraqueitis infecciosa bovina.

#### **4.2.5. VACUNAS DE ÁCIDOS NUCLEICOS.**

##### **Vacunas de ADN.**

El manejo de los ácidos nucleicos permite el desarrollo de vacunas de ADN «desnudo». Esta técnica consiste en la inoculación directa del ADN plasmídico circular bacteriana que codifica el antígeno que nos interesa mediante la previa inserción en él de los genes. La entrada de este ADN en la célula permitirá la vacunación con respuestas inmunológicas celulares óptimos, aunque variables según la vía de administración.

Por otro lado, puede desarrollar una buena memoria inmunológica, que podría depender de la propia persistencia del ADN. Las expectativas tras la experimentación animal en ratones se incrementaron enormemente; sin embargo, se están encontrado problemas en

los modelos con primates y humanos que han frenado la confianza que se depositó en ellas. El desarrollo de estas vacunas se está aplicando en la protección frente a la malaria o el VIH. La tecnología del ADN «desnudo» se utiliza no solo para generar protección directa frente a un agente sino también para identificar antígenos protectores mediante la experimentación en el laboratorio, y son prometedoras en el tratamiento del cáncer.

Uno de los riesgos de estas vacunas, si bien es bajo, es que el ADN pueda integrarse en el ADN de la célula y provoque la transformación celular.

Actualmente existen al menos dos vacunas de ADN comercializadas en Sanidad Animal: una frente al virus del Oeste del Nilo (WNV), que afecta fundamentalmente a caballos y puede también infectar aves y humanos, que está basada en la proteína de la cápsida y otra frente al virus de la necrosis hematopoyética infecciosa del salmón (IHN).

### **Vacunas ARN**

Se basan en la administración de ARN mensajero, presentando la ventaja sobre las anteriores de su mayor seguridad al evitar la posibilidad de integración del ADN en el genoma del huésped en forma de transposón y su mayor actividad citoplasmática. Desgraciadamente, su carga negativa y su hidrofilia impiden su acceso al interior de la célula, lo que, unido a su inestabilidad, impidió la apuesta por estas vacunas.

En cambio, avances en su administración mediante vectores de entrada, o los más recientes sistemas no virales como nanopartículas lipídicas sintéticas, nanoemulsiones catiónicas o mecanismos de electroporación, han solventado el problema y actualmente representan una de las vacunas con mayor potencial de futuro por permitir la fabricación de vacunas frente a patógenos conocidos, o no, de forma rápida (varios días incluso) y barata mediante plataformas de fabricación genéricas que utilizan métodos completamente sintéticos sin necesidad de cultivos celulares y dando lugar a vacunas que producen potentes respuestas inmunitarias innatas y adaptativas. Estas características las convertirían en las vacunas ideales frente a pandemias de gripe o amenazas bioterroristas.

### **4.2.6 VACUNAS EN PLANTAS.**

Se define como “el uso como vacuna de las partes de las plantas (tubérculos, frutos, hojas, etc.) modificadas genéticamente (transgénicas) o infectadas con un virus vegetal, con el fin de que produzcan componentes específicos (antígenos) de un patógeno (virus, bacteria, etc.) contra el cual se desea proteger a una persona o animal”.

El principal promotor de expresión usado en plantas es el **35S** del Virus del Mosaico de la Coliflor (**35S CPMV**). El proceso de elaboración de estas vacunas consiste en insertar el gen de interés en el vector, que contiene el promotor y el terminador. El tejido vegetal que podemos usar puede ser tanto vegetativo como reproductor. Una vez que se produce la transformación, el tejido vegetal se incuba en un medio sintético para la generación completa.

Las principales ventajas de las vacunas comestibles es que las plantas son económicas y fáciles de mantener, ya que no requieren de materiales caros para su crecimiento; es difícil que se contaminen con patógenos que afectan a mamíferos; son una opción a considerar en los países en desarrollo, en los que es muy difícil mantener sistemas que mantengan la cadena de frío, la utilización de jeringas estériles y personal capacitado.

El principal problema o desventaja de estas vacunas es que los antígenos que están en los alimentos pueden degradarse en el estómago e intestino antes de inducir la respuesta inmune.

En el campo de la Medicina Veterinaria, algunas de las vacunas comestibles obtenidas en plantas han sido: la **glicoproteína S** y péptidos protectores del *coronavirus*, que produce la Gastroenteritis Transmisible de los Cerdos (**GETC**); los péptidos de la **VP2** del *parvovirus* canino, la **VP1** de la fiebre aftosa; la **VP60** del virus que produce la enfermedad hemorrágica de los conejos, un péptido lineal de la hemaglutinina del *Virus de la Peste Bovina* y un gen que codifica para un factor de virulencia (F18) de **E. coli** que produce el edema de los cerdos.

#### 4.2.7. VACUNAS DE REVERSIÓN GÉNICA.

La tecnología de estas vacunas se desarrolló recientemente para combatir el subtipo **H5N1** del *Virus de la Influenza Aviar*, cepa de gran virulencia y difusión que se mantiene en continua expansión desde 1996, habiendo afectado a países asiáticos, europeos y africanos.

La tecnología de esta vacuna consiste en acoplar los genes de las proteínas del virus que nos interesan desde el punto de vista inmunológico.

La rapidez de preparación es una de las ventajas que destaca de este tipo de vacunas, ya que no hay que cultivar el virus, y por tanto tener que adaptarlo a cultivos. Por otro lado, este procedimiento permite combinaciones según las condiciones epidemiológicas del momento y diferenciar los animales vacunados de los infectados.

### 5. PRINCIPIOS DE PRODUCCIÓN DE VACUNAS VETERINARIAS

Como ocurre con cualquier medicamento, la producción de vacunas empieza en una instalaciones de investigación y desarrollo (I+D), donde se llevan a cabo todos los estudios preclínicos destinados a demostrar la calidad del producto, además de su seguridad y eficacia.

Todos estos estudios en general se realizan de acuerdo con unas normas de referencia internacionales, como las buenas prácticas de laboratorio (BPL), en el caso de los estudios preclínicos, o las buenas prácticas clínicas (BPC), en el caso de los estudios clínicos.

La forma de garantizar la pureza, la inocuidad, la potencia y la eficacia de las vacunas veterinarias puede variar de un país a otro dependiendo de las necesidades locales. Sin

embargo, son imprescindibles unas normas y unos controles de producción adecuados para asegurar la disponibilidad de productos uniformes de gran calidad que puedan utilizarse en los programas de sanidad animal.

Tanto las vacunas vivas como las inactivadas se pueden formular con distintos componentes antigénicos y pueden contener adyuvantes, estabilizantes, conservantes antimicrobianos y diluyentes.

Los adyuvantes se diseñan para potenciar la eficacia inmunizante de la vacuna. Los más utilizados son las emulsiones de agua en aceite (simples o dobles), que consisten en un aceite mineral o vegetal y un agente emulsionante.

También se utilizan otros adyuvantes, como el gel de hidróxido de aluminio o la saponina. Además de estos adyuvantes tradicionales, se están elaborando vacunas que incluyen ingredientes adicionales que producen efectos inmunomoduladores en los animales hospedadores y sirven para aumentar la eficacia del producto.

Estos ingredientes pueden consistir en componentes inmunógenos de los microorganismos, como bacterias muertas, que estimulan la respuesta inmunitaria a otras fracciones de la vacuna, o las citoquinas, que se pueden utilizar para regular aspectos específicos del sistema inmunitario y están incluidas en constructos de ADN<sub>r</sub> utilizados en los productos que se elaboran mediante biotecnología.

### **Control de calidad y comercialización**

Antes de comercializar una vacuna en un país determinado, debe solicitarse la aprobación de la autoridad reguladora correspondiente a la autoridad competente, la cual deberá evaluar y autorizar dicha vacuna para asegurarse de que cumple con los requisitos reguladores locales relativos al producto. En el expediente que se genere para la aprobación de la autoridad reguladora correspondiente, deben describirse las materias primas que se utilizarán, así como los pasos para la fabricación, los controles que se realizarán durante el proceso y los controles que se realizarán en el producto terminado antes de que el responsable autorice su puesta en circulación. Asimismo, también deberán describirse las pruebas necesarias para demostrar la calidad, inocuidad y eficacia de la vacuna.

Una vez la autoridad competente haya otorgado la autorización reguladora correspondiente, puede lanzarse la producción industrial en un punto de fabricación que esté autorizado por dicha autoridad con arreglo a los requisitos nacionales y que disponga del equipo, las instalaciones y el personal adecuados para la producción y los controles. Inspectores oficiales con experiencia deberán inspeccionar periódicamente dicho lugar de fabricación. Para producir vacunas puras, inocuas y eficaces es necesario contar con una garantía de calidad.

La forma de garantizar estos aspectos puede variar de un país a otro dependiendo de las necesidades locales. Sin embargo son imprescindibles unas **normas y unos controles de**

**producción** adecuados para asegurar la disponibilidad de productos uniformes de gran calidad que pueden utilizarse en los programas de sanidad animal.

Debido al gran número de especies animales y de agentes patógenos relacionados con las mismas, la variedad de productos fabricados es muy grande y el volumen de fabricación suele ser bajo. Los productos deben protegerse frente a la contaminación orgánica o inorgánica y frente a la contaminación cruzada. El entorno también debe protegerse, sobre todo cuando se utilizan agentes biológicos patógeno o exóticos, y el personal debe protegerse frente a los agentes que resultan patógenos para el ser humano. Por lo tanto, resulta de importancia crucial el sistema de garantía de calidad.

El **control de calidad** afecta al muestreo, a las especificaciones y al análisis, así como a los procedimientos de organización, documentación y liberación para asegurar que se lleven a cabo las pruebas necesarias y relevantes, y que los materiales no se liberen para su uso ni los productos se liberen para su venta o suministro hasta que se haya comprobado que tienen la calidad necesaria.

El control de calidad no termina en las pruebas de laboratorio, sino que afecta a todas las decisiones que pueden tener que ver con la calidad del producto. La independencia del control de calidad respecto a la producción se considera fundamental para que la operación de control de calidad sea satisfactoria.

Este control se ha basado siempre en tres componentes:

- El control de las materias primas.
- El control del proceso de producción.
- Y el control del producto final.

La caracterización de las materias primas se basa en gran medida en las pruebas fisicoquímicas, inmunológicas, biológicas y microbiológicas sobre ellas. Pero debe incluir igualmente las auditorías de los proveedores para garantizar que las características pertinentes se mantienen inalteradas entre lotes.

La idoneidad de los materiales de partida debe definirse claramente mediante especificaciones escritas. Deben constar los datos del proveedor, método de fabricación, origen geográfico y la especie animal de la cual derivan los materiales.

Asimismo, la capacidad de los medios de cultivo de permitir el crecimiento deseado y su efectividad deben validarse adecuadamente con antelación. Los medios deben esterilizarse in situ o en el momento de su fabricación. Y todos aquellos materiales como gases, medios, ácidos, agentes antiespumantes que se introduzcan en los biorreactores deben ser estériles.

Así el uso de sistemas de producción basados en bancos celulares de líneas celulares diploides o líneas celulares continuas permite la correcta caracterización de esos materiales de partida.

En estas líneas celulares se debe verificar la identidad de las líneas celulares mediante marcadores genéticos y compararla con una línea de referencia positiva. Se suelen utilizar varios modelos animales como los ratones atímicos o nude o usar ratones, ratas o hámster lactantes tratados con un suero antitimocito.

Para el caso específico que se empleen huevos embrionados de pollo deben derivar de parvadas de pollos SPF (libre de patógenos específicos) en los que se hayan realizado intensos controles para descartar agentes infecciosos y que no hayan sido vacunadas.

Otro factor a valorar es la disminución potencial de la viabilidad celular durante el periodo de almacenamiento y las características de crecimiento en las distintas fases de su ciclo vital.

Por último, es necesario valorar la presencia potencial de contaminantes:

- para las bacterias y elementos fúngicos, por medios de cultivo convencionales,
- para los Micoplasmas, por medio de cultivo convencionales y técnicas de marcado fluorescente
- para los virus, mediante combinación de ensayos, como la microscopía electrónica, la detección de la transcriptasa inversa, las pruebas de infectividad in vitro e in vivo y pruebas para inducir anticuerpos específicos en animales de laboratorio.

En el **proceso de producción**, debemos contar que éste esté validado. Consideramos la validación, como el acopio y la evaluación de datos, que comienza en la etapa de desarrollo del proceso y continúa a lo largo de la fase de producción, para comprobar que los procesos de fabricación, con inclusión del equipo, edificios, personal y materiales, son capaces de alcanzar los resultados que se pretende, de una manera uniforme y continua.

La **validación** puede ser prospectiva, simultánea y retrospectiva, según cuando se realice en relación con la producción. Para que se considere validado, un proceso debe cumplir sistemáticamente todas las especificaciones en todos los pasos de la producción, al menos tres veces consecutivas. Si se introducen modificaciones en el proceso, el equipo o los sistemas que intervienen en el proceso, o se presentan desviaciones es necesario volver a validarlo.

Un proceso de producción debidamente validado permitirá obtener un producto uniforme, es decir, que las características críticas de la vacuna están siempre presentes. Estas características incluyen su **eficacia y su inocuidad**. Éstas son probadas en ensayos clínicos y una vez demostrados deben comprobarse que cada uno de los lotes obtenidos son homogéneos con estos utilizados en los ensayos clínicos.

Las **pruebas del producto final**, se convierten en una demostración de la uniformidad de la producción, con el fin de garantizar que cada uno de los lotes posea las mismas características de un lote cuya inocuidad y eficacia han sido demostradas en los ensayos clínicos.

Así, consideramos que las **actividades de control de calidad externo** se realizan a través de revisión documental y control analítico, y se verifica por medio de pruebas de laboratorio fisicoquímicas, inmunológicas, microbiológicas y biológicas. El control del producto final se realiza por pruebas de identidad, ensayo de potencia, pruebas de seguridad y aplicación general (adyuvante, conservador, inactivante y pH).

En los últimos años se ha producido un rápido desarrollo de las técnicas fisicoquímicas de análisis y caracterización y purificación de antígenos de proteínas y polisacáridos que han sido incluidos en los controles de calidad de vacunas.

Se debe realizar un **seguimiento del rendimiento** tras su puesta en el mercado, para lo que se debe mantener un sistema de notificación de reacciones adversas y un mecanismo efectivo para la pronta retirada del producto en caso de que sea necesario.

Los **métodos** utilizados en el **control de calidad** de las vacunas son los siguientes:

**Control de identificación:** se emplea para determinar el tipo y subtipo de los microorganismos componentes de la vacuna y para detectar rápidamente, eventuales contaminaciones por otros microorganismos o componentes antigénicos, estas determinaciones se realizan por la prueba de fijación del complemento.

**Control de esterilidad:** verifica que la vacuna esté libre de microorganismos contaminantes. Se realiza mediante la siembra de una alícuota de vacuna en los diferentes medios de cultivo: caldo simple agar, Sabouraud, Tioglicolato y detección de Micoplasma, esta última sobre todo para vacunas recombinantes. Se incuban a 37°C y se observan durante 21 días. No debe haber crecimiento de microorganismo en ninguno de los cultivos

**Control de inocuidad:** se verificará que la vacuna no tenga microorganismo vivo (en el caso de las bacterinas) y que no provoquen reacciones inaceptables en los animales vacunados, utilizándolas según las recomendaciones del laboratorio productor (prueba de tolerancia)

Se realizarán pruebas de inocuidad en las especies de destino siguiendo las directrices internacionales armonizadas para las pruebas de inocuidad de las vacunas vivas e inactivadas de la Cooperación Internacional sobre la Armonización de Requisitos Técnicos relativos al Registro de Medicamentos Veterinarios (VICH). En el caso de vacunas vivas, preocupa que el hospedador pueda excretar el microorganismo transmitido a los animales con los que contacte, causando así enfermedad si mantiene virulencia residual o revierte la virulencia tras repetidos pases por el hospedador, por lo que deben someterse a pruebas de virulencia mediante estudios de pases.

Además, debe estudiarse la capacidad de cada vacuna viva de excretar, propagarse a los animales de destino y no de destino por contacto y de persistir en el medio ambiente.

**Control de inmunogenicidad o eficacia vacunal:** está orientado a determinar la protección a corto y largo plazo de la vacuna en la especie para la que fue preparada.

Debe comprobarse mediante estudios estadísticamente válidos de vacunación y exposición en el animal hospedador, empleando animales más sensibles normalmente de corta edad. Siempre que se pueda, debe promoverse la aplicación de los procedimientos para reemplazar, reducir y refinar las pruebas que se empleen en animales (regla de las 3R).

El control de la inmunogenicidad de la vacuna frente a la FA, bien de manera directa en bovinos o cerdos, vacunándolos y después desafiándoles con el virus, con el fin de determinar el porcentaje de animales protegidos por la vacuna, o por medios indirectos, vacunando a los animales y determinando los niveles de anticuerpos presentes en el suero mediante pruebas en ratones lactantes.

Los valores obtenidos en estas pruebas son convertidos en expectativas porcentuales de protección. Esta debe ser igual o superior al 75% entre 3 y 5 semanas después de ser aplicada.

**Pruebas de interferencia:** debe tenerse en cuenta las posibles interferencias entre dos vacunas distintas del mismo fabricante que se recomienda administrar al animal en un plazo máximo de 2 semanas. Debe estudiarse la inocuidad y la eficacia de esta asociación.

**Duración de inmunidad:** se realiza con el fin de verificar que la vacuna confiere protección a los animales vacunados durante el tiempo indicado por el laboratorio productor, se puede realizar de las dos maneras similares al control de la eficacia vacunal.

**Control de la estabilidad:** tiene por finalidad verificar que la vacuna es estable por 18 meses o más (según indique el laboratorio productor) cuando son elaborados y conservados adecuadamente.

**Técnicas moleculares en los controles de calidad:** hoy se disponen de pruebas sumamente sensibles y específicas para evaluar las vacunas. Ayuda a comprobar la seguridad de las vacunas. Una de las técnicas empleadas es la PCR o reacción en cadena de la polimerasa para la detección de posibles contaminaciones. Sin embargo como la técnica no solo detecta viriones completos sino partes de genoma vírico, es preciso ser prudentes a la hora de extraer conclusiones sobre los resultados y sus repercusiones en la inocuidad del producto.

**Requisitos adicionales para las vacunas vivas de ADN:** antes de autorizar la liberación, los fabricantes de las vacunas deben llevar a cabo una evaluación de riesgos para determinar el impacto que ejercerá en el entorno humano y animal. Ello cuenta con un procedimiento general a seguir en la UE.

Además, antes de la liberación, el fabricante debe analizar una muestra representativa de cada lote/serie para comprobar su pureza, inocuidad y potencia.

Los **BANCOS DE VACUNAS**, suministran reservas de antígeno o de vacunas que pueden ser de distintos tipos. Pueden funcionar como un banco que conserva, el componente antigénico o la vacuna formulada lista para usar, o ambas cosas.

