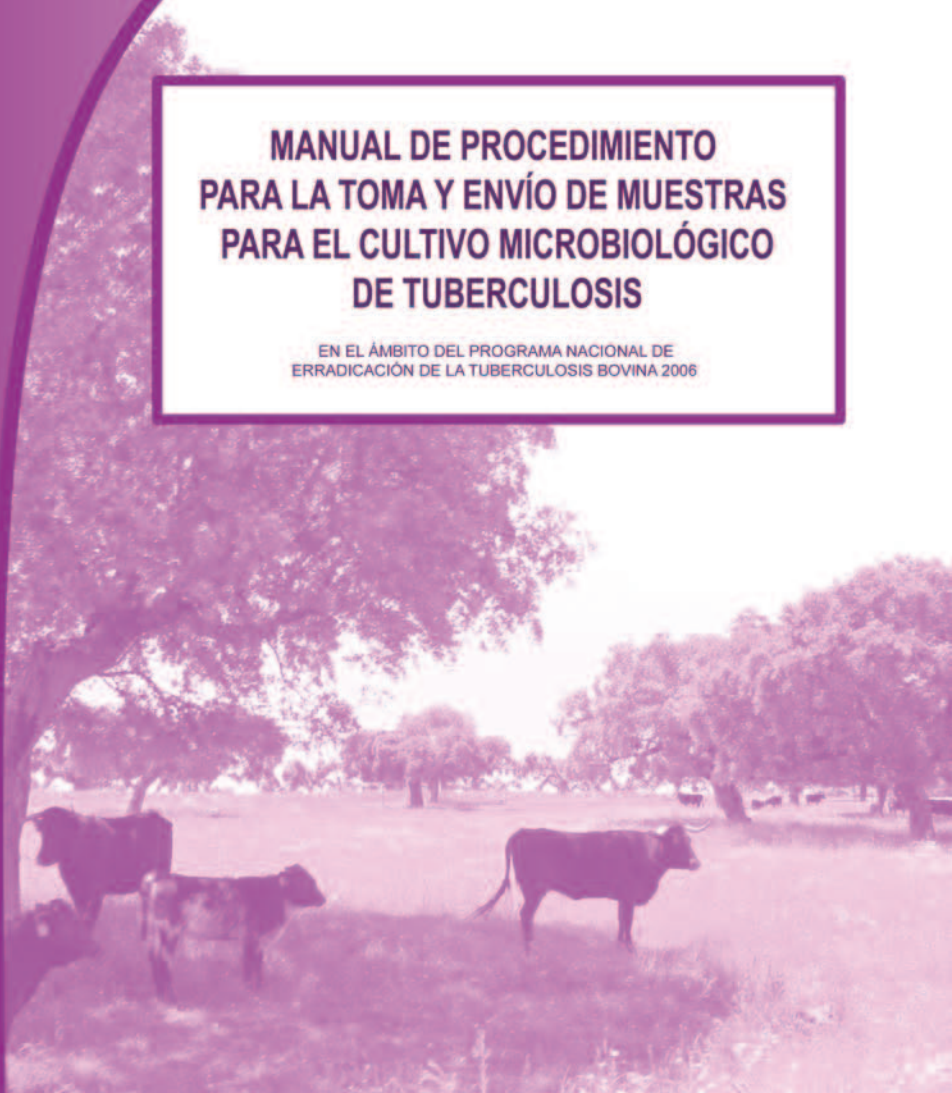


2006

*Manuales de
procedimiento*

**MANUAL DE PROCEDIMIENTO
PARA LA TOMA Y ENVÍO DE MUESTRAS
PARA EL CULTIVO MICROBIOLÓGICO
DE TUBERCULOSIS**

EN EL ÁMBITO DEL PROGRAMA NACIONAL DE
ERRADICACIÓN DE LA TUBERCULOSIS BOVINA 2006



2006



MINISTERIO DE
AGRICULTURA, PESCA
Y ALIMENTACIÓN

SECRETARÍA GENERAL DE AGRICULTURA,
DIRECCIÓN GENERAL DE GANADERÍA,
SUBDIRECCIÓN GENERAL DE SANIDAD ANIMAL



UNIVERSIDAD COMPLUTENSE
MADRID
LABORATORIO DE VIROLOGÍA SANITARIA (VISAVET)

Índice

	Pag.:
Ámbito de aplicación	3
Muestras de tejidos y órganos para el cultivo microbiológico	3
Toma de las muestras	
Conservación de las muestras	
Envío de las muestras al laboratorio	
Envío de cultivos de <i>Mycobacterium bovis</i> / <i>M. caprae</i>	5
Envío de ADN de <i>M. bovis</i> / <i>M. caprae</i>	5
Envío de perfiles de espigotipado	7
Documentación a adjuntar	7

Ámbito de aplicación

Este manual es aplicable en la toma de muestras y su envío al laboratorio para la identificación del agente etiológico de la tuberculosis bovina así como para el envío de cultivos con crecimiento positivo de *M. bovis* / *M. caprae*, ADN de *M. bovis* / *M. caprae*, y perfiles de espigotipado.



