

**MANUAL PARA TOMA Y  
REMISIÓN DE MUESTRAS AL  
LABORATORIO NACIONAL DE  
REFERENCIA PARA LAS  
ENCEFALOPATÍAS  
ESPONGIFORMES TRANSMISIBLES  
(EETs)**

**LCV ALGETE**

**REV. AÑO 2015**

***El presente Manual es un documento de trabajo para los Servicios Veterinarios Oficiales de las Comunidades Autónomas.***

***El objetivo de este documento es procurar la Coordinación entre los diferentes agentes implicados en la vigilancia y diagnóstico de las EETs, estableciendo unos criterios uniformes para la toma de muestras y su posterior remisión al Laboratorio Nacional de Referencia (Laboratorio Central de Veterinaria de Algete).***

# **LABORATORIO CENTRAL DE VETERINARIA (LCV) DE ALGETE**

## **LABORATORIO CENTRAL DE VETERINARIA (LCV) DE ALGETE**

### **Dirección:**

Ctra. M106. Km 1, 4.  
Algete (Madrid)  
CP: 28110

**Tel:** 91-3479256

**Fax:** 913473778

### **Director Técnico Área Control y Genética:**

Enrique Anadón Navarro

### **Director Adjunto Área Control y Genética:**

Tomás Mayoral Ortega

# I. VIGILANCIA EPIDEMIOLOGICA DE LAS EETs

## 1.- VIGILANCIA EN GANADO BOVINO (EEB).

### A.- VIGILANCIA ACTIVA.

El programa de vigilancia activa de la Encefalopatía Espongiforme Bovina (EEB) es regulado por el **anexo II.A del Real Decreto 3454/2000**, de 22 de diciembre, por el que se establece y regula el Programa Integral coordinado de vigilancia y control de las encefalopatías espongiformes transmisibles de los animales.

La vigilancia activa recogida en el Programa Nacional, se adapta a los cambios normativos tanto comunitarios como nacionales relativos a las modificaciones de las edades de los animales objeto de muestreo obligatorio.

El objetivo básico de esta vigilancia es realizar una búsqueda efectiva de la enfermedad, mediante el control de determinadas poblaciones de animales sacrificados para consumo humano y de otros animales de riesgo, distintos de aquellos sospechosos de EEB, como son los animales muertos o aquellos cuyo sacrificio no está destinado al consumo humano. Además, un segundo objetivo de la vigilancia activa es determinar la evolución temporal de la prevalencia de la enfermedad.

El citado anexo II.A determina las subpoblaciones de animales que deben muestrearse en el contexto de vigilancia activa de EEB, según el riesgo derivado de la situación epidemiológica vigente en cada momento, y que por que tanto deben ser objeto de investigación por pruebas de diagnóstico rápido en los laboratorios autorizados por las CCAA, y en su caso, por posteriores pruebas de confirmación en el Laboratorio Nacional de Referencia.

Los detalles relativos a la sistemática a seguir en esta vigilancia activa pueden consultarse en el vigente Programa Nacional de Vigilancia, Control y Erradicación de la EEB.

En el año 2015 se realizará un seguimiento de las subpoblaciones de animales que se describen a continuación mediante la realización de **pruebas de diagnóstico rápido** en los laboratorios autorizados por las CCAA.

#### **A.1. Animales sacrificados para consumo humano:**

Se realizarán pruebas de EEB a:

**A.1.1.-** Todos los animales nacidos en países incluidos en el Anexo de la Decisión 2009/719/CE y modificaciones, por la que se autoriza a determinados Estados Miembros a revisar su programa anual de seguimiento de la EEB, de los siguientes grupos de edad:

a) **Mayores de cuarenta y ocho meses (48) de edad** siempre que se trate de:

- 1º.- Animales sometidos a un sacrificio de urgencia.
- 2º.-Animales que durante la inspección ante-mortem sean sospechosos de sufrir una enfermedad o hallarse en un estado de salud que pueda perjudicar a la salud de las personas, salvo los animales sacrificados en el marco de una campaña de erradicación que no presenten signos clínicos de la enfermedad.

b) Todos los **animales autóctonos sanos sacrificados para consumo humano que hayan nacido con anterioridad al 1 de enero de 2001**, siempre que procedan de explotaciones en las que se hayan diagnosticado focos de EEB. Dicha condición será recogida en la documentación prevista en el artículo 6 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.

**A.1.2.-** Todos los animales nacidos en países no incluidos en el Anexo de la Decisión 2009/719/CE y modificaciones y por lo tanto son países no autorizados a revisar su programa anual de seguimiento de la EEB, de los siguientes grupos de edad:

a) **Mayores de treinta meses (30) de edad** siempre que se trate de:

- 1º.- Animales sacrificados de manera normal para el consumo humano, o

- 2º.- Animales sacrificados en el marco de la ejecución del Real Decreto 2611/1996, de 20 de diciembre, por el que se regulan los programas nacionales de erradicación de enfermedades de los animales, siempre que en este último caso no presenten signos clínicos de la enfermedad.

**b) Mayores de veinticuatro meses (24) de edad si se trata de:**

- 1º.- Animales sometidos a un sacrificio de urgencia.
- 2º.- Animales que durante la inspección ante-mortem sean sospechosos de sufrir una enfermedad o hallarse en un estado de salud que pueda perjudicar a la salud de las personas, salvo los animales sacrificados en el marco de una campaña de erradicación que no presenten signos clínicos de la enfermedad.

Se entiende como "sacrificio de urgencia", según la sección I, capítulo VI, punto 1 del anexo III del Reglamento (CE) 853/2004 a aquel sacrificio realizado en un animal que, estando por lo demás sano, ha debido sufrir un accidente que impidió su transporte al matadero atendiendo a su bienestar.

Se entiende como "inspección ante mortem", según la sección I, capítulo II, parte B, punto 2, del anexo I del Reglamento (CE) 854/2004, a aquella que deberá permitir en particular determinar respecto del animal concreto sometido a inspección si existen señales:

- a) de que se haya puesto en peligro su bienestar, o
- b) de que se den cualesquiera condiciones que puedan ser perjudiciales para la salud humana o la sanidad animal, prestando una atención especial a la detección de zoonosis y de enfermedades animales en relación con las cuales la legislación de la Unión establece normas zoonitarias.

Se exceptuarán de esta consideración, los animales sin síntomas clínicos de la enfermedad, sacrificados en el marco de una campaña de erradicación de enfermedades de las establecidas en el Real Decreto 2611/1996, que serán considerados en el epígrafe que corresponde en función del destino final de esas canales.