Dichos bancos pueden establecerse para ofrecer un servicio nacional o internacional, ya que las vacunas pueden utilizarse con distintos fines, desde vacunaciones masivas sistemáticas hasta vacunaciones de emergencia o intervenciones estratégicas.

Los bancos de vacunas se pueden clasificar según su cobertura geográfica o según el tipo de producto con el que trabajan. El banco también puede seleccionar serotipos adecuados según las necesidades existentes en el momento de la utilización.

El inconveniente de los bancos de vacuna es el lapso de tiempo que transcurre entre el momento en el que se toma la decisión de utilizar vacunas y el momento en el que se dispone de la vacuna formulada a modo de producto final.

Las vacunas listas para usar pueden utilizarse rápidamente y están disponibles para su uso inmediato durante la totalidad de su periodo de validez. Si no se utilizan, el inconveniente es que el periodo de validez tiene un límite y a menudo es más corto que el del Ag conservado.

Por otro lado, en el caso de enfermedades causadas por varios serotipos y cepas de gran variedad antigénica, la formulación preestablecida puede no proteger lo suficiente contra la cepa involucrada en un determinado brote.

## **6. MARCO LEGAL**

- REGLAMENTO (UE) 2019/6 DEL PARLAMENTO EUROPEO Y DEL CONSEJO de 11 de diciembre de 2018 sobre medicamentos veterinarios y por el que se deroga la Directiva 2001/82/CE. Las vacunas se encuentran dentro de la categoría de medicamentos veterinarios inmunológicos.
- REGLAMENTO DELEGADO (UE) 2020/689 DE LA COMISIÓN de 17 de diciembre de 2019 por el que se completa el Reglamento (UE) 2016/429 del Parlamento Europeo y del Consejo en lo referente a las normas de vigilancia, los programas de erradicación y el estatus de libre de enfermedad con respecto a determinadas enfermedades de la lista y enfermedades emergentes.
- REAL DECRETO 1132/2010, de 10 de septiembre, por el que se modifica el Real Decreto 109/1995, de 27 de enero, sobre medicamentos veterinarios. Para regular el uso de las autovacunas.

Se puede añadir todas las regulaciones por enfermedad y sus programas de vigilancia a nivel nacional y algunas regionales porque muchas de las competencias en materia de sanidad animal están transferidas a las Comunidades Autónomas

## **BIBLIOGRAFIA**

OIE manual terrestre capítulo 1.1.8. Principios de producción de vacunas veterinarias (NB: Versión adoptada en mayo de 2018).

Inmunología. Curso 2009-10. Tema 30. Departamento de sanidad animal de la UCM.

La biotecnología en Sanidad Animal, ARBOR, Ciencia, Pensamiento y Cultura. Vol. 190-768.

Comité Asesor de vacunas. Asociación Española de Pediatría.

<https://vacunasaep.org/documentos/manual/cap-1>

Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. El desarrollo de nuevas vacunas.

<https://www.elsevier.es/es-revista-enfermedades-infecciosas-microbiologia-clinica-28-articulo-el-desarrollo-nuevas-vacunas-S0213005X15002700>.

Diferentes tipos de vacunas contra la COVID-19: cómo funcionan. Mayo Clinic

<https://www.mayoclinic.org/es-es/diseases-conditions/coronavirus/in-depth/different-types-of-covid-19-vaccines/art-20506465>.

Vacunas veterinarias. Facultad de Veterinaria de Cáceres. Trabajo fin de grado. Maria Mercedes Grande Preciados.

[https://dehesa.unex.es/bitstream/10662/4432/1/TFGUEX\\_2016\\_Grande\\_Preciado.pdf](https://dehesa.unex.es/bitstream/10662/4432/1/TFGUEX_2016_Grande_Preciado.pdf)

**MATERIAL PARA LA PREPARACIÓN DEL TEMA 78**

**HIGIENE GANADERA. MARCO LEGAL. PROGRAMA NACIONAL DE CONTROL OFICIAL DE HIGIENE DE LA EXPLOTACIÓN GANADERA**

*Este material no tiene carácter oficial, por lo que en ningún caso vinculará al Tribunal Calificador. Constituye, únicamente, un instrumento complementario que servirá de apoyo al opositor para enfocar cada uno de los epígrafes, pero nunca de forma exclusiva ni excluyente. El Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación no se hace responsable del contenido del mismo.*

*Los materiales no serán objeto de actualización constante.*

## **ÍNDICE**

### **1 HIGIENE GANADERA. MARCO LEGAL**

- 1.1. ESTRATEGIA DE LA GRANJA A LA MESA
- 1.2. MARCO LEGAL

### **2. PROGRAMA NACIONAL DE CONTROL OFICIAL DE HIGIENE DE LA EXPLOTACIÓN GANADERA**

- 2.1. ÁMBITO DE APLICACIÓN
- 2.2. OBJETIVOS
- 2.3. PROGRAMA DE CONTROL
  - 2.3.1. Autoridades competentes
  - 2.3.2. Procedimiento
  - 2.3.3. Muestreo
  - 2.3.4. Controles
  - 2.3.4. Revisión

MATERIAL NO OFICIAL

## **1. HIGIENE GANADERA. MARCO LEGAL.**

Las explotaciones ganaderas están sujetas a una serie de requisitos que regulan su producción y se enmarcan en la política de seguridad alimentaria de la UE.

Los estándares de seguridad alimentaria de la UE son de los más exigentes del mundo y abarcan toda la cadena de producción en aplicación del principio “de la granja a la mesa”.

Entre estos requisitos se incluyen aspectos de higiene, sanidad animal, medio ambiente y salud pública, que garantizan la producción de alimentos nutritivos, sanos, seguros y de calidad para satisfacer las demandas del consumidor europeo.

El Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación (MAPA), a través de la Subdirección General de Sanidad e Higiene Animal y Trazabilidad, es el responsable de garantizar el cumplimiento de la normativa en el sector primario, así como de proteger los intereses del mismo haciendo de él un sector competitivo.

### **1.1. ESTRATEGIA DE LA GRANJA A LA MESA**

La estrategia “de la granja a la mesa” está en el corazón del pacto verde europeo, con el objetivo de hacer que los sistemas alimentarios sean justos, saludables y respetuosos con el medio ambiente. El sector agroalimentario consume grandes recursos naturales, lo que genera pérdida en la biodiversidad e impactos negativos para la salud. Aproximadamente un tercio de las emisiones mundiales de gases efecto invernadero procede de los sistemas alimentarios.

Sin olvidar la seguridad alimentaria y la inocuidad de los alimentos, los principales objetivos de esta estrategia son:

- Garantizar suficientes alimentos, que sean asequibles y nutritivos, sin superar los límites del planeta.
- Reducir a la mitad el uso de plaguicidas y fertilizantes, así como la venta de antimicrobianos.
- Aumentar la cantidad de tierra dedicada a la agricultura ecológica.
- Promover un consumo de alimentos y dietas saludables más sostenibles.
- Reducir la pérdida y el desperdicio de alimentos.
- Luchar contra el fraude alimentario en la cadena de suministro.
- Mejorar el bienestar de los animales.

### **1.2. MARCO LEGAL**

La legislación de la cadena alimentaria incluye requisitos básicos de higiene alimentaria para el sector de producción primaria. El objetivo principal de estas normas de higiene es incrementar el nivel de seguridad alimentaria, y la confianza del consumidor final.

A nivel europeo destaca la siguiente normativa:

- **Reglamento 2016/429** de “legislación sobre sanidad animal”.
- **Reglamento 2017/625** relativo a los controles y otras actividades oficiales realizados para garantizar la aplicación de la legislación sobre alimentos y piensos, y de las normas sobre salud y bienestar de los animales, sanidad vegetal y productos fitosanitarios.
- **Reglamento 2002/178**, por el que se establecen los principios y los requisitos generales de la legislación alimentaria, se crea la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria y se fijan procedimientos relativos a la seguridad alimentaria.
- **Reglamento 2004/852**, relativo a la higiene de los productos alimenticios.
- **Reglamento 2004/853**, por el que se establecen normas específicas de higiene de los alimentos de origen animal.
- **Reglamento 2009/1069**, por el que se establecen las normas sanitarias aplicables a los subproductos animales y los productos derivados no destinados al consumo humano.

A nivel nacional destaca la siguiente normativa:

- **Ley 8/2003 de sanidad animal.**
- **Ley 17/2011**, de seguridad alimentaria y nutrición.
- **Real Decreto 1749/1998**, por el que se establecen las medidas de control aplicables a determinadas sustancias y sus residuos en los animales vivos y sus productos.
- **Real Decreto 361/2009**: por el que se regula la información sobre la cadena alimentaria que debe acompañar a los animales destinados a sacrificio.
- **Real Decreto legislativo 1/2015**, por el que se aprueba el texto refundido de la Ley de garantías y uso racional de los medicamentos y productos sanitarios.
- **Real Decreto 1528/2012**, de 8 de noviembre, por el que se establecen las normas aplicables a los subproductos animales y los productos derivados no destinados al consumo humano. Este real decreto tiene por objeto establecer disposiciones específicas de aplicación en España del Reglamento (CE) n.º 1069/2009, del Parlamento Europeo y del Consejo, de 21 de octubre, por el que se establecen las normas sanitarias aplicables a los subproductos animales y los productos derivados no destinados al consumo humano.
- **Real Decreto 1632/2011**, de 14 de noviembre, por el que se regula la alimentación de determinadas especies de fauna silvestre con subproductos animales no destinados a consumo humano, que facilita y asegura la ejecución en el ordenamiento español del contenido del Reglamento 1069/2009, del Parlamento Europeo y del Consejo, de 21 de octubre de 2009, y del Reglamento (UE) 142/2011, de la Comisión, de 25 de febrero de 2011, para la aprobación de un marco básico para la alimentación de especies de fauna silvestre con subproductos animales no destinados a consumo humano, en especial las especies necrófagas y otras especies protegidas que también son necrófagas de una manera facultativa.

## **2. PROGRAMA NACIONAL DE CONTROL OFICIAL DE HIGIENE DE LA EXPLOTACIÓN GANADERA**

El programa nacional de control oficial de higiene de la explotación ganadera presenta un enfoque general, que permite su aplicación a cualquier tipo de explotación, y está basado en el riesgo potencial que cada actividad tiene sobre la seguridad alimentaria.

El objetivo del programa es unificar en un solo control todos aquellos aspectos básicos que deben ser tenidos en cuenta a la hora de controlar la higiene de una explotación ganadera, sin entrar en otros controles que se rigen por normativas específicas. Se incluyen en él todos los aspectos de higiene de la explotación ganadera, gestión básica de la sanidad animal, gestión de subproductos, gestión del uso de medicamentos veterinarios y gestión documental de los registros obligatorios de la explotación.

Además, este programa de control tiene vinculaciones con el Programa de control oficial de la distribución, prescripción y dispensación de los medicamentos veterinarios, con el fin de llevar a cabo una trazabilidad de los medicamentos dispensados desde las comerciales, para comprobar el registro de los mismos en los libros de registro de tratamiento en la explotación ganadera.

Igualmente, desde este programa se verificará si determinados procesos de prescripción efectuados por parte del veterinario son los adecuados. En caso de incumplimientos, se dará traslado de los mismos a las autoridades competentes del programa de control oficial de la distribución, prescripción y dispensación de los medicamentos veterinarios.

### **2.1. AMBITO DE APLICACIÓN**

Estos controles se llevan a cabo en subexplotaciones pertenecientes a una explotación ganadera de producción y reproducción de cualquier especie (sin contar las de acuicultura), que mantienen y crían animales con fines lucrativos. Por lo tanto, no se incluyen las explotaciones de autoconsumo, ni las de pequeño tamaño (definidas en el anexo I del Plan Nacional de Control Oficial de la Higiene en las explotaciones ganaderas).

Las explotaciones de producción primaria ganadera incluidas son:

- Explotaciones con animales de producción cárnica
- Explotaciones de producción láctea
- Explotaciones de producción de huevos
- Explotaciones de producción de miel
- Explotaciones de producción de caracoles
- Explotaciones de caza silvestre

También se incluyen las ganaderías extensivas, y las explotaciones ganaderas especiales siguientes según la definición REGA:

- Tratantes u operadores comerciales
- Mercados periódicos
- Plazas de toros permanentes
- Pastos permanentes
- Centros de testaje, selección y reproducción animal

## **2.2. OBJETIVOS:**

El objetivo general de este programa es verificar el cumplimiento de la normativa en materia de higiene de la producción primaria para reducir los riesgos que puedan afectar a la seguridad alimentaria y la sanidad animal; mediante la adopción, por parte del operador, de prácticas correctas de higiene en las explotaciones ganaderas, incluidas medidas de bioseguridad y del uso correcto de los medicamentos veterinarios y en particular de los antibióticos.

Para poder valorar la eficacia de este control, este objetivo general se ha concretado en un objetivo estratégico general a cumplir en el periodo de 5 años, y tres objetivos operativos nacionales que serán valorados de forma anual. Se revisarán cada año para su renovación o sustitución.

### Objetivo estratégico:

Mejorar el nivel de higiene general y uso racional del medicamento en las explotaciones controladas.

### Objetivos operativos:

- Conocer el grado de implantación de las normas básicas de higiene en los establecimientos controlados.
- Conocer el grado de cumplimiento de los requisitos obligatorios en relación al uso racional del medicamento veterinario en explotación ganadera.
- Asegurar la subsanación de los incumplimientos detectados en la explotación.

## **2.3. PROGRAMA DE CONTROL**

### **2.3.1. Autoridades competentes**

**El Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación** es el encargado de coordinar, realizar el seguimiento y supervisar a nivel nacional, la ejecución del programa nacional, a través de la Dirección General de Sanidad de la Producción Agraria. Además, realiza la evaluación del Programa en función de los resultados anuales, verificaciones y auditorías realizadas.

**Las Comunidades Autónomas** son las autoridades competentes en su ámbito territorial para llevar a cabo la organización, programación, coordinación, ejecución, control y evaluación de la higiene de la producción primaria ganadera. Ellas elaboran y aprueban el programa autonómico, ejecutan y desarrollan dicho programa, lo supervisan en su ámbito territorial, envían los informes anuales al Ministerio, y aprueban las medidas correctoras de su programa autonómico en línea con la directiva del Programa Nacional.

La **coordinación** entre el Ministerio de Agricultura y las Comunidades Autónomas se lleva a cabo a través del **Comité de Red de Alerta Sanitaria Veterinaria**.

### 2.3.2. Procedimiento

Antes de llevar a cabo el Programa de Control, es imprescindible realizar una planificación de los controles a realizar, y de los recursos disponibles para ello.

El personal encargado de realizar los controles oficiales deberá poseer la cualificación, experiencia, formación y la capacidad jurídica necesaria, no estar sometido a ningún conflicto de intereses, y tener acceso a los procedimientos documentados y registros necesarios.

Será necesario establecer un esquema de formación específica para los inspectores que garantice la eficacia de los controles.

Dentro de los recursos disponibles destacan las bases de datos SINTRAN, PRESVET, RASVE y PNCOCA.

Los procedimientos deben estar establecidos documentalmente, y contener toda la información necesaria para el personal que realiza los controles. Dentro de esta documentación se deben indicar los siguientes aspectos:

- Organización de las autoridades de control y coordinación entre ellas.
- Objetivos a alcanzar.
- Funciones y responsabilidades del personal.
- Descripción del procedimiento de muestreo, métodos, técnicas de control, interpretación de resultados y decisiones.
- Actuaciones tras los controles y seguimiento.
- Cooperación entre unidades o servicios.
- Verificación de la idoneidad de métodos de muestreo y análisis.

Los controles se deben priorizar en función del riesgo, y se realizan de forma periódica en los establecimientos registrados a lo largo de todo el año. Aquellas explotaciones que fueron objeto de inspección en el año anterior y no hayan presentado irregularidades podrán ser exceptuadas del muestreo. Los controles se realizarán sin notificación previa salvo excepciones justificadas, y el tiempo de aviso no superará las 72 horas.

La muestra mínima a analizar ascenderá al 1% del total de subexplotaciones que forman parte del universo de control. Este porcentaje será distribuido por especies y de forma proporcional a la importancia de las capacidades productivas de cada sector dentro de la Comunidad Autónoma correspondiente. La selección de las subexplotaciones, así como de las explotaciones especiales se realizará sobre la base de un análisis de riesgo, con la excepción de un 15% que será por muestreo aleatorio.

Las subexplotaciones y explotaciones especiales que pasen a formar parte de la muestra, de acuerdo con una fase de selección, se descartarán automáticamente del universo del que se continúe tomando la muestra en fases sucesivas. Cualquiera que sea la modalidad adoptada, la Comunidad Autónoma debe garantizar que el muestreo sea representativo, desde el punto de vista geográfico, así como desde el punto de vista del tipo y tamaño de explotación.

### **2.3.3. Muestreo**

La selección de la muestra dirigida se realiza sobre la base de un análisis de riesgo, según los siguientes criterios:

- **Número de animales.** Aquellas explotaciones que superen el número medio de animales por explotación (en la comunidad autónoma correspondiente) obtendrán mayor puntuación. (Valor máximo a obtener en este punto: 3).
- **Tipo de explotación.** Las explotaciones especiales de tratantes y operadores comerciales obtendrán 2 puntos, las explotaciones de producción y reproducción 1, y las explotaciones especiales 0.
- **Tipo de subexplotación:** aquí se puntúa a las explotaciones de producción y reproducción en las últimas fases de producción (cebadero, aves de puesta, explotaciones de producción de leche) con 2 puntos.
- **Presencia de un veterinario en la explotación.** Aquellas explotaciones sin veterinario de explotación, o sin un sistema de aseguramiento de la calidad suman 3 puntos.
- **Consideraciones de salud pública y sanidad animal.** En este punto se valoran aquellas incidencias sanitarias que presente cada explotación: resultados desfavorables en la encuesta de bioseguridad; resultados positivos en PNIR, explotaciones no indemnes a enfermedades de control oficial, con positivos en patologías de importancia y declaración obligatoria; o sin adhesión a programas voluntarios oficiales de control de enfermedades. (Valor máximo a obtener en este punto: 5).
- **Resultados de los controles anteriores.** Aquellas explotaciones que obtuvieran incumplimientos o irregularidades en alguno de los controles realizados puntuarán hasta un máximo de 3 puntos.
- **Explotaciones nunca antes inspeccionadas en el Programa de Higiene de la Producción Primaria** puntuarán 3 puntos.

**Todas aquellas explotaciones que obtengan 15 puntos o más, serán consideradas de alto riesgo y serán controladas obligatoriamente. Las explotaciones con una puntuación de entre**

4 y 15 se considerarán de riesgo medio, y las explotaciones con una puntuación inferior a 4 de bajo riesgo.

Adicionalmente, se seleccionará una muestra por sospecha que ascienda al 1% del total de subexplotaciones. La sospecha podrá venir motivada por denuncias previas, resultados desfavorables en el Programa de control de Medicamentos, resultados desfavorables en programas de vigilancia, control y erradicación de enfermedades, o la falta de comunicación a PRESVET de las prescripciones de antibióticos.