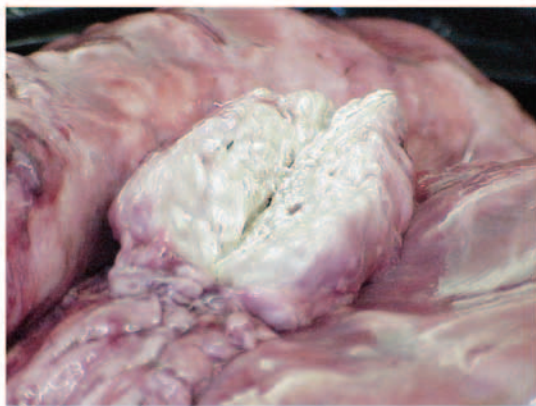
Muestras de tejidos y órganos para el cultivo microbiológico

a. Toma de muestras

Según la Directiva 64/432/EEC, el material patológico para la confirmación de *Mycobacterium bovis* debe ser tomado de nódulos linfáticos y órganos parenquimatosos anómalos tales como pulmón, hígado, bazo, etc.

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

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

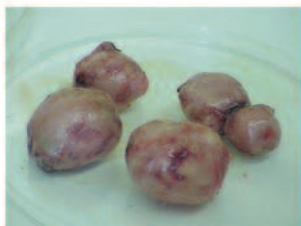


- Cabeza: retrofaringeo y mandibular.
- Cavidad torácica: mediastínico y bronquial.
- Miembro torácico: cervical superficial o preescapular.
- Cavidad abdominal: mesentérico y hepático.
- Glándula mamaria: supramamarios.

2006

MINISTERIO DE
AGRICULTURA, PESCA
Y ALIMENTACIÓNSECRETARÍA GENERAL DE AGRICULTURA,
DIRECCIÓN GENERAL DE GANADERÍA,
SUBDIRECCIÓN GENERAL DE SANIDAD ANIMALUNIVERSIDAD COMPLUTENSE
MADRID
LABORATORIO DE VIGILANCIA SANITARIA (VISAVET)

Este material debe recogerse porque son las localizaciones más frecuentes de *M. bovis* y *M. caprae* en los animales que están descritas en la literatura científica y/o porque así está contemplado por la normativa comunitaria.



La toma de muestras, en el caso de que el cadáver corresponda a un animal procedente de un rebaño de estatuto T3 y en el cual se suspende la calificación por la aparición de algún reaccionante positivo en espera de confirmación, comprenderá al menos 4 de las 5 localizaciones anteriores ya que en otro

caso la toma de muestras se considerará no válida y el estatuto del rebaño será retirado, independientemente del resultado de la prueba de aislamiento efectuada sobre los ganglios de la muestra incompleta.

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

b. Conservación de las muestras

Siempre que se pueda garantizar, la temperatura ideal 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) que además permite prolongar el tiempo de envío.

c. Envío de las muestras al laboratorio

Antes de remitir un envío, deben contactar con el responsable del Laboratorio autorizado donde vaya a realizarse el cultivo bacteriológico.

TOMA DE MUESTRAS

Las muestras se remitirán refrigeradas o congeladas en contenedores isotermos resistentes a los golpes, en las que se introducirán acumuladores de frío o nieve carbónica (de acuerdo con la temperatura a la que se encuentra y se vaya a enviar la muestra).

Envío de cultivos de *Mycobacterium bovis* / *M. caprae*

Este material se remitirá al Laboratorio de Vigilancia Sanitaria (VISAVET) del Departamento de Sanidad Animal de la Facultad de Veterinaria de Madrid para la base de datos Nacional de Caracterización Molecular de cepas de *M. bovis* y *M. caprae*.

El transporte de las muestras se realizará siguiendo lo descrito en la Guía Técnica del Real Decreto 664/1997 del 12 de Mayo para la Evaluación y Prevención de los Riesgos relacionados con la Exposición a Agentes Biológicos (Apéndice 5). En caso de no disponer de la Guía Técnica pueden ponerse en contacto con la Subdirección de Sanidad Animal o los laboratorios colaboradores.