## **A.2. Animales muertos y no sacrificados para consumo humano, mayores de cuarenta y ocho (48) meses:**

Se realizarán pruebas de la EEB a todos los animales bovinos mayores de **cuarenta y ocho meses** de edad que hayan muerto o hayan sido sacrificados, pero que no fueron sacrificados en el marco de una epidemia, como es el caso de la fiebre aftosa. No obstante, si se trata de animales nacidos en países no recogidos en el anexo de la Decisión 2009/719/CE y modificaciones, se realizarán pruebas de la EEB a todos los animales bovinos mayores de **veinticuatro meses**.

Se incluyen específicamente las siguientes subpoblaciones:

- Animales bovinos muertos en explotación o durante el transporte.
- Animales bovinos que hayan sido sacrificados, pero no para consumo humano ni en el marco de una epidemia, incluidos animales de campañas de erradicación de enfermedades de las establecidas en el Real Decreto 2611/1996, desvieje o similares no destinados a consumo humano.

NOTA: Todo animal que, habiendo mostrado síntomas compatibles con la EEB, muera o se sacrifique en la explotación, será clasificado dentro de la subpoblación de **animal sospechoso**, y por lo tanto se tratará como se describe en el apartado B explicado a continuación.

Los animales bovinos sacrificados como aplicación de las medidas de erradicación de un foco de EEB, y pertenecientes a la población de riesgo (descendientes y cohorte de edad) se muestrearán todos en base a la investigación epidemiológica que se realice en ese foco.

En caso de que el resultado de las pruebas rápidas realizadas fuera **positivo o dudoso**, se remitirá la muestra para su análisis mediante **pruebas de confirmación** al Laboratorio Nacional de Referencia para las EET (LCV).

## **B.- VIGILANCIA PASIVA.**

Todos los animales sospechosos por sintomatología deberán ser sometidos a pruebas de laboratorio para confirmar o descartar la enfermedad.

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 (definidos en el apartado 4.6.B del *Programa nacional de vigilancia, control y erradicación de la EEB*) se someterán a control, independientemente de su edad, mediante **pruebas de confirmación** en el Laboratorio Nacional de Referencia para las EET (LCV Algete).

La investigación de laboratorio que se realice en este contexto de vigilancia pasiva será realizada exclusivamente por el Laboratorio Nacional de Referencia (LCV - Algete).

En el apartado II de este manual, se describe con detalle el procedimiento de toma y remisión al laboratorio de la muestras de bovino sospechosos a EEB.

Se someterán a control mediante pruebas de confirmación, establecidas en el Manual OIE:

**B.1.- Todos los animales sospechosos por sintomatología** (todo animal vivo, sacrificado o muerto que presente o haya presentado anomalías neurológicas o de comportamiento o trastorno del SNC, con respecto a los cuales no se pueda establecer otro diagnóstico a tenor de un examen clínico, de la respuesta a un tratamiento, de un examen *post mortem* o tras un análisis de laboratorio *ante* o *post mortem*).

**B.2.- Todos los animales de los grupos A1 y A2 antes especificados, cuya muestra haya resultado positiva o dudosa a test rápidos en los laboratorios autorizados.**

En todo momento, los animales descritos como sospechosos de padecer una EET (ANEXO I apartados B1 y B2) se someterán a control mediante métodos y protocolos de confirmación, establecidos en el Manual OIE, en el Laboratorio Nacional de Referencia para las EETs (LCV).

Cuando el resultado del examen histopatológico sea dudoso o negativo, o cuando el material se haya autolisado, los tejidos se someterán a examen según uno de los otros métodos de diagnóstico establecidos en el citado Manual (inmunocitoquímica, inmunotransferencia, demostración de las fibrillas características mediante microscopía electrónica o una combinación de tests rápidos) definidos en el ANEXO II punto 2. Estas muestras han de remitirse al Laboratorio Nacional de Referencia de EETs.

## **C. PRUEBAS A REALIZAR EN LA ESPECIE BOVINA.**

### **C.1. PRUEBAS DE DIAGNÓSTICO RÁPIDO.**

Las autorizadas para la especie bovina en el punto 4 del Capítulo C del Anexo X del Reglamento 999/2001 y sus posteriores modificaciones:

— prueba de inmunotransferencia basada en un procedimiento de Western blot para la detección del fragmento PrP<sup>Res</sup> resistente a la proteinasa K (*Prionics-Check Western test*),

— inmunoanálisis de doble anticuerpo (método sándwich) para la detección de la PrP<sup>Res</sup> (protocolo de ensayo corto), efectuado tras una fase de desnaturalización y otra de concentración (*Bio-Rad TeSeE SAP Rapid test*),

— inmunoanálisis basado en una microplaca (ELISA) para la detección de PrP<sup>Res</sup> resistente a la proteinasa K con anticuerpos monoclonales (*Prionics-Check LIA test*),

— inmunoanálisis en el que utilice un polímero químico para la captura selectiva de PrP<sup>Sc</sup> y un anticuerpo de detección monoclonal dirigido contra regiones conservadas de la molécula PrP (*IDEXX HerdChek BSE Antigen Test Kit, EIA e HerdChek BSE-Scrapie Antigen (Idexx Laboratories)*),

— inmunoanálisis de flujo lateral que utilice dos anticuerpos monoclonales diferentes para la detección de fracciones de PrP resistentes a la proteinasa K (*Prionics Check PrioSTRIP*),

— inmunoanálisis de doble anticuerpo que utilice dos anticuerpos monoclonales diferentes dirigidos contra dos epítopos presentes en la PrP<sup>Sc</sup> bovina en estado muy desplegado (*Roboscreen Beta Prion BSE EIA Test Kit*),

## C.2. PRUEBAS DE CONFIRMACIÓN.

Se someterán inmediatamente a métodos y protocolos de confirmación todos los animales de la vigilancia activa cuyo resultado haya sido dudoso o positivo así como todos los animales sospechosos por sintomatología investigados en el marco de la vigilancia pasiva.

Los métodos de confirmación serán los autorizados asimismo en el citado Reglamento, conforme a las directrices técnicas establecidas en el Manual de la OIE sobre pruebas diagnósticas y vacunas, en su última edición: inmunohistoquímica, inmunotransferencia, observación de las fibrillas características por microscopía electrónica, examen histopatológico o combinación de pruebas de diagnóstico rápido.

Cuando el resultado del examen histopatológico sea dudoso o negativo, o cuando el material se haya autolisado, los tejidos se someterán a examen según uno de los otros métodos de diagnóstico establecidos en el citado Manual.

Las muestras para confirmación se remitirán al LNR para las EETs (LCV - Algete) donde se realizarán las que se consideren necesarias para confirmar o descartar la enfermedad.

Si el resultado de dichos métodos de confirmación es negativo, el animal será considerado negativo.

Cuando el resultado de análisis sea positivo, se considerará al animal **positivo a EEB**.