#### **2.3.4. Controles**

Los controles podrán ser administrativos o in situ, con el correspondiente levantamiento de acta, informe posterior a la inspección; así como vigilancia y seguimiento en caso de incumplimientos detectados.

Los controles a realizar implican la revisión de los siguientes aspectos:

##### **REQUISITOS GENERALES DE HIGIENE:**

- Se realiza una inspección visual de las instalaciones, y documental de planes y procedimientos de limpieza y desinfección para asegurar la correcta limpieza de las instalaciones, equipos, vehículos...
- Comprobar el estado de los animales con destino al matadero para garantizar su limpieza para el sacrificio.
- Comprobación del tipo de agua y control analítico del mismo para asegurar su potabilidad.
- Comprobación de la existencia de controles de plagas y justificación documental.
- Comprobación documental y visual de los procesos y registros de gestión de residuos y sustancias peligrosas.
- Comprobación documental y visual de la existencia de normas de higiene personal.

##### **REQUISITOS ESPECIALES DE HIGIENE EN EXPLOTACIONES DE PRODUCCION DE LECHE:**

- Los locales y equipos de ordeño deben estar contruidos para evitar la contaminación de leche, separados de los locales de animales, con superficies de fácil limpieza (revisión del protocolo de limpieza), y los recipientes del transporte deben ser limpiados como mínimo diariamente tras su uso.
- Control visual durante el ordeño, y control documental.
- Control de eliminación de subproductos no destinados a consumo humano (procedentes de animales enfermos, o en tratamiento y sin finalizar el tiempo de espera).
- Control visual y del registro de temperaturas de los lugares en los que se conserve la leche y vehículos de transporte.

**REGISTROS:**

- Del origen, conservación y naturaleza de los alimentos para animales, fabricantes, etiquetado...
- Medicamentos veterinarios y otros tratamientos, fechas de administración, tiempos de espera...
- Enfermedades detectadas.
- Resultados de los análisis y muestreos realizados.
- Informes de controles efectuados.
- Libro de registro de la explotación, control de movimientos e identificación de los animales.

**CONTROL SANITARIO:**

- Control de la notificación obligatoria de sospecha de enfermedades.
- Control de desinfecciones y aislamiento de animales en caso de declaración de enfermedades.
- Control documental del sacrificio obligatorio de animales por enfermedades.
- Presencia de un veterinario de explotación.
- Medidas preventivas al introducir nuevos animales y registro de las entradas realizadas.
- Documentos de comunicación de resultados de los análisis efectuados en las muestras animales realizadas bajo programas nacionales oficiales de sanidad animal.

**GESTIÓN DE SUBPRODUCTOS:**

- Existencia de un sistema de eliminación de cadáveres, registro de su recogida y almacenamiento.
- Registros de gestión de leche, huevos, miel...
- Registro de la gestión de estiércol.
- Control de los tiempos de espera al usar fertilizantes en ganadería extensiva.

**HIGIENE DE PIENSOS Y ALIMENTOS PARA ANIMALES:**

- Uso de pienso adecuado para la especie.
- Almacenamiento para evitar contaminaciones.
- Limpieza y mantenimiento de los equipos de suministro de alimentos.
- Registro de entradas.
- Procedimiento de limpieza al administrar piensos medicamentosos.

- Almacenamiento adecuado de piensos medicamentosos.

**USO RACIONAL DE MEDICAMENTOS:**

- Control de recetas de los tratamientos administrados, y correcta cumplimentación de los registros.
- Control de los tiempos de espera.
- Control de la presencia y almacenamiento de medicamentos veterinarios.
- Control de recetas que amparen la presencia de medicamentos veterinarios en la explotación, y su validez temporal.
- Control de la eliminación de medicamentos, y revisión del protocolo llevado a cabo.

En cada visita control se levantará un acta específica, que podrá ser de control inicial, o de seguimiento. Las visitas de seguimiento tienen como objetivo comprobar la subsanación de los incumplimientos detectados en inspecciones iniciales de control.

El ganadero o su representante debe firmar el acta y formular las observaciones necesarias sobre su contenido. Siempre debe quedar constancia escrita de la comunicación al titular de la explotación de los incumplimientos detectados, y de los plazos y medidas de subsanación.

En el caso de detección de incumplimientos, el acta de inspección se remite al órgano competente para iniciar las actuaciones, diligencias o procedimientos oportunos, incluido el procedimiento sancionador. Tras la comprobación de dichos incumplimientos, las autoridades competentes adoptarán las medidas adicionales necesarias para determinar el origen y alcance del incumplimiento, establecer las responsabilidades y medidas adecuadas para garantizar que el operador subsane dicho incumplimiento y evitar su repetición. Si fuera necesario se establecerían medidas cautelares.

**2.3.5. Revisión del programa**

Cada año se realizará una revisión del programa de control, evaluando sus resultados, la eficacia del mismo, y estableciendo nuevos objetivos operativos. La supervisión del cumplimiento de los controles oficiales se realizará según se establece en el PNCOCA. Se supervisará documentalmente el 10% de los controles oficiales realizados, procedimientos, trabajo del inspector, elaboración formal del acta...; y un mínimo del 1% de las supervisiones realizadas in situ. En este caso, un supervisor acompañará al inspector y supervisará su trabajo en todo el proceso, dejando recogida un acta de supervisión.

Según el Reglamento 2017/625, la autoridad competente en la ejecución de este Programa Nacional de control deberá someterse a auditorías internas o externas, que a su vez deben someterse a examen independiente.

## **BIBLIOGRAFÍA**

Estrategia de la granja a la mesa. Página web:

<https://www.consilium.europa.eu/es/policies/from-farm-to-fork/>

Programa Nacional de Control Oficial de la Higiene en las Explotaciones Ganaderas.

[https://www.mapa.gob.es/es/ganaderia/temas/sanidad-animal-higiene-ganadera/pncodehigienedelaproduccionprimariaganadera2022\\_tcm30-523380.pdf](https://www.mapa.gob.es/es/ganaderia/temas/sanidad-animal-higiene-ganadera/pncodehigienedelaproduccionprimariaganadera2022_tcm30-523380.pdf)

Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. Guías de Sanidad Animal e Higiene ganadera.

<http://www.MAPA.gob.es/es/ganaderia/publicaciones/>

MATERIAL NO OFICIAL

**MATERIAL PARA LA PREPARACIÓN DEL TEMA 79**

**PLAN NACIONAL DE INVESTIGACIÓN DE RESIDUOS. MARCO LEGAL.  
CLASIFICACIÓN DE RESIDUOS.**

*Este material no tiene carácter oficial, por lo que en ningún caso vinculará al Tribunal Calificador. Constituye, únicamente, un instrumento complementario que servirá de apoyo al opositor para enfocar cada uno de los epígrafes, pero nunca de forma exclusiva ni excluyente. El Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación no se hace responsable del contenido del mismo.*

*Los materiales no serán objeto de actualización constante.*

## **ÍNDICE**

### **1. INTRODUCCIÓN**

### **2. MARCO LEGAL**

2.1. NORMATIVA COMUNITARIA

2.2. NORMATIVA NACIONAL

### **3. PLAN NACIONAL DE INVESTIGACIÓN DE RESIDUOS (PNIR)**

3.1. DEFINICIONES.

3.2. LA COMISIÓN NACIONAL.

3.3. PLAN NACIONAL DE INVESTIGACIÓN DE RESIDUOS (PNIR)

3.4. CLASIFICACIÓN DE LAS SUSTANCIAS OBJETO DE INVESTIGACIÓN

3.5. CONTROLES.

3.6. DINÁMICA DE LOS CONTROLES.

3.7. ESTRATEGIA, NIVELES Y FRECUENCIA DE LOS CONTROLES

3.8. LABORATORIOS OFICIALES

3.9. MÉTODOS DE ANÁLISIS

3.10. PROCEDIMIENTO DE ACTUACIÓN ANTE LA APARICIÓN DE RESULTADOS POSITIVOS.

## **1. INTRODUCCIÓN**

La gran explosión demográfica sufrida a nivel mundial tras la revolución industrial se ha puesto de manifiesto por un crecimiento exponencial de la población hasta el punto de llegar a superar en el primer cuarto del S. XXI los 8.000 M de habitantes. Este hecho ha originado que los sistemas clásicos de producción de alimentos (extensivos) hayan sido progresivamente sustituidos por sistemas de producción intensiva tanto en la agricultura como en la ganadería.

Para mantener estos sistemas se requiere cada vez más el empleo de herbicidas, pesticidas, abonos, etc. de cara a mantener la producción. Los sistemas de producción ganaderos en los que los animales viven hacinados y en grandes explotaciones no han sido ajenos a esto, lo que ha supuesto un incipiente incremento del uso de productos farmacológicos de carácter veterinario destinados, bien al tratamiento de las enfermedades que se desarrollan o bien, a su administración con carácter preventivo con objeto de mantener o incrementar la producción. Esto genera el que estas sustancias puedan incorporarse a la cadena alimenticia con los consiguientes riesgos para la salud del consumidor.

Para garantizar la salud de los animales productores de alimentos es necesario administrar medicamentos veterinarios cuya utilización puede dejar residuos en los alimentos obtenidos. Los riesgos que ello conlleva en humanos pueden suponer un problema por toxicidad aguda; pero más importante es el que se puedan originar efectos acumulativos a largo plazo que puedan desembocar en efectos teratogénicos, mutagénicos o carcinogénicos.

El disponer de programas de control de residuos apropiados nos permite contribuir a certificar la calidad de los alimentos de origen animal producidos. Tal como indica en su capítulo 6 el Código Sanitario de los Animales Terrestres (Manual de la OIE), la mejor manera de garantizar la inocuidad y la calidad de los alimentos es aplicar una estrategia integrada y multidisciplinaria en toda la cadena alimentaria. Esto es posible a través de métodos basados en la evaluación del riesgo.

La directiva 96/23 establece que los Estados miembros de la UE confiarán a un servicio u organismo público central la elaboración de los planes de vigilancia para la detección de residuos o sustancias en: los animales vivos, sus excrementos, los tejidos y productos de origen animal, así como en los alimentos para animales y el agua para beber.

Este servicio u organismo público coordinará las actividades de los servicios centrales y regionales encargados realmente de efectuar la vigilancia, así como recoger los resultados de los controles y las informaciones que se deben comunicar a la Comisión Europea. Por otra parte, los Estados Miembros presentarán a la Comisión los planes de vigilancia relativos a la detección de grupos de residuos o sustancias.

Los planes deben respetar los niveles y las frecuencias de muestreo establecidos en el anexo IV de la Directiva. La Comisión informará a los países de la UE cada año y enviará

al Parlamento Europeo y al Consejo una comunicación que recoja los resultados de las acciones llevadas a cabo en el ámbito regional, nacional y de la UE.

En este Tema se describe la estructura del sistema de control de residuos en España. Se revisa la legislación aplicable y se describe el órgano encargado de coordinar a las partes intervinientes. Se muestran los controles a efectuar, su dinámica, la frecuencia, etc. y se indica el procedimiento de actuación ante la aparición de resultados no conformes. Así mismo se indican los laboratorios de referencia y sus labores.

## **2. MARCO LEGAL**

Marco reglamentario relativo al Plan Nacional de Investigación de Residuos (PNIR):

### **2.1. NORMATIVA COMUNITARIA**

- **DIRECTIVA 96/23/CE** relativa a las medidas de control aplicables respecto de determinadas sustancias y sus residuos en los animales vivos y sus productos.
- **DECISIÓN 97/747/CE DE LA COMISIÓN** de 27 de octubre de 1997 por la que se fijan los niveles y frecuencias de muestreo previstas en la Directiva 96/23/CE del Consejo, con vistas al control de determinadas sustancias y sus residuos en determinados productos animales.
- **DIRECTIVA 2003/74/CE DEL PARLAMENTO EUROPEO Y DEL CONSEJO**, de 22 de septiembre de 2003, que modifica la Directiva 96/22/CE del Consejo por la que se prohíbe utilizar determinadas sustancias de efecto hormonal y tireostático y sustancias beta-agonistas en la cría de ganado.
- **REGLAMENTO (CE) 470/2009 DEL PARLAMENTO EUROPEO Y DEL CONSEJO** de 6 de mayo de 2009 por el que se establecen procedimientos comunitarios para la fijación de los límites de residuos de las sustancias farmacológicamente activas en los alimentos de origen animal, se deroga el Reglamento (CEE) no 2377/90 del Consejo y se modifican la Directiva 2001/82/CE del Parlamento Europeo y del Consejo y el Reglamento (CE) no 726/2004 del Parlamento Europeo y del Consejo.
- **REGLAMENTO (UE) 37/2010 DE LA COMISIÓN** de 22 de diciembre de 2009 relativo a las sustancias farmacológicamente activas y su clasificación por lo que se refiere a los límites máximos de residuos en los productos alimenticios de origen animal.
- **REGLAMENTO (UE) 2017/625 DEL PARLAMENTO EUROPEO Y DEL CONSEJO** de 15 de marzo de 2017 relativo a los controles y otras actividades oficiales realizados para garantizar la aplicación de la legislación sobre alimentos y piensos, y de las normas sobre salud y bienestar de los animales, sanidad vegetal y productos fitosanitarios.
- **REGLAMENTO DELEGADO (UE) 2019/2090 DE LA COMISIÓN** de 19 de junio de 2019 que complementa al Reglamento (UE) 2017/625 del Parlamento Europeo y del Consejo en lo que respecta a los casos de sospecha o constatación de incumplimiento de las normas de la Unión aplicables al uso de sustancias farmacológicamente activas autorizadas o sus residuos en medicamentos

veterinarios o como aditivos de piensos o de las normas de la Unión aplicables al uso de sustancias farmacológicamente activas no autorizadas o prohibidas o sus residuos

- **REGLAMENTO DE EJECUCIÓN (UE) 2021/808 DE LA COMISIÓN** de 22 de marzo de 2021 relativo al funcionamiento de los métodos analíticos para los residuos de sustancias farmacológicamente activas utilizadas en animales productores de alimentos y a la interpretación de resultados, así como a los métodos que deben utilizarse para el muestreo, y por el que se derogan las Decisiones 2002/657/CE y 98/179/CE.

## **2.2. NORMATIVA NACIONAL**

- **REAL DECRETO 1749/1998**, de 31 de julio, por el que se establecen las medidas de control aplicables a determinadas sustancias y sus residuos en los animales vivos y sus productos.
- **REAL DECRETO 1080/2012**, de 13 de julio, por el que se modifica el Real Decreto 1749/1998, de 31 de julio, por el que se establecen las medidas de control aplicables a determinadas sustancias y sus residuos en los animales vivos y sus productos.
- **REAL DECRETO 2178/2004** de 12 de noviembre, por el que se prohíbe utilizar determinadas sustancias de efecto hormonal y tirostático y sustancias beta-agonistas de uso en la cría del ganado.
- **LEY 17/2011**, de 5 de julio, de seguridad alimentaria.

## **3. PLAN NACIONAL DE INVESTIGACIÓN DE RESIDUOS**

La Directiva 96/23 trata sobre la investigación de residuos en los animales y carnes frescas; estableciéndose la vigilancia de sustancias de acción farmacológica, de sus residuos y de contaminantes del medio ambiente en especies animales y en sus productos destinados a consumo humano. Con esta disposición se pretendió hacer que los productores, así como todas aquellas personas que intervinieran en la cadena alimentaria, asumieran una mayor responsabilidad en lo que respecta a la inocuidad de los productos de origen animal destinados a consumo humano.

Determinados problemas sanitarios acaecidos en décadas recientes como el de la Encefalopatía Espongiforme Bovina, dioxinas y policlorobifenilos (PCBs), Clembuterol, resistencias a antibióticos etc. han obligado a la redefinición y estructuración de algunos aspectos de la seguridad alimentaria lo que llevó a la derogación de la Directiva 96/23 tras la aprobación del Reglamento 625/2017.

No obstante, la trasposición de la Directiva 96/23 al fuero español a través del Real Decreto 1749/98 aún permanece vigente. En dicho reglamento se establecen las medidas de control aplicables a determinadas sustancias y sus residuos en los animales vivos y sus productos.

En esta normativa se establece que se debe:

- Crear un órgano de coordinación para llevar a cabo la ejecución de las investigaciones encaminadas a determinar la presencia de sustancias con actividad farmacológica y sus residuos en productos de origen animal a lo largo del territorio nacional como es la Comisión Nacional del Plan Nacional de Investigación de Residuos (P.N.I.R.).
- Regular aspectos relacionados con el control de las sustancias y sus residuos, como normativa básica estatal, si bien contiene disposiciones aplicables a las importaciones de terceros países, que deben considerarse de aplicación plena por incidir en el comercio y sanidad exteriores.
- Contemplar un conjunto de normas muy detalladas que establezcan entre otras disposiciones la frecuencia mínima de los controles oficiales.
- Regular tanto la metodología de la recogida de muestras como los aspectos relativos al procedimiento administrativo y, a las infracciones y sanciones aplicables en caso de incumplimiento de lo dispuesto en la misma.

En definitiva, hacer que los productores y todas aquellas personas que intervengan en el sector ganadero y la cadena alimenticia asuman una mayor responsabilidad sobre la inocuidad de cualquier producto de origen animal destinado al consumo humano.

El objetivo del PNIR es establecer las medidas de control sobre las sustancias que pueden ser suministradas a los animales y sus residuos (y también contaminantes ambientales), para así detectarlos en cualquiera de las fases de la cadena alimentaria, tanto en animales vivos como en sus productos de transformación.

