

MATERIAL PARA LA PREPARACIÓN DEL TEMA 1

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 relacionado 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 de halla integrada en un ámbito reglamentado, se debe optar por el sistema de las “buenas prácticas de laboratorio” (BPL). En caso contrario, el 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 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 (ejemplo planes de vigilancia, control y erradicación de enfermedades animales).

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 un 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

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 otro garantiza 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 a 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**.

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.

La LEBA es un documento público y 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.

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

En el punto 1.5 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.

Además, dentro del ámbito de Sanidad debemos hacer mención a la CEA-ENAC-22 de "Laboratorio de ensayos en el ámbito de la Sanidad Animal: Directrices para la acreditación".

El objetivo de este documento es establecer los criterios para la acreditación de los laboratorios que realizan ensayos en el ámbito de la Sanidad Animal (ej. inmunológicos, basados en biología molecular, etc.).

En este documento se establece una diferenciación entre los **métodos de ensayo** atendiendo al nivel de confianza que aportan y que, por tanto, marcarán el nivel de actividades adicionales que ENAC requerirá en relación la demostración de su validez:

1. Métodos de referencia (Tipo I). Son métodos que gozan de reconocimiento nacional o internacional y son ampliamente aceptados. Entre los métodos de referencia se encuentran los publicados en legislación, normas internacionales o nacionales elaboradas por los Organismos de Normalización o por Organizaciones Técnicas reconocidas (ej. OIE, EFSA, laboratorios nacionales o comunitarios de referencia, etc.).
2. Métodos basados en métodos de referencia (Tipo II). Métodos descritos en procedimientos internos del laboratorio, que están basados en métodos de referencia y que no suponen una modificación técnica respecto del método de referencia que ponga en cuestión su validez técnica. Deben mantenerse actualizados en relación con el método de referencia en que se basan.
3. Otros métodos (Tipo III). Son aquellos métodos desarrollados por el propio laboratorio o por cualquier otra parte y que no disponen del reconocimiento de los métodos de referencia. Deben contar con suficientes garantías de validez basadas en la disponibilidad de la información necesaria sobre sus características de funcionamiento, que permitan valorar si son adecuados al uso previsto.

En lo referente a las características de funcionamiento de los métodos, y en concreto a la **validación** se establece la siguiente diferenciación:

Los Métodos de referencia (Tipo I) y los Métodos basados en métodos de referencia (Tipo II) no requieren de una validación completa si una Verificación Interna del método. Para los considerados Otros métodos (Tipo III, desarrollados por el laboratorio o por cualquier otra parte), el laboratorio debe disponer de evidencias completas de que dichos métodos han sido adecuadamente validados de acuerdo a estándares reconocidos, así como de toda la información sobre el trabajo experimental realizado para la validación del método.

El **aseguramiento de la calidad** debe ser tanto interno como externo y puede aplicarse de diferentes formas:

CONTROL INTERNO

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: evaluando la eventual discrepancia de resultados.
- 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.

CONTROL EXTERNO (intercomparaciones)

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.

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.

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*.

La Norma se actualizó en 2005, siendo en 2017 la publicación de la que actualmente está en vigor. 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 les 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 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.

- 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 de 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, en función de la actividad del Laboratorio. Una Opción A y una opción B están disponibles. Para cumplimentar con la ISO/IEC 17025 nueva versión debemos:
 - 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 a 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. Determina 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.

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.

www.enac.es

MATERIAL NO OFICIAL

MATERIAL PARA LA PREPARACIÓN DEL TEMA 2

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.

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.

2. SISTEMAS DE GESTIÓN AMBIENTAL.

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 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.

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.

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.

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

La primera publicación de la Norma fue en 1996, y en 2004 se publicó una segunda versión del documento. 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 gestión

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.

Cabe reseñar la adopción de la estructura de alto nivel en la elaboración de la versión del 2015 lo que ha constituido el punto de inflexión a la hora de entender e implantar la nueva ISO 14001. ¿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.

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.

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 APPLICABLES 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 un 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 CO₂,
- 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 su 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 un control) o indirecto (sobre los que no se dispone control pero si una influencia como 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 beneficio) para la formulación de los objetivos del próximo año.

La identificación de los aspectos ambientales del LCV 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. Así por ejemplo 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 poder 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 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 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.

MATERIAL NO OFICIAL

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 3

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 comprara 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.

Debemos diferenciar dos tipos de auditorías: internas y externas.

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” 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. 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.

2ª Evaluación

Fase en la que ENAC designa al equipo auditor quien realizará el estudio documental previo y las visitas de la auditoría como tal. La auditoría se desarrolla en 3 fases:

- a. Reunión inicial
- b. Desarrollo de la auditoría:
- c. Reunión final

Posteriormente, el equipo auditor 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.

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.

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 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.

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.

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.

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.

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.
- 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.

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 por 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.

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.

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.

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.

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 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 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

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.

MATERIAL NO OFICIAL

MATERIAL PARA LA PREPARACIÓN DEL TEMA 4

VALIDACIÓN DE ENSAYOS. 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. INTRODUCCIÓN

2. VALIDACIÓN DE ENSAYOS

3. CRITERIOS DE VALIDACIÓN

4. ETAPAS DE VALIDACIÓN

4.1 DEFINICION Y ESPECIFICACIÓN DE REQUISITOS

4.2 DISEÑO EXPERIMENTAL

4.3 VALIDACIÓN O DEMOSTRACIÓN

4.4 DECLARACIÓN DE MÉTODO VALIDADO

ANEXO I. ESQUEMA DE PROCESO DE VALIDACIÓN

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.

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 y fiables, 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 17025 de "Requisitos generales relativos a la competencia de los laboratorios de ensayo y calibración", contiene todos los requisitos que los laboratorios 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

2. VALIDACIÓN DE ENSAYOS

En lo referente a la realización de los ensayos, especifica 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. Podemos definir por tanto **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.

Verificación 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. Es empleado en la confirmación de la idoneidad y se justifica en la medida que permite simplificar las actuaciones a realizar por un laboratorio para la puesta en práctica de un procedimiento de medición, en lugar de una validación completa.

Ajuste a propósito se define como el grado de que los datos producidos por un proceso de medida permitan al usuario tomar decisiones técnica y administrativamente correctas para un propósito determinado.

Si bien este paso, de verificación o validación, 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 |

Los pasos a seguir en la validación de pruebas tienen el propósito de responder a una pregunta importante: **“¿está una prueba determinada lista para ser implementada en un laboratorio clínico, analítico o de diagnóstico?”**

A grandes rasgos podríamos decir que la validación implica establecer, junto con su rendimiento analítico, sus características y limitaciones.

Los datos obtenidos de la validación, deben registrarse de forma que puedan detectarse tendencias y, siempre que sea posible, deben aplicarse técnicas estadísticas para analizar los resultados.

Cabe reseñar que en el ámbito de la Sanidad Animal, mediante el documento CEA-ENAC-22 de *“Laboratorio de ensayos en el ámbito de la Sanidad Animal: Directrices para la acreditación”*. En este documento se establece una diferenciación entre los métodos de ensayo (Métodos tipo I, II y III) atendiendo al nivel de confianza que aportan y que, por tanto, marcarán el nivel de actividades adicionales que ENAC requerirá en relación a la demostración de su validez:

En lo referente a las características de funcionamiento de los métodos, y en concreto a la validación se establece la siguiente diferenciación:

Los Métodos de referencia (Tipo I) y los Métodos basados en métodos de referencia (Tipo II) no requieren de una validación completa si una Verificación Interna del método. Para los considerados Otros métodos (Tipo III, desarrollados por el laboratorio o por cualquier otra parte), el laboratorio debe disponer de evidencias completas de que dichos métodos han sido adecuadamente validados de acuerdo a estándares reconocidos, así como de toda la información sobre el trabajo experimental realizado para la validación del método.

3. CRITERIOS DE VALIDACIÓN

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.

Algunos de los parámetros cuya determinación se debe incluir para la validación son:

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. Hace referencia a la capacidad de la técnica para detectar un determinado analito o cuantificarlo.

- **Linealidad:**

Podemos definirla como la capacidad de un método analítico de obtener resultados linealmente proporcionales a la concentración del analito en la muestra, dentro de un intervalo determinado. Dentro de este parámetro estudiamos la proporcionalidad entre la concentración del analito y la respuesta, así como el intervalo o rango de concentraciones de analito 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.

El ensayo de linealidad puede realizarse tanto sobre soluciones patrón de analito, como sobre muestras problema que contengan concentraciones crecientes de analito. Se realizará el tratamiento matemático de los resultados normalmente con programas informáticos, así como el tratamiento estadístico de los datos para evaluar la linealidad y la proporcionalidad.

- **Precisión:**

Es el grado de concordancia entre los valores de una serie repetida de ensayos analíticos efectuados sobre una muestra homogénea. Se requiere para su estudio la repetición del análisis sobre una muestra, pueden realizarse concretamente tres tipos de estudios:

Repetibilidad: medida de la precisión de un método efectuado en las mismas condiciones, sobre la misma muestra, por un mismo analista, en el mismo laboratorio, con los mismos aparatos y reactivos, y en un corto intervalo de tiempo.

Reproducibilidad: medida de la precisión de los resultados de un método analítico efectuado sobre la misma muestra, pero en condiciones diferentes (diferentes analistas, aparatos, días,...en el laboratorio, *precisión intralaboratorio*). Cuando los laboratorios son distintos hablamos de *precisión interlaboratorio*.

Robustez: grado de reproducibilidad de un método analítico sometido deliberadamente a pequeñas variaciones con objeto de conocer su estabilidad frente a ellas y definir las de mayor influencia sobre la variabilidad de los resultados. Los resultados de los estudios de precisión se expresan en forma de desviación estándar y coeficiente de variación.

- **Exactitud**

Indica la capacidad del método analítico para dar resultados lo más próximos posibles al valor verdadero. Podremos tener mediciones precisas pero poco exactas,

sin embargo para que un método sea exacto se requiere un cierto grado de precisión.

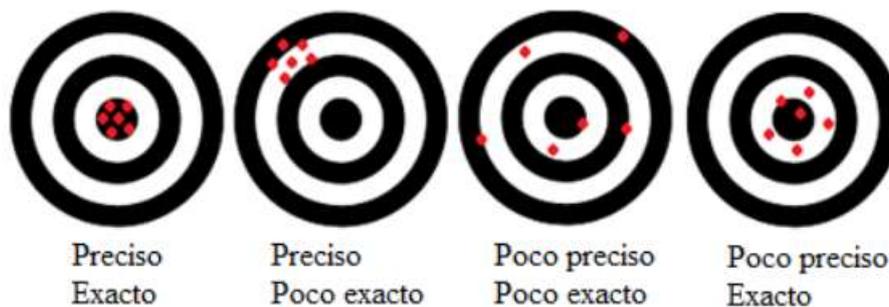
Una falta de exactitud puede darse por exceso o por defecto. Las desviaciones por exceso suelen producirse cuando existen interferencias analíticas; mientras que las desviaciones por defecto suelen darse en métodos analíticos muy laboriosos.

Para su estudio es necesario disponer de un valor de referencia. Existen tres posibles vías para obtener el valor de referencia:

- mediante una referencia externa: material de referencia certificado (MRC), material de referencia o patrón químico, muestra obtenida a partir de un programa interlaboratorio.
- Mediante comparación de métodos: comparación interna que consiste en el estudio del comportamiento de un analito en una muestra analizada por diferentes métodos en el propio laboratorio; o comparación externa que consiste en la participación en un programa interlaboratorio.
- Mediante el método de adiciones: se añade una cantidad conocida de patrón a la muestra y se compara la diferencia entre los resultados que se obtienen de la muestra sin adicionar y la muestra adicionada, con el valor teórico de la adición que se toma como valor de referencia.

Matemáticamente la exactitud suele expresarse en forma de diferencia entre el valor hallado y el valor de referencia. Estadísticamente se utiliza el sistema de Test de *t de Student*.

En la siguiente imagen se puede observar la diferencia entre la precisión y la exactitud.



- 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 del método analítico de detectar un analito o secuencia genómica que es propia del microorganismo buscado, y excluye todos los demás microorganismos conocidos que pudieran dar una reacción cruzada.
- 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. Caracteriza el ámbito de aplicación de una prueba de cribado.
- Sensibilidad analítica:
Es la capacidad de un método analítico de registrar ligeras variaciones de concentración.
 - Límite de detección (L_C):
Es la menor concentración o cantidad de analito detectable con razonable certeza por un procedimiento analítico dado; que será la cantidad o concentración mínima a partir de la cual es factible realizar el análisis
 - Límite de cuantificación (L_D):
Es la menor concentración o cantidad de analito de una muestra que puede ser determinada con aceptable precisión y exactitud bajo las condiciones experimentales establecidas. Este será un término cuantitativo

Parámetros para la evaluación del rendimiento diagnóstico: Hace referencia a la capacidad del método para discernir entre muestras positivas y negativas.

- Sensibilidad diagnóstica:
Proporción de muestras de animales de referencia que se sabe que están infectados y que dan positivo en una prueba.
- Especificidad diagnóstica:
Proporción de muestras de animales de referencia que se sabe que no están infectados y que dan negativo en una prueba.

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. Para ello se tendrá en cuenta el estudio de los resultados obtenidos durante el proceso de validación del método (precisión, exactitud,...) y el estudio de las posibles causas de incertidumbre agrupándolas bien por etapas (toma de muestras, extracción, preparación de las curvas de calibración, etc.) o por magnitudes implicadas (pesada, volumen, calidad de reactivos, etc.). La combinación de todas las contribuciones consideradas nos permitirá calcular la incertidumbre.

Por otro lado el intervalo de trabajo o rango también se confirmará en función de los resultados obtenidos después de haberse llevado a cabo la evaluación de los distintos parámetros de validación.

4. ETAPAS DE VALIDACIÓN

El proceso de validación puede descomponerse en sus cuatro partes esenciales.

4.1 DEFINICION Y ESPECIFICACIÓN DE REQUISITOS

Definición y especificación de los requisitos a conseguir con el método de ensayo o calibración, es decir, hay que definir el alcance, el propósito de dicho método o ensayo.

Los requisitos habituales sobre el método vendrán impuestos por los clientes o por la legislación. 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.

Es conveniente considerar aquellos aspectos relacionados con el alcance del método (número de analistas a determinar, el analito, su concentración o el intervalo de concentraciones, la matriz (o matrices), pues ello condicionará algunas de las características del método.