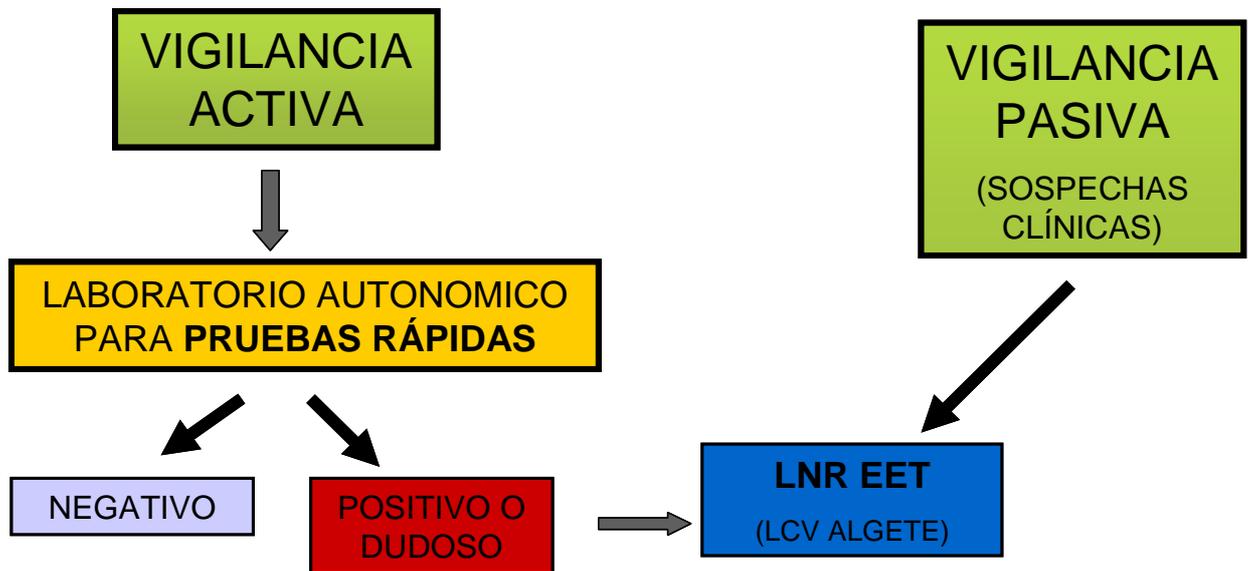
En el caso de animales positivos será necesario discriminar la cepa de EEB que les afecta, clasificándolas en: EEB tipo Clásico, EEB tipo Low (L) o EEB tipo High (H). Esta discriminación será realizada también en el LNR para las EETs (LCV-Algete), como laboratorio autorizado por el Laboratorio de Referencia de la UE (LR-UE), siguiendo los métodos aprobados al efecto por el Reglamento 1148/2014 y las pautas dictadas por el Laboratorio de Referencia de la Unión Europea (LR-UE).

### **Confirmación de casos sospechosos por tests rápidos.**

Los tests rápidos de diagnóstico podrán emplearse como método confirmatorio de EEB siguiendo las siguientes pautas dictadas por el Laboratorio de Referencia de la Unión Europea (LR-UE):

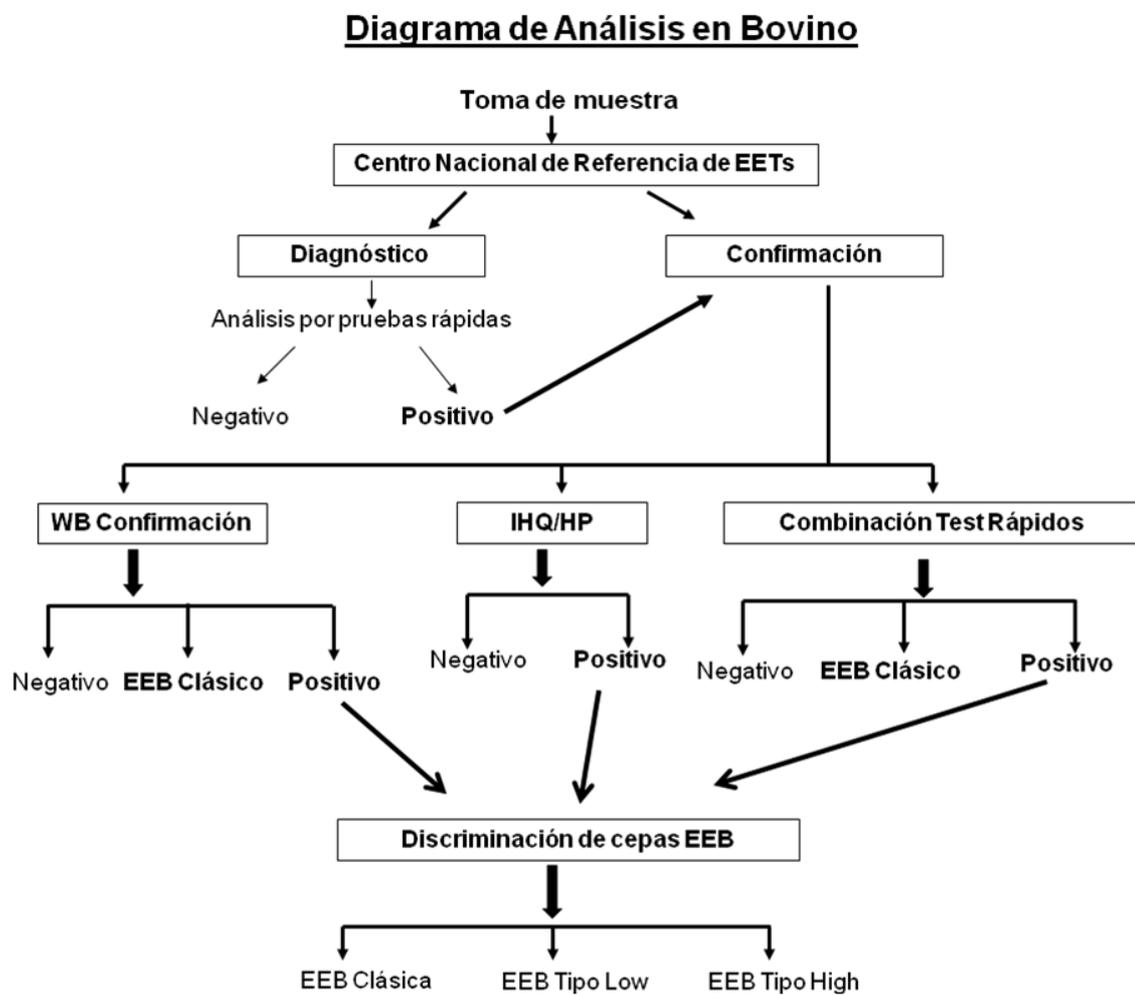
- La confirmación se realizará en el Laboratorio Nacional de Referencia para EETs.
- El segundo test rápido usado debe de incluir tejido de bovino positivo y negativo como control.
- El segundo test rápido usado debe de ser diferente (dos resultados por el mismo test, son insuficientes para la confirmación del caso).
- Si el primer test usado ha sido uno basado en inmunotransferencia, el resultado debe ser documentado y presentado al LCV.
- Uno de los dos test rápidos realizados debe de estar basado en inmunotransferencia.
- Cuando los resultados de los test rápidos realizados no sean concordantes, la muestra debe ser sometida a uno de los métodos de confirmación anteriormente descritos. En caso de realizarse un examen histopatológico y el resultado sea negativo o no concluyente, o cuando el material se haya autolisado, los tejidos serán analizados por alguno de los otros métodos de confirmación.