### 3.1. DEFINICIONES.

En este contexto se entenderá por:

- Residuo: cualquier sustancia, metabolito o producto de degradación o de reacción de sustancias activas, presente en los alimentos como resultado del uso intencionado de medicamentos veterinarios o de productos fitosanitarios y que puede resultar nocivo para la salud.
- Contaminante: son las sustancias agregadas a los alimentos de manera no intencionada, pero que sin embargo se encuentran en el mismo como resultado de las distintas etapas de producción, fabricación, transformación, preparación, tratamiento, acondicionamiento, empaquetado, transporte o almacenamiento, o como consecuencia de la contaminación medioambiental. Ej: metales pesados, micotoxinas, nitratos, dioxinas y PCBs, hidrocarburos aromáticos policíclicos, furanos, sustancias relacionadas con los materiales en contacto con alimentos, etc.
- Autoridad competente. Los órganos competentes de las Comunidades Autónomas para el mercado interior y los Ministerios de Sanidad y Consumo y de Agricultura, Pesca y Alimentación en los ámbitos de su competencia respecto de los intercambios

con terceros países, así como para las oportunas comunicaciones a otros Estados miembros y a la Comisión Europea

- Sustancias o productos no autorizados: Las sustancias o productos cuya administración a un animal esté prohibida por la normativa comunitaria o nacional, así como las sustancias o productos que no figuran como expresamente autorizados.
- Tratamiento ilegal: La utilización de sustancias o productos no autorizados o la utilización de sustancias o productos autorizados según lo dispuesto en el Real Decreto 109/1995, de 27 de enero, sobre medicamentos veterinarios para fines o en condiciones distintas de las establecidas en el mismo.
- Muestra oficial: Una muestra tomada por la autoridad competente y que incluye, las indicaciones de la especie, la naturaleza y el método de muestreo, así como la identificación y el origen del animal o producto animal. Según la naturaleza de la muestra se indicará asimismo el sexo del animal y la cantidad de muestra tomada.
- Laboratorio autorizado: aquel designado por la autoridad competente como capacitado, en base a la normativa vigente, para proceder al examen de una muestra oficial con el fin de detectar la posible presencia de residuos.
- Límite máximo de residuo (LMR): es desde el punto de vista de la seguridad del consumidor, el contenido máximo admisible de residuos en una matriz resultante de la utilización de un medicamento veterinario autorizado en animales productores de alimentos. Otra definición podría ser: la concentración máxima de un residuo de una sustancia farmacológicamente activa que puede admitirse en los alimentos de origen animal.
- Periodo de retirada (o tiempo de espera o tiempo de supresión): es el periodo de tiempo que hay que respetar antes de destinar al consumo las canales tratadas con un medicamento, de tal forma que los residuos del principio activo y/o sus metabolitos estén por debajo de los LMR fijados.

### **3.2. LA COMISIÓN NACIONAL.**

Es el órgano colegiado encargado de la coordinación de la vigilancia de la cadena de producción de alimentos procedentes de animales; en especial de la detección de residuos y sustancias incluidas en el ANEXO (al final de este documento).

La Comisión Nacional como órgano colegiado está compuesta por miembros de diferentes Ministerios, así como de las comunidades autónomas. Está formado por:

- a) Presidente: el Director general de Salud Pública del Ministerio de Sanidad y Consumo.
- b) Vicepresidente: el Director general de Ganadería del Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación.

c) Vocales:

- ✓ El Subdirector general de Sanidad Exterior y Veterinaria de la Dirección General de Salud Pública.
- ✓ El Subdirector general de Sanidad Veterinaria del Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, que actuará como Secretario de la Comisión.
- ✓ Un representante del Instituto de Salud «Carlos III».
- ✓ Un representante del Instituto Nacional de Consumo.
- ✓ Un representante del Instituto de Toxicología.
- ✓ Un representante de cada Comunidad Autónoma (nombrado entre los diferentes órganos competentes de cada Comunidad Autónoma). Una vez nombrados, estos vocales forman parte de la Comisión de forma plena y actuarán con voz y voto.

d) Asesores:

- ✓ Los Directores de los Laboratorios Nacionales de Referencia. Todos ellos actuarán con voz pero sin voto.
- ✓ Un representante designado por el Ministerio del Interior.

Los asesores actuarán con voz pero sin voto. No obstante, cuando así lo estime el Presidente de la Comisión podrá solicitar el asesoramiento de personas ajenas a la misma, con reconocida cualificación científica, en relación con determinados asuntos, así como la colaboración de las asociaciones afectadas.

Las funciones de la Comisión Nacional son:

- a) Elaborar, previa consulta con las Comunidades Autónomas, los planes de control para su comunicación a la Comisión Europea.
- b) Coordinar las actividades de los servicios centrales y de las Comunidades Autónomas encargadas de efectuar los controles y la vigilancia de los diferentes residuos. La mencionada coordinación se extenderá a todos los servicios que participen en la lucha contra la utilización fraudulenta de sustancias o productos en la ganadería.
- c) Reunir el conjunto de datos remitidos por las Comunidades Autónomas para evaluar los medios aplicados y los resultados obtenidos en la ejecución de las medidas previstas.
- d) Transmitir anualmente a la Comisión Europea, a más tardar el 31 de marzo de cada año, los datos y resultados contemplados en el apartado anterior, incluidos los resultados de las investigaciones emprendidas.
- e) Formular, en cualquier momento, las propuestas que se estimen precisas para la mejora de la eficacia de los planes.

### **3.3. PLAN NACIONAL DE INVESTIGACIÓN DE RESIDUOS (PNIR)**

La entrada de España a la Comunidad Europea exige la transposición, a nuestro Derecho interno, de las normas comunitarias aplicables al control de ciertas sustancias con o sin acción farmacológica, así como sus residuos. Así se publicó en España el RD 1262/1989, transposición de la Directiva europea 86/469/CEE por el que se aprobó el Plan Nacional de Investigación de Residuos en los animales y en las carnes frescas, estableciéndose la vigilancia de residuos, de sustancias de acción farmacológica y de contaminantes del medio ambiente, pero solamente en determinadas especies animales y en sus carnes.

Con el fin de ampliar esta vigilancia en otras especies animales y al conjunto de los alimentos de consumo humano que obtenemos de los animales, el RD 1262/1989 es derogado por el RD 1749/1998 del 31 de julio.

Con el RD 1749/1998 del 31 de julio se lleva a efecto la transposición de la directiva 96/23/CE donde se establecían los criterios generales de los planes nacionales y fijaba las medidas de actuación ante cualquier incumplimiento ya que, igualmente con esta disposición se pretendía hacer que los productores y todas aquellas personas que intervengan en el sector ganadero asuman una mayor responsabilidad en lo que respecta a la inocuidad de cualquier producto de origen animal de su propiedad que sea empleado para el consumo humano.

El objetivo del PNIR es:

- garantizar que los alimentos frescos y sus productos procedentes de animales se elaboren y comercialicen en ausencia de residuos de sustancias que tengan actividad farmacológica y de sus metabolitos.
- Impedir que se comercialicen y utilicen de forma indiscriminada sustancias cuyo uso esté restringido o prohibido.

La Comisión Nacional presentará anualmente (a más tardar el 31 de marzo del año en curso) a la Comisión Europea el plan inicial de cada año en el que se precisarán las medidas nacionales durante ese año y, posteriormente, cualquier actualización del plan, previamente autorizado, basándose en la experiencia de años anteriores.

El plan deberá:

- a) Prever la detección e investigación de los diferentes grupos de residuos o de sustancias contempladas en el ANEXO según el tipo de animal o producto.
- b) Precisar, en particular, las medidas de detección e investigación de la presencia de las citadas sustancias en los animales, en los piensos y en el agua de bebida de los mismos; así como en todos los emplazamientos en que se críen o se mantengan los animales; y de sus residuos en las matrices procedentes de dichos animales
- c) Respetar las normas, los niveles y frecuencia de muestreo definidos en los anexos III y IV del RD 1749/98.

### Contenido, aprobación y seguimiento del plan

El plan inicial precisará lo siguiente:

- a) La normativa relativa a la utilización de las sustancias descritas, en particular, las disposiciones sobre su prohibición, autorización, distribución, comercialización y normas sobre su administración.
- b) Los límites de tolerancia de aquellas sustancias para las que no existan límites máximos de residuos establecidos de conformidad con lo dispuesto en el Reglamento 2377/90, del Consejo, de 26 de junio de 1990, por el que se establece un procedimiento comunitario de fijación de los límites máximos de residuos de medicamentos veterinarios en los alimentos de origen animal.
- c) (Tras comunicación a las autoridades competentes):
  1. Las normas seguidas para la toma de muestras oficiales y, en particular, las referentes a las indicaciones que deben figurar en las mismas
  2. La naturaleza de las medidas previstas por las autoridades competentes en lo referente a los animales o los productos en los que se haya comprobado la presencia de residuos
  3. La infraestructura de los servicios (en especial la naturaleza e importancia de los servicios que participen en la ejecución de los planes)
  4. La lista de laboratorios autorizados con indicación de su capacidad de tratamiento de muestras
  5. La lista de sustancias que se pueden detectar, los métodos de análisis y las normas de interpretación de los resultados, así como el número de muestreos que se efectúen de las sustancias contempladas
  6. El número de muestras oficiales que deben tomarse, en relación con el número de animales sacrificados en los años anteriores y según los niveles y frecuencia descritos.

Tras su comunicación a la Comisión Europea, el plan podrá ser modificado o complementado por la Comisión Nacional en respuesta a la solicitud que, en tal sentido, dirija la Comisión Europea. La aprobación del plan, así como sus modificaciones, se realizará mediante el procedimiento previsto en la normativa comunitaria. Las actualizaciones anuales del plan nacional, bien a instancia de la Comisión Nacional en base a las evoluciones o a los resultados obtenidos, o por iniciativa de la Comisión Europea se aprobarán según el procedimiento previsto en la normativa comunitaria.

La especial peculiaridad del reino de España en cuanto a su organización territorial hace que las competencias en materia del control de residuos se encuentren transferidas a las Comunidades Autónomas; éstas por tanto informarán a la Comisión Nacional sobre su ejecución a más tardar el 28 de febrero de cada año, de los resultados y de las medidas de control seguidas correspondientes al año anterior. Una vez recibida y recopilada la

mencionada información será remitida por la Comisión Nacional a la Comisión Europea antes del 31 de marzo de cada año para su evaluación.

El muestreo a que se refiere el plan podrá llevarse a cabo desde dos puntos de vista:

1. **Plan aleatorio:** Las muestras son tomadas con el objetivo de detectar tratamientos ilegales o para controlar el cumplimiento de los LMR (límites máximos de residuos) de medicamentos veterinarios, niveles máximos de pesticidas o los niveles establecidos en la legislación relativa a contaminantes. Se distribuirá este muestreo de la manera más uniforme posible a lo largo de todo el año (atendiendo siempre a la eficacia de las sustancias a investigar), garantizando en todo caso que en todos los meses del año se realiza toma de muestras. En cada muestra se realizarán las determinaciones analíticas que se consideren más interesantes, teniendo en cuenta la legislación vigente y la información actualizada respecto a los problemas surgidos para un producto en cuestión.

2. **Plan sospechoso o dirigido:** se muestrean aquellos animales o productos con resultados anteriores de incumplimiento de la normativa o que puedan poner de manifiesto un tratamiento ilegal, o sospecha de incumplimiento del periodo de retirada (supresión) de medicamentos veterinarios autorizados.

### 3.4. CLASIFICACIÓN DE LAS SUSTANCIAS OBJETO DE INVESTIGACIÓN

En el RD 1749/98 se hayan descritos los grupos de sustancias que serán objeto de investigación dentro de este plan como se recoge en el ANEXO. Estos grupos son:

A. SUSTANCIAS PROHIBIDAS Y NO AUTORIZADAS. Comprende lo subgrupos:

1. Estilbenos
2. Antitirodianos
3. Esteroides
4. Lactonas del ác. resorcílico
5.  $\beta$ -agonistas
6. Resto de sustancias prohibidas (las recogidas en el Reglamento 2377/90)

B. MEDICAMENTOS VETERINARIOS Y CONTAMINANTES. Este grupo se subdivide en:

1. Sustancias antibacterianas (incl. sulfamidas y quinolonas)
2. Otros medicamentos veterinarios: como
  - a. Antihelmínticos
  - b. Anticoccidianos y nitroimidazoles
  - c. Carbamatos y piretroides
  - d. Tranquilizantes
  - e. Antiinflamatorios no esteroideos

f. Otras sustancias con actividad

3. Contaminantes Ambientales:

a. Compuestos Organoclorados y PCB's

b. Compuestos Organofosforados

c. Elementos químicos

d. Micotoxinas

e. Colorantes

f. Otros

En el grupo A se recogen las sustancias que se hallan prohibidas y que bajo ningún concepto deberían utilizarse en producción ganadera. Seguidamente se indica brevemente las propiedades que poseen y sus efectos para el ser humano.

**Los estilbenos** son una familia de compuestos derivados del estilbeno (Etilbestrol, dietilbestrol, etc.) que pueden actuar como disruptores endocrinos.

**Los tireostáticos** (como tiuracilo, metiltiuracilo o propiltiuracilo, etc.) son sustancias que rebajan el metabolismo basal por alteración de la síntesis, secreción o acción periférica de la hormona del tiroides. Su uso recomendado es en los casos de hiperfunción tiroidea, sin embargo, también se emplean de forma clandestina para aumentar la ganancia de peso por aumento en la acumulación de grasa. Pueden originar efectos tóxicos a largo plazo.

**Los esteroides** son iguales o similares a ciertas hormonas del cuerpo. Entre los anabolizantes tenemos los de origen natural (17-beta estradiol, progesterona y testosterona) y los de síntesis o exógenos (tipo DES o dietilestilbestrol -estilbenos-, acetato de trembolona y zeranol). La acción cancerígena de acuerdo a los antecedentes históricos del DES y estilbenos en general ha determinado su prohibición. Existen más de 100 variantes de esteroides anabólicos. Las sustancias anabolizantes producen un aumento de la síntesis proteica.

Similar efecto al de los esteroides producen las llamadas **lactonas del ácido resorcílico** (como cearalanona, cearaleno, cearalenol. etc). Son estrógenos no esteroideos y pueden provocar alteraciones endometriales en la mujer, trastornos en el sistema reproductor en desarrollo, alteraciones de la fertilidad en mujeres y además tienen actividad inmunodepresora.

**Los  $\beta$ -agonistas** (como salbutamol, clenbuterol o cimaterol, etc.) empleados para el tratamiento de afecciones respiratorias se han utilizado ilegalmente en medicina veterinaria principalmente en bovinos por dos razones: como promotores del crecimiento y para mejorar la composición de la canal al disminuir la grasa en la masa muscular. Disminuyen el catabolismo muscular, que se acompaña de un ligero incremento en la síntesis del tejido, añadiendo también como parte de sus características la lipólisis del tejido graso. Se prohibieron por sus efectos sobre la salud debido a que causan intoxicaciones de diversa naturaleza a los consumidores.

**Los antibióticos** (prohibidos como promotores del crecimiento) son probablemente uno de los grupos más ampliamente utilizados en medicina veterinaria para la profilaxis y tratamiento de enfermedades infecciosas. Su empleo puede ser doble, bien como antibacterianos o bien como promotores del crecimiento habiendo generado uno de los problemas más serios para la salud pública como son las resistencias bacterianas. Los antibióticos actúan como promotores del crecimiento mejorando la productividad del ganado al alterar la fermentación microbiana en el rumen provocando que se genere más energía metabolizable por kilogramo de alimento consumido.

### **3.5. CONTROLES**

El RD 1749/98 indica que se debe establecer controles oficiales sobre:

- a) Las sustancias enumeradas en el grupo A del anexo, en la fase de fabricación, así como en las etapas posteriores de manipulación, almacenamiento, transporte, distribución y venta o adquisición.
- b) Los alimentos para animales en las fases de la cadena de producción y distribución.
- c) Los animales a lo largo de toda la cadena de producción y los productos básicos de origen animal.

Estos controles deberán efectuarse para detectar la posesión o la presencia de sustancias o productos prohibidos que puedan estar destinados a ser administrados a los animales con fines de engorde, pero preferentemente se efectuarán para detectar un posible tratamiento ilegal en el animal.

### **3.6. DINÁMICA DE LOS CONTROLES.**

La toma de muestras será realizada por la autoridad competente (inspectores) en presencia del responsable o representante de la explotación ganadera investigada. A ello se unirá la presencia de testigos si fueran requeridos o, en su ausencia, en presencia de dos miembros de la autoridad si el responsable o representante se negasen a actuar como tales.

Todo ello se hará levantando el correspondiente acta formalizada de toma de muestra donde se indicarán todos los datos para identificar la muestra inequívocamente: explotación, propietario, animal, etc. La muestra se dispondrá en el recipiente adecuado que una vez cerrado deberá ser precintado convenientemente y trazada su identificación en el acta de toma de muestra. La muestra se habrá de tomar por triplicado (peculiaridad del sistema especialmente garantista del estado español a diferencia de otros países pertenecientes a la U.E. donde la muestra es única). Se verá posteriormente en el apartado 3.9 más detalladamente.

### **3.7. ESTRATEGIA, NIVELES Y FRECUENCIA DE LOS CONTROLES**

Las muestras oficiales se tomarán según la estrategia, niveles y frecuencia contemplados en los anexos III y IV RD 1749/98 a fin de ser examinadas en los laboratorios autorizados.

A continuación, se muestra para las especies mayoritarias un resumen:

- Bovinos: se deberá realizar una toma de muestra igual o mayor al 0.4 % de sacrificios realizados en el año precedente que se repartirán para su análisis de esta forma:
  - Grupo A: 62 %
  - Grupo B: 38 %. Estas se repartirán entre sus subgrupos de esta forma:
    - B1: 30%
    - B2: 30%
    - B3: 10% y
    - 30% restante a criterio de la autoridad
- Ovinos y caprinos: Se tomará un número de muestras de al menos el 0.05% de los sacrificios precedentes. que se repartirán para su análisis de esta forma:
  - Grupo A: 80 %
  - Grupo B: 20 %. Estas se repartirán entre sus subgrupos de esta forma:
    - B1: 30%
    - B2: 30%
    - B3: 10% y
    - 30% restante a criterio de la autoridad
- Porcinos: Se tomará un número de muestras de al menos el 0.05% de los sacrificios precedentes. que se repartirán para su análisis de esta forma:
  - Grupo A: 60 %
  - Grupo B: 40 %. Por subgrupos:
    - B1: 30%
    - B2: 30%
    - B3: 10% y
    - 30% restante a criterio de la autoridad
- Aves: Se tomará un número de muestras de al menos el 1 por cada 200 Toneladas (peso neto) de la producción del año precedente (con un mínimo de 100 muestras) que se repartirán para su análisis de esta forma:
  - Grupo A: 50 %
  - Grupo B: 40 %. Por subgrupos:
    - B1: 30%

- B2: 30%
  - B3: 10% y
  - 30% restante a criterio de la autoridad
- Leche: Se tomará un número de muestras de al menos el 1 por cada 15.000 Toneladas de la producción del año anterior (con un mínimo de 300 muestras) que se repartirán para su análisis de esta forma:
    - Grupo A6, B1, B2a, B2e: 70 %
    - Grupo B3: 15 %
    - 15% restante a criterio de la autoridad
  - Huevos: Se tomará un número de muestras de al menos el 1 por cada 15.000 toneladas de la producción del año anterior (con un mínimo de 200 muestras) que se repartirán para su análisis de esta forma:
    - Grupo A6, B1, B2b: 70 %
    - Grupo B3a: 30 %

### **3.8. LABORATORIOS OFICIALES**

La designación se hará por escrito donde se incluirá las condiciones. Las autoridades que designen los laboratorios oficiales se asegurarán de que:

- a) dispongan de experiencia, equipamiento y la infraestructura necesarios para la realización de análisis o ensayos o diagnósticos de las muestras;
- b) cuenten con personal suficiente con la cualificación, la formación y la experiencia adecuadas;
- c) garanticen que las tareas que tienen encomendadas se realicen de manera imparcial y sin conflictos de intereses en lo que respecta al ejercicio de sus funciones como laboratorio oficial;
- d) puedan entregar en tiempo oportuno los resultados del análisis, ensayo o diagnóstico efectuado sobre las muestras tomadas durante los controles y otras actividades oficiales;
- e) funcionen de acuerdo con la norma EN ISO/IEC 17025 y estén acreditados de acuerdo con dicha norma por un organismo nacional de acreditación de conformidad con el Reglamento (CE) 765/2008

Conforme a lo recogido en el Reglamento 625/2017, los laboratorios designados por las autoridades competentes podrán pertenecer a otro Estado Miembro o un tercero del Espacio Económico Europeo.