Una parte inicial y esencial del proceso es además el estudio y búsqueda de documentos normativos editados por entidades de normalización o de prestigio reconocido (EURL, OiE..) ya que suelen contener la información necesaria ajustada a determinados usos; cuando el laboratorio compruebe que no es así, siempre puede complementarlos en medida de lo necesario o, incluso, desarrollar sus propios métodos. Antes de incorporar un método en la rutina del laboratorio, este deberá siempre verificar su capacidad para aplicarlo en las mismas condiciones que indique el documento normativo seleccionado.

4.2 DISEÑO EXPERIMENTAL

En el caso que se recurra a un **proceso de verificación** del desempeño de un método, es necesario partir de un método normalizado, o con un amplio reconocimiento en el sector y confirmar que se obtienen resultados equivalentes, pero en las condiciones de trabajo del laboratorio, su equipamiento, personal, etc. utilizando el método tal y como establece el documento normativo, o con modificaciones o adecuaciones concretas para su adaptación a las condiciones de trabajo del laboratorio.

Es difícil establecer una pauta general para establecer la extensión de una verificación, ya que depende de la complejidad y tipología de la actividad y puesto que las validaciones originales, también lo son. Al menos, son necesarias pruebas de confirmación de la veracidad, la precisión y la especificidad en los métodos cuantitativos, y para los métodos cualitativos especificidad, límite de detección y precisión. Esta simplificación también afecta al número de muestras frente a una validación completa. Además, y a diferencia de lo que ocurre con la validación, en una verificación las especificaciones a cumplir vendrán establecidas en los documentos normativos seleccionados.

Sin embargo, cuando el laboratorio recurre a métodos desarrollados internamente, no normalizados o normalizados, pero con un uso que está fuera del alcance del documento, entonces el laboratorio deberá validar estos procedimientos.

La **validación** requiere un procedimiento de trabajo analítico desarrollado, es decir, un **procedimiento de validación** con el que se pretende comprobar el proceso de validación, el cual debe contener los criterios de validación (test de aceptación) para la toma de decisiones. Deben definirse los **parámetros de la validación** y los **criterios de aceptabilidad para cada parámetro**, ya que como se ha mencionado anteriormente, los parámetros de un método, son las características del mismo, que le hacen apto para un uso previsto y que se han visto anteriormente.

Se debe definir el **grado de validación** que es necesario en función de las circunstancias que rodean al método. Puede ser:

- Una validación **completa** evaluando todos los parámetros con MRC o con una muestra analizada por un método alternativo, preferiblemente un método de referencia.
- También se puede realizar una **ampliación de validación** a otras matrices cuando el método ya ha sido validado para una matriz anteriormente, o existe un estudio preliminar de precisión y exactitud (criterios de aceptación).
- O se puede realizar un **ensayo de adecuación** lo que implica que el método ya ha sido validado por otro laboratorio de ensayo competente estimando sus propias características de precisión.

En cuanto a la **selección de las características a validar**, se debe tener en cuenta que dependen del tipo de método y del objetivo.

Al igual que en la verificación, las actividades relacionadas con la validación de un método de desarrollo interno, no normalizado o normalizado usado fuera de su alcance,

varían en función de su tipología y tipos de medición. En el caso de **procedimientos de medición cualitativos**, al menos serán necesarias pruebas de:

- Confirmación de identidad.
- Especificidad o selectividad.
- Límite de detección.
- Precisión, en condiciones de:
 - o Repetibilidad, a corto plazo.
 - o Precisión intermedia, a medio plazo.
 - o Reproducibilidad, a más largo plazo.

Los **métodos cuantitativos** requerirán otro nivel de evaluación más complejo. Una vez confirmado o no su comportamiento lineal y, a partir de este, el intervalo de medición, se podrán incluir estudios relacionados con el desempeño, como son:

- Especificidad o selectividad.
- Límite de cuantificación, cuando sea aplicable.
- Precisión, en condiciones de:
 - o Repetibilidad, a corto plazo.
 - o Precisión intermedia, a medio plazo.
 - o Reproducibilidad, a más largo plazo.
- Veracidad.
- Recuperación.
- Robustez.
- Evaluación de la incertidumbre de la medición.

Se deberá **planificar** el desarrollo identificando las etapas, recursos y controles intermedios y finales que permitan alcanzar el fin pretendido (Plan de Validación). Se tendrá en cuenta:

- La preparación de muestras o materiales que van a ser analizados, testigos reactivos, blanco matriz, material control, MRC, matrices de las muestras, disoluciones patrón (teniendo en cuenta que se encuentren convenientemente preparados y calibrados), etc.
- Equipamiento necesario incluyendo la versión de software y los datos de referencia. Se debe tener en cuenta que los equipos deberán estar calibrados para asegurar la fiabilidad de sus medidas.
- Otros materiales necesarios, como reactivos, material de laboratorio, etc.
- Personal analista necesario, debidamente cualificado para la manipulación de las muestras, preparación de reactivos, manejo de equipos, etc. Para el desarrollo de las pruebas de validación, el personal a cargo deberá conocer el procedimiento de método de ensayo y el número de ensayos o mediciones a realizar de acuerdo a lo establecido en el plan de validación.
- Además, se deberá definir la figura del responsable de validación con las competencias y autorización designada para realizar el seguimiento de la validación,

análisis de resultados, confirmación de aceptación de criterios, etc. Deberá con los resultados obtenidos de cada prueba realizar los cálculos matemáticos, comparativos y/o estadísticos correspondientes a cada ensayo para lo cual podrá utilizar para ese fin un software estadístico, calculadora o una hoja de cálculo Excel, etc.

- Se describirá (secuencia ordenada), el proceso seguido para determinar cada uno de los parámetros de validación predefinidos, incluyendo el número de repeticiones, y/u observaciones, registrando cualquier dato o variación que no esté previamente reflejada en este procedimiento o en el procedimiento de ensayo.
- Se describirá la programación para el procesamiento de todas las submuestras previstas cada día, definiendo las variaciones de personal y equipos para poder evaluar el método en condiciones de repetibilidad y reproducibilidad.
- Se deberá definir los puntos de control para cada etapa identificada 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. Es necesario establecer un plan de control de aseguramiento de la validez de los resultados para asegurar que los datos obtenidos entran dentro de los resultados esperados o dicho de otro modo, no se desvían del valor asignado más de los límites control que se han establecido.
- Se deberá realizar la identificación de riesgos inherentes o consecuencia de errores de aplicación y las actuaciones en caso de producirse desviaciones.
- Se deberá tener en cuenta las precauciones y limitaciones, relacionadas con los reactivos tóxicos que se pudieran emplear, agentes biológicos zoonóticos, organismos modificados genéticamente, etc. Es indispensable cumplir con la evaluación de riesgos y medidas de contención necesarias. Igualmente, habrá que tener en cuenta limitaciones técnicas, de infraestructura, compra de MRC, etc. Todas estas limitaciones se asocian pues, a la optimización en el centro de trabajo con el material, equipos a disposición, etc.

Como normas básicas que deben cumplirse en la validación de un ensayo podemos citar:

- Debe validarse el procedimiento completo; la etapa de medida instrumental es la que suele introducir menos error; por el contrario las etapas previas que requieren una importante intervención humana, son susceptibles de incorporar mayor sesgo y/o componentes de incertidumbre mayores.
- Debe validarse todo el intervalo de concentraciones.
- Debe validarse teniendo en cuenta la variedad de matrices que nos encontraremos en las muestras de rutina.

Se deberá contar con información documentada y registros de la toma de datos, cálculos y expresión de resultados. Los datos obtenidos en la validación deben registrarse de forma que puedan detectarse tendencias y, siempre que sea posible, deben aplicarse técnicas estadísticas para analizar los resultados. Asimismo, cualquier modificación

realizada al plan de validación durante el proceso debe quedar debidamente documentada.

Las pruebas experimentales se realizarán normalmente por el propio laboratorio y con sus recursos, pero en proceso de planificación inicial será interesante considerar fuentes externas de apoyo que permitan, por ejemplo, realizar mediciones con métodos ya validados o mediante la participación en comparaciones interlaboratorio.

Como hemos mencionado anteriormente, en ocasiones, el método deberá ser diseñado por el laboratorio, partiendo de cero, o recopilando información de todas las fuentes posibles (publicaciones científicas, libros, artículos, investigaciones, etc.).

4.3 VALIDACIÓN O DEMOSTRACIÓN

Validación o demostración de que el método descrito es capaz de cumplir los requisitos y datos de partida, para lo que se suelen utilizar algunas técnicas y métodos estadísticos, entre los que se pueden citar los siguientes:

- Calibración utilizando patrones de referencia o materiales de referencia.
- Comparación de los resultados conseguidos con otros métodos.
- Comparación entre distintos laboratorios, con los mismos o diferentes métodos.
- Evaluación sistemática de los factores que influyen en los resultados.
- Estimación de la incertidumbre de los resultados basada en el conocimiento científico de los principios teóricos del método y la experiencia práctica.

Se deberá evaluar para cada parámetro de validación, si los resultados de las pruebas son satisfactorios, es decir, si cumplen con los criterios de aceptabilidad establecidos en el plan, se considera que el método es aceptable.

4.4 DECLARACIÓN DE MÉTODO VALIDADO

Declaración sobre las condiciones y circunstancias en las que el método ha sido validado y, por tanto, es aplicable.

Toda la información se recopila en un informe que 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.

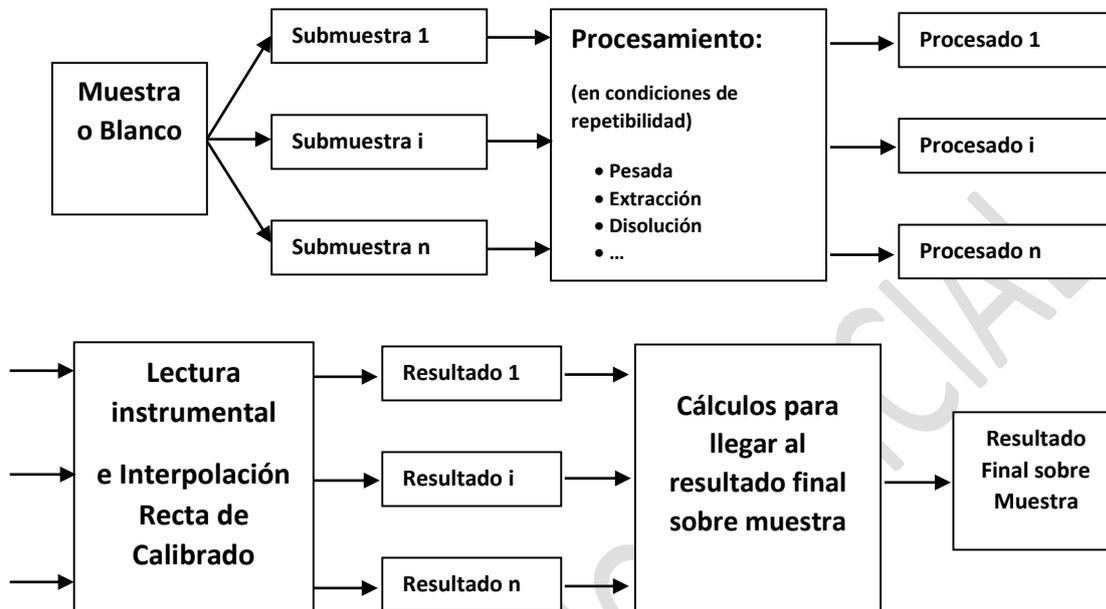
Por último, dos cuestiones que el laboratorio no debe olvidar para no comprometer su competencia e integridad son:

- Una vez los métodos han sido verificados o validados, estos deben aplicarse de rutina en condiciones idénticas. Cualquier desviación deberá ser comunicada a los clientes, tener una base técnica justificada, documentarse en la extensión necesaria y autorizarse por personal competente para ello.
- Cuando se producen cambios en las condiciones del método (por ejemplo, nueva versión de la norma en la que se basa el método interno, nuevos equipos, cambio en la versión del software y datos de referencia, método no empleado durante un largo periodo de tiempo, resultados de los controles de calidad) puede ser necesario volver a realizar nuevas pruebas de verificación o validación para garantizar que se mantiene su competencia y, por tanto, deberá valorarse también si es necesario confirmar la competencia del personal. Si el laboratorio trabaja con métodos normalizados, deberá estar atento a los cambios que pueda realizar el emisor del mismo para valorarlos e incorporarlos en la medida necesaria a su trabajo diario, previa verificación.

MATERIAL NO ORIGINAL

ANEXO I. ESQUEMA DE PLANIFICACIÓN DE PROCESO DE VALIDACIÓN

Se muestra esquemáticamente la planificación del proceso de validación para facilitar su comprensión.



BIBLIOGRAFÍA

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

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

Guía para la aplicación de UNE-EN ISO/IEC 17025:2017, Pedro Pablo Morillas Bravo. AENOR ediciones.

Manual práctico de calidad en los laboratorios. Enfoque ISO 17025. Salvador Sagrado, Maria José Medina, Emilio Bonet y Yolanda Martín. AENOR ediciones.

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).

OIE, Capítulo 1.1.5 Principios y métodos de validación de las pruebas de diagnóstico de las enfermedades infecciosas. (Mayo 2013).

MATERIAL NO OFICIAL

MATERIAL PARA LA PREPARACIÓN DEL TEMA 5

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. DESARROLLO DE UN ENSAYO DE INTERCOMPARACIÓN

2. TRATAMIENTO E INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

2.1. TRATAMIENTO ESTADÍSTICO DE LOS RESULTADOS

2.1.1. Ensayos cualitativos

2.1.2. Ensayos cuantitativos

2.1.3. Ensayos semicuantitativos

2.2. ACTUACIÓN ANTE RESULTADOS NO SATISFACTORIOS

3. ERRORES COMUNES

1. CONCEPTO Y TIPOS DE ENSAYOS DE INTERCOMPARACIÓN

1.1. CONCEPTO

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), los **ensayos de intercomparación** 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”*.

Uno de los **principios básicos** de la organización y participación en ensayos de intercomparación es que estos 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 diversas conclusiones, haciendo de los ensayos de intercomparación una valiosa herramienta para diversos objetivos.

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. Por otro lado, permite **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**.

1.2. TIPOS DE ENSAYOS DE INTERCOMPARACIÓN

Los ensayos de intercomparación pueden clasificarse de acuerdo con diversos aspectos.

La clasificación más común se realiza teniendo en cuenta la **finalidad** con la que se realiza el ensayo de intercomparación, pudiendo distinguir:

- 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. 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.

- Ensayos **colaborativos**. Son 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**.
- Ensayos **de certificación de materiales de referencia**. 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.
- Otros 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.

1.3. DESARROLLO DE UN ENSAYO DE INTERCOMPARACIÓN

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 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.