En el Cuadro 1. se presenta el esquema del flujo de muestras hasta el LNR EET.



Cuadro 1. Esquema del flujo de muestras hasta el LNR.

En el Cuadro 2 . se presenta el diagrama de análisis que se realizan en el LNR de EETs de Algete para la especie Bovina.



Cuadro 2. Diagrama de flujo de análisis realizados en el LNR de EETs para la especie bovina.

## **2.- VIGILANCIA EN GANADO OVINO Y CAPRINO (Tembladera).**

### **A.- VIGILANCIA ACTIVA.**

El programa de vigilancia activa de la Tembladera regulado por el **anexo II.B del Real Decreto 3454/2000**, de 22 de diciembre, por el que se establece y regula el Programa Integral coordinado de vigilancia y control de las encefalopatías espongiformes transmisibles de los animales, con el objetivo básico de realizar una búsqueda efectiva de la enfermedad, mediante el control de determinadas poblaciones de animales sacrificados para consumo humano y de otros animales de riesgo, distintos de aquellos sospechosos de EET, como son los animales muertos o aquellos cuyo sacrificio no está destinado al consumo humano. Además, un segundo objetivo de la vigilancia activa es determinar la evolución temporal de la prevalencia de la enfermedad.

El citado anexo II.B determina las subpoblaciones de ovinos y caprinos que deben muestrearse y ser objeto de investigación por pruebas de diagnóstico rápido, en los laboratorios autorizados por las CCAA, y posteriores pruebas de confirmación, en su caso, en el Laboratorio Nacional de Referencia cuando el resultado de la prueba rápida sea positivo o dudoso.

Se realizará un seguimiento de las subpoblaciones de animales que se describen a continuación mediante la realización de **pruebas de diagnóstico rápido** en los laboratorios autorizados por las CCAA en una muestra de animales que se determinará para cada CCAA en virtud de los requisitos establecidos en los Programas anuales de Vigilancia y Control de EET.

**A.1 Animales sacrificados para consumo humano, mayores de 18 meses o en cuya encía hayan hecho erupción 2 incisivos definitivos.**

**A.2 Animales no sacrificados para consumo humano, mayores de 18 meses o en cuya encía hayan hecho erupción 2 incisivos definitivos:**

- a) Animales muertos en explotación

- b) Animales que hayan sido sacrificados, pero no para consumo humano ni en el marco de una campaña de erradicación de enfermedades de las establecidas en el Real Decreto 2611/1996.
- c) Animales ovinos/caprinos de sacrificio de erradicación pertenecientes a la población de riesgo (descendientes y cohorte de edad).

La muestra será representativa para cada región y temporada. La selección de la muestra estará destinada a evitar una representación excesiva de cualquier grupo por lo que se refiere al origen, la especie, la edad, la raza, el tipo de producción o cualquier otra característica. La edad del animal se estimará en función de la dentadura, signos evidentes de madurez u otra información fiable. Se evitará, siempre que sea posible, realizar un muestreo múltiple en el mismo rebaño.

NOTA: Todo animal que, habiendo mostrado síntomas compatibles con la EET, muera o se sacrifique en la explotación, o sea detectado en matadero será clasificado dentro de la subpoblación de animal sospechoso, y por lo tanto se tratará como se describe en el apartado B a continuación.

En caso de que el resultado de las pruebas rápidas realizadas fuera **positivo o dudoso**, se remitirá muestra para análisis mediante **pruebas de confirmación** al Laboratorio Nacional de Referencia para las EET (LCV Algete).

## **B.- VIGILANCIA PASIVA.**

La **vigilancia pasiva** de la enfermedad consiste, básicamente, en la detección de animales positivos mediante 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 (todo animal vivo, sacrificado o muerto que presente o haya presentado anomalías neurológicas o de comportamiento o trastorno del SNC, con respecto a los cuales no se pueda establecer otro diagnóstico a tenor de un examen clínico, de la respuesta a un tratamiento, de un examen *post mortem* o tras un análisis de laboratorio *ante o post mortem*) deberán ser sometidos a pruebas de laboratorio para confirmar o descartar la enfermedad.

La investigación de laboratorio que se realice en este contexto de vigilancia pasiva, será realizada exclusivamente por el Laboratorio Nacional de Referencia para las EET (LCV-Algete).

Los detalles relativos a la sistemática a seguir en esta vigilancia pasiva pueden consultarse en el vigente Programa Nacional de Vigilancia, Control y Erradicación de la Tembladera.

En el apartado II de este manual, se describe con detalle el procedimiento de toma y remisión al laboratorio de las muestras de ovinos y caprinos sospechosos a EETs

Para conocer con más detalle cómo detectar a los ovinos y caprinos que manifiestan un comportamiento o signos clínicos compatibles con encefalopatía esponjiforme transmisible se recomienda visitar la página de internet del laboratorio comunitario de referencia:

[http://webarchive.nationalarchives.gov.uk/20130123162956/http://vla.defra.gov.uk/science/sci\\_tse\\_rl\\_video.htm](http://webarchive.nationalarchives.gov.uk/20130123162956/http://vla.defra.gov.uk/science/sci_tse_rl_video.htm)  
<http://www.tse-lab-net.eu/training.html>

La sintomatología es a menudo poco perceptible y quienes mejor pueden identificarla son las personas que se ocupan de los animales a diario. Conviene advertir que hay casos de animales que manifiestan sólo algunos de estos signos, los cuales pueden también variar en intensidad. El porcentaje de casos sospechosos variará según las situaciones epidemiológicas y, por tanto, no se puede predecir de manera fiable.

No obstante, esta subpoblación demuestra tener una prevalencia elevada. La identificación, declaración y clasificación precisa de estos animales dependerá del programa permanente de concienciación de los ganaderos y veterinarios.

Este programa y la calidad de los sistemas de investigación y análisis en laboratorio que empleen los *Servicios Veterinarios* son esenciales para la credibilidad del sistema de vigilancia.