A petición del laboratorio de referencia de la Unión Europea o del laboratorio nacional de referencia, los laboratorios oficiales participarán en ensayos interlaboratorios o en ensayos de aptitud organizados en su calidad de laboratorios oficiales.

A nivel de la Unión Europea se establece una red jerarquizada de laboratorios en cuya base se encuentran los Laboratorios Oficiales de Análisis (LOA) o Laboratorios de Control (LC) o Laboratorios de Rutina (LR) quienes verdaderamente soportan el peso del control oficial de residuos. En la cúspide se hallan los Laboratorios Europeos de Referencia y en medio los Laboratorios Nacionales de Referencia.

### **3.8.1. Laboratorios Nacionales de Referencia (LNR)**

En España se encuentran designados tres laboratorios:

1. Centro Nacional de Alimentación (CNA), Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición (AESAN), Carretera de Pozuelo a Majadahonda km 5,100 28220 MAJADAHONDA (Madrid)
2. Laboratorio Central de Sanidad Animal (LCSA), Ministerio de Agricultura Pesca y Alimentación (MAPA), Camino del Jau s/n 18320 SANTA FE (Granada)
3. Laboratorio Arbitral Agroalimentario (LAA), Ministerio de Agricultura Pesca y Alimentación (MAPA) Carretera de La Coruña, km 10,700, 28023 Madrid (también C/ Aguarón 13, 28023 Madrid).

Cada uno de ellos tiene encomendadas las labores de referencia para los grupos que se recogen en el ANEXO.

Las competencias y funciones de los Laboratorios Nacionales de Referencia serán las siguientes:

- a) Coordinar las actividades de los laboratorios de rutina autorizados, encargados de los análisis de residuos y, en particular, de coordinar la elaboración de las normas y métodos de análisis de cada residuo o grupo de residuos de que se trate.
- B) Colaborar con las autoridades competentes a organizar el plan de vigilancia de residuos.
- c) Organizar periódicamente pruebas comparativas (ensayos de aptitud) para cada residuo o grupo de residuos para los que hayan sido designados.
- d) Promover y garantizar que los laboratorios autorizados respeten los límites de detección establecidos.
- e) Asegurar la difusión de la información suministrada por los Laboratorios Comunitarios de Referencia.
- f) Garantizar a su personal la posibilidad de participar en las reuniones de perfeccionamiento organizadas por la Comisión o los Laboratorios Comunitarios de Referencia.

g) Proporcionar apoyo técnico y formación al personal de los laboratorios autorizados.

### **3.8.2. Laboratorios Europeos de Referencia (LER)**

Son cuatro:

1. Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit (BVL) D-12277 Berlin, Alemania
2. Wageningen University & Research (WAG) Box 9101, 6700 HB Wageningen, Holanda.
3. European Union Reference Laboratory for ANTIMICROBIAL AND DYE RESIDUES IN FOOD (ANSES-AFSSA-CNEVA) F-35306 Fougères Cedex, Francia
4. Instituto Superiore di Sanità (ISS) I-00161 Roma, Italia

Sus funciones son:

- a) Fomentar y coordinar la búsqueda de nuevos métodos de análisis e informar a los Laboratorios Nacionales de Referencia de los progresos alcanzados en el ámbito de los métodos y de los materiales de análisis.
- b) Ayudar a los Laboratorios Nacionales de Referencia a que pongan en práctica un sistema apropiado de aseguramiento de la calidad basado en los principios de buenas prácticas de laboratorio.
- c) Aprobar los métodos validados como métodos de referencia para integrarlos en una colección de métodos.
- d) Suministrar a los Laboratorios Nacionales de Referencia los métodos analíticos de rutina reconocidos durante el procedimiento de fijación de los límites máximos de residuos.
- e) Suministrar a los Laboratorios Nacionales de Referencia detalles sobre los métodos analíticos y los ensayos comparativos que deban efectuarse y comunicarles los resultados obtenidos.
- f) Suministrar a los Laboratorios Nacionales de Referencia que lo soliciten un dictamen técnico sobre el análisis de las sustancias para los cuales hayan sido designados como Laboratorios Comunitarios de Referencia.
- g) Organizar ensayos comparativos (de aptitud) para los Laboratorios Nacionales de Referencia, debiéndose determinar la frecuencia de dichos ensayos de acuerdo con la Comisión. Con el fin de efectuar dichos ensayos, los laboratorios comunitarios de referencia deberán distribuir muestras blancas y muestras que contengan cantidades conocidas del residuo que se tenga que analizar.

- h) Identificar y cuantificar los residuos cuando surjan conflictos con los resultados de análisis concernientes a transacciones entre dos Estados Miembros o no sean aceptados por alguno de ellos.
- i) Organizar cursos de formación y perfeccionamiento para los expertos de los laboratorios nacionales.
- j) Proporcionar asistencia técnica y científica a la Comisión, incluido el programa de normas, medidas y ensayos comparativos.
- k) Elaborar y enviar a la Comisión un informe anual sobre sus actividades.
- l) Colaborar, en el ámbito de los métodos y materiales de análisis, con los laboratorios designados por terceros países.

### **3.9. MÉTODOS DE ANÁLISIS**

El análisis de las muestras deberá efectuarse con:

- Los métodos oficiales de rutina y de referencia que se establezcan en la normativa comunitaria, o bien con
- Aquellos reconocidos internacionalmente, o, en su defecto, con
- Métodos validados o
- Establecidos por los Laboratorios Nacionales de Referencia, o
- Métodos desarrollados por el propio laboratorio siempre que éste se halle acreditado y los métodos cumplan con los requisitos mínimos exigidos (Dec. 2002/657 y Reg 808/2021)

Las muestras tomadas y posteriormente empleadas en los análisis se distribuirán de la siguiente forma:

1. Espécimen 1: Destinado al análisis inicial. Quedará en poder de la autoridad y será remitido en las adecuadas condiciones de conservación y mantenimiento al laboratorio encargado de efectuar los análisis a la mayor brevedad posible.

2. Espécimen 2: Destinado al análisis contradictorio. Será entregado juntamente con una copia del acta de toma de muestra al responsable del establecimiento investigado quedando en su poder y debiendo garantizar su conservación hasta su análisis si fuera necesario. Si el resultado inicial fuera positivo, se ofrecerá al interesado la realización de un “contraanálisis” que pueda refutar el resultado inicial o por el contrario confirmarlo. El análisis de este espécimen correrá por cuenta del responsable de la explotación investigada. Podrá ser llevado a cabo en cualquier laboratorio que el interesado designe o en uno oficial para lo cual (si lo considera) deberá designar un perito de parte. La desaparición, destrucción o deterioro de dicho ejemplar de la muestra se presumirá maliciosa, salvo prueba de lo contrario.

3. Espécimen 3: Destinado al análisis dirimente. Esta muestra quedará en poder de la autoridad y se utilizará para dirimir caso de que el contradictorio resulte favorable al interesado. Este análisis será realizado por el correspondiente Laboratorio Nacional de Referencia.

Cuando del resultado del análisis inicial aparezcan resultados positivos de los que se deduzcan infracciones, se incoará el correspondiente procedimiento sancionador sin perjuicio de que el expedientado no acepte dichos resultados y proceda a solicitar el análisis contradictorio. La renuncia expresa o tácita a efectuar el análisis contradictorio o la no aportación de la muestra obrante en poder del interesado supondrá aceptación de los resultados a los que se hubiese llegado en la práctica del primer análisis.

El mencionado análisis contradictorio que correrá por cuenta del interesado se realizará de acuerdo con una de las dos posibilidades siguientes:

- 1.º En el laboratorio donde se practicó el análisis inicial, siguiendo las mismas técnicas empleadas por el mismo y en presencia del técnico que certificó dicho análisis o personas designadas por el mismo, mediante la designación por el interesado de perito de parte. A tal fin se comunicará al interesado fecha y hora.
- 2.º En un laboratorio autorizado, oficial o privado, con excepción del Laboratorio Nacional de Referencia para la sustancia detectada, por un técnico que designe el propio laboratorio utilizando las mismas técnicas que las empleadas en el análisis inicial.

En el caso de que existiera contradicción entre los resultados de los análisis inicial y contradictorio, éstos serán confirmados mediante un tercer análisis, que será dirimente y definitivo, utilizando el tercer ejemplar de la muestra en cuestión. Esta confirmación será realizada por el Laboratorio Nacional de Referencia correspondiente según la sustancia o residuo de que se trate. En el caso de que el resultado del análisis inicial sea confirmado mediante el análisis dirimente, este último deberá ser costado por el interesado.

Cuando el resultado del análisis sea negativo, se procederá a su comunicación al interesado y a la destrucción de todos los ejemplares de la muestra correspondiente, salvo que sean utilizados con fines científicos, didácticos o de investigación.

En aquellos casos en que el análisis sea aconsejable realizarlo sobre elementos o sustratos de muestra de tamaño reducido que no permita obtener la cantidad suficiente para constituir tres ejemplares de análisis o cuando existan situaciones de peligro para la salud pública, la muestra podrá estar constituida por un número inferior de ejemplares de análisis, los cuales serán examinados en un solo acto analítico y se convocará a un mismo acto y en el mismo laboratorio a dos técnicos, uno de ellos nombrados por la Administración y el otro en representación del interesado, para que se practique el análisis en un solo acto. Q

### **3.10. PROCEDIMIENTO DE ACTUACIÓN DE LA ADMINISTRACIÓN ANTE LA APARICIÓN DE RESULTADOS POSITIVOS.**

En caso de sospecha de fraude o de resultado positivo tras uno de los controles previstos en el apartado 1 anterior, se aplicará lo dispuesto en los artículos 14 al 17, así como las medidas previstas en el capítulo V (RD1749/98), sin perjuicio de la aplicación de las sanciones penales que correspondan. Ello supone la identificación de los animales, y realizar una investigación adicional para determinar la causa de aparición de residuos.

- En el caso de tratamiento ilegal, se realizará una investigación adicional sobre la fuente o fuentes de las sustancias o productos de que se trate. Los animales no podrán salir de la explotación en ningún caso mientras no estén disponibles los resultados finales de los controles, salvo por motivos urgentes y con destino al sacrificio. Si se confirman los resultados positivos los animales deberán ser eliminados de la cadena alimentaria
- Cuando se detecten residuos de sustancias o productos autorizados en cantidades superiores al límite máximo de residuos fijados, la autoridad competente llevará a cabo una investigación en la explotación de origen con el fin de determinar las razones de la superación de dicho límite (LMR). Se establecerá la prohibición de la salida de los animales de la explotación de que se trate o de los productos de la explotación durante un período de tiempo determinado, así como cualquier medida necesaria para el mantenimiento de la salud pública. En caso de infracciones repetidas de un mismo actor se emprenderá durante un período de seis meses (como mínimo) un control reforzado de los animales y/o productos de la explotación o del establecimiento. Todo resultado que ponga de manifiesto una superación de los límites máximos de residuos dará lugar a declarar como no aptos para el consumo humano todas las canales o productos de que se trate. El coste de las investigaciones, controles, destrucción de las canales afectadas, etc. correrá a cargo del propietario o de las personas en cuyo poder estén los animales/canales sin compensación ni indemnización alguna.

### ANEXO

Clasificación de los grupos farmacológicos. Competencia de los Laboratorios Nacionales y Europeos de referencia. Especies objeto de investigación en cada grupo farmacológico.

GRUPO SUSTANCIA	CLASIFICACIÓN FARMACOLÓGICA	LNR	LER	Especie a investigar							
				Bov Cap Porc y Ov	Aves Corral	Acuicultura	Leche	Huevos	Conejo y caza	Miel	
<b>Grupo A.</b>  <b>ANABOLIZANTES Y SUSTANCIAS NO AUTORIZADAS</b>	<b>1. Estilbenos</b>	CNA	WAG	G	A	P			C		
	<b>2. Antitiroideos</b>	LCSA	WAG	G	A				C		
	<b>3. Esteroides</b>	CNA	WAG	G	A				C		
	<b>4. Lactonas del ác. Resorcílico</b>	CNA	WAG	G	A				C		
	<b>5. <math>\beta</math>-agonistas</b>	CNA	BVL	G	A	P			C		
	<b>6. Sustancias prohibidas (Reg. 2377/90)</b>	CNA/ LCSA	-	G	A	P	L	H	C		
<b>Grupo B.</b>  <b>MEDICAMENTOS VETERINARIOS Y CONTAMINANTES</b>	<b>1. Sustancias antibacterianas (incl. sulfamidas y quinolonas)</b>	CNA	ANSES	G	A	P	L	H	C	M	
	<b>2. Otros medicamentos veterinarios:</b>										
	<b>a) Antihelmínticos</b>	LCSA	BVL	G	A	P	L		C		
	<b>b) Anticoccidiales y nitroimidazoles</b>	LCSA	BVL	G	A			H	C		
	<b>c) Carbamatos y piretroides</b>	LCSA		G	A				C	M	
	<b>d) Tranquilizantes</b>	LCSA	WAG	G							
	<b>e) Antiinflamatorios no esteroideos</b>	LCSA	BVL	G	A		L		C		
	<b>f) Otras sustancias con actividad</b>	LCSA	BVL								
	<b>3. Contaminantes Ambientales:</b>										
	<b>a) Compuestos Organoclorados y PCB's</b>	LAA	ISS	G	A	P	L	H	C	M	
	<b>b) Compuestos Organofosforados</b>	LAA	ISS	G			L			M	
	<b>c) Elementos químicos</b>	LAA	ISS	G	A	P	L		C	M	
	<b>d) Micotoxinas</b>	LAA	WAG	G	A	P	L				
	<b>e) Colorantes</b>	LAA	ANSES	G		P					
	<b>f) Otros:</b>	LAA									

## **BIBLIOGRAFÍA**

Plan nacional de investigación de residuos 2020.

[https://www.mapa.gob.es/es/ganaderia/temas/sanidad-animal-higiene-ganadera/plannacionaldeinvestigacionderesiduos2020\\_tcm30-111662.pdf](https://www.mapa.gob.es/es/ganaderia/temas/sanidad-animal-higiene-ganadera/plannacionaldeinvestigacionderesiduos2020_tcm30-111662.pdf)

Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición

[https://www.aesan.gob.es/AECOSAN/web/home/aecosan\\_inicio.htm](https://www.aesan.gob.es/AECOSAN/web/home/aecosan_inicio.htm)

Plan nacional de investigación de residuos (PNIR). Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación.

<https://www.mapa.gob.es/es/ganaderia/temas/sanidad-animal-higiene-ganadera/Higiene-de-la-produccion-primaria-ganadera/plan-nacional-de-investigacion-de-residuos-pnir/>

MATERIAL NO OFICIAL

**MATERIAL PARA LA PREPARACIÓN DEL TEMA 80**

**INVESTIGACIÓN DE RESIDUOS EN ANIMALES VIVOS Y SUS PRODUCTOS. MÉTODOS ANALÍTICOS. TIPOS. CRITERIOS MÍNIMOS DE FUNCIONAMIENTO. CONTROL DE CALIDAD DE LOS ENSAYOS. MARCO LEGAL.**

*Este material no tiene carácter oficial, por lo que en ningún caso vinculará al Tribunal Calificador. Constituye, únicamente, un instrumento complementario que servirá de apoyo al opositor para enfocar cada uno de los epígrafes, pero nunca de forma exclusiva ni excluyente. El Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación no se hace responsable del contenido del mismo.*

*Los materiales no serán objeto de actualización constante.*

## **ÍNDICE**

### **1. INTRODUCCIÓN**

### **2. MARCO LEGISLATIVO**

### **3. METODOS ANALÍTICOS**

3.1. NIVELES DE CONCENTRACIÓN EN ANÁLISIS DE RESIDUOS

3.2. EFECTO DE LA MATRIZ

3.3. CARACTERÍSTICAS DE LOS MÉTODOS DE ANÁLISIS DE RESIDUOS

3.4. MÉTODOS OFICIALES DE ANÁLISIS DE RESIDUOS

3.5. TIPOS DE MÉTODOS DE ANÁLISIS DE RESIDUOS

### **4. CRITERIOS MÍNIMOS DE FUNCIONAMIENTO**

4.1. CARACTERÍSTICAS DE FUNCIONAMIENTO DE LOS MÉTODOS DE ANÁLISIS. VALIDACIÓN.

4.2. CRITERIOS DE FUNCIONAMIENTO DE LOS MÉTODOS DE ANÁLISIS.

4.3. REQUISITOS ESPECÍFICOS DE FUNCIONAMIENTO PARA LA ESPECTROMETRÍA DE MASAS.

### **5. CONTROL DE CALIDAD DE LOS ENSAYOS**

## 1. INTRODUCCIÓN

Los medicamentos veterinarios se utilizan ampliamente en la producción de animales de abasto con finalidades terapéuticas, preventivas y zootécnicas. Sin embargo, un uso no racional puede dar lugar a la presencia de residuos en los tejidos animales o en sus productos, por encima de niveles seguros y provocar efectos adversos para los consumidores. Las sustancias farmacológicamente activas administradas a los animales o sus metabolitos pueden aparecer en los alimentos de origen animal llegando a ser nocivos para la salud humana, si no se respeta el llamado “período o tiempo de espera o supresión”.

La normativa europea regula qué medicamentos y cómo se pueden aplicar para tratar las enfermedades que afectan a los animales productores de alimentos. El uso responsable de los medicamentos garantiza el bienestar de los animales productores de alimentos y evita en cierta medida su inclusión en la cadena alimentaria. La presencia de sustancias medicamentosas en alimentos de origen animal supone un potencial riesgo para la salud del consumidor y debe ser investigada para evitar su introducción en la cadena alimentaria a niveles superiores a los legalmente establecidos. Se trata de garantizar que no queden residuos que afecten a la salud del consumidor.

Para proteger la salud hay todo un sistema basado en el principio de prevención que respecto de los medicamentos veterinarios establece: la autorización previa del uso de los medicamentos veterinarios, un control en su comercialización (requieren receta veterinaria) así como en su empleo y la necesidad de respetar unos periodos antes de destinar los productos de los animales tratados al consumo humano.

Aun así, como la ausencia absoluta de residuos es inevitable hay un programa nacional de vigilancia que aplican todas las CC.AA. (Comunidades Autónomas) para comprobar que no se superan los límites de residuos de medicamentos establecidos. A través de este programa se controla en las explotaciones ganaderas los animales vivos, el agua y los piensos y en establecimientos de producción de alimentos matrices como carne, leche, huevos, miel etc.