En el caso de cultivos se remitirán los tubos de medio de cultivo (preferentemente sólido aunque también puede enviarse medio líquido) que tengan un crecimiento sospechoso y/o positivo de *M. bovis* / *M. caprae*.

Envío de ADN de *M. bovis* / *M. caprae*

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

2006



MINISTERIO DE
AGRICULTURA, PESCA
Y ALIMENTACIÓN

SECRETARÍA GENERAL DE AGRICULTURA
DIRECCIÓN GENERAL DE GANADERÍA
SUBDIRECCIÓN GENERAL DE SANIDAD ANIMAL



UNIVERSIDAD COMPLUTENSE
MADRID
LABORATORIO DE VIGILANCIA SANITARIA (VISAVET)

Para la extracción de ADN se debe seguir el siguiente protocolo:

- Extracción de ADN a partir de medio de cultivo sólido.

Con un asa de platino se selecciona una colonia sospechosa de ser *M. bovis* / *M. caprae* y se resuspende en 200 microlitros de agua ultrapura estéril. Esta suspensión se incuba durante 10 minutos a 100°C, y después de 5 minutos a temperatura ambiente se da un pulso en una minifuga. El ADN se conserva a una temperatura mínima de -20°C hasta su utilización.



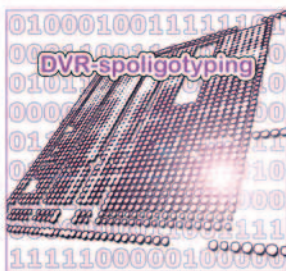
- Extracción de ADN a partir de medio de cultivo líquido.

Se recogen 200 microlitros de medio líquido con crecimiento de *M. bovis* / *M. caprae* con una micropipeta y se centrifuga a 12.000 revoluciones por minuto durante 10 minutos. Se descarta el sobrenadante y se resuspende el sedimento con 1 mililitro de agua destilada estéril. Se centrifuga en las mismas condiciones y se repite este lavado una vez más. Por último se resuspende el sedimento en 200 microlitros de agua ultrapura estéril y se procesa de la misma forma que la descrita para la extracción de ADN a partir de medio de cultivo sólido.

Las muestras de ADN congeladas se remitirán al Laboratorio de Vigilancia Sanitaria (VISAVET) con acumuladores de frío o nieve carbónica en una caja de poliespán. En estos casos, el laboratorio de origen debe conservar siempre una alícuota del ADN por si acaso hubiese alguna pérdida, deterioro, etc. en el transporte.

MUESTRAS DE ADN

Envío de perfiles de espoligotipado



En el caso de que el laboratorio realice la técnica de caracterización molecular para los miembros del complejo *M. tuberculosis* "Direct Variable Repeat Spacer Oligonucleotide Typing o DVR-spoligotyping" deberá remitir el perfil de espoligotipo obtenido para su incorporación en la base de datos Nacional. Para ello, enviará al Laboratorio responsable de la actualización de la base de datos la radiografía de los espoligotipos escaneada y guardada en formato tif. En la radiografía se debe identificar claramente las posiciones de los controles positivos y negativos, así como las referencias

de las cepas de *M. bovis* / *M. caprae* en estudio.

La tuberculosis en fauna silvestre es parte integrante del programa nacional de erradicación de la Tuberculosis para el futuro establecimiento de medidas suplementarias. Debido a esto, las cepas de *M. bovis* y *M. caprae* o perfiles de espoligotipo procedentes de animales salvajes también se incorporarán en la base de datos Nacional para poder realizar estudios epidemiológicos.

Documentación a adjuntar

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

- Identificación completa del animal.
- Código de la explotación.
- Datos del veterinario o remitente y teléfono de contacto.
- Órganos o linfonodos remitidos.
- Zona y fecha de recogida.
- Convivencia con otras especies animales.



En caso de tener alguna de este manual puede consultar a la Subdirección General de Sanidad Animal, Laboratorio Nacional de Referencia o Laboratorio de Vigilancia Sanitaria (Tel.: 913 944 083).

*Manuales de
procedimiento*

2006

PROGRAMA NACIONAL DE ERRADICACIÓN DE LA TUBERCULOSIS BOVINA



SECRETARÍA GENERAL DE AGRICULTURA
DIRECCIÓN GENERAL DE GANADERÍA
SUBDIRECCIÓN GENERAL DE SANIDAD ANIMAL

www.mapa.es



UNIVERSIDAD COMPLUTENSE
MADRID
LABORATORIO DE VIGILANCIA SANITARIA

www.vigilanciasanitaria.es