## **C. PRUEBAS A REALIZAR EN LAS ESPECIES OVINA Y CAPRINA**

### **1.- PRUEBAS DE DIAGNÓSTICO RÁPIDO**

Son las autorizadas para las especies ovina y caprina en el punto 4 del Capítulo C del Anexo X del Reglamento 999/2001 y sus posteriores modificaciones:

— inmunoanálisis de doble anticuerpo (método sándwich) para la detección de PrP<sup>Res</sup> (protocolo de ensayo corto), efectuado tras una fase de desnaturalización y otra de concentración (*Bio-Rad TeSeE SAP rapid test*),

— inmunoanálisis de doble anticuerpo (método sándwich) para la detección de PrP<sup>Res</sup> con el *TeSeE Sheep/Goat Detection kit*, efectuado tras una fase de desnaturalización y otra de concentración con el *TeSeE Sheep/Goat Purification kit (Bio-Rad TeSeE Sheep/Goat rapid test)*,

— inmunoanálisis en el que se utilice un polímero químico para la captura selectiva de PrP<sup>Sc</sup> y un anticuerpo de detección monoclonal dirigido contra regiones conservadas de la molécula PrP (*HerdChek BSE-Scrapie Antigen (IDEXX Laboratories)*),

— inmunoanálisis de flujo lateral que utilice dos anticuerpos monoclonales diferentes para la detección de fracciones de PrP resistentes a la proteinasa K (*Prionics Check PrioSTRIP SR* (protocolo de lectura visual)).

### **2.- PRUEBAS DE CONFIRMACIÓN**

Las muestras procedentes de vigilancia Pasiva (sospechas clínicas) y las muestras procedentes de la vigilancia activa con resultado positivo o dudoso en las pruebas rápidas, se someterán a control mediante métodos de confirmación.

Los métodos de confirmación serán los autorizados asimismo en el citado Reglamento, conforme a las directrices técnicas establecidas en el Manual de la OIE sobre pruebas diagnósticas y vacunas, en su última edición: método inmunohistoquímico, inmunotransferencia SAF o una alternativa

autorizada por la OIE, observación de las fibrillas características por microscopía electrónica o examen histopatológico.

Si el examen histopatológico es dudoso o negativo, los tejidos serán sometidos a otro examen por uno de los otros métodos.

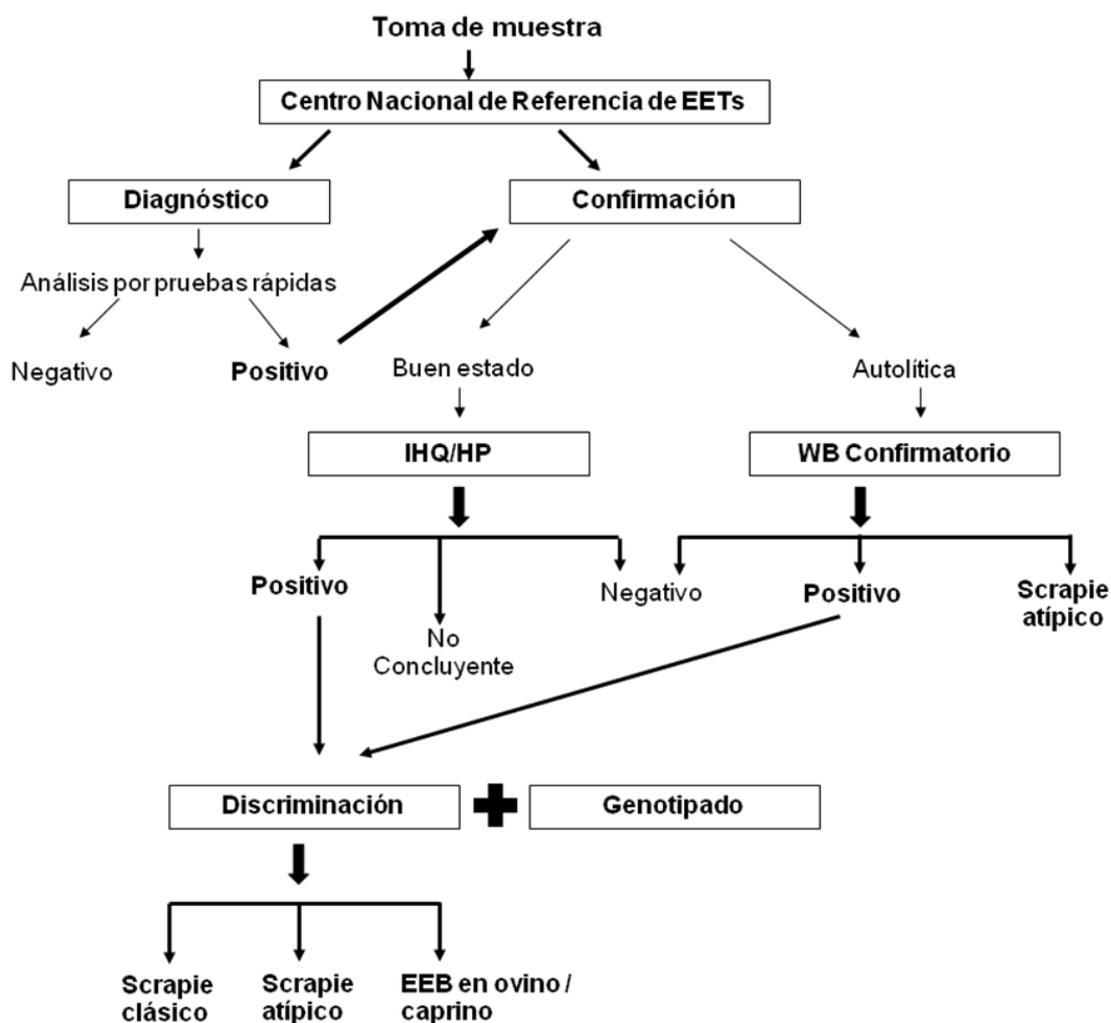
Las muestras para confirmación se remitirán al LNR para las EETs (LCV - Algete) donde se realizarán las que se consideren necesarias para confirmar o descartar la enfermedad.

Si el resultado de la prueba de confirmación es negativo (a excepción del análisis histopatológico), el animal será considerado negativo. En el supuesto de que un resultado de uno de los exámenes de confirmación mencionados sea positivo, los animales se considerarán casos positivos de EET.

En el caso de animales positivos será necesario discriminar la cepa de EET responsable: Tembladera, Tembladera atípica y EEB en ovino y caprino. Esta discriminación será realizada también en el LNR para las EETs (LCV-Algete), como laboratorio autorizado por el Laboratorio de Referencia de la UE (LR-UE), siguiendo los métodos aprobados al efecto por el Reglamento 999/2001.

En el Cuadro 3. se presenta diagrama de los análisis realizados en el LNR para las especies de ovino y caprino.