El Plan Nacional de Investigación de Residuos (PNIR) está regulado por el Real Decreto 1749/98, trasposición al Derecho español de la Directiva 96/23/CE. En él se establecen las medidas de control aplicables a determinadas sustancias y sus residuos en los animales y sus productos. Esta directiva establece las medidas de control relativas a las sustancias y a los grupos de residuos enumerados en su anexo I. Estas sustancias se dividen en dos grupos: a) las sustancias con efecto anabolizante (proceso de creación de tejidos) y sustancias no autorizadas, y b) los medicamentos veterinarios y contaminantes. Al igual que en la citada directiva, en el RD 1749/98 se hayan descritos los grupos de sustancias que serán objeto de investigación dentro de este plan. Estos grupos son:

### A. SUSTANCIAS PROHIBIDAS Y NO AUTORIZADAS. Comprende lo subgrupos:

1. Estilbenos
2. Antitirodianos
3. Esteroides

4. Lactonas del ác. Resorcílico

5. β-agonistas

6. Resto de sustancias prohibidas (las recogidas en el Reglamento 2377/90)

B. MEDICAMENTOS VETERINARIOS Y CONTAMINANTES. Este grupo se subdivide para su clasificación en:

1. Sustancias antibacterianas (incl. sulfamidas y quinolonas)

2. Otros medicamentos veterinarios: como

- a. Antihelmínticos
- b. Anticoccidianos y nitroimidazoles
- c. Carbamatos y piretroides
- d. Tranquilizantes
- e. Antiinflamatorios no esteroideos
- f. Otras sustancias con actividad

3. Contaminantes Ambientales:

- a. Compuestos Organoclorados y PCB's
- b. Compuestos Organofosforados
- c. Elementos químicos
- d. Micotoxinas
- e. Colorantes
- f. Otros

En el grupo A se recogen las sustancias que se hallan prohibidas y que bajo ningún concepto deberían utilizarse en producción ganadera. Seguidamente se indica brevemente las propiedades que poseen y sus efectos para el ser humano.

**Los estilbenos** son una familia de compuestos derivados del estilbeno (Etilbestrol, dietilbestrol, etc.) que pueden actuar como disruptores endocrinos.

**Los tireostáticos** (como tiuracilo, metiltiuracilo o propiltiuracilo, etc.) son sustancias que rebajan el metabolismo basal por alteración de la síntesis, secreción o acción periférica de la hormona del tiroides. Su uso recomendado es en los casos de hiperfunción tiroidea, pero sin embargo, también se emplean de forma clandestina para aumentar la ganancia de peso por aumento en la acumulación de grasa. Pueden originar efectos tóxicos a largo plazo.

**Los esteroides** son iguales o similares a ciertas hormonas del cuerpo. Entre los anabolizantes tenemos los de origen natural (17-beta estradiol, progesterona y testosterona) y los de síntesis o exógenos (tipo DES o dietiletilbestrol -etilbenos-, acetato de trembolona y zeranol). La

acción cancerígena de acuerdo a los antecedentes históricos del DES y estilbenos en general ha determinado su prohibición. Existen más de 100 variantes de esteroides anabólicos. Las sustancias anabolizantes producen un aumento de la síntesis proteica.

Similar efecto al de los esteroides producen las llamadas **lactonas del ácido resorcílico** (como cearalanona, cearaleno, cearalenol. etc). Son estrógenos no esteroideos y pueden provocar alteraciones endometriales en la mujer, trastornos en el sistema reproductor en desarrollo, alteraciones de la fertilidad en mujeres y además tienen actividad inmunodepresora.

**Los  $\beta$ -agonistas** (como salbutamol, clenbuterol o cimaterol, etc.) empleados para el tratamiento de afecciones respiratorias se han utilizado ilegalmente en medicina veterinaria principalmente en bovinos por dos razones: como promotores del crecimiento y para mejorar la composición de la canal al disminuir la grasa en la masa muscular. Disminuyen el catabolismo muscular, que se acompaña de un ligero incremento en la síntesis del tejido, añadiendo también como parte de sus características la lipólisis del tejido graso. Se prohibieron por sus efectos sobre la salud debido a que causan intoxicaciones de diversa naturaleza a los consumidores.

**Los antibióticos** (prohibidos como promotores del crecimiento) son probablemente uno de los grupos más ampliamente utilizados en medicina veterinaria para la profilaxis y tratamiento de enfermedades infecciosas. Su empleo puede ser doble, bien como antibacterianos o bien como promotores del crecimiento habiendo generado uno de los problemas más serios para la salud pública como son las resistencias bacterianas. Los antibióticos actúan como promotores del crecimiento mejorando la productividad del ganado al alterar la fermentación microbiana en el rumen provocando que se genere más energía metabolizable por kilogramo de alimento consumido.

En este Tema se describe la estructura del sistema de control de residuos desde el punto de vista laboratorial. Se revisa la legislación aplicable, así como las normas que específicamente atañen a los métodos de análisis; su selección, validación y las características que necesitan ser establecidas para considerar un método como apto. Así mismo se resumen las características más importantes que deben tener las técnicas de análisis empleadas, en especial la espectrometría de masas. Finalmente se muestran las herramientas disponibles en el laboratorio para garantizar que los lotes de análisis en el día a día no presentan desviaciones o errores que permitan dudar de la calidad de los resultados.

## 2. MARCO LEGISLATIVO.

- **DIRECTIVA 96/23/CE** relativa a las medidas de control aplicables respecto de determinadas sustancias y sus residuos en los animales vivos y sus productos.
- **DECISIÓN DE LA COMISIÓN 2002/657/CE**, de 12 de agosto de 2002, por la que se aplica la Directiva 96/23/CE del Consejo en cuanto al funcionamiento de los métodos analíticos y la interpretación de los resultados
- **REGLAMENTO (CE) 470/2009 DEL PARLAMENTO EUROPEO Y DEL CONSEJO** de 6 de mayo de 2009 por el que se establecen procedimientos comunitarios para la fijación de los límites de residuos de las sustancias farmacológicamente activas en los alimentos de origen animal, se deroga el Reglamento (CEE) no 2377/90 del Consejo y se modifican la

Directiva 2001/82/CE del Parlamento Europeo y del Consejo y el Reglamento (CE) no 726/2004 del Parlamento Europeo y del Consejo.

- **REGLAMENTO (UE) 37/2010 DE LA COMISIÓN** de 22 de diciembre de 2009 relativo a las sustancias farmacológicamente activas y su clasificación por lo que se refiere a los límites máximos de residuos en los productos alimenticios de origen animal.
- **REGLAMENTO (UE) 2017/625 DEL PARLAMENTO EUROPEO Y DEL CONSEJO** de 15 de marzo de 2017 relativo a los controles y otras actividades oficiales realizados para garantizar la aplicación de la legislación sobre alimentos y piensos, y de las normas sobre salud y bienestar de los animales, sanidad vegetal y productos fitosanitarios.
- **REGLAMENTO DE EJECUCIÓN (UE) 2021/808 DE LA COMISIÓN** de 22 de marzo de 2021 relativo al funcionamiento de los métodos analíticos para los residuos de sustancias farmacológicamente activas utilizadas en animales productores de alimentos y a la interpretación de resultados, así como a los métodos que deben utilizarse para el muestreo, y por el que se derogan las Decisiones 2002/657/CE y 98/179/CE.

### **3. METODOS ANALÍTICOS**

**Una técnica analítica** es el medio utilizado para llevar a cabo el análisis químico (asociable en ocasiones a un instrumento), mientras que el método analítico es un concepto más amplio pues no sólo incluye a la o las técnicas analíticas empleadas en un análisis sino también todas las operaciones previas, intermedias y finales implicadas hasta la obtención de un resultado. En los métodos analíticos empleados en la determinación de residuos concurren una serie de circunstancias que los hace diferentes de cualquier método de análisis estándar:

- a. La magnitud del mensurando (analito) en relación con la matriz
- b. La presencia de muchos otros constituyentes de la matriz que compiten con el analito de interés.

#### **3.1. NIVELES DE CONCENTRACIÓN EN ANÁLISIS DE RESIDUOS**

Muchas veces los tratamientos farmacológicos veterinarios suponen la administración de unos pocos miligramos o gramos del principio activo contenido en el medicamento, que tras su absorción inmediatamente entran a formar parte del animal distribuyéndose mediante la sangre hasta la última célula.

Por otra parte, no todo el producto administrado permanece en el individuo, sino que genéricamente se reparte de la siguiente forma;

- a) la mayor parte de él puede llegar a ser excretado sin ejercer su actividad,
- b) otra parte se metaboliza ejerciendo su actividad terapéutica llegando a transformarse en otras especies con las que guarda relación (llamados metabolitos); y finalmente,
- c) una parte de él queda residiendo en el individuo y acumulándose en determinados órganos (llamados "órganos diana") si el tratamiento es continuado.

En definitiva, de los pocos mg administrados tan solo algunos  $\mu\text{g}$  podrían permanecer como “residuo o metabolito” en el individuo lo que nos lleva a pensar que su concentración se encuentra en el orden de los  $\mu\text{g}$  por algunas decenas de kg de peso del individuo, por ejemplo: 10-100  $\mu\text{g}/10\text{-}100\text{kg}$  o lo que es lo mismo del orden de  $1\mu\text{g}/10000000 \mu\text{g}$  o 0.00001 %.

Los métodos analíticos aplicables a la determinación de residuos se incluyen dentro de los que se denominan métodos para la determinación trazas y ultratrazas. Generalmente, los métodos de análisis empleados en la determinación de constituyentes mayoritarios (1-100 %) suelen ser simples, sin excesiva complejidad en lo concerniente al tratamiento de las muestras así como en el posterior proceso de medida basado en alguna propiedad física de la materia como absorción de radiación, intensidad de corriente, etc. En cambio, los métodos para la determinación de residuos son métodos en los que los analitos de interés se encuentran en proporciones minúsculas en la muestra por ello se requieren técnicas analíticas avanzadas capaces de identificar el analito a este orden de magnitud y métodos de procesado capaces de extraer los analitos de interés de la matriz disponiéndolos a una concentración susceptible de ser medida por los equipos de medida empleados.

### **3.2. EFECTO DE LA MATRIZ**

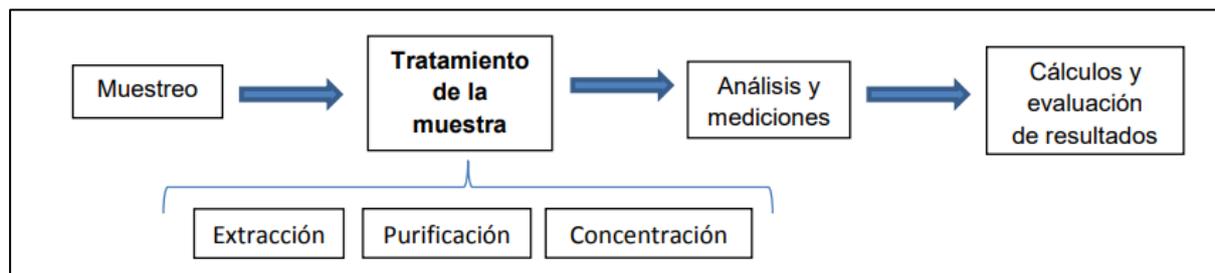
Si problemática es la determinación de los analitos (principios activos o sus metabolitos) a las concentraciones a las que se encuentran presentes en una matriz animal, no menos problemático es su distinción o separación de dicha matriz.

Las muestras con las que nos manejamos en el análisis de residuos suelen ser de una gran complejidad en lo que a su naturaleza se refiere. Basta para ello comparar matrices más simples como un agua natural o un fármaco con un hígado, riñón, músculo, etc. que son las matrices habituales en análisis de residuos. En los primeros se trata de una matriz simple (a priori) sin excesivos constituyentes (en el caso del fármaco el principio activo y algún excipiente o medio disolvente y poco más); mientras que si nos ponemos a pensar el contenido de un músculo tenemos que contiene toda clase sustancias del medio fisiológico contenidas en los líquidos intra y extracelulares amén de la cantidad de componentes y constituyentes de las células y dentro de éstas, todos sus orgánulos.

En definitiva, los principios activos o sus metabolitos objeto de análisis en el caso de los residuos se encuentran en presencia de una infinidad de sustancias que pueden interferir en el posterior proceso de medida.

### **3.3. CARACTERÍSTICAS DE LOS MÉTODOS DE ANÁLISIS DE RESIDUOS**

Los problemas antes citados de la insignificante proporción en que se encuentran los analitos en una muestra de origen animal junto con la inmensa cantidad de otras sustancias que los acompañan pertenecientes a la matriz hace que la gran mayoría de los métodos descritos presenten una sistemática común como se esquematiza en la figura:



Este tipo de muestras requieren un tratamiento físico-químico exhaustivo que permita por un lado separar los analitos de interés del grueso de la matriz, purificarlos eliminando más sustancias interferentes que pudieran acompañarlos y finalmente, concentrarlos para poder ser “visualizados” por las técnicas analíticas empleadas que ya de por sí deben ser extremadamente sensibles y selectivas. Así pues, la etapa de tratamiento de la muestra es crucial en el posterior devenir del análisis y conlleva genéricamente las tres etapas antes citadas como extracción, purificación y concentración.

1. La primera etapa implica una extracción sólido-líquido (SLE). Si la muestra es un sólido como un pienso o tejido animal, o líquido-líquido (LLE) si es un fluido (leche, plasma u orina) con un solvente o mezcla de solventes elegidos de acuerdo con la naturaleza tanto de los analitos a extraer como de la matriz implicada.

Mediante la extracción los analitos son puestos en contacto con un disolvente que los separa en una primera etapa del resto de componentes de la matriz. Pero en este disolvente no solo se extraen los analitos de interés (que sería el caso ideal) sino que a éstos le acompañan multitud de otras sustancias presentes en la matriz que poseen propiedades químicas similares a los analitos de interés.

Para llevar a cabo esta etapa se escogen habitualmente disolventes orgánicos en los que los analitos son fácilmente solubles, aunque por desgracia, también muchas otras sustancias afines presentes.

Dependiendo de su naturaleza química, los principios activos farmacológicos son altamente solubles en diferentes solventes orgánicos como n-hexano, diclorometano, acetato de etilo, acetona, acetonitrilo, metanol, etc.; incluso mezclas de ellos que previamente deben ser optimizadas. Las características fisicoquímicas de los analitos (y las del resto de la matriz) como polaridad, solubilidad, etc. harán prevalecer el uso de uno y otro.

Un posterior filtrado o centrifugado del extracto de la muestra inicial permite separar las fases: sólida (insolubilizada en el disolvente) y líquida que contendrá los analitos; si la matriz era sólida o habrá una única fase líquida si la matriz era líquida (orina, plasma, etc.) En cualquier caso, el centrifugado permite eliminar algún insoluble.

2. Una vez separados del grueso de la matriz los analitos deben ser purificados para tratar de eliminar alguno de los interferentes que los ha acompañado durante la extracción.

La purificación se puede realizar de muy diversas maneras. Es posible utilizar la extracción líquido-líquido (LLE) con distintos tipos de solventes para la purificación de extractos. Para ello el extracto líquido previamente obtenido filtrado o centrifugado se mezcla con un disolvente inmiscible con él y en el que los analitos son más (o totalmente) solubles que en el primero.

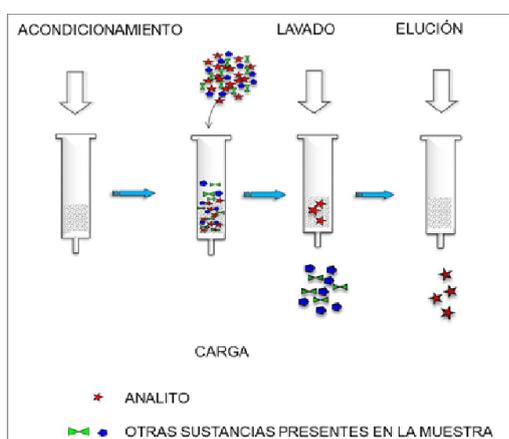
Tras una intensa agitación los analitos tienden a pasarse (solubilizarse) al segundo disolvente. Si se deja reposar un tiempo los líquidos inmiscibles tienden a separarse habiéndose producido el trasvase de los analitos del primero al segundo y la consiguiente purificación (o eliminación de interferentes que permanecen en el primer disolvente).

Más utilizada que la LLE es la extracción en fase sólida (*Solid Phase Extraction, SPE*), que además de eliminar componentes co-extraídos de la matriz permite la concentración de los extractos para así poder alcanzar los límites de detección que en algunas regulaciones suelen ser muy bajos. Este sistema también permite el cambio de solvente por uno adecuado al instrumento de medida. Se emplean cartuchos (figura) con rellenos específicos.

La extracción en fase sólida es una técnica que permite simultáneamente la concentración del analito y eliminación de impurezas. Se basa en la partición selectiva del analito en una fase sólida (sorbente) y una fase líquida (muestra). Para que el analito sea retenido por el sorbente (relleno), debe tener mayor afinidad que por el disolvente que lo contiene. Posteriormente, se eluye del relleno en el que se encontraba absorbido utilizando un disolvente muy afín al analito. En la figura siguiente se esquematiza el fundamento de la extracción en fase sólida. Todas las fases descritas se realizan sobre el mismo cartucho:

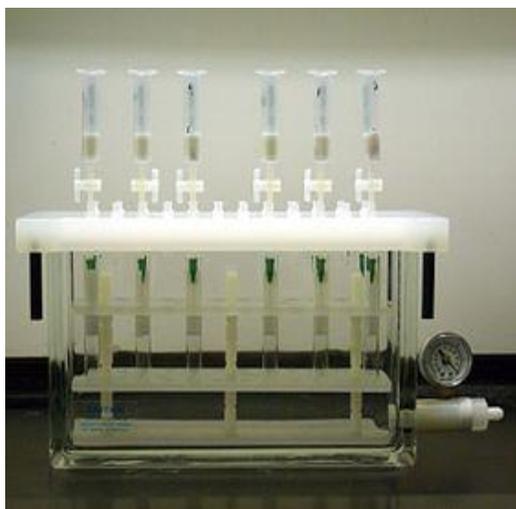
a) En una primera fase se acondiciona la unidad de extracción en fase sólida (cartucho SPE) haciendo pasar disolvente de equilibrado o lavado,

b) En una segunda fase se deposita (adiciona) la muestra líquida procedente del extracto inicial que contiene los analitos (rojos) junto con muchas sustancias interferentes. De esta forma el disolvente pasa (atraviesa) por el cartucho junto con muchos otros constituyentes que no son retenidos en el relleno; permaneciendo así fijados o retenidos selectivamente los analitos. En este paso los analitos de nuevo se separan de otras sustancias que son arrastradas por el disolvente, permaneciendo ellos fijados en el cartucho.



c) En una tercera fase (opcional) se lava el cartucho con otro disolvente o mezcla de ellos que de nuevo selectivamente arrastra algunos interferentes presentes sin afectar a los analitos que permanecen fijados aún.

d) Finalmente en la elución, se hace pasar un nuevo disolvente (o mezcla) muy afín a los analitos que los arrastra hasta un tubo colector situado bajo el montaje (foto). Una vez más algunos constituyentes interferentes que habían quedado fijados en el relleno



podrían separarse junto con los analitos cuando éstos abandonan el relleno, pero algún otro habrá quedado fijado irreversiblemente al relleno separándose por tanto de los analitos de interés. A modo de resumen: al final lo que se ha producido son diferentes procesos cromatográficos en los que teniendo en cuenta la naturaleza de los analitos de interés implicados, el tipo de relleno empleado y los disolventes (o sus mezclas) usados se dispone de los analitos en ausencia de una gran parte de la matriz que los acompañaba en el extracto inicial. En la foto se muestra un sistema para el

procesado de múltiples muestras simultáneamente.