La fase de planificación **no puede ser subcontratada a terceras partes**, según lo dispuesto en la ISO 17043.

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.

Posteriormente, será 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. 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 intralaboratorio. 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** de un **número representativo** de las muestras de ensayo de todo el lote.
- 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.

En la interpretación de estos tests de homogeneidad y estabilidad, 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**.

Sobre las muestras enviadas es también fundamental calcular el **valor asignado**, así como el valor de **incertidumbre** asociado a este.

Una vez los laboratorios han **aceptado la participación en el programa**, el organizador deberá enviar a los participantes la documentación definitiva, indicando el **objetivo u objetivos del ensayo**, el **número de muestras a ensayar**, los **métodos de ensayo admitidos**, los **criterios para el envío de resultados**, el **calendario** con los plazos para el envío de muestras y de resultados, el **procedimiento** en caso de **desviaciones** y un documento de **declaración de aceptación**, que deberá devolverse firmado por el participante.

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. 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.

Tras la recepción de las muestras, tendrán lugar las fases de ensayo y de envío de resultados al organizador. 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.

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, incluyendo:

- 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

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 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 **cuantitativa o cualitativa**.

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 pruebas para determinar la **homogeneidad y estabilidad** de las muestras, empleando los resultados obtenidos por todos los laboratorios.

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.

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 σ_{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).

2.1.1. 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.

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 (κ)**. 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

$$\kappa = \frac{Po - Pe}{1 - Pe}$$

2.1.2. 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 (σ_{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.

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:

$$Z = \frac{V_L - V_A}{\sigma_{obj}}$$

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**

2.1.3. Ensayos semicuantitativos

Se podrán estudiar como **cualitativos**, 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 mercado**. 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 **instrumento o los instrumentos** 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. 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.

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)

MATERIAL NO OFICIAL

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 6

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.

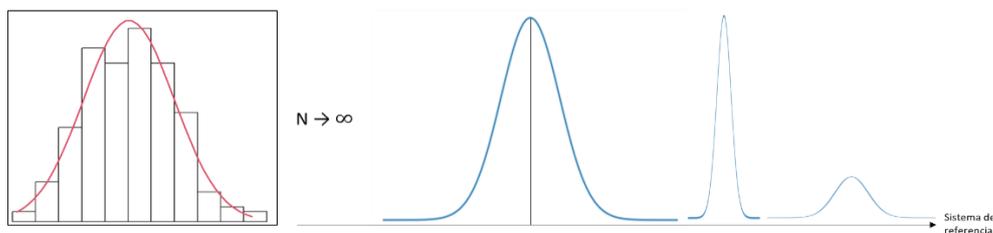
De todos es sabido que cualquier disciplina de la ciencia moderna tiene un carácter cuantitativo. Obviamente en muchos casos una respuesta cuantitativa es mucho más valiosa que una cualitativa. Para un científico tiene más valor conocer que una muestra contiene tal nivel de albúmina, anticuerpos, etc. 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 μ

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 σ . 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:

$$CV (\%) = \frac{\sigma}{\mu} \cdot 100 = \frac{\text{desviación típica}}{\text{media}} \cdot 100$$

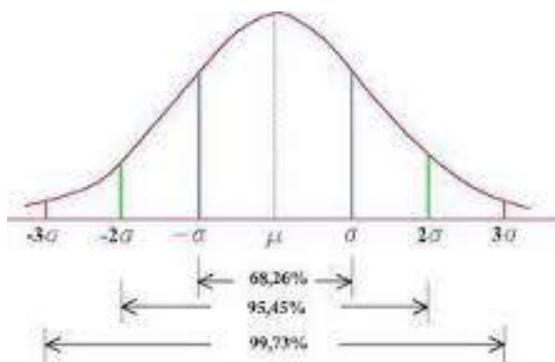
Este parámetro permite comparar la variabilidad de dos poblaciones con distintas magnitudes (medias). Al expresarse por unidad de la población permite distinguir aquella población más precisa (la de menor CV).

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 (μ). 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:

$$F = \frac{s_1^2}{s_2^2} \quad \text{Siendo } s_1^2 > s_2^2.$$

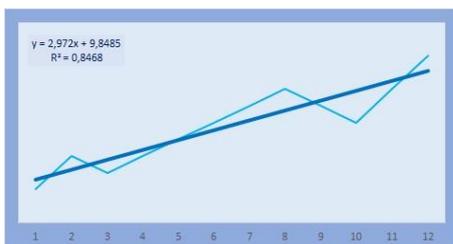
Si el valor $F_{calc} > F_{tab}$ para el nivel de probabilidad considerado se concluye con que la precisión de ambos conjuntos de datos es diferente.

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.).

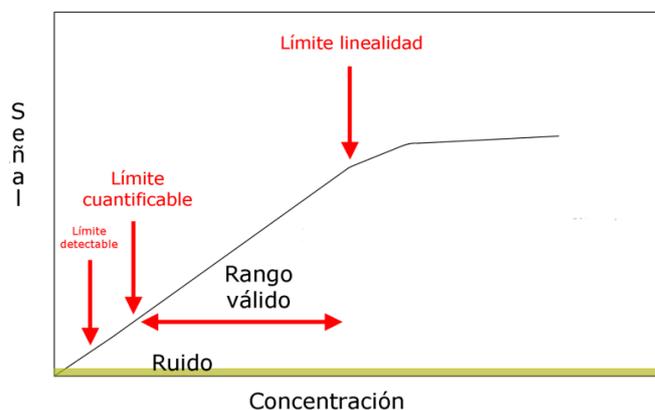
En un caso de éstos, se dispone de un conjunto de valores: una variable independiente (x) (concentración, cantidad, etc.) y una variable dependiente (y) (absorbancia, área o altura cromatográfica, etc.) cuya representación en un sistema cartesiano puede exhibir cierta tendencia o dependencia entre las 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.

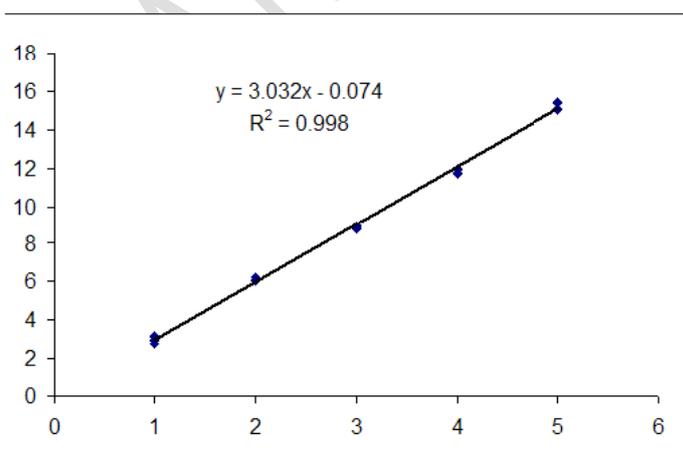
5.1. REGRESIÓN LINEAL



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



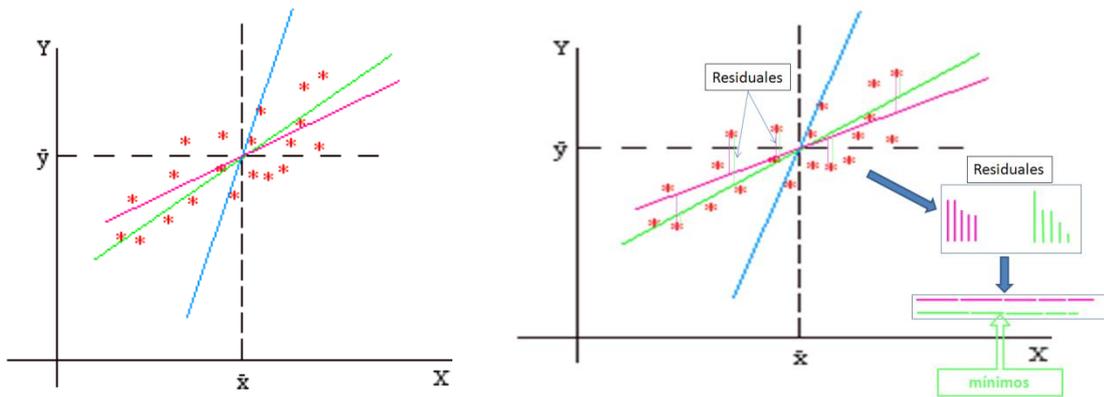
se puede interpolar el valor de señal obtenido para una muestra problema y calcular así la concentración de analito en la misma.

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 cuadráticos 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:

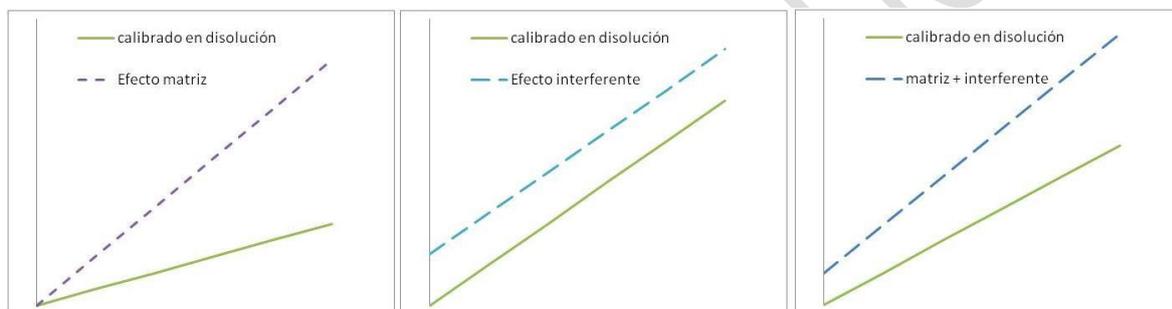
$$S_k = \frac{S_{y,x}}{b} \cdot \sqrt{1 + \frac{1}{n} + \frac{(Y_k - \bar{Y})^2}{b^2 \cdot \sum_{i=1}^n (X_i - \bar{X})^2}}$$

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:

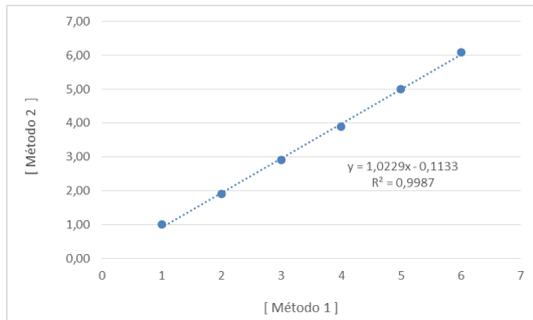
- en disolución: varias disoluciones de patrones en el disolvente de disolución
- en matriz: varias muestras de una matriz blanco (una matriz similar a la que se le aplica el método o la propia matriz objeto del método) adicionadas de patrón del analito de interés.

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

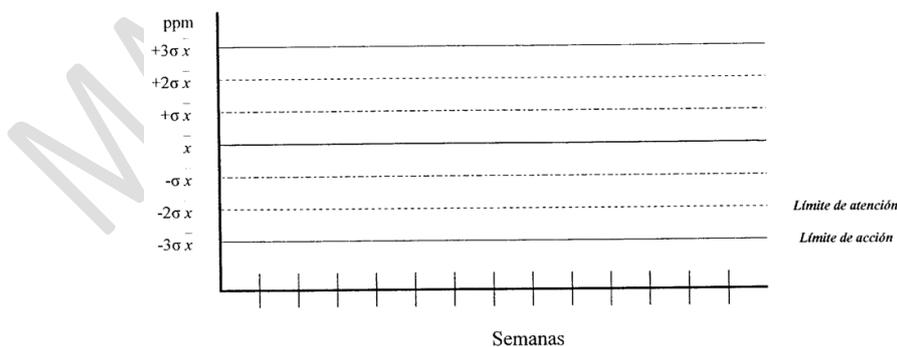
b) Pendiente $\neq 1$ y ordenada diferente $\neq 0$, => Los dos métodos ofrecen resultados diferentes. Aquí habrá que analizar la pendiente (si la pendiente $b > 1$ => el método

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

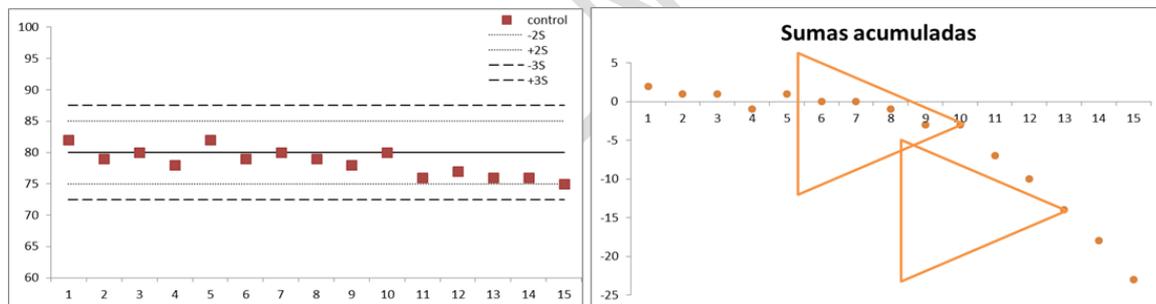
momento un resultado cae fuera de esta línea y cerca de la de acción, ello significa que el sistema está fuera de control y se debe detener e investigar las causas que conducen a esa situación.

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° . 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 n° 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 (2×2). 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 7

**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 considerado 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.

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)**. 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.

Para cumplir con estos objetivos establecidos en el Reglamento REACH se contemplan los siguientes procesos:

- **Registro (título II)**: se tendrá que registrar toda aquella sustancia fabricada/importada en cantidades iguales o superiores a 1 tonelada/anual.
 - **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 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.

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.

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.
- 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: las 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) | | | |
| Peligro 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.
- **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.

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 cerradas 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 cuadrado 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 incendio.

2. Líquidos corrosivos en envases cuadrado 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 incendio.

| | |
|--|--|
| | 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 **toxica**.

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)**¹ 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.
2. Identificación de los peligros.
3. Composición /información sobre los componentes, que incluya los números de identificación CAS² de cada sustancia.
4. Primeros auxilios.
5. Medidas de lucha contra incendios.
6. Medidas en caso de vertido accidental.
7. Manipulación y almacenamiento.
8. Controles de exposición/protección personal.
9. Propiedades fisicoquímicas.
10. Estabilidad y reactividad.
11. Información toxicológica.

¹ 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.

² 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.

12. Información ecológica.
13. Consideraciones relativas a la eliminación.
14. Información relativa al transporte.
15. Información reglamentaria.
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...