### Diagrama de Análisis en Pequeños rumiantes



Cuadro 3. Diagrama de flujo de análisis realizados en el LNR para las especies ovina/caprino

## II. TOMA DE MUESTRAS

En la actualidad, los primeros pasos para el diagnóstico de EETs implica la investigación del sistema nervioso central a la altura del tronco encefálico.

Recientemente, se han descrito nuevas formas de la enfermedad, causadas por cepas denominadas "atípicas" en bovino (Tipo-H y Tipo-L) y en pequeños rumiantes (Tembladera atípica). Para detectar estas nuevas cepas, el cerebelo parece ser una región importante para una buena clasificación de estas nuevas variantes.

La muestra mínima requerida para cualquier especie animal de cualquier subpoblación es el *tronco encefálico a la altura del óbex*. Adicionalmente, en pequeños rumiantes, es obligatorio tomar parte de cerebelo.

La toma de muestras se realizará por personal formado específicamente para ello. Las muestras se remitirán al laboratorio a la mayor brevedad, a ser posible dentro de las 48 horas posteriores a la toma de muestras, y mediante un sistema que garantice la llegada de la muestra en adecuadas condiciones de conservación.

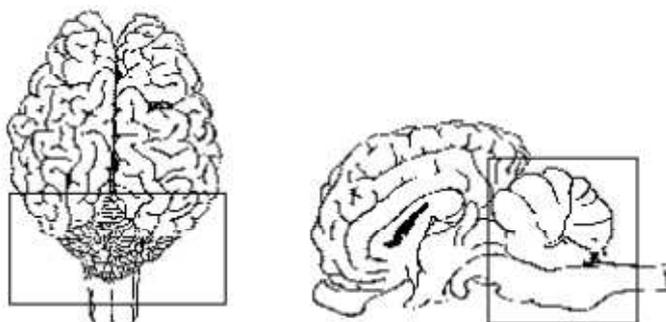
Las muestras deben remitirse en envases individuales herméticos e irrompibles, perfectamente identificados y acompañadas de la hoja/s de toma de muestras correspondientes debidamente cumplimentadas.

Se puede usar cualquier método de toma de muestra que permita extraer intacto el tronco encefálico sin contaminar y que evite cualquier riesgo de contaminación entre muestras sucesivas.

## 1. TOMA DE MUESTRAS EN LA VIGILANCIA PASIVA

### A. TOMA DE MUESTRAS EN BOVINO

La toma de muestras consistirá en la extracción del encéfalo completo cuando sea posible, y en todo caso, siempre el tronco encefálico completo vía foramen mágnum de acuerdo con el esquema de la Figura 1.



**Fig. 1**

Una vez realizada la extracción del tronco del encéfalo, debe enviarse en fresco ( $5 \pm 3^\circ \text{C}$ ) al LNR para la realización de las técnicas de confirmación.

Estudios realizados en el Laboratorio de Referencia de la UE sugieren que el cerebelo es una zona diana del encéfalo para discriminar los casos de EEB clásicos de los atípicos. Por esta razón se recomienda que, siempre que sea posible, se extraiga al menos una porción del mismo y se envíe al LNR para que el caso de que el animal resulte positivo a EEB, se pueda realizar los análisis encaminados a la discriminación de cepas de EEB.

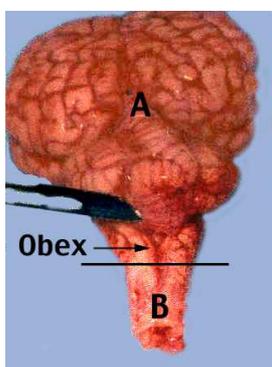
### B. TOMA DE MUESTRAS EN OVINO Y CAPRINO.

La toma de muestras consistirá en la extracción del encéfalo completo incluido el tronco encefálico y si no fuera posible, al menos se debe recoger obligatoriamente, según el Reglamento 999/2001, el tronco encefálico completo y una porción del cerebelo.

Posteriormente se realizará un corte caudal del óbex, siguiendo el esquema de la figura 2, obteniendo así dos secciones:

- Sección A: encéfalo y tronco encefálico rostral.
- Sección B: médula oblongada caudal espinal.

Una vez realizada la extracción del tronco del encéfalo y de porción del cerebelo, debe enviarse en fresco refrigerado ( $5 \pm 3^\circ \text{C}$ ) al LNR para la realización de las técnicas de confirmación.



- Sección A: encéfalo y tronco encefálico rostral
- Sección B: médula oblongada caudal espinal

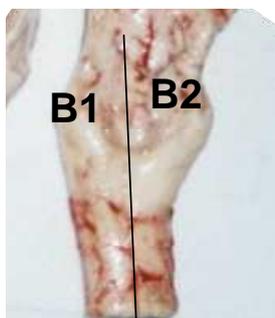
Figura 2.

## 2. TOMA DE MUESTRAS EN LA VIGILANCIA ACTIVA

La **TOMA DE MUESTRA** consistirá en:

1. La extracción del tronco encefálico, vía *foramen magnum*.
2. En el caso de pequeños rumiantes (ovino y caprino) es obligatorio la extracción de una porción de cerebelo para la discriminación de cepas. En el caso de animales bovinos, con el objeto también de realizar esta discriminación, es recomendable la extracción de al menos una porción del cerebelo.

3. Realizar una sección longitudinal del mismo siguiendo la línea media, según el esquema de la Figura 3, obteniendo 2 secciones simétricas.



**Fig. 3**

#### **REMISIÓN** de muestras:

- **Sección B1**: Muestra en fresco para el diagnóstico mediante los tests rápidos en el laboratorio autorizado de cada Comunidad Autónoma. Enviar al LNR el resto de muestra de esta sección siempre que sea posible.
- **Sección B2**: Muestra en fresco (4° C) para la confirmación y/o para discriminación de cepas de EETs. Enviar al LNR para la confirmación mediante los métodos descritos en la última edición del Manual OIE así como la discriminación de cepas tanto de EEB como de Scrapie.
- **Cerebelo**: en el caso de animales ovinos y caprinos. En el caso de animales bovinos resultaría recomendable. Enviar al LNR para la discriminación de cepas.

### **3. TOMA DE MUESTRAS PARA GENOTIPADO**

- **Genotipado de casos positivos**: en todos los casos positivos de tembladera en la especie ovina se determinará en el LNR en genotipo del gen Prnp para los codones 136, 154 y 171, tal y como se establece en el punto 8.1. del anexo III del capítulo
- **Genotipado aleatorio**: tal y como se indica en punto 8.2. de la parte II del capítulo A del anexo III del Reglamento 999/2001,

deberá determinarse el genotipo de la proteína priónica de los codones 136, 141, 154 y 171 de una muestra mínima de ovinos. En los Estados miembros con una población de ovinos adultos de más de 750 000 cabezas, la muestra mínima será de 600 animales. Las muestras podrán incluir animales sacrificados para el consumo humano, animales muertos en la explotación y animales vivos, y habrán de ser representativas de toda la población ovina.