En procedimientos como este es crucial la selección de los disolventes así como el relleno de los cartuchos a emplear. Se han desarrollado multitud de rellenos con diferentes propiedades químicas (afinidad, polaridad, etc.) que se comercializan denominándolos atendiendo a su naturaleza (C-18, C-8, Florisil, Sílice, etc.).

3. Finalmente indistintamente del procedimiento de purificación empleado LLE o SPE jugando con la relación de volúmenes en la que se encuentran los analitos inicialmente y finalmente se puede conseguir un aumento de la concentración por un factor que puede llegar a ser de varios cientos. Esto es, si por ej. el extracto inicial que contenía los analitos era de 10 ml y tras la purificación se dispone de ellos en un volumen de 100  $\mu$ l el factor de concentración será de  $10000\mu\text{l}/100\mu\text{l} = 100$ .

Similar a la SPE es una metodología que se ha desarrollado en los últimos años que se conoce como QuEChERS<sup>1</sup>, (acrónimo de *Quick-rápido, Easy-fácil, Cheap-económico, Effective-efectivo, Rugged-robusto y Safe-seguro*) o también Extracción en Fase Sólida Dispersiva (SPE-d). Ofrece las ventajas de altas recuperación; además el proceso es robusto y fiable. El método "QuEChERS" combina una primera fase de extracción simple con acetonitrilo y diferentes sales (NaCl, acetato sódico anhidro, etc.) y una segunda etapa de dispersión en fase sólida (dSPE). Esta última fase permite la eliminación del agua presente en la muestra y una limpieza o "clean-up", que se consigue adicionando una

<sup>1</sup> Anastassiades y col. J AOAC Int . Mar-Apr 2003;86(2):412-31. Fast and easy multiresidue method employing acetonitrile extraction/partitioning and "dispersive solid-phase extraction" for the determination of pesticide residues in produce

mezcla de sulfato de magnesio y un sorbente, que puede ser una amina primaria y secundaria (PSA), y un adsorbente tipo C18, C-8, carbón negro grafitado (GCB), etc. Se emplea en dos pasos:

**PASO 1:** Preparación y Extracción de la Muestra. Se homogeneiza la muestra con un disolvente orgánico (por ej. acetonitrilo). Se añaden sales y ácidos (tampones) para mejorar la eficacia de la extracción y proteger compuestos sensibles. Esta adición además aumenta la fuerza iónica de la fase acuosa de la matriz (hígado, músculo, plasma, huevo etc.), por lo que los analitos tenderán a estar más en el disolvente orgánico adicionado.

**PASO 2:** Limpieza de la Muestra. Una alícuota del extracto centrifugado o filtrado se limpia mediante Extracción en Fase Sólida Dispersiva (d-SPE), elemento clave en la técnica QuEChERS. Se preparan unos tubos de Polipropileno de centrífuga con cantidades precisas de  $MgSO_4$  (para eliminar el exceso de agua y contaminantes no deseados de las muestras extraídas) y sorbentes de Extracción en Fase Sólida (C-18, C-8, etc.) en polvo a diferencia de la SPE en la que estaban contenidos en un cartucho. Tras agitación y centrifugación, si se hace una adecuada elección de disolvente y adsorbente; el extracto (fase acuosa) estará limpio y listo para ser analizado por GC/MS o LC/MS, mientras que en el adsorbente permanecerán las sustancias interferentes.

Conceptualmente el proceso de QUECHERS es similar a una SPE inversa (aquella en la que el relleno SPE se utiliza para retener y fijar exclusivamente los constituyentes de la matriz (interferentes y no los analitos). En los QUECHERS la adición de sales (aumento de la fuerza iónica del medio) por un lado favorece el que los analitos se concentren en la fase acetonitrilo, y por otro la adición del relleno C-18, C-8, etc. disperso (en polvo y no rellenando un cartucho) produce la fijación de los componentes más hidrofóbicos de la muestra, con lo cual los analitos de interés se concentran y hallan purificados en la fase acetonitrilo.

Los procedimientos anteriormente descritos son genéricos y los más ampliamente utilizados, pero no son los únicos, sino que se han descrito algunos más como el empleo de extracciones con fluidos supercríticos, etc. que por razones de brevedad no se describirán.

### 3.4. MÉTODOS OFICIALES DE ANÁLISIS DE RESIDUOS

El sistema de control de residuos de medicamentos veterinarios en España (similar al resto de estados de la UE) se encuentra adecuadamente organizado. Para ello se dispone de una estructura robusta fundamentada en los siguientes pilares:

- Un órgano de coordinación. Siendo la Comisión Nacional del PNIR quien dispone toda la logística del plan de control en estrecha colaboración con los responsables designados por las Comunidades Autónomas. Además, se dispone de los inspectores encargados del muestreo, las indicaciones acerca del número de muestras a analizar, los plazos, la recogida de resultados, su sistematización y posterior remisión a la Comisión Europea para su aprobación, etc.

- Un soporte legal como es todo el compendio de normativa existente sobre el control de residuos (Directiva 96/23, Reg. 2377/90, R.D. 1749/98, Reg. 808/21, etc.) donde se establece: los grupos de sustancias objeto de control, las sustancias, el número de muestras de cada una de las especies a investigar dependiendo del volumen de animales sacrificados en años precedentes, etc.
- Una tupida red de laboratorios a nivel europeo formada por los laboratorios de control oficial (o laboratorios de rutina) que en primera instancia, son sobre quienes recae la primera responsabilidad de la investigación de los residuos; un conjunto de laboratorios nacionales de referencia encargados de coordinar a dichos laboratorios y garantizar que las disposiciones normativas son trasladadas y cumplidas en lo referente a límites, sustancias, características de los métodos, desarrollo de métodos, técnicas, etc.; y por último los laboratorios europeos de referencia como último eslabón de la cadena de comunicación con la Comisión Europea.

Pero en esta robusta estructura descrita se echa en falta algo tan crucial como son los métodos oficiales de análisis para el control de residuos. Son muy pocos los descritos y publicados a día de hoy; alguno incluso ha caído en desuso. Por lo que se podría decir que no hay métodos oficiales de análisis como tales. Por lo general los métodos utilizados por los laboratorios de control de residuos suelen ser métodos desarrollados o distribuidos por los laboratorios de referencia, o desarrollados por los propios laboratorios de control o, incluso métodos publicados en revistas de investigación de prestigio.

La ausencia de métodos oficiales a nivel europeo para el control de residuos posee una serie de inconvenientes como:

- Falta de homogeneidad en el seno de la UE en lo referente al control oficial por cuanto cada estado miembro puede utilizar sus propios métodos; incluso dentro de un estado diferentes laboratorios pueden utilizar diferentes métodos para el control de un mismo tipo de sustancias. Esto podría generar polémica entre estados en los intercambios intracomunitarios.
- Falta de robustez por cuanto los métodos de análisis no son los mismos en todos los estados surgiendo por tanto las consiguientes controversias a la hora de comparación de resultados entre dos países generándose inseguridad y dificultad para el reconocimiento mutuo.

Cuando se desató la sensibilidad por el control de los residuos de productos farmacológicos se desarrollaron algunos métodos “oficiales” publicados como tales. No obstante, como es sabido el establecimiento de un método como “oficial” requiere exhaustivos estudios multilaboratoriales encaminados a su desarrollo y posterior validación para la obtención de sus características de funcionamiento (o figuras de mérito) con las que evaluar su ajuste al propósito deseado (fit to purpose).

Cuando se daba la situación de que un método no podía ser “aceptado” por no ajustarse al objetivo perseguido (no poseer suficiente sensibilidad, veracidad, o reproducibilidad, etc.) se requería una nueva etapa de optimización y posterior revalidación involucrando de nuevo a

los laboratorios participantes. Esto hacía caer a los laboratorios implicados en ciclos que se alargaban excesivamente de tal forma que desarrollar/establecer un método como oficial se hacía muy longevo no siendo práctico como seguidamente se verá.

Adicionalmente, la experiencia adquirida en materia de crisis alimentarias como las recientemente vividas con:

- a) Dioxinas (1976 Italia en fábrica liberación de dioxinas, 1999 Bélgica en aves de corral y huevos, 2008 Irlanda en carne de cerdo y productos porcinos)
- b) Aceite de colza desnaturalizado España 1981
- c) Clembuterol 1990 Asturias hígado ternera
- d) Vacas locas 1996 Inglaterra
- e) Gripe aviar 1997 Hong Kong
- f) Benzopirenos 2001 en aceite de oliva
- g) Melanina 2008 China en leche

Etc., donde en muy breve intervalo de tiempo se requería disponer de resultados que permitieran conocer el problema, socorrer y proteger al ciudadano ayudó a cambiar la idea del establecimiento de métodos oficiales como tales. El sistema de establecimiento de métodos oficiales entendido por entonces no estaba preparado para dar una respuesta inmediata y rápida a las situaciones de alerta desencadenadas.

En esta situación, la ausencia de métodos oficiales ofrece también una serie de ventajas como son:

- Un alto grado de flexibilidad que permitía a los laboratorios seleccionar libremente los métodos, o desarrollarlos “a medida” para resolver problemas puntuales dependiendo de las necesidades del momento (clembuterol, dioxinas, vacas locas, etc.).
- Por otra parte, se permitía actualizar las técnicas, los equipos de medida y en definitiva los métodos de forma paralela al desarrollo tecnológico y consecuentemente ofrecer mayor seguridad alimentaria al consumidor.
- Además, se propiciaba establecer mecanismos de “intervención rápida” ante problemas surgentes en el día a día.
- Finalmente permitió también incrementar los catálogos de métodos ofertados por los laboratorios con métodos para diferentes combinaciones analito-matriz-técnica analítica de forma fácil y rápida. De esta forma la aparición de un nuevo contaminante, o, un nuevo método más sensible o, el cambio de una matriz por otra donde es más fácil detectar los residuos se pudo hacer con la debida celeridad.

En este contexto de acción rápida nos encontramos que el sistema de control de residuos establecía métodos no oficiales seleccionados libremente por los laboratorios que debían ser

dotados del rigor y robustez necesarios para satisfacer las demandas de calidad y seguridad alimentaria exigidas por el consumidor.

El sistema de control adquirió este rigor y robustez necesarios en lo concerniente a los métodos analíticos fundamentándose en cuatro pilares:

1. Se estableció normativamente la obligatoriedad de que los laboratorios dedicados al análisis de residuos implantaran sistemas de control y garantías de calidad conforme a las normas (Buenas prácticas de laboratorio, ISO-45001, ISO UE-EN17025, etc.) como requisito fundamental. Esto conllevaba un proceso por el que una entidad independiente (Tercera Parte, o Entidad de Acreditación) evaluara un laboratorio de ensayo o calibración con el fin de comprobar que tenía capacidad técnica y humana para la actividad objeto del alcance. La obtención de la acreditación por la norma ISO 17025 es un logro internacionalmente reconocido que aumenta la confianza del usuario en los laboratorios que superaran el proceso. En España la entidad que concede la acreditación es ENAC (Entidad Nacional de Acreditación).

2. La necesidad de validar los métodos de análisis recogidos en el alcance de los laboratorios conforme a unas exigencias mínimas que permitieran demostrar que se ajustaban al propósito para el que habían sido desarrollados. Es decir, demostrar fehacientemente en base a la experimentación previa llevada a cabo en cada laboratorio que los métodos reunían unas características de desempeño que los hacían aptos para el uso al que estaban destinados. Estas exigencias mínimas para los métodos de análisis fueron recogidas en dos normas: la Decisión 2002/657 (CE) y posteriormente el Reglamento 808/2021 CE que establecieron los procedimientos de validación, así como los criterios de funcionamiento comunes aplicables a los métodos.

3. Adicionalmente, estas dos normas dispusieron unas características mínimas de resolución, así como unos criterios de funcionamiento comunes para dichos métodos analíticos. Establecían que las técnicas de detección reunieran una serie de requisitos en cuanto a su capacidad de identificar el analito y lo que es más importante confirmar su presencia en las muestras.

4. Finalmente a todo lo anterior se le sumó el que los laboratorios debieran demostrar su competencia participando de manera regular y satisfactoria en programas de ensayos de aptitud reconocidos u organizados por laboratorios de referencia nacionales o comunitarios u otras organizaciones de prestigio (FAPAS, TRIESTE, etc.)

En conclusión, con estos cuatro pilares que fundamentaron el sistema de control de residuos permitió conferirle la robustez y fiabilidad adecuada sin necesidad de recurrir a los tediosos y extensos procesos de normalización de métodos de análisis.

### **3.5. TIPOS DE MÉTODOS DE ANÁLISIS DE RESIDUOS**

La clasificación de los métodos de análisis se puede hacer en base a diversos criterios.

1. Atendiendo al número de analitos que se determinan se clasifican en:

a. **Métodos para un solo residuo:** Como su nombre indica fueron desarrollados para la determinación de un único analito. Fueron los primeros métodos empleados en el control de residuos. Eran tediosos y laboriosos en los que las técnicas de detección empleadas eran poco selectivas por lo que se requería un exhaustivo tratamiento de muestra. Son métodos caídos ya en desuso como los que detallaban la determinación de cloranfenicol o sulfadimidina o trembolona, etc.

b. **Método multi-residuo:** es aquel con la capacidad de extraer la mayor cantidad de analitos posible de una muestra sometida a ensayo utilizando un único procedimiento analítico. Los métodos de extracción multi-residuos son muy empleados puesto que permiten extraer, con relativa facilidad, gran cantidad de sustancias simultáneamente de un amplio rango de polaridades. El principal inconveniente de estos métodos es la presencia de componentes de la matriz que pueden generar interferencias durante el análisis, dando lugar a resultados incorrectos. Para solucionar en parte este problema y así aumentar la selectividad y la sensibilidad, se han desarrollado diversos métodos extracción, purificación y concentración.

2. Otro criterio para clasificar los métodos de análisis de residuos es basándose en la naturaleza del resultado que ofrecen:

a. **Métodos criba (screening):** Se han utilizado tradicionalmente en el control analítico de residuos veterinarios. No requieren equipamiento sofisticado y algunos son muy conocidos, por ejemplo, los métodos microbiológicos de inhibición del crecimiento bacteriano o los Test ELISA. Los métodos de cribado permiten tratar un elevado número de muestras en busca de posibles resultados no conformes. Si bien, cuando se sospecha que un resultado puede ser “no conforme” se debe confirmar posteriormente mediante un método de confirmación.

b. **Métodos de confirmación:** Son los mayoritariamente empleados en el control de residuos; proporcionan información total o complementaria basada en la estructura molecular de la sustancia a identificar existiendo por tanto una relación unívoca entre la sustancia y la propiedad medida y, también entre la magnitud de la propiedad y la cantidad de sustancia presente permitiendo en este caso cuantificar de manera inequívoca la sustancia de interés. Los métodos de confirmación se basan en métodos cromatográficos con detección por espectrometría de masas (GC-MSMS, LC-MS/MS,) y poseen una elevada especificidad y sensibilidad además de ser rápidos.

#### 4. CRITERIOS MÍNIMOS DE FUNCIONAMIENTO.

La Decisión 2002/657/CE estableció las características y criterios de funcionamiento de los métodos de análisis aplicados en el control de residuos de medicamentos veterinarios en matrices de origen animal. Recientemente esta Decisión ha sido modificada y complementada por el Reglamento 808/2021; no obstante su contenido no ha sido derogado totalmente estableciéndose un periodo de coexistencia de las dos normas hasta 10/junio/2026.

La Decisión normalizó las características exigibles a los métodos aplicables al análisis de residuos así como los criterios a aplicar para la identificación de las sustancias. En ella se establecieron unas definiciones que persisten en el Reg 808/2021 como:

- **Característica de funcionamiento:** característica de fiabilidad de un método analítico que permite evaluar su calidad y permite la comparabilidad entre métodos. Por ej. exactitud, veracidad, precisión, repetibilidad, recuperación, robustez, capacidad de detección, etc.
- **Criterio de funcionamiento:** Exigencia que se asigna a una característica de funcionamiento en función de la cual se puede determinar si un método es adecuado para el fin perseguido. Por ej. criterio de veracidad: 80-120 %, criterio de precisión: C.V. < 32 %
- **Límite máximo de residuos (LMR) de una sustancia:** el contenido máximo de residuos resultante de la utilización de un medicamento veterinario (expresado en mg/Kg o en µg/Kg sobre la base del peso en fresco) autorizado en la Comunidad o reconocido como admisible en un producto alimenticio. Los cálculos de estos valores (LMR) se basan en el tipo y en la cantidad de residuos que no constituyen ningún riesgo toxicológico significativo para la salud humana. Se tiene en cuenta el IDA (ingesta diaria admisible) o un IDA temporal, un factor de seguridad adicional y otros riesgos relativos a la salud pública así como aspectos relacionados con la tecnología alimentaria. Los LMR descritos se recogen en el Reg. 37/2010.
- **Error alfa ( $\alpha$ ):** probabilidad de que la muestra analizada sea conforme, aunque se haya obtenido un resultado de medición no conforme.
- **Método de confirmación:** método que proporciona información completa o complementaria que permite identificar y, de ser necesario, cuantificar de manera inequívoca la sustancia al nivel de interés.
- **Límite de decisión para confirmación ( $CC\alpha$ ):** límite en el cual y a partir del cual se puede concluir con una probabilidad de error de  $\alpha$  que una muestra no es conforme, y el valor  $1 - \alpha$  significa certeza estadística en porcentaje de que se ha superado el límite permitido;
- **Capacidad de detección ( $CC\beta$ ):** contenido mínimo de analito que puede ser detectado o cuantificado en una muestra con una probabilidad de error de  $\beta$ . En el caso de sustancias farmacológicamente activas prohibidas o no autorizadas, el  $CC\beta$  es la concentración más baja a la que un método es capaz de detectar o cuantificar, con una certeza estadística de  $1 - \beta$ , muestras que contengan residuos de sustancias prohibidas o no autorizadas; en el caso de sustancias autorizadas, la  $CC\beta$  es la concentración en la que el método es capaz de detectar concentraciones por debajo del límite permitido con una certeza estadística de  $1 - \beta$ .
- **Efecto matriz:** diferencia de respuesta analítica entre un patrón de una concentración determinada disuelto en el disolvente y un patrón de la misma concentración en presencia de matriz.
- **Nivel de interés:** concentración de una un analito en una muestra que es significativa para determinar su conformidad de acuerdo con la legislación. Por ejemplo en el límite máximo

de residuos o en el contenido máximo de sustancias autorizadas o a la concentración más baja que se puede alcanzar analíticamente de las sustancias prohibidas o no autorizadas. En definitiva el nivel al que el método debe ofrecer una respuesta inequívoca acerca de la conformidad de la muestra. Es un nivel de concentración al que un método debe funcionar adecuadamente. Para una sustancia con LMR estará en la zona próxima el LMR. En cambio para sustancias prohibidas estará en la zona de concentraciones más bajas que el método permite determinar.