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

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**, entendiéndose 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 INCIDEN

Para aquellos incidentes y accidentes que han sido previstos mediante la evaluación inicial de riesgos y/o en posteriores revisiones, la metodología **NTES 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. 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 taparlo 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
- **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 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
- 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.

BIBLIOGRAFÍA

European Chemicals Agency

<http://echa.europa.eu/>

European Commission. Environment.

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

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

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

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 8

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

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:

FASE 2: ¿Qué código de la lista de residuos hay que aplicar?

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

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.

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) | |
| 14 | RESIDUOS DE DISOLVENTES, REFRIGERANTES Y PROPELENTES ORGÁNICOS (EXCEPTO LOS DE LOS CAPÍTULOS 07 Y 08) | B |
| 15 | RESIDUOS DE ENVASES; ABSORBENTES, TAPAS 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) | |
| 18 | RESIDUOS DE SERVICIOS MÉDICOS O VETERINARIOS O DE INVESTIGACIÓN ASOCIADA (SALVO 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 | A |
| 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** se 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 (*)]
- ✓ Códigos de residuos no peligrosos absolutos (RNP)
- ✓ Código espejo
 - 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.

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 sig 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. |

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 entre otros:

- 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.

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.

Las normas sanitarias aplicables a esta clase de residuos es mediante 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.

Sanitario



Citotóxico





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 aquellos mezclas que produzcan una reacción severa o que su reacción libere productos.

- Contenedores como depósito final de Residuos Urbanos o asimilables 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 del laboratorio para la Producción de Residuos Peligrosos por la CCAA
- ✓ 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 garantizan 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 poliestirén. Traslado a vertedero autorizado del resto de residuos orgánicos.

2.3.3 Gestión de residuos generados en áreas de contención biológica 3 o 4

En las instalaciones de contención biológica 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 los residuos procedentes de las camas y viruta, residuos procedentes de los lechos de estabulación de tales animales y otras clase de residuos como 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».

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.

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

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.

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.

- 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.

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.

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.

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.

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

MATERIAL PARA LA PREPARACIÓN DEL TEMA 9

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. INSTRUMENTOS NORMATIVOS GENERALES QUE ACTÚAN EN EL CAMPO DE LA SEGURIDAD Y SALUD EN EL TRABAJO.

- 2.1. LA CONSTITUCIÓN ESPAÑOLA DE 1978.
- 2.2. LA DIRECTIVA “MARCO” DE SEGURIDAD: DIRECTIVA 89/391.
- 2.3. EL RD LEGISLATIVO 2/2015 POR EL QUE SE APRUEBA EL TEXTO REFUNDIDO DEL ESTATUTO DE LOS TRABAJADORES.
- 2.4. LA LEY DE PREVENCIÓN DE RIESGOS LABORALES: LEY 31/95.
- 2.5. DIRECTIVAS COMUNITARIAS ESPECÍFICAS.
- 2.6. NORMAS REGLAMENTARIAS.
- 2.7. LAS GUÍAS Y NOTAS TÉCNICAS DE PREVENCIÓN DEL INSST.

3. GESTIÓN EN PREVENCIÓN DE RIESGOS LABORALES.

- 3.1. PLAN DE PREVENCIÓN DE RIESGOS LABORALES.
- 3.2. EVALUACIÓN DE RIESGOS
- 3.3. PLANIFICACIÓN DE LA ACTIVIDAD PREVENTIVA
- 3.4. FORMACIÓN
- 3.5. INFORMACIÓN
- 3.6. CONSULTA Y PARTICIPACIÓN
- 3.7. COMUNICACIÓN INTERNA Y EXTERNA
- 3.8. CUMPLIMIENTO LEGAL
- 3.9. DOCUMENTACIÓN DEL SGPRL
- 3.10. CONTROL DE LAS OPERACIONES
- 3.11. INCIDENTES
- 3.12. NO CONFORMIDADES, ACCIONES CORRECTIVAS, PREVENTIVAS
- 3.13. Control de las emergencias
- 3.14. Seguimiento y medición
- 3.15. Auditorías
- 3.16. Revisión por la Dirección.

4. 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. 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:

2.1. 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.

2.2. 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.

2.3. 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”.

2.4. 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.

2.5. 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

2.6. 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.
- 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.

- RD 67/2010, de 29 de enero, de adaptación de la legislación de Prevención de Riesgos Laborales a la Administración General del Estado.

2.7. 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 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, 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 520: Prevención del riesgo biológico en el laboratorio: trabajo con virus.
- 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.

3. GESTIÓN EN PREVENCIÓN DE RIESGOS LABORALES.

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.

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:

3.1. 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 (PPRL)** 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. Este documento ha de estar aprobado por la dirección y asumido por toda su estructura organizativa.

El Plan de prevención de riesgos laborales deberá incluir: la estructura organizativa, las responsabilidades, las funciones, las prácticas, los procedimientos, los procesos y los recursos necesarios para realizar la acción de prevención de riesgos en el laboratorio.

El PPRL 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 y la asignación de responsabilidades, así como los medios y plazos para lograr estos objetivos.

3.2. 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.

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.

3.3. 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: Eliminar, sustituir, diseñar controles, utilización de protección colectiva y por último, utilizar Equipos de Protección Individual (EPIs).

3.4. 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.

3.5. INFORMACIÓN

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.

3.6. 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).

3.7. 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 SGPRL.

3.8. 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.

3.9. DOCUMENTACIÓN DEL SGPRL

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.

Similar a un sistema de gestión de la calidad, debe existir una gestión de dichos documentos en cuanto a: elaboración, codificación, revisión, aprobación, distribución y revisión y actualización.

3.10. 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.

3.11. 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.

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 SGPRL 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.

3.12. 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 **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 SGPRL, se ha de establecer, implementar y mantener un procedimiento para la gestión de las de las no conformidades que puedan presentarse, así como de las acciones correctivas y preventivas diseñadas para el tratamiento de dichas no conformidades.

3.13. 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 para ello.

3.14. 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.

3.15. 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 dicho fin, 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.

3.16. 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.

4. 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 seguro y saludable, 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.

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 10

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 requieren 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.¹

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.

¹ 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 es lo que vamos a enviar, 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 (OMG) 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 ² | Número ONU ² | 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.

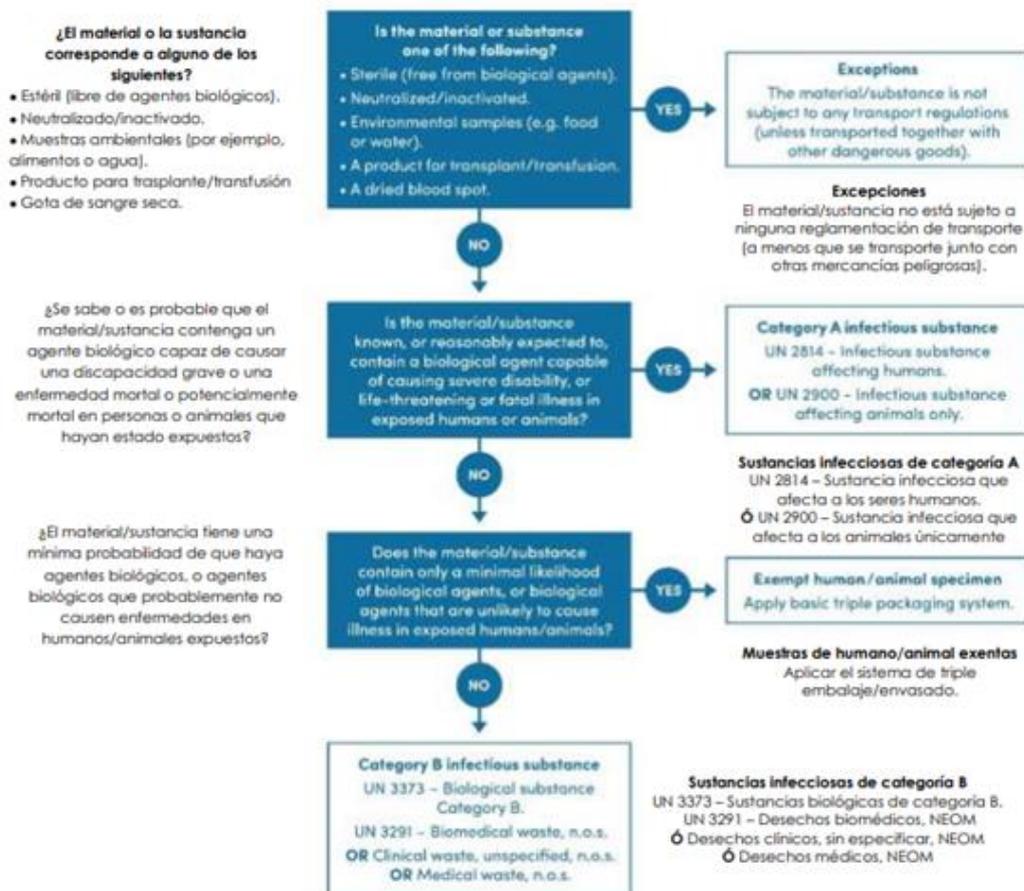


Figura 1 Resumen del proceso de definición y clasificación de las sustancias infecciosas.

Fuente: ilustración creada para la 4ª edición del Manual de Bioseguridad en el Laboratorio de la WHO.

2

2.2.1. 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.

² 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 incapacitantes 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:
 - Desechos clínicos, sin especificar
 - Desechos biomédicos
 - 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.³

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.

³ 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 embalsarse 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).

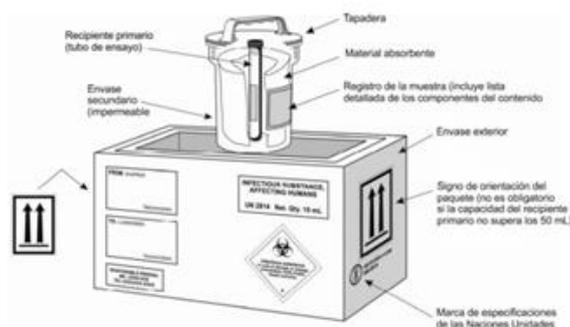


Figura 3. Ejemplo triple embalaje

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°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 ICAO⁴") 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

⁴ 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 OMS, 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 (DGR⁵) 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

⁵ 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 Cartagena⁶" 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.

⁶ Su nombre completo es "Protocolo de Cartagena sobre Seguridad de la Biotecnología del Convenio sobre la Diversidad Biológica"

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 a 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

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://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 11

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, biocontención y 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 de alta patogenicidad, virus de la gripe A (H1N1) 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 y biocontención.

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 de quienes trabajan en laboratorios u otras personas y del medio ambiente externo, a agentes potencialmente peligrosos.

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) garantizando la custodia de los agentes manejados o almacenados dentro de la instalación de contención.

| 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.*

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, y está asociado a las actividades internas del laboratorio.

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.

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 posteriormente los microorganismos los podemos clasificar en 4 grupos de riesgo).

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.

Los niveles de bioseguridad son los siguientes:

- 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.

- 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.

- 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 el 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.

- 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.

Es importante remarcar que no hay una equivalencia exacta entre los grupos de riesgo en los que se clasifican los microorganismos y los niveles de bioseguridad. El grupo de riesgo clasifica un patógeno dentro de una escala humana (el daño que puede infligir al ser humano o a sus intereses: ganadería, agricultura), mientras la bioseguridad hace referencia a las prácticas y procedimientos operativos, pero también al diseño, construcción y equipamiento de la instalación.

2.3. BIOPROTECCIÓN

Según la OIE, la bioprotección o biocustodia del laboratorio 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.

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.

3. GESTIÓN DEL RIESGO BIOLÓGICO

El análisis del riesgo biológico que debe 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, a agentes y toxinas biológicos procedentes del laboratorio.

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.
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.
3. Gestión del riesgo (es decir, ¿cómo pueden esos riesgos prevenirse o minimizarse hasta niveles aceptables?). Al ser uno de los puntos específicos 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?). Las comunicaciones del riesgo están pensadas para informar a las 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?).

A continuación, nos centraremos en tratar la **gestión del riesgo**:

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.

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 individual (EPI) 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 EPIs 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.

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:

- Grupo de riesgo 1: Presentan riesgo individual y poblacional escaso o nulo. Son aquellos 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.

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.

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 o de bioseguridad establecido¹:

¹ 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.

| A. Medidas de Contención | B. Niveles de Contención | | |
|--|---|---|--|
| | 2 | 3 | 4 |
| Lugar de Trabajo | | | |
| 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 |
| Instalaciones | | | |
| 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 |
| Equipos | | | |
| 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 |
| Normas de Trabajo | | | |
| 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 |
| Residuos | | | |
| 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 |
| Otras medidas | | | |
| 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 indique 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 (NC1)

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/

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 12

**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. METODOLOGÍAS DE ESTERILIZACIÓN PREPARATIVA.**
 - 2.1. ESTERILIZACIÓN POR CALOR.
 - 2.1.1. Calor húmedo.
 - 2.1.1.1.1. Autoclave.
 - 2.1.1.1.2. Tindalización.
 - 2.1.2. Calor seco.
 - 2.1.2.1.1. Horno pasteur o poupinell.
 - 2.1.2.1.2. Flameado.
 - 2.2. ESTERILIZACIÓN POR MÉTODOS MECÁNICOS.
 - 2.2.1. Filtración.
 - 2.3. ESTERILIZACIÓN POR RADIACIONES.
 - 2.4. ESTERILIZACIÓN POR MÉTODOS QUÍMICOS.
 - 2.4.1. Agentes químicos líquidos.
 - 2.4.2. Esterilizantes gaseosos.
- 3. METODOLOGÍAS DE ESTERILIZACIÓN FINAL.**
 - 3.1. INCINERACIÓN.
 - 3.2. HIDRÓLISIS ALCALINA
 - 3.3. SAS, AIR LOCK Y DUNK TANK.
 - 3.4. BIOWASTE.
- 4. DESCONTAMINACIÓN AÉREA O DE SALAS.**
- 5. 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 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.

La esterilización la podemos clasificar en dos grandes grupos: la esterilización preparativa y la 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.

Entre los factores que afectan a la eficacia de los procesos de esterilización, podemos citar los siguientes: la concentración de microorganismos inicial, la presencia de materia orgánica, la estandarización de la carga, el tiempo de exposición, la temperatura y la humedad relativa.

2. METODOLOGÍAS DE ESTERILIZACIÓN PREPARATIVA.

La esterilización preparativa se puede realizar, como se ha indicado, por mecanismos físicos o químicos. 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. 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.