Por tanto, las muestras a remitir para realizar el genotipado pueden ser de varios tipos:

- Sangre con **anticoagulante remitida en fresco** ( $5 \pm 3^\circ \text{C}$ ).
- Homogeneizados de animales negativos, analizados previamente por los laboratorios autorizados de las CC.AA. remitidos en **fresco** ( $5 \pm 3^\circ \text{C}$ ).
- Muestra de tejido (tronco encefálico) remitida en **fresco** ( $5 \pm 3^\circ \text{C}$ ).

#### 4. CUESTIONES RELACIONADAS CON EL MUESTREO

En algunas ocasiones, sobre todo en animales muertos en explotaciones, puede producirse una toma de muestras inadecuada porque la muestra se encuentre en fase putrefacción. En estos casos, la región del óbex puede estar dañada, incompleta, distorsionada o autolítica por lo que no es posible una orientación anatómica correcta (Fig.4).



Fig. 4

En estos casos, no será posible tomar una muestra de la región anatómica diana pero no puede evitarse; lo importante es que se anote para ayudar a la interpretación de los resultados obtenidos, e informar al personal encargado de recoger las muestras que se debe evitar esa baja calidad siempre que sea posible.

**!!! SIEMPRE QUE SE ENVIEN MUESTRAS AL LCV DE ALGETE, TANTO EN EL CASO DE LA VIGILANCIA PASIVA COMO EN EL DE LA ACTIVA ES MUY IMPORTANTE RECORDAR QUE:**

*De acuerdo con las indicaciones del Laboratorio Comunitario de Referencia (VLA Weybridge), para poder realizar las diferentes pruebas confirmatorias y/o discriminatorias, la cantidad mínima requerida para la confirmación por técnicas de la OIE, será de **6 gramos**.*

*En el caso de ovinos donde la cantidad de muestra tomada es menor, la cantidad debe aproximarse lo más posible a la requerida.*

## DOCUMENTACIÓN DE ACOMPAÑAMIENTO DE LAS MUESTRAS.

Las muestras irán acompañadas, como mínimo, de la documentación que a continuación se señala. Cuando la muestra sea enviada de un laboratorio a otro, para confirmación de resultados, se adjuntará también copia completa de la documentación de la misma:

- **Todas las muestras** irán acompañados por la documentación establecida como **Modelo 1 o 2** (según especie).
- Además, para los **animales sospechosos** se adjuntará la encuesta según el **Modelo 3**, que recoge los síntomas detectados.
- Cuando las **muestras sean enviadas desde un laboratorio autorizado de la CCAA al LNR** Laboratorio Nacional de Referencia, se adjuntará la documentación establecida como **Modelo 4**
- Las muestras para el **genotipado del gen PrP de ovinos** se acompañarán del **modelo 5**.

Todos estos modelos están disponibles en los programas nacionales de vigilancia, control y erradicación de la Encefalopatías Espongiformes Transmisibles en la dirección web:

<http://rasve.magrama.es/Publica/Programas/Normativa.asp>

Enlaces de interés:

[http://webarchive.nationalarchives.gov.uk/20130123162956/http://vla.defra.gov.uk/science/sci\\_tse\\_rl\\_video.htm](http://webarchive.nationalarchives.gov.uk/20130123162956/http://vla.defra.gov.uk/science/sci_tse_rl_video.htm)

<http://www.tse-lab-net.eu/training.html>

**Modelo 1:****HOJA DE TOMA DE MUESTRAS: PROGRAMA DE VIGILANCIA DE EEB**

FECHA: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

IDENTIFICACIÓN DE LA MUESTRA: \_\_\_\_\_

Nº CROTAL \_\_\_\_\_

Nº REGIST LABOORAT: \_\_\_\_\_

**DEFINICIÓN DE LA SUBPOBLACIÓN****A.1- Animal sospechoso (CUMPLIMENTAR SIEMPRE EL MODELO 3):**Muerto:  en explotación  en transporte  en mataderoSacrificado:  en explotación  en transporte  en matadero**A.2- Animal sacrificado para consumo humano** Sacrificado de urgencia > 48 meses  Sacrificado > 48 meses con alteraciones en la inspección ante-mortem Nacido en España antes 1/01/01 y procedente de explotación en la que se han diagnosticado focos EEB Sacrificado y procedente de un país sin revisión de su programa de seguimiento de EEB:

&gt; 30 meses si es sacrificio de rutina

&gt; 24 meses en sacrificios especiales (urgencia y síntomas antemortem)

**A.3- Animales > 48 meses muertos o cuyo sacrificio no esté destinado a consumo humano**Muerto:  en explotación  en transporte  en mataderoSacrificado:  en explotación  en transporte  erradicación de enfermedades distintas de EEB

Especificar cuando proceda: raza de lidia campaña de saneamiento

 Muerto > 24 meses procedente de un país sin revisión de su programa de seguimiento de EEB**A.4-Animal sacrificado como medida de erradicación de foco EEB** Descendiente de un animal positivo Grupo de edad de animal positivo ( $\pm$  12 meses)  Otros**A.5- Otra subpoblación (Especificar motivo de la toma de muestra):****LUGAR DE TOMA DE MUESTRAS** Matadero  Industria de transformación  Desolladero o local de faenado  Explotación Planta intermedia  Sala de tratamiento de carne de reses de lidia  Incineradora

ESTABLECIMIENTO/EXPLOTACIÓN:

Nº REGISTRO:

COMUNIDAD AUTÓNOMA:

PROVINCIA:

MUNICIPIO:

**DATOS DEL ANIMAL**

FECHA DE SACRIFICIO O MUERTE:

Nº IDENTIFICACIÓN:

APTITUD:

FECHA DE NACIMIENTO:

SEXO:

RAZA:

**DATOS DE LA EXPLOTACIÓN**

PROPIETARIO DE LA EXPLOTACIÓN:

NIF:

Nº REGISTRO DE LA EXPLOTACIÓN:

DOMICILIO:

PROVINCIA DE LA EXPLOTACIÓN:

MUNICIPIO:

**CUADRO CLÍNICO**

ANIMAL OBJETO DE SACRIFICIO DE URGENCIA (Especificar las causas o adjuntar el certificado veterinario):

ANIMAL CON SINTOMATOLOGÍA EN LA INSPECCIÓN ANTE-MORTEM (Especificar los síntomas clínicos detectados):

Veterinario responsable de la toma de muestras:

Fecha: \_\_\_\_\_

Firma.: \_\_\_\_\_

## Modelo 2:

### HOJA DE TOMA DE MUESTRAS: PROGRAMA DE VIGILANCIA DE EET EN

FECHA: \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_

IDENTIFICACION DE LA MUESTRA: (Preferentemente nº crotal)