- **Nivel de referencia a efectos de intervención:** Nivel designado legalmente como de interés para discernir si una muestra es conforme o no conforme. Por ejemplo para algunas sustancias que están prohibidas se fija un nivel mínimo (MMPR) en el que los métodos deben ofrecer una respuesta que no deje lugar a la duda.
- **MMPR<sup>2</sup> (mínimum method performance requirement):** Para algunas sustancias se establece este “nivel mínimo de resolución que deben tener los métodos”. Se trata de un nivel que como mínimo debe alcanzar la técnica en cuestión. Se ha definido para algunos analitos por ej. Nitroimidazoles MMPR = 1 µg/kg. (por lo tanto el nivel de detección de estos analitos debe ser inferior a 1 µg/kg). Este concepto aparece en la Guía de los EURL Sept. 2020 sobre interpretación de la decisión (en el reglamento no se hace alusión a este límite). Ej.

Substances	Matrix	MMPR*
Diethylstilbestrol (DES) Dienestrol (DE) Hexestrol (HEX) Benzestrol (BENZ)	Urine	0.5 ppb for DES 1 ppb for DE, HEX, BENZ
	Liver	1ppb (for all substances)
	Meat (including fish)	1 ppb (for all substances)

\*CCβ for screening methods or CCα for confirmatory methods should be lower than the value expressed in this column.

#### 4.1. CARACTERÍSTICAS DE FUNCIONAMIENTO DE LOS MÉTODOS DE ANÁLISIS. VALIDACIÓN.

Se detallan en capítulo 2 del Reglamento 808/2021.

Solo serán aplicables métodos de análisis que permitan identificar la sustancia objeto de interés de manera inequívoca. Estos métodos son los que permiten obtener información acerca de la estructura molecular de la sustancia como los métodos de detección por espectrometría de masas en sus diferentes variantes como de alta resolución (HRMS), triple cuadrupolo (QQQ), tiempo de vuelo (TOF), orbitrap, etc. Los métodos de detección espectroscópicos (fluorescencia o UV-Vis de diodos) solo serán de aplicación para la detección de sustancias autorizadas.

Por lo que respecta a los métodos de análisis se indica que deberán:

<sup>2</sup> Esta definición no aparece en Reg. 808/2021, sino en las guías de interpretación del reglamento publicadas por los L.E.R. (*guidances*). (<https://eurl-residues.eu/>)

- ✓ estar documentados en instrucciones de ensayo o procedimientos normalizados de trabajo (PNT), de preferencia con arreglo la norma ISO 78-2:1999,
- ✓ haber sido validados y cumplir los criterios de funcionamiento y otros requisitos aplicables a los métodos analíticos establecidos en las dos normas,
- ✓ permitir la cuantificación de la sustancias de interés en la zona de referencia a efectos de intervención (LMR, MMPR, etc.) es decir, ser operativos y fiables al nivel de interés para cada sustancia.

En ambas normas se establecen procedimientos de validación susceptibles de ser empleados. No obstante, a partir de 10/junio/2021 solo se puede validar conforme a los criterios establecidos en el Reg. 808/2021. En todos los casos deberán determinarse como mínimo las características de funcionamiento que se muestran (indicado con SI) en la tabla siguiente (808/2021):

Método:	Confirmación		Criba (screening)		
	Cualitativo	Cuantitativo	Cualitativo	Semicuantitativo	Cuantitativo
Grupo sustancias:	A	A, B	A, B	A, B	A, B
Criterios identificación:	SI	SI			
CC $\alpha$ :	SI	SI			
CC $\beta$ :			SI		SI
Veracidad:			SI		
Precisión:			SI		
Efecto matriz relativo/ Recuperación:			SI		
Selectividad: Especificidad:			SI		
Estabilidad:			SI		
Robustez:			SI		
A: Sustancias del grupo A (prohibidas) B: Sustancias del grupo B (autorizadas)					

Pueden ser aplicables otros enfoques de validación distintos de los descritos en la norma siempre que permitan obtener la misma cantidad y calidad de información.

## 4.2. CRITERIOS DE FUNCIONAMIENTO DE LOS MÉTODOS DE ANÁLISIS.

### 4.2.1. Veracidad

Se establecen los criterios que se aceptarán para la veracidad obtenida durante la validación:

Conforme al Reg. 808/2021 en el caso de análisis repetidos de un material de referencia certificado, la desviación entre la fracción de masa media determinada experimentalmente, con corrección de recuperación, y el valor certificado cumplirá los rangos de veracidad mínima recogidos en el cuadro siguiente:

Veracidad mínima de los métodos cuantitativos	
Fracción de masa	Rango
$\leq 1 \mu\text{g}/\text{kg}$	- 50 % a +20 %
$> 1 \mu\text{g}/\text{kg}$ a $10 \mu\text{g}/\text{kg}$	- 30 % a +20 %
$\geq 10 \mu\text{g}/\text{kg}$	- 20 % a +20 %

Cuando no se disponga de materiales de referencia certificados, es aceptable que la veracidad de las mediciones se evalúe de otras maneras como, por ejemplo, utilizando materiales con valores asignados a partir de estudios interlaboratorios o añadiendo cantidades conocidas del analito o analitos a una matriz en blanco.

### 4.2.2. Precisión

Se establecen los criterios mínimos de aceptación para la precisión obtenida en la validación:

El coeficiente de variación (CV) para el análisis repetido de un material de referencia o enriquecido, en condiciones de reproducibilidad intralaboratorio, no superará el nivel calculado mediante la ecuación de Horwitz. La ecuación es la siguiente:

$$CV = 2(1 - 0.5 \log C)$$

donde C es la fracción de masa expresada como potencia (exponente) de 10 (por ejemplo,  $1 \text{ mg}/\text{g} = 10^{-3}$ ). Para las fracciones de masa inferiores a  $120 \mu\text{g}/\text{kg}$ , la aplicación de la ecuación de Horwitz arroja valores inaceptablemente altos. Por consiguiente, el coeficiente de variación máximo autorizado no deberá ser superior a los valores presentados en el cuadro siguiente.

Coeficiente de variación aceptable	
Fracción de masa	CV de reproducibilidad (%)
> 1 000 µg/kg	16 (adaptado a partir de la ecuación de Horwitz)
> 120 µg/kg – 1 000 µg/kg	22 (adaptado a partir de la ecuación de Horwitz)
10 – 120 µg/kg	25 *
< 10 µg/kg	30 *

\* El CV (%) presentado es una orientación y debe ser tan bajo como sea razonablemente posible.

En el caso de los análisis efectuados en condiciones de repetibilidad, el coeficiente de variación en condiciones de repetibilidad será igual o inferior a dos tercios (2/3) de los valores enumerados en el cuadro.

#### 4.2.3. Requisitos aplicables a la separación cromatográfica

Para la cromatografía líquida (LC) o de gases GC), el tiempo de retención mínimo aceptable para los analitos examinados será el doble del tiempo de retención correspondiente al volumen vacío de la columna (o *tiempo muerto*).

El tiempo de retención del analito en el extracto corresponderá al del patrón de calibración, al de un patrón similar a la matriz o al de un patrón de matriz enriquecida, con una tolerancia de  $\pm 0,1$  minuto.

Para la cromatografía rápida, en la que el tiempo de retención es inferior a 2 minutos, se aceptará una desviación inferior al 5 % del tiempo de retención. En caso de que se utilice un patrón interno, la relación entre el tiempo de retención cromatográfica del analito y el del patrón interno, es decir, el tiempo relativo de retención del analito, se corresponderá con el del patrón de calibración, el patrón similar a la matriz o el patrón de matriz enriquecida, con una desviación máxima del 0,5 % para la cromatografía de gases y del 1 % para la cromatografía líquida, en el caso de métodos validados a partir de la fecha de entrada en vigor del presente Reglamento.

#### 4.3. REQUISITOS ESPECÍFICOS DE FUNCIONAMIENTO PARA LA ESPECTROMETRÍA DE MASAS.

(Por razones de brevedad solo se detallarán aquí los criterios de funcionamiento por espectrometría de masas por ser la técnica única a emplear para la confirmación de sustancias prohibidas). Son adecuadas la espectrometría de masas de baja resolución (LRMS, con resolución de masa unidad) y la espectrometría de masas de alta resolución (HRMS) incluidos, por ejemplo, los instrumentos de doble focalización, de tiempo de vuelo (TOF) y orbitrap.

La identificación por espectrometría de masas se puede llevar a cabo de varias formas:

- Mediante registro de espectros de masa de barrido completo (*Full Scan*, FS). Esto es registrar el espectro de la sustancia para posteriormente será comparado con un patrón de la biblioteca espectral disponible.
- Registro selectivo de iones (SIM). Registro/adquisición de un único ión (M+)

- c) Técnicas de espectrometría en equipos más modernos (Orbitrap, triples cuadrupolos, etc.) en las que a partir de un ion producido se puede fragmentar en una celda de colisión (2º cuadrupolo) y obtener iones de segunda generación (hijos/daughter) que en un tercer cuadrupolo son seleccionados y posteriormente detectados.
- d) Una combinación de técnicas de espectrometría de masas (MS) o espectrometría de masas secuencial (MSn) con modos de ionización adecuados.

Para confirmar la identidad de un analito en HRMS, la desviación de la masa de todos los iones de diagnóstico será inferior a 5 ppm (o en el caso de  $m/z < 200$ , inferior a 1 mDalton). La resolución será normalmente superior a 10 000 para todo el rango de masas a un valle del 10 %, o superior a 20 000 en anchura a media altura (FWHM).

Cuando la determinación mediante espectrometría de masas se lleve a cabo registrando espectros de barrido completo (*Full scan*) (tanto LRMS como HRMS), solo serán adecuados los iones de diagnóstico con una intensidad relativa superior al 10 % en el espectro de referencia del patrón de calibración, patrón similar a la matriz o patrones de matriz enriquecida. Los iones de diagnóstico incluirán el ion molecular (si se encuentra presente en una intensidad de  $\geq 10$  % del pico base) y los iones fragmento o iones producto característicos.

Selección del ion precursor: cuando la identificación mediante espectrometría de masas la fragmentación tras la selección del ion precursor se realizará con una resolución de masa de una unidad o mejor. El ion precursor seleccionado será preferiblemente el ion molecular.

Iones fragmento o iones producto: los iones producto o fragmento seleccionados son iones de diagnóstico para el analito o producto medido. Se corresponderán con fragmentos del ion molecular. Siempre que sea posible, se omitirán las transiciones no selectivas (por ejemplo, el catión de tropilio  $[C_7H_7]^+$  propio de compuestos aromáticos o la pérdida de agua,  $M^+-18$ ).

La relación señal-ruido (S/N) de los iones de diagnóstico será igual o superior a tres a uno (3:1).

Intensidades relativas: las intensidades relativas de los iones de diagnóstico (relación de iones o *ratio*) se expresan como porcentaje de la intensidad del ion o de la transición más abundante. Para todos los análisis mediante espectrometría de masas, se determinará al menos una relación de iones. La relación de iones del analito que debe confirmarse corresponderá a las de los patrones similares a la matriz, los patrones de matriz enriquecida o las disoluciones patrón en concentraciones comparables, medidas en las mismas condiciones, con una desviación relativa inferior a  $\pm 40$  % (Reglamento 808/2021)

Se utilizará un sistema de puntos de identificación para valorar los modos de adquisición de las técnicas empleadas. Para confirmar la identidad de sustancias para las que se ha establecido un LMR (uso autorizado) presentes en una matriz, se requiere un mínimo de 4 puntos de identificación. En el caso de las sustancias no autorizadas o prohibidas, se requieren 5 puntos de identificación. Un punto puede proceder de la separación cromatográfica. El cuadro siguiente muestra el número de puntos de identificación que aporta cada una de las técnicas. Para alcanzar el número de puntos de identificación necesario para la confirmación. Puede conseguirse puntos de identificación obteniéndolos, empleando diferentes técnicas para la detección de un analito en una muestra.

Cuadro 3

Puntos de identificación por técnica

Técnica	Puntos de identificación
Separación (modo GC, LC, SFC, CE)	1
Ion LR-MS	1
Selección de ion precursor en un rango de masas $< \pm 0,5$ Da	1 (indirecto)
Ion producto LR-MS <sup>+</sup>	1,5
Ion HR-MS	1,5
Ion producto HR-MS <sup>+</sup>	2,5

Cuadro 4

Ejemplos de número de puntos de identificación, técnicas específicas y combinaciones de técnicas (n = un número entero)

Técnica(s)	Separación	Número de iones	Puntos de identificación
GC-MS (EI o CI)	GC	n	1 + n
GC-MS (EI y CI)	GC	2 (EI) + 2 (CI)	1 + 4 = 5
GC-MS (EI o CI) 2 derivados	GC	2 (Derivado A) + 2 (Derivado B)	1 + 4 = 5
LC-MS	LC	n (MS)	1 + n
GC- o LC-MS/MS	GC o LC	1 precursor + 2 productos	1 + 1 + 2 × 1,5 = 5
GC- o LC-MS/MS	GC o LC	2 precursores + 2 productos	1 + 2 + 2 × 1,5 = 6
GC- o LC-MS <sup>3</sup>	GC o LC	1 precursor + 1 producto MS <sup>2</sup> + 1 producto MS <sup>3</sup>	1 + 1 + 1,5 + 1,5 = 5
GC- o LC-HRMS	GC o LC	n	1 + n × 1,5

EI: ionización por impacto electrónico

CI: ionización química

Todos los análisis mediante espectrometría de masas deberán combinarse con una técnica de separación (LC o GC). Entre las técnicas de separación adecuadas se encuentran la cromatografía líquida y de gases, la electroforesis capilar (CE) y la cromatografía de fluidos supercríticos (SFC).

## 5. CONTROL DE CALIDAD DE LOS ENSAYOS.

Durante los análisis de rutina se utilizará material de referencia certificado (MRC) (siempre que se disponga) como control para aportar pruebas del adecuado funcionamiento del método. Dado que rara vez se dispone de un MRC que contenga los analitos pertinentes en los niveles de concentración requeridos, también pueden utilizarse como alternativa materiales de referencia suministrados y caracterizados por los laboratorios de referencia de la Unión Europea o por laboratorios que posean una acreditación ISO/IEC 17043: 2010(18). Otra posibilidad, en ausencia de las anteriores, es utilizar materiales de referencia internos que se controlen periódicamente.

Para cada serie (tanda) de análisis realizado, se analizará simultáneamente un conjunto de muestras empleadas como control del método:

- muestra de control de la adecuación del instrumento (ST, *Standard solution*) que permita verificar el buen estado del equipo. Bien podría ser un patrón en disolución (en ausencia

de matriz) que contenga todos los analitos contemplados en el método. Se inyecta al inicio de la secuencia de inyección de un lote de muestras y sirve para verificar que el instrumento está en condiciones;

- b) muestra de control de calidad enriquecida a una concentración ( $MST_{\text{control}}$ , *estándar en matriz*) próxima al LMR o CM para las sustancias farmacológicamente activas, o próxima al VRI o al NMC para las sustancias prohibidas o no autorizadas). Se trata de una muestra de control *no conforme*. Serían muestras blanco adicionadas al nivel de interés para verificar el correcto funcionamiento del equipo al nivel crítico.
- c) muestra de control conforme (muestra en blanco, MBL *matrix blank*)
- d) blanco de reactivo RBL (*reagent blank*), que al igual que la anterior permita establecer que los reactivos utilizados en el proceso no presentan contaminación de los analitos.
- e) muestras del calibrado ( $MST1$ - $MST5$ , *matrix standards*). En el caso de los métodos cuantitativos, con cada tanda de muestras oficiales se analizará y medirá una serie de muestras enriquecidas a diferentes niveles que permitan obtener una curva de calibración. Como mínimo se emplearán cinco, incluido el nivel 0 (sin adicionar). Estas muestras podrán analizarse en el equipo bien antes o bien después del conjunto de muestras 1.-4.

Se recomienda el siguiente orden para el análisis (<-> inyección en el sistema cromatográfico o similar, a emplear):

1. Las muestras de control de calidad:
  - a. muestra de control de la adecuación del instrumento al sistema (ST),
  - b. muestras de control conformes (blancos de matriz y de reactivos MBL y RBL),
2. Muestras pendientes de confirmación (esto es, las muestras que son objeto de análisis el lote; las muestras “problema”)
3. Muestras de control conforme de nuevo (MBL y RBL) y
4. Muestras de control de calidad enriquecida (muestra de control no conforme,  $MST_{\text{control}}$ ). Pueden ser también muestras de MR preparado por el propio laboratorio o MRC si se dispone.
5. Muestras del calibrado.

Cuando sea posible, se evaluará la veracidad (a partir de muestras enriquecidas) de todos los analitos de las muestras de control no conformes, mediante gráficos de control de calidad de conformidad con el capítulo 7.7 de la norma ISO/IEC 17025: 2017. Si ello requiere un número desproporcionado de determinaciones de veracidad, el número de analitos podrá reducirse a varios analitos representativos.

## **BIBLIOGRAFÍA**

Web conjunta de los LER:

<https://eurl-residues.eu/>

DECISIÓN DE LA COMISIÓN 2002/657/CE, de 12 de agosto de 2002, por la que se aplica la Directiva 96/23/CE del Consejo en cuanto al funcionamiento de los métodos analíticos y la interpretación de los resultados

REGLAMENTO DE EJECUCIÓN (UE) 2021/808 DE LA COMISIÓN de 22 de marzo de 2021 relativo al funcionamiento de los métodos analíticos para los residuos de sustancias farmacológicamente activas utilizadas en animales productores de alimentos y a la interpretación de resultados, así como a los métodos que deben utilizarse para el muestreo, y por el que se derogan las Decisiones 2002/657/CE y 98/179/CE.

Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición

<https://www.aesan.gob.es/>

Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. PNIR.

<https://www.mapa.gob.es/es/ganaderia/temas/sanidad-animal-higiene-ganadera/Higiene-de-la-produccion-primaria-ganadera/plan-nacional-de-investigacion-de-residuos-pnir/>