2.1. 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 ≥ 160 °C durante dos a cuatro horas. El calor “húmedo” es especialmente eficaz cuando se utiliza en el autoclave.

2.1.1. Calor húmedo

El efecto final de la esterilización por calor húmedo a 121°C es la desnaturalización y coagulación de las proteínas.

2.1.1.1. 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 cuya función es la eliminación de todos los microorganismos y esporas del material introducido en él.

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.

Actualmente, los dos tipos de autoclave más utilizados son:

- a) Autoclaves de desplazamiento por gravedad.
- b) 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.

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 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.

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.

2.1.1.2. 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.

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 (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.

2.1.2. 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 estarían dados 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.

2.1.2.1. 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).

Estufa de convección por gravedad:

En este tipo de estufa 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.

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 material que no se pueden esterilizar en autoclave por problemas de corrosión, así como fluidos oleaginosos (impermeables al vapor del autoclave).

2.1.2.2. 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.

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 prácticas microbiológicas deban de hacerse en dichas cabinas (según el agente patógeno que se manipule).

2.2. ESTERILIZACION POR METODOS MECANICOS.

2.2.1. 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 μm , aunque más recientemente se tiende a la utilización de poros de 0.1 μm .

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.

● 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 3 ó 4.

2.3. 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, siendo el resultado final la inhibición de la síntesis de ADN.

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.

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.

2.4. 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.

2.4.1. 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 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.

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. 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; 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 hidrógeno. 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.

2.4.2. 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.

3. 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.

3.1. 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, 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.

3.2. HIDRÓLISIS ALCALINA

La digestión por hidrólisis alcalina 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 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.

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.

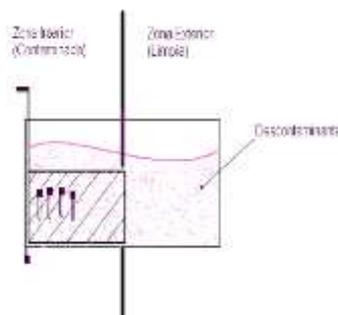
3.3. SAS, AIR LOCK Y DUNK TANKS.

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 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 materiales de pequeño tamaño entre zonas de diferente riesgo biológico.

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, un sumidero de drenaje para los efluentes generados en los procesos de descontaminación y 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 tank** 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.



3.4. 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 nivel 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.

4. 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 proceder a 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 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 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 elemento vehiculante 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.

El peróxido de hidrógeno (H₂O₂) 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.

Hay que tener en consideración que el H₂O₂ es un compuesto inestable, descomponiéndose en oxígeno y agua, por lo que la concentración de H₂O₂ 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 H₂O₂ 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 (H₂O, 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.

5. 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 la vigilancia de ciertos parámetros como: presión, tiempo, temperatura, etc.

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.

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.

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**¹, son los más fiables.

En el autoclave o en las descontaminaciones de salas por H₂O₂, normalmente se utilizan **esporas no patógenas de *Geobacillus stearothermophilus*** para verificar su correcto funcionamiento. Si tras el ciclo de esterilización este microorganismo “control” sigue siendo viable, el procedimiento efectuado habrá sido insuficiente y por tanto deberá volverse a esterilizar todo.

¹ 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.

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>

MATERIAL NO OFICIAL

MATERIAL PARA LA PREPARACIÓN DEL TEMA 13

MUESTREO. TÉCNICAS DE MUESTREO. REMISIÓN DE MUESTRAS AL LABORATORIO. MANIPULACIÓN DE MUESTRAS.

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. MUESTREO: CONSIDERACIONES GENERALES

2. TÉCNICAS DE MUESTREO. TIPOS DE MUESTRAS

2.1. EXTRACCIÓN DE SANGRE

2.2. RECOGIDA DE OTROS LÍQUIDOS ORGÁNICOS

2.3. HISOPADO Y RASPADO

2.4. NECROPSIA

2.5. OTRAS TÉCNICAS DE MUESTREO

3. REMISIÓN DE MUESTRAS AL LABORATORIO

4. MANIPULACIÓN DE MUESTRAS

4.1. MANIPULACIÓN DE MUESTRAS EN SU RECEPCIÓN

4.2. ALMACENAMIENTO DE MUESTRAS

MATERIAL NO OFICIAL

1. MUESTREO: CONSIDERACIONES GENERALES

La **toma de muestras** es el primer paso de las actuaciones laboratoriales, y por tanto resulta fundamental para garantizar un correcto diagnóstico y unos resultados fiables.

Por ello, debe realizarse teniendo un previo conocimiento exhaustivo de la **patogenia** de la enfermedad o enfermedades que se desea estudiar, así como de la **epidemiología** de la misma en la región en la que se vaya a tomar la muestra, o la **evolución epidemiológica** en caso de tomarse muestras durante un brote de la enfermedad.

Para poder realizar una buena toma de muestras, es necesario tener en cuenta:

- **Qué tipo o tipos de muestras** tomar para realizar el diagnóstico.
- **De qué animales** tomar las muestras, así como el número mínimo de animales necesario para asegurar que la muestra es suficientemente representativa de la población y los resultados estadísticamente significativos.
- Las **condiciones** en las que se deben tomar las muestras.

La elección del **tipo o tipos de muestra** a tomar dependerá de múltiples factores, incluyendo el **objetivo del análisis**, y la **enfermedad** o enfermedades que se desea analizar:

- **Objetivo** del análisis: se deben tomar las muestras adecuadas al objetivo. En el caso de muestreo para el análisis de enfermedades infecciosas, es necesario diferenciar fundamentalmente entre la toma de muestras para **análisis histopatológico o clínico** (para la identificación de signos clínicos y de lesiones que puedan contribuir al diagnóstico), **análisis de la presencia del agente o agentes**, y **análisis serológico** de la presencia de anticuerpos.
- En cuanto a las **enfermedades** a analizar, se debe tener en cuenta el **tropismo de los agentes** infecciosos, así como su capacidad de inducción de respuesta inmune mediada por anticuerpos. Las muestras se tomarán preferiblemente de aquellos órganos, tejidos, o líquidos orgánicos en los cuales el agente se encuentre presente con mayor probabilidad, o bien el suero para realizar análisis serológicos.

La **especie animal** en la que tomar las muestras debe ser **susceptible** a la enfermedad a analizar. Además, para elegir los animales a muestrear se deben tener en cuenta otras circunstancias relacionadas con los animales, como la **presentación de signos clínicos**. En caso de presentación de signos clínicos, las muestras se tomarán con preferencia a partir de animales enfermos o muertos, lo cual aumentará la probabilidad de presencia del agente o agentes infecciosos. En cualquier caso, puede resultar conveniente tomar muestras también a partir de animales sanos, para realizar pruebas epidemiológicas o bien para obtener valores basales con fines comparativos.

Para los **análisis serológicos**, se debe tener en cuenta el estado inmunitario previo del animal (por ejemplo, los animales **vacunados** no serán útiles en los programas de centinelaje si presentan resultados positivos a serología).

Resulta también fundamental considerar el **número mínimo** de animales a incluir para que la muestra sea **representativa**. En programas de vigilancia y seguimiento de la salud animal, se deben emplear **métodos estadísticos** para calcular el tamaño muestral, teniendo en cuenta el **nivel mínimo de prevalencia** que se desea poder detectar así como el **valor de confianza** con que se desea obtener los resultados. El cálculo del **tamaño muestral (n)** puede realizarse mediante la siguiente fórmula, siendo:

- **α** el nivel de significación (y por tanto siendo **1- α** el nivel de confianza)
- **p** la prevalencia de la enfermedad en la población
- **Se** la sensibilidad de la prueba

$$n = \frac{\ln(\alpha)}{\ln(1 - p \times Se)}$$

En cualquier caso, la metodología estadística, así como las fórmulas empleadas para calcular el tamaño muestral, variarán en función del **objetivo** del muestreo, así como de las **características del análisis a realizar**.

En cuanto a las **condiciones** para la toma de muestras, deben ser lo más **estrictas** posible para evitar que estas puedan contaminarse en el origen.

Además, es fundamental considerar cuestiones de **bienestar animal**, procurando minimizar las molestias ocasionadas a los individuos muestreados y evitar en la medida de lo posible el sufrimiento de los animales, así como cuestiones de **bioseguridad** (evitando la liberación de especímenes potencialmente infectados).

Debe **evitarse el estrés**, las lesiones y el riesgo físico innecesario a los animales, así como a las personas que las manipulen. También se debe tener en cuenta para la obtención de una muestra determinada la posible influencia de determinadas sustancias químicas en el posterior análisis, así por ejemplo, el empleo de anestésicos para la contención de los animales o los eutanásicos, puede influir en un análisis toxicológico; o determinadas anticoagulantes o conservantes de los tejidos como la heparina, la formalina o el hielo seco pueden influir negativamente en ciertas pruebas analíticas.

Igual consideración merece, la utilización de detergentes para la limpieza del material de obtención de muestras o de los antisépticos para limpiar la zona del animal de la cual se obtendrá la muestra. En ambos casos, aunque siempre es importante la asepsia en la obtención de las muestras, tenemos que tener en cuenta que puede igualmente interferir en los resultados analíticos.

En el caso que se investigue enfermedades de causas desconocidas, deben obtenerse muestras que sean representativas de las diferentes fases de avance de la enfermedad en un animal o en la población (preclínica, clínica, fase de aceptación crónica y convalecencia). Un

conocimiento exhaustivo de la patogenia de la enfermedad que se está estudiando nos permitirá muestrear los tejidos o líquidos donde con mayor probabilidad se encontrará el agente infeccioso, saber si hay uno o varios órganos dianas, la duración y el lugar de la infección en cada tipo de tejido, la duración y vía de excreción, el periodo de tiempo donde la infección es detectable e incluso si ha habido infección en el pasado por la respuesta de los anticuerpos.

2. TÉCNICAS DE MUESTREO. TIPOS DE MUESTRAS

Existen diferentes técnicas de muestreo, relacionadas con los diversos tipos de muestras que se pueden tomar.

Podemos decir que hay tres **tipos de muestreo**:

- *Muestreo probabilístico*: es aquel en el que cada muestra tiene la misma probabilidad de ser elegida.
- *Muestreo intencional u opinático*: en el que la persona que selecciona la muestra es quien procura que sea representativa, dependiendo de su intención u opinión, siendo por tanto la representatividad subjetiva.
- *Muestreo sin norma*: se toma la muestra sin norma alguna, de cualquier manera, siendo la muestra representativa si la población es homogénea y no se producen sesgos de selección.

Nosotros siempre haremos **muestreo probabilístico** para el análisis de muestras laboratoriales, ya que en caso de elegir la técnica adecuada, es el que nos asegura la representatividad de la muestra y nos permite el cálculo de la estimación de los errores que se cometen.

Dentro del muestreo probabilístico podemos distinguir entre los siguientes tipos de muestreo:

- **Muestreo aleatorio con y sin reemplazo**: un muestreo es aleatorio cuando, el proceso de selección de la muestra garantice que todas las muestras posibles que se pueden obtener de la población tienen la misma probabilidad de ser elegidas, es decir, todos los elementos de la población tienen la misma posibilidad de ser seleccionados para formar parte de la muestra. Cuando un elemento es seleccionado, y hemos medido las variables necesarias para el estudio y puede volver a ser seleccionado, se dice que hacemos un muestreo aleatorio con reemplazamiento o reposición. Generalmente recibe el nombre de muestreo aleatorio simple. En caso de que el elemento no vuelva a formar parte de la población de manera que no puede volver a ser seleccionado se dice que se ha obtenido la muestra mediante un muestreo aleatorio sin reposición o reemplazamiento.
- **Muestreo estratificado**: este sistema de muestreo, permite dividir a la población en subpoblaciones, que llamamos estratos, con características comunes. Dentro de cada estrato se hace una selección aleatoria. Nos permite dar a cada estrato la misma probabilidad de estar en la muestra global.

En general, el muestreo estratificado proporciona mejores resultados que el muestreo aleatorio, mientras más diferentes sean los estratos entre sí y más homogéneos internamente.

- **Muestreo por conglomerados:** la población se divide en unidades o grupos, llamados conglomerados (generalmente son unidades o áreas en los que se ha dividido la población), que deben ser lo más representativas posible de la población, es decir, deben representar la heterogeneidad de la población objeto del estudio y ser entre sí homogéneos. El motivo para realizar este muestreo es que a veces resultaría demasiado costoso realizar una lista completa de todos los individuos de la población objeto del estudio, o que cuando se terminase de realizar la lista no tendría sentido la realización del estudio. El principal inconveniente que tiene es que si los conglomerados no son homogéneos entre sí, la muestra final puede no ser representativa de la población.
- **Muestreo sistemático:** en este método de muestreo, se elige al azar un componente de la población y el resto se elige a partir de ese componente añadiéndole de un número seleccionado de forma sistemática. Ej; x , $x+20$, $x+40$...
- **Otros tipos de muestreo:** El muestreo bietápico es un caso particular de muestreo por conglomerados en el que en la segunda etapa no se seleccionan todos los elementos del conglomerado, sino que se seleccionan un determinado número de elementos de cada conglomerado de manera aleatoria. Los conglomerados de primera etapa se denominan unidades primarias, los de segunda etapa, secundarias. El muestreo polietápico es una generalización del anterior, de manera que cada conglomerado puede estar formado a su vez por otros conglomerados y así sucesivamente en varias etapas.

En las muestras analíticas de Sanidad animal, el enfoque de sus técnicas de muestreo es netamente epidemiológico.

Este muestreo si su finalidad es la de establecer un diagnóstico, se deberá seleccionar aquellos animales que tengan clínica o que se sospeche claramente de infección, y en el caso de la serología, que hayan estado infectados. Por eso, se deben obtener las muestras que con mayor probabilidad den la máxima sensibilidad y especificidad a la investigación. El buen conocimiento de la patogenia de la enfermedad nos permitirá obtener las muestras y realizar el muestreo de manera adecuada.

En cambio si la finalidad es la elaboración de programas de vigilancia, se podría realizar un muestreo dirigido, basándose en el riesgo, que tenga por finalidad el detectar con la máxima probabilidad los individuos infectados (mediante un conocimiento adecuado de la epidemiología de la población); o bien un muestreo aleatorio, donde se eligen al azar los animales a analizar, nos aseguran que éstos sean representativos de la población (con un intervalo de confianza), dentro de las limitaciones impuestas por los distintos ambientes y sistema de producción. Es el sistema idóneo para el cálculo de la prevalencia (número de animales enfermos dentro de una población), el estado inmunitario o la ausencia de enfermedad.

En muestras analíticas alimentarias, la mayoría de las técnicas de muestreo son aleatorias o estratificadas.

Las técnicas de muestreo diferirán entre la toma de muestras a partir de **animales vivos** y a partir de **necropsias**, y a su vez serán diferentes en función del tipo de muestra que se desee tomar.

2.1. EXTRACCIÓN DE SANGRE

La **sangre** es un tejido líquido sobre el cual se pueden realizar gran cantidad de análisis, aportando información valiosa sobre los procesos fisiológicos y patológicos que tienen lugar en un animal, pero también sobre la **presencia de agentes patógenos** y el estado inmunitario.

La extracción de sangre es un método de muestreo **que puede ser considerado muy versátil**, ya que, en función de la adición o no de anticoagulante a la muestra y del procesamiento posterior, permite la obtención de **diferentes tipos de muestras**:

- **Sangre completa.** Se puede emplear para realizar **pruebas de detección del agente** (tanto pruebas moleculares como pruebas de aislamiento o siembra y pruebas de detección inmunológica), siempre y cuando se prevea que este puede estar presente en la sangre (por ejemplo, en la fase de viremia de infecciones víricas). Además, se pueden realizar pruebas clínicas de hematología para comprobar si existen alteraciones de los valores fisiológicos, como pueden ser la presencia de anemia (característica de algunas enfermedades animales), o neutrofilia (que puede ser indicativa de una infección en curso), entre otros. También es una buena muestra para la realización de **análisis genéticos mediante la extracción de ADN**, dada la facilidad de obtención de la muestra y su alto contenido en células nucleadas.
- **Suero.** Se obtiene tras la recogida de sangre en **tubos sin anticoagulante**, de tal manera que se consuman los factores de la coagulación y se forme un **coágulo**, separándose el suero de los componentes celulares. El suero puede obtenerse mediante decantación o bien mediante pipeteo, pudiendo realizarse una fase de centrifugación previa para garantizar la separación completa. Se emplea fundamentalmente para la realización de pruebas para detectar la **presencia de anticuerpos**, aunque también puede emplearse para realizar pruebas **bioquímicas**, con el mismo objetivo que las pruebas clínicas hematológicas.
- **Plasma.** Se diferencia del suero en que se recoge en tubos **con anticoagulante**, produciéndose la separación de los componentes celulares de la sangre tras realizar una **centrifugación** suficiente, sin la intervención de factores de la coagulación. Lo más frecuente es su utilización para la realización de pruebas clínicas **bioquímicas**, siendo la muestra de elección para realizar pruebas de coagulación (ya que no se pueden realizar en suero).
- **Componentes celulares o coágulo sanguíneo.** Pueden emplearse, en el campo de la sanidad animal, para la realización de pruebas de presencia de agentes infecciosos. Además, también pueden emplearse para la extracción de ADN para análisis genéticos.

La recogida debe realizarse en **condiciones de asepsia**, realizando primero el rasurado y el tratamiento con antisépticos de la zona a puncionar. La técnica más frecuente para la extracción es la **venopunción del animal vivo**, siendo empleada en menor medida la punción arterial. En función de la especie animal, otros factores como su edad o tamaño, y de las condiciones de las que se disponga para realizar el muestreo (por ejemplo, la disposición de mangas de manejo), se puede realizar la extracción a partir de las venas yugular, caudal, braquial, cefálica, mamaria o cava.

Tras la recogida, se debe tratar la muestra con sumo cuidado para evitar causar **hemólisis**.

La conservación puede realizarse en refrigeración, o en congelación en el caso de los sueros.

2.2. RECOGIDA DE OTROS LÍQUIDOS ORGÁNICOS

En ocasiones, puede resultar de interés la recogida de otros tipos de líquidos orgánicos, fundamentalmente en el caso de **presentación de signos clínicos**. Algunos de estos casos pueden incluir:

- Cuadros clínicos que cursan con **presencia de líquidos orgánicos libres en cavidades** (ascitis, derrame pleural...).
- Cuadros clínicos con lesiones **purulentas**, pudiendo obtenerse dicho pus mediante punción.
- Los **líquidos vesiculares** presentes en lesiones de este tipo resultan una fuente muy concentrada de agentes patógenos. Puede obtenerse a partir de vesículas que se presenten **íntegras** mediante punción.

Además, hay otros tipos de líquidos orgánicos, no relacionados de forma directa con la sintomatología clínica, que también pueden resultar de interés ante determinados cuadros:

- La **orina** puede ser una muestra de interés en caso de sospecha de determinados agentes, como la *Leptospira*, o en caso de presentarse sintomatología compatible con infecciones renales o del tracto urinario.
- La **leche** puede obtenerse de forma individual o bien como muestras del tanque de leche. Para su obtención directamente de los animales se debe realizar la limpieza del pezón y su secado previo, y desechar el primer chorro extraído. Las condiciones de conservación requeridas dependerán del tipo de análisis a realizar.
- Las **secreciones nasales** y la **saliva** también pueden resultar muestras de gran interés, recogidas directamente mediante el uso de tubos de diferente calibre.
- Se pueden emplear muestras de **semen** obtenidas mediante estimulación artificial.
- Además, pueden obtenerse muestras a partir del **lavado broncoalveolar, vulvar o prepucial**.

En caso de sospecha de enfermedades infecciosas, todas estas muestras pueden emplearse para realizar pruebas de detección del agente. Además, obtener información sobre el tipo de líquido también puede proporcionar claves sobre los aspectos clínicos de la infección.

La técnica de muestreo dependerá del **tipo de muestra**, existiendo gran variabilidad en función de los diferentes líquidos orgánicos mencionados.

En el caso del **líquido libre en cavidades** o de la **orina** pueden obtenerse mediante punción, que además puede ser ecoguiada para una mayor precisión. Resulta fundamental que las condiciones de asepsia sean estrictas para garantizar que no se dan contaminaciones, debiendo rasurar y aplicar antisépticos en la zona antes de realizar la punción.

La orina también puede obtenerse mediante **micción espontánea** de los animales o mediante sondaje, aunque resulta una muestra menos informativa para la realización de estudios bacteriológicos por la presencia de bacterias en el tracto urinario y por tanto la alta probabilidad de contaminación.

Para la obtención de **secreciones nasales y de saliva** pueden emplearse utensilios de muestreo específicos, como las sondas esofágicas.

2.3. HISOPADO Y RASPADO

El **hisopado y el raspado** son, asimismo, técnicas de muestreo **altamente versátiles**, que permiten la obtención de un gran número de muestras diferentes.

Se puede realizar el muestreo por **hisopado**, entre otros, de muestras **oculares, óticas, de mucosa oral, nasales o faríngeas, fecales, uretrales, vulvares, vaginales o prepuciales**.

En cuanto al **raspado**, puede realizarse para la obtención de muestras **epiteliales superficiales** (por ejemplo para la detección de ectoparásitos o para la identificación de lesiones epidérmicas), u **oculares**.

En general, los hisopos deberán mantenerse húmedos tras la recolección de la muestra, para lo cual se deben introducir en un volumen adecuado del medio de transporte determinado en función de la prueba o pruebas a realizar (normalmente, solución salina fisiológica o medios de cultivo específicos líquidos).

2.4. NECROPSIA

Las necropsias son muy útiles para la realización de pruebas diagnósticas, ya que no solo permiten la obtención de **muestras para el diagnóstico laboratorial**, sino que además resultan útiles para la **identificación de lesiones** que pueden ayudar a identificar el agente o agentes involucrados en su producción.

La necropsia debe realizarse por veterinarios y especialistas en anatomía patológica cualificados para llevar a cabo dichas investigaciones post-mortem.

La necropsia puede llevarse a cabo **bien en campo** o bien **en un laboratorio designado** tras el desplazamiento hasta el mismo de los órganos o del cadáver completo. En ambos casos, se deben seguir de forma exhaustiva los **procedimientos de bioseguridad y biocontención pertinentes**, garantizando así la seguridad y minimizando la probabilidad de liberación de agentes infecciosos al ambiente, pero también la ausencia de contaminación de las muestras. Los tejidos y líquidos obtenidos deberán introducirse en recipientes (con o sin agentes conservantes, en función del objetivo del análisis) que puedan ser descontaminados. Además, es fundamental que el personal que las lleve a cabo use equipos de protección personal y ropa adecuada de trabajo, desechable o que pueda descontaminarse.

Las muestras obtenidas pueden corresponder a **uno o varios órganos** (completos o bien regiones de los mismos) o **líquidos orgánicos**. Deben conservarse para su análisis laboratorial bien empleando conservantes (como la formalina), siempre que estos sean compatibles con el análisis a realizar, o bien mediante su mantenimiento en refrigeración constante.

2.5. OTRAS TÉCNICAS DE MUESTREO

Existen otras múltiples técnicas de muestreo, que pueden ser relativamente frecuentes en función de la especie animal de la que se trate, y que dependerán del tipo de muestra que se desea obtener. Algunos tipos de muestras frecuentemente empleadas incluyen:

- **Heces.** Pueden obtenerse del ambiente, siempre y cuando sean recientes, o bien directamente a partir del recto o cloaca. Pueden obtenerse mediante su recogida directa o mediante **hisopado rectal**, en cuyo caso el hisopo deberá conservarse correctamente empleando el líquido de transporte correspondiente. Además, en algunos casos particulares, pueden obtenerse directamente del suelo de las explotaciones empleando calzas. Se trata de muestras de alto valor cuando se sospecha de agentes con tropismo por el sistema digestivo.
- **Animales** completos, como en el caso de las **abejas melíferas** (pudiendo recogerse abejas moribundas o muertas recientemente, así como vivas para su sacrificio mediante congelación), o **animales acuáticos** (fundamentalmente animales letárgicos o que nadan en la superficie o los márgenes de los tanques, aunque según el objetivo del análisis también pueden recogerse animales aparentemente sanos).
- **Huevos** en el caso de especies ovíparas, **plumas y pelo**.
- **Muestras ambientales**, obtenidas de la cama de los animales o del pienso que consumen, por ejemplo.

3. REMISIÓN DE MUESTRAS AL LABORATORIO

El **envío de muestras al laboratorio** debe realizarse bajo las condiciones determinadas de conservación en función del tipo de muestras de que se trate, pudiéndose realizar el envío a bajas temperaturas para aquellas muestras que lo requieran.

El **embalaje** deberá cumplir con lo dispuesto en la **normativa vigente** para el transporte de mercancías peligrosas (ADR, Acuerdo Europeo sobre Transporte Internacional de Mercancías Peligrosas por Carretera), e incluir en el mismo una referencia **al código UN correspondiente a la categoría de muestras que se desea enviar**.

Además, es fundamental que la ruta se planifique de tal manera que se garantice que las muestras pasan en tránsito el menor tiempo posible, evitando una posible degradación de las mismas.

En cuanto a la **identificación de las muestras**, debe ser **clara** y fácilmente visible, y realizarse empleando métodos apropiados. Así, la metodología empleada para realizar el marcaje debe poder resistir las condiciones en que se encontrará la muestra (incluyendo condiciones de humedad y congelación), así como su uso y manipulación.

Las muestras deberán ir acompañadas sobre **información** sobre su procedencia, los datos de contacto del remitente, y los datos epidemiológicos conocidos. La documentación debe enviarse incluida en un sobre de plástico en el exterior del paquete, y debe incluirse también una copia entre el envase secundario y el envase externo.

En cuanto al **caso**, debe incluirse información acerca de:

- Los agentes patógenos sospechosos y las pruebas que se solicitan al laboratorio
- La especie, raza, sexo, edad e identificación inequívoca de los animales muestreados
- Historial del caso, incluyendo la presencia o ausencia de signos clínicos y su duración, los hallazgos de los exámenes ante y post-mortem, y la fecha de los primeros casos detectados

Además, y especialmente en caso de enviarse múltiples muestras en el mismo envío, deberá adjuntarse un **listado de contenidos**.

4. MANIPULACIÓN DE MUESTRAS

4.1. MANIPULACIÓN DE MUESTRAS EN SU RECEPCIÓN

La **recepción, desembalado y alicuotado** de las muestras debe realizarse evitando la posibilidad de **contaminación cruzada** y la **exposición** a los potenciales agentes del personal encargado de realizar estas operaciones. Además, para establecer las condiciones en que se manipularán los agentes a su llegada al laboratorio, se deberá realizar una **evaluación del riesgo** y garantizar que el personal ha recibido una formación adecuada al respecto. Siempre que sea posible, se procurará que el personal esté informado de la llegada de muestras de material biológico.

La **zona de recepción de muestras** debe estar equipada para garantizar la seguridad a lo largo de la primera fase de manipulación y procesado de los envíos, evitar la contaminación de la zona de trabajo y prevenir la contaminación cruzada entre las muestras recibidas, sobre todo entre aquellas provenientes de envíos diferentes. Además, la zona debe estar diseñada para

facilitar su desinfección, lo cual resulta esencial en caso de que el embalaje de la muestra presente fugas. Así, debe contar con una zona dedicada en exclusiva al desembalado de los paquetes recibidos cuyas superficies deben ser fáciles de limpiar, y que debe incluir cabinas de bioseguridad. Por otro lado, se debe contar con equipos para el registro de las muestras, incluyendo ordenadores, impresoras o cuadernos de registro. En caso de recibirse muestras identificadas mediante sistemas de código de barras, será fundamental además disponer de un lector que permita su implementación. El desembalado debe realizarse de acuerdo a los procedimientos en vigor a tal fin en el laboratorio, empleando los equipos de protección correspondientes, y los paquetes deben permanecer cerrados hasta que este tenga lugar.

En cuanto al **registro** de las muestras, debe incluir información acerca de la procedencia, la fecha de envío, el estado del embalaje externo e interno, el estado de la muestra, o la temperatura a la que se encuentra el envase interno en el momento de la recepción.

Una vez comprobado que la información que acompaña las muestras es correcta, y que estas se encuentran en buen estado, estas se podrán transferir a la zona apropiada del laboratorio. Solamente podrán transferirse las muestras contenidas en un recipiente adecuado y que hayan sido debidamente registradas.

4.2. ALMACENAMIENTO DE MUESTRAS

Para llevar a cabo **estudios posteriores**, así como para poder **contar con un banco de muestras que puedan servir como material de referencia**, y especialmente en el caso de muestras de alto valor biológico, estas se deberán **almacenar de forma que se garantice su correcta conservación**, y deberán identificarse de forma inequívoca y con suficiente información para caracterizar la muestra por completo.

El método de conservación de **muestras** incluyendo tejidos, líquidos y cultivos, dependerá del uso que se desee darle a dicha muestra. Además, deberá tenerse en cuenta la **frecuencia esperada** de uso, preparándose **alícuotas de aquellas muestras que se prevea que se van a utilizar de forma más frecuente**. Así, se pueden evitar problemas relacionados con las fluctuaciones de temperatura o la degradación por exposición a radiación ultravioleta.

Para conservar al máximo la integridad de las muestras, deberán protegerse de ciertas condiciones ambientales como la **deseccación**, los **cambios frecuentes de temperatura**, la exposición a **rayos ultravioletas**, la **contaminación** o la posible pérdida de la identificación. Además, resulta interesante almacenar las muestras de mayor valor biológico en al menos dos lugares distintos y en diferentes condiciones de conservación.

El almacenamiento a **temperaturas ultrabajas** se considera el método óptimo para el almacenamiento a largo plazo, mientras que las temperaturas **de congelación** se consideran adecuadas para la conservación de muestras durante periodos de **5-10 años**. En cualquier caso, las condiciones de temperatura y el tiempo durante el cual las muestras conservan sus propiedades en dichas condiciones dependerán en gran medida del **tipo de muestra o la presencia de determinados agentes** en las mismas. Además, se debe tener en cuenta la **rapidez de congelación, el tamaño y densidad del material, y los medios de almacenamiento**.

Todas las muestras almacenadas en el laboratorio deben estar **correctamente identificadas** y se debe disponer de suficientes datos de las mismas. Además, debe ser posible acceder de forma sencilla a los datos disponibles para las muestras, así como, si es posible, a resultados anteriores.

Además, en el mantenimiento de muestras en almacenamiento resulta fundamental tener en cuenta **consideraciones** sobre **bioseguridad, biocontención y bioprotección**.

MATERIAL NO OFICIAL

BIBLIOGRAFÍA

Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE). Capítulo 1.1.2. del Manual de las pruebas de diagnóstico para los animales terrestres (2018): Recogida, presentación y almacenamiento de muestras para el diagnóstico.

Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE). Parte 2 del Manual de las pruebas de diagnóstico para los animales acuáticos (2021): Recomendaciones aplicables a enfermedades específicas.

MATERIAL NO OFICIAL

MATERIAL PARA LA PREPARACIÓN DEL TEMA 14

AMINOÁCIDOS Y PROTEÍNAS. CONCEPTO Y TIPOS. MÉTODOS DE AISLAMIENTO, CUANTIFICACIÓN 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. AMINOÁCIDOS

2.1 CONCEPTO

2.2 CLASIFICACIÓN DE LOS AMINOÁCIDOS

2.3 ESTRUCTURA DE LOS AMINOÁCIDOS

2.4 UNIÓN ENTRE AMINOÁCIDOS

2.5 ENLACE PEPTÍDICO

3. PROTEÍNAS

3.1 CONCEPTO

3.2 FUNCIONES LAS PROTEÍNAS

3.3 CLASIFICACIÓN DE LAS PROTEÍNAS

3.4 PROPIEDADES DE LAS PROTÍNAS

3.4.1 Solubilidad

3.4.2 Desnaturalización y renaturalización

3.4.3 Especificidad

3.4.4 Capacidad amortiguadora

3.5 ESTRECTURA DE LAS PROTEÍNAS

3.6 SINTESIS DE PROTEÍNAS

4. MÉTODS DE AISLAMIENTO, CUANTIFICACIÓN Y APLICACIONES EN LOS LABORATORIOS

4.1 MÉTODOS

4.2 CUANTIFICACIÓN DE LAS PROTEÍNAS

4.3 APLICACIONES EN LOS LABORATORIOS

1. INTRODUCCIÓN

Los aminoácidos son los componentes fundamentales de las proteínas, biomoléculas estas últimas de interés en las organizaciones estructurales y funcionales de células y tejidos. Téngase en cuenta que todas las enzimas, fundamentales para las reacciones bioquímicas, y todos los anticuerpos, esenciales en los procesos de inmunidad, son proteínas y se encuentran por tanto constituidos por aminoácidos.

Los aminoácidos y las proteínas son los pilares fundamentales de la vida.

2. AMINOÁCIDOS

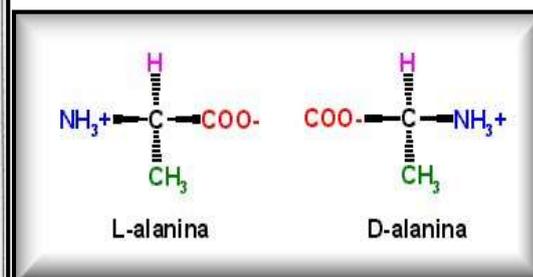
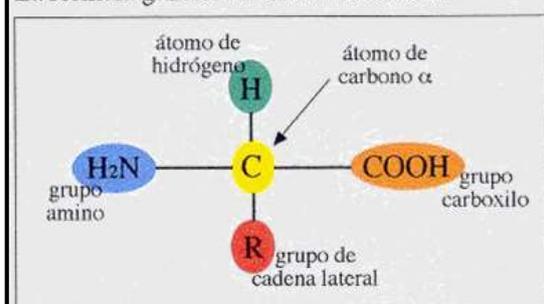
2.1 CONCEPTO

Los aminoácidos son moléculas orgánicas de bajo peso molecular que se combinan para formar proteínas, y están formados por átomos de carbono (C), nitrógeno (N), hidrógeno (H) y oxígeno (O). Así mismo, algunos, como la metionina y cisteína, contienen azufre (S).

Cuando las proteínas se digieren o se descomponen, los aminoácidos se acaban. Los organismos utilizan los aminoácidos para producir proteínas con el fin de ayudar al organismo a:

- Descomponer los alimentos.
- Reparar las células.
- Desarrollar y reparar músculos y huesos
- Proporcionar energía.
- Regular procesos metabólicos.

La fórmula general de un aminoácido es:



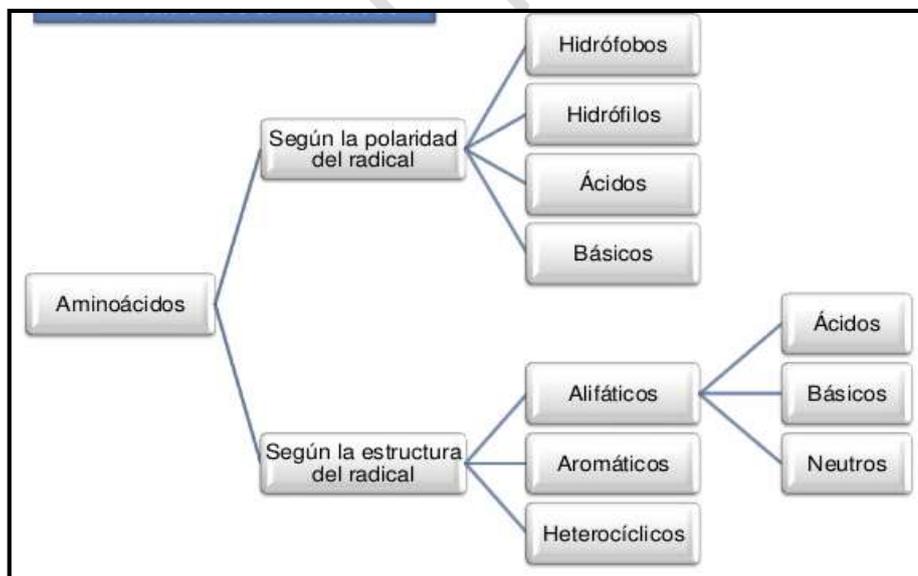
Derivados de ácidos carboxílicos, se caracterizan por poseer un grupo carboxilo ($-\text{COOH}$) y un grupo amino ($-\text{NH}_2$) que se unen al mismo carbono (carbono α). Las otras dos valencias del carbono se saturan con un átomo de H y con un grupo variable denominado radical (-R). Este radical determina las propiedades químicas y biológicas de cada aminoácido.

Tridimensionalmente el **carbono** α presenta una configuración tetraédrica en la que el carbono se dispone en el centro y los cuatro elementos que se unen a él ocupan los vértices. Cuando en el vértice superior se dispone el $-\text{COOH}$ y se mira por la cara opuesta al grupo R, según la disposición del grupo amino ($-\text{NH}_2$) a la izquierda o a la derecha del carbono α se habla de " α -**L-aminoácidos** o de " α -**D-aminoácidos** respectivamente. En las proteínas sólo se encuentran aminoácidos de configuración L.

2.2 CLASIFICACIÓN DE LOS AMINOÁCIDOS

Los aminoácidos se diferencian entre sí por la estructura de la cadena lateral R. Los distintos aminoácidos que componen las proteínas son 20. La combinación de éstos da lugar a todas las proteínas. Hay 100,000 tipos de proteínas que se componen de solo 20 aminoácidos.

Los aminoácidos son sustancias anfóteras. Una sustancia anfótera es aquella que es capaz de comportarse como un ácido o como una base dependiendo del medio en el que se encuentre. Los aminoácidos en la naturaleza se encuentran libres o formando parte de las proteínas.



➤ Según la estructura del radical:

- **Aminoácidos alifáticos.** Son los aminoácidos en los que el radical R es una cadena hidrocarbonada abierta, que puede tener, además, grupos $-\text{COOH}$ y $-\text{NH}_2$. Los aminoácidos alifáticos se clasifican en neutros, ácidos y básicos.

- Neutros. Si el radical R no posee grupos carboxilo ni amino.
- Ácidos. Si el radical R presenta grupos carboxilo, pero no amino.
- Básicos. Si el radical R tiene grupos amino, pero no grupos carboxilo
- **Aminoácidos aromáticos.** Son aquellos cuyo radical R es una cadena cerrada, generalmente relacionada con el benceno.
- **Aminoácidos heterocíclicos.** Aquellos cuyo radical R es una cadena cerrada, generalmente compleja y con algunos átomos distintos del carbono y del hidrógeno.

➤ Según la polaridad: ácidos, básicos, polares y apolares o hidrofóbicos.

Los aminoácidos que un organismo no puede sintetizar y, por tanto, tienen que ser suministrados con la dieta se denominan **aminoácidos esenciales**; y aquellos que el organismo puede sintetizar se llaman **aminoácidos no esenciales**.

Cada especie animal puede sintetizar sólo algunos de los aminoácidos que necesita para formar proteínas y, por lo tanto, depende de la dieta para incorporar aquellos que no puede sintetizar. Esos aminoácidos se los considera esenciales y no porque sean los únicos necesarios para la vida de la especie, sino porque deben estar incluidos en la dieta. Cada especie, tiene su grupo de aminoácidos esenciales propios. Los organismos heterótrofos pueden sintetizar la mayoría de los aminoácidos esenciales.

Los **aminoácidos esenciales** para la mayoría de **animales** son: **arginina, histidina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, fenilalanina, treonina, triptófano y valina**. Todos estos participan en diversos procesos como la síntesis de proteínas de los tejidos, la leche, los huevos o la síntesis de otros metabolitos corporales.

La **cisteína y la tirosina** se consideran aminoácidos **semi esenciales**. Es importante saber que la cisteína puede ser sintetizada a través de la metionina y la tirosina se puede sintetizar a través de la fenilalanina.

Sin embargo, tanto los aminoácidos esenciales como los no esenciales juegan un papel importante para mantener la vida.

2.3 ESTRUCTURA DE LOS AMINOÁCIDOS

Los aminoácidos son compuestos sólidos; incoloros; cristalizables; de elevado punto de fusión (habitualmente por encima de los 200°C); solubles en agua; con actividad óptica y con un comportamiento anfótero.

Todos los aminoácidos, salvo la glicocola o glicina, presentan el carbono α asimétrico, ya que está enlazado a cuatro radicales diferentes: un grupo amino, un grupo carboxilo, un radical R y un hidrógeno. Debido a esta característica, los aminoácidos presentan actividad óptica, es decir, son capaces de desviar el plano de luz polarizada que atraviesa una

disolución de aminoácidos. Si un aminoácido desvía el plano de luz polarizada hacia la derecha, se denomina **dextrógiro (+)**, y si lo hace hacia la izquierda, **levógiro (-)**. (No confundir con L-aa y D-aa).

Estados iónicos pKa

El comportamiento anfótero se refiere a que, en disolución acuosa, los aminoácidos son capaces de ionizarse, dependiendo del pH, como un ácido (cuando el pH es básico), como una base (cuando el pH es ácido) o como un ácido y una base a la vez (cuando el pH es neutro). En este último caso adoptan un estado dipolar iónico conocido como **zwitterión**.

La glicina se caracteriza por dos pKa: uno corresponde a la posición más ácida (pKa1) y el otro a la menos ácida (pKa2). Otros aminoácidos con cadenas laterales neutras presentan valores de pKa similares a los de la glicina.

El pH en el cual un aminoácido tiende a adoptar una forma dipolar neutra (igual número de cargas positivas que negativas) se denomina **Punto Isoeléctrico**. La solubilidad en agua de un aminoácido es mínima en su punto isoeléctrico, corresponde a un máximo en la concentración del zwitterión.

| Aminoácido | Tipo | Abreviatura | Letra | pK _{a1} (-COOH) | pK _{a2} (-NH ₂) | pK _{aR} (R) | pI |
|-----------------|--------------------|-------------|-------|--------------------------|--------------------------------------|----------------------|-------|
| Glicina | Neutros apolares | GLI | G | 2,34 | 9,78 | | 6,06 |
| Alanina | | ALA | A | 2,35 | 9,69 | | 6,02 |
| Valina | | VAL | V | 2,32 | 9,62 | | 5,97 |
| Leucina | | LEU | L | 2,36 | 9,64 | | 6,00 |
| Isoleucina | | ILE | I | 2,36 | 9,68 | | 6,02 |
| Metionina | | MET | M | 2,28 | 9,21 | | 5,75 |
| Prolina | | PRO | P | 1,99 | 10,60 | | 6,30 |
| Fenilalanina | Neutros aromáticos | PHE | F | 1,83 | 9,29 | | 5,53 |
| Tirosina | | TRY | Y | 2,20 | 9,11 | 10,07 | 5,65 |
| Triptófano | | TRP | W | 2,38 | 9,39 | | 5,89 |
| Serina | Neutros polares | SER | S | 2,21 | 9,15 | | 5,68 |
| Cisteína | | CYS | C | 1,96 | 10,28 | 8,18 | 5,07 |
| Treonina | | TRE | T | 2,71 | 9,62 | | 6,16 |
| Asparagina | | ASG | N | 2,02 | 8,80 | | 5,41 |
| Glutamina | | GLN | Q | 2,17 | 9,13 | | 5,65 |
| Ácido aspártico | Ácidos | ASP | D | 2,09 | 9,82 | 3,86 | 2,97 |
| Ácido glutámico | | GLU | E | 2,19 | 9,67 | 4,25 | 3,22 |
| Lisina | Básicos | LYS | K | 2,18 | 8,95 | 10,53 | 9,74 |
| Arginina | | ARG | R | 2,17 | 9,04 | 12,48 | 10,76 |
| Histidina | | HIS | H | 1,82 | 9,17 | 6,00 | 7,58 |

Aquellos aminoácidos que poseen cadenas laterales que contienen grupos ácidos o básicos se caracterizan mediante tres valores de pKa. El valor del pKa extra (puede ser pKa2 o pKa3) refleja la naturaleza de la función presente en la cadena lateral.

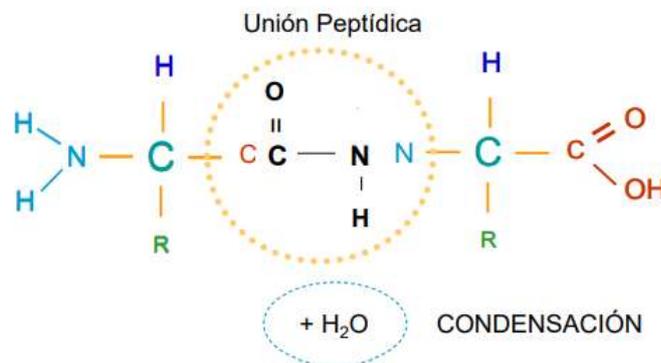
Los puntos isoeléctricos de estos aminoácidos se encuentran a medio camino entre los valores de los pKa del monocatión y del monoanión.

Las propiedades ácido-base de la cadena lateral de los aminoácidos son importantes tanto para las propiedades de las proteínas que los contienen como para el análisis de mezclas de aminoácidos que pueden ser separados en base a su capacidad para dar o aceptar protones.

2.4 UNIÓN ENTRE AMINOÁCIDOS

- ✓ Los enlaces químicos de tipo amídico entre aminoácidos se denominan enlaces peptídicos y a las cadenas formadas, **péptidos**.
- ✓ Si el número de aminoácidos que forma un péptido es dos, se denomina **dipéptido**, si es tres, **tripéptido**, si es de cuatro, **tetrapéptido**, etc.
- ✓ Si es inferior a 50 (10 según que textos) se habla de **oligopéptido**, y si es superior a 50 se denomina **polipéptido**.
- ✓ Sólo cuando un polipéptido se halla constituido por más de cincuenta moléculas de aminoácidos o si el valor de su peso molecular excede de 5 000 se habla de **proteína**.

Unión entre aminoácidos



Los aminoácidos se unen entre sí mediante uniones peptídicas para formar cadenas lineales no ramificadas.

2.5 ENLACE PEPTÍDICO.

1. En un enlace peptídico, los átomos del grupo carboxilo y del grupo amino se sitúan en un mismo plano, con distancias y ángulos fijos.
2. Los grupos de aminoácidos unidos por este enlace se denominan residuos para resaltar la pérdida de una molécula de agua en cada enlace.

3. El amino libre de un extremo y el carboxilo libre del otro extremo de la cadena reciben el nombre de N-terminal y C-terminal respectivamente. Por convenio, los aminoácidos se numeran desde el N-terminal.

4. El enlace peptídico tiene un comportamiento similar al de un enlace doble, es decir, presenta una cierta rigidez que inmoviliza en un plano los átomos que lo forman.

5. Además es un enlace más corto que otros enlaces C-N. Esto le impide girar libremente, los únicos enlaces que pueden girar son los C α -C y los C α -N que no corresponden al enlace peptídico.

3. PROTEÍNAS

3.1 CONCEPTO

La palabra proteína viene del griego protos que significa "lo más antiguo, lo primero". Las proteínas son biopolímeros (macromoléculas orgánicas) de elevado peso molecular; compuestos químicos muy complejos que se encuentran en todas las células vivas.

Hay ciertos elementos químicos que todas ellas poseen, pero los diversos tipos de proteínas los contienen en diferentes cantidades.

Están constituidas básicamente por carbono (C), hidrógeno (H), oxígeno (O) y nitrógeno (N); aunque pueden contener también azufre (S) y fósforo (P) y, en menor proporción, hierro (Fe), cobre (Cu), magnesio (Mg), yodo (Y). Se distinguen químicamente de los lípidos y de los hidratos de carbono por contener nitrógeno.

Las proteínas son las moléculas orgánicas más abundantes en las células; constituyen alrededor del 50% de su peso seco o más en algunos casos.

Una bacteria puede tener cerca de 1000 proteínas diferentes, pero en una célula humana puede haber 10.000 clases de proteínas distintas.

Son **polímeros de aminoácidos** unidos por enlaces peptídicos. Una proteína puede contener varios cientos o miles de aminoácidos y la disposición o secuencia de estos aminoácidos determina la estructura y la función de las diferentes proteínas. Es así que una molécula de proteína puede tener miles de aminoácidos en diferentes combinaciones, lo que provee a cada proteína de propiedades únicas. Los aminoácidos se unen entre sí originando péptidos. Según su tamaño molecular, pueden ser oligopéptidos, formados por no más de 10 aminoácidos y polipéptidos, constituidos por más de 10 aminoácidos. Cuando el número de aminoácidos supera los 50 y el polipéptido tiene una estructura tridimensional específica, entonces se habla propiamente de proteínas.

3.2 FUNCIONES DE LAS PROTEÍNAS

-ENZIMAS

Es la función más importante.

- Las enzimas son las proteínas más numerosas y especializadas y actúan como biocatalizadores de las reacciones que constituyen el metabolismo celular.
- Se diferencian de los catalizadores no biológicos porque las enzimas son específicas de la reacción que catalizan y de los sustratos que intervienen en ellas.

- Estructurales

Es una de las funciones más características:

- Algunas *glucoproteínas* forman parte de las membranas celulares.
- Otras proteínas forman el citoesqueleto de las células, las fibras del huso, de los cilios y flagelos.
- *Histonas* forman parte de los cromosomas eucariotas.
- *Colágeno*, que mantiene unidos los tejidos animales y forma los tendones y la matriz de los huesos y cartílagos.
- *Elastina*, en el tejido conjuntivo elástico (ligamentos paredes de vasos sanguíneos).
- La *queratina*, que se sintetiza en la epidermis y forma parte de pelos, uñas, escamas de reptiles, plumas, etc.
- La *fibrina*, que forma la seda y las telas de arañas. Es una disolución viscosa que solidifica rápidamente al contacto con el aire.

-Transporte

Además de las proteínas transportadoras de las membranas, existen otras extracelulares que transportan sustancias a lugares diferentes del organismo.

- *Hemoglobina*, la hemocianina y la mioglobina del músculo estriado.
- Los *citocromos* transportan electrones en la cadena respiratoria (mitocondrias) y en la fase luminosa de la fotosíntesis (cloroplastos).
- La *seroalbúmina* transporta ácidos grasos, fármacos y productos tóxicos por la sangre.
- Las *lipoproteínas* transportan el colesterol y los triacilglicéridos por la sangre.

-Motora /contráctil

El movimiento y la locomoción en los organismos unicelulares y pluricelulares dependen de las proteínas contráctiles: la *dineína*, en cilios y flagelos, la *actina* y *miosina*, responsables de la contracción muscular.

-Almacenamiento

En general, las proteínas no se utilizan para la obtención de energía. No obstante, algunas como la *ovoalbúmina* de la clara de huevo, la *caseína* de la leche o la *gliadina* de la semilla de trigo, son utilizadas por el embrión en desarrollo como nutrientes.

-Anticongelante

Las proteínas intracelulares y del medio interno intervienen en el mantenimiento del equilibrio osmótico en coordinación con los tampones.

-Defensa

Inmunoglobulina, trombina y fibrinógeno.

-Hormonal

Insulina y glucagón. Hormona del crecimiento segregada por la hipófisis. Calcitonina.

-Homeostasis

Las proteínas intracelulares y del medio interno intervienen en el mantenimiento del equilibrio osmótico en coordinación con los tampones

3.3 CLASIFICACIÓN DE PROTEÍNAS

-Holoproteínas: Formadas solamente por aminoácidos. Se clasifican en:

1. Fibrosas. Más simples que las globulares. Forman estructuras alargadas, ordenadas en una sola dimensión, formando haces paralelos. Son responsables de funciones estructurales y protectoras.

Tenemos: **Colágenos:** *en tejidos conjuntivos, cartilagosos*, **Queratinas:** *En formaciones epidérmicas: pelos, uñas, plumas, cuernos*, **Elastinas:** *En tendones y vasos sanguíneos*
Fibroínas: *En hilos de seda, (arañas, insectos).*

2. Globulares. Más complejas que las fibrosas. Forman estructuras compactas, casi esféricas, solubles en agua o disolventes polares. Son responsables de la actividad celular.

Prolaminas: *Zeína (maíz), gliadina (trigo), hordeína (cebada)*, **Gluteninas:** *Glutenina (trigo), orizanina (arroz).* **Albúminas:** *Seroalbúmina (sangre), ovoalbúmina (huevo), lactoalbúmina (leche)* **Hormonas:** *Insulina, hormona del crecimiento, prolactina, tirotrópina*
Enzimas: *Hidrolasas, Oxidasas, Ligasas, Liasas, Transferasas.*

-Heteroproteínas: Formadas por una fracción proteínica y por un grupo no proteínico, que se denomina "grupo prostético". Se clasifican según la naturaleza del grupo prostético en:

1. Glucoproteínas: *ribonucleasa mucoproteínas, anticuerpos, hormona luteinizante*

2. Lipoproteínas: *De alta, baja y muy baja densidad, que transportan lípidos en la sangre*

3. Nucleoproteínas: Nucleosomas de la cromatina, ribosomas, histonas y protaminas de eucariotas.

4. Cromoproteínas: Pueden ser de dos tipos:

a) **Porfirínicas.** Hemoglobina, mioglobina que transportan oxígeno, citocromos, que transportan electrones

b) **No porfirínicas** como la hemocianina (pigmento respiratorio de crustáceos y moluscos, de color azul y que contiene cobre)

5. Fosfoproteínas: Tienen PO_4H_3 en el grupo prostético. La caseína de la leche.

| | | |
|------------------|-----------------|------------------------|
| PROTEÍNAS | Holoproteínas | Proteínas filamentosas |
| | | Proteínas globulares |
| | Heteroproteínas | Cromo proteínas |
| | | Glucoproteínas |
| | | Lipoproteínas |
| | | Nucleoproteínas |
| | | Fosfoproteínas |
| | | |

3.4 PROPIEDADES DE LAS PROTEÍNAS

Las propiedades de las proteínas dependen sobre todo de los radicales R libres y de que éstos sobresalgan de la molécula y, por tanto, tengan la posibilidad de reaccionar con otras moléculas.

El conjunto de aminoácidos de una proteína cuyos radicales poseen la capacidad de unirse a otras moléculas y de reaccionar con éstas se denomina centro activo de la proteína.

3.4.1 SOLUBILIDAD

Las proteínas son solubles en agua cuando adoptan una conformación globular. La solubilidad es debida a los radicales (-R) libres de los aminoácidos que, al ionizarse, establecen enlaces débiles (puentes de hidrógeno) con las moléculas de agua. Así, cuando una proteína se solubiliza queda recubierta de una capa de moléculas de agua (capa de solvatación) que impide que se pueda unir a otras proteínas lo cual provocaría su precipitación (insolubilización). Esta propiedad es la que hace posible la hidratación de los tejidos de los seres vivos.

La solubilidad depende del pH, temperatura, concentración iónica... A pesar de ser solubles, la mayoría de las membranas biológicas son impermeables al paso de proteínas.

3.4.2 DESNATURALIZACION Y RENATURALIZACION

La desnaturalización de una proteína se refiere a la ruptura de los enlaces que mantenían sus estructuras cuaternaria, terciaria y secundaria, conservándose solamente la primaria. En estos casos las proteínas se transforman en filamentos lineales y delgados que se entrelazan hasta formar compuestos fibrosos e insolubles en agua.

Los agentes que pueden desnaturalizar a una proteína pueden ser: calor excesivo; sustancias que modifican el pH; alteraciones en la concentración; alta salinidad; agitación molecular; etc... El efecto más visible de éste fenómeno es que las proteínas se hacen menos solubles o insolubles y que pierden su actividad biológica.

La mayor parte de las proteínas experimentan desnaturalizaciones cuando se calientan entre 50 y 60 °C; otras se desnaturalizan también cuando se enfrían por debajo de los 10 a 15 °C.

La desnaturalización puede ser reversible (renaturalización) pero en muchos casos es irreversible.

3.4.3 ESPECIFICIDAD

Es una de las propiedades más características y se refiere a que cada una de las especies de seres vivos es capaz de fabricar sus propias proteínas (diferentes de las de otras especies) y, aún, dentro de una misma especie hay diferencias proteicas entre los distintos individuos. Esto no ocurre con los glúcidos y lípidos, que son comunes a todos los seres vivos.

La enorme diversidad proteica interespecífica e intraespecífica es la consecuencia de las múltiples combinaciones entre los aminoácidos, lo cual está determinado por el ADN de cada individuo.

La especificidad de las proteínas explica algunos fenómenos biológicos como: la compatibilidad o no de trasplantes de órganos; injertos biológicos; sueros sanguíneos; etc... o los procesos alérgicos e incluso algunas infecciones.

3.4.4 CAPACIDAD AMORTIGUADORA

Las proteínas, al estar constituidas por aminoácidos, tienen un comportamiento anfótero y esto las hace capaces de neutralizar las variaciones de pH del medio, ya que pueden comportarse como un ácido o una base y por tanto liberar o retirar protones (H⁺) del medio donde se encuentran.

3.5 ESTRUCTURA DE LAS PROTEÍNAS

La estructura tridimensional de una proteína es un factor determinante en su actividad biológica. Tiene un carácter jerarquizado, es decir, implica unos niveles de complejidad creciente que dan lugar a 4 tipos de estructuras: primaria, secundaria, terciaria y cuaternaria.

Cada uno de estos niveles se construye a partir del anterior.

La **estructura primaria** está representada por la sucesión lineal de aminoácidos que forman la cadena peptídica y, por lo tanto, indica qué aminoácidos componen la cadena y el orden en que se encuentran. El ordenamiento de los aminoácidos en cada cadena peptídica, no es arbitrario sino que obedece a un plan predeterminado en el ADN.

Esta estructura define la especificidad de cada proteína.

La **estructura secundaria** está representada por la disposición espacial que adopta la cadena peptídica (estructura primaria) a medida que se sintetiza en los ribosomas. Es debida a los giros y plegamientos que sufre como