#### DEFINICION DE LA SUBPOBLACION

##### Animal sospechoso (CUMPLIMENTAR SIEMPRE MODELO 3)

Muerto:	<input type="checkbox"/> en matadero	<input type="checkbox"/> en transporte	<input type="checkbox"/> en explotación
Sacrificado:	<input type="checkbox"/> en matadero	<input type="checkbox"/> en transporte	<input type="checkbox"/> en explotación

Animal > 18 meses (especificar animales de campaña de erradicación, si procede)

*destinado a consumo humano*

<b>No destinado a consumo:</b>	muerto:	<input type="checkbox"/> en explotación	<input type="checkbox"/> en transporte	<input type="checkbox"/> en matadero
	Sacrificado no para consumo:	<input type="checkbox"/> en explotación	<input type="checkbox"/> en transporte	<input type="checkbox"/> en transporte
	Erradicación			

Otra subpoblación (Especificar motivo de la toma de muestra)

#### LUGAR DE TOMA DE MUESTRAS

matadero      industria de transformación      planta intermedio      explotación      incineradora

Establecimiento/explotación: \_\_\_\_\_ nº de registro: \_\_\_\_\_

Comunidad Autónoma: \_\_\_\_\_ provincia: \_\_\_\_\_ municipio: \_\_\_\_\_

#### DATOS DEL ANIMAL

fecha de sacrificio o muerte: \_\_\_\_\_ nº identificación: \_\_\_\_\_

fecha de nacimiento: \_\_\_\_\_ sexo: \_\_\_\_ raza: \_\_\_\_\_ especie \_\_\_\_\_

#### DATOS DE LA EXPLOTACIÓN

nombre y NIF del propietario de la explotación: \_\_\_\_\_

domicilio: \_\_\_\_\_

nº de registro de la explotación: \_\_\_\_\_

Comunidad Autónoma de la explotación: \_\_\_\_\_

provincia de la explotación: \_\_\_\_\_ municipio: \_\_\_\_\_

#### OBSERVACIONES

Nombre, firma del Veterinario responsable de la toma de muestras: \_\_\_\_\_

Teléfono de contacto

Modelo 3

**ENCUESTA DEL CUADRO CLÍNICO DE ANIMALES SOSPECHOSOS**

FECHA: \_\_\_ / \_\_\_ / \_\_\_

*IDENTIFICACION DE LA MUESTRA: (Preferentemente*

1. Fecha de aparición de los primeros síntomas: \_\_\_\_\_

2. Detalle de la sintomatología:

Cambios de comportamiento

- Nerviosismo
- Agresividad
- Aprehensión o miedo
- Hiperestesia o reacción exagerada a estímulos externos
- Movimientos anormales de la cabeza
- Otros

Cambios locomotores o de postura

- Ataxia o Incoordinación
- Posturas anormales
- Hipermetría: elevación excesiva de extremidades al andar
- Caídas y dificultad para levantarse
- Otros

Prurito

Lesiones cutáneas

Temblores

Otros síntomas neurológicos

- Tetania o contracciones musculares
- Movimientos en círculos
- Empuja objetos fijos con la cabeza
- Patadas en sala de ordeño. Dificultad para entrar en sala
- Otros:

3. Descripción y tiempo del tratamiento suministrado:

- Tratamiento 1:
  - Sustancia y nombre comercial: \_\_\_\_\_
  - Período de aplicación: \_\_\_\_\_
- Tratamiento 2:
  - Sustancia y nombre comercial: \_\_\_\_\_
  - Período de aplicación : \_\_\_\_\_

4. Otras enfermedades de tipo nervioso de las que se sospecha/diagnostico diferencial  
(indicar si han sido descartadas y método empleado)

\_\_\_\_\_

5. Observaciones: \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

Nombre, firma del Veterinario responsable de la toma de muestras: \_\_\_\_\_

Teléfono de contacto

Modelo 4

**HOJA DE REMISIÓN DE MUESTRAS Y RESULTADOS AL LABORATORIO NACIONAL DE REFERENCIA PARA EL DIAGNOSTICO DE EETs.**

FECHA: \_\_\_ / \_\_\_ / \_\_\_\_\_

IDENTIFICACION DE LA MUESTRA: (número crotal)

IDENTIFICACION DE LA MUESTRA: (número de id. del Laboratorio remitente)

**DATOS DEL LABORATORIO REMITENTE**

Centro: \_\_\_\_\_  
Dirección: \_\_\_\_\_  
Persona remitente de la muestra: \_\_\_\_\_

**DATOS DE LOS ENSAYOS REALIZADOS**

Fecha de análisis: _____		
Técnicas empleadas:	Resultado obtenido:	Anticuerpos utilizados (Solo Inmunohistoquímica)
_____	_____	_____
_____	_____	_____
_____	_____	_____
_____	_____	_____

**DATOS DE LA MUESTRA**

Estado de la muestra remitida:

- Fresca con región anatómica identificable
- Fresca sin región anatómica identificable
- Autolítica
- Avanzado Estado de descomposición:

Cantidad remitida: \_\_\_\_\_

**OBSERVACIONES**

Empty box for observations.

## Modelo 5

### HOJA DE TOMA DE MUESTRAS PARA GENOTIPADO DEL GEN PrP:

FECHA: \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_

IDENTIFICACION DE LA MUESTRA: (Preferentemente nº crotal)

#### DEFINICION DE LA SUBPOBLACION

<input type="checkbox"/> Animal sospechoso
<input type="checkbox"/> Animal > 18 meses (dos incisivos definitivos) sacrificado para consumo humano
<input type="checkbox"/> Animal > 18 meses (con dos incisivos definitivos) que se ha tomado la muestra en la explotación
Animal sacrificado como medida de erradicación de foco de tembladera
<input type="checkbox"/> Descendiente de animal positivo
<input type="checkbox"/> Grupo de edad de animal positivo ( $\pm$ 12 meses)
<input type="checkbox"/> Que convive en explotación con animal positivo
<input type="checkbox"/> Otros

#### LUGAR DE TOMA DE MUESTRAS

Matadero	Industria de transformación	Planta intermedio	Explotación	Incineradora
Establecimiento/explotación: _____ Nº de registro: _____				
Comunidad Autónoma: _____ Provincia: _____ Municipio: _____				

#### DATOS DEL ANIMAL

Fecha de sacrificio o muerte: _____ Nº identificación: _____
Fecha de nacimiento: _____ Sexo: _____ Raza: _____ Especie: _____

#### DATOS DE LA EXPLOTACIÓN

Nombre y NIF del propietario de la explotación: _____
Domicilio: _____
Nº de registro de la explotación: _____
Comunidad Autónoma de la explotación: _____
Provincia de la explotación: _____ Municipio: _____

Nombre, firma del Veterinario responsable de la toma de muestras: \_\_\_\_\_

Teléfono de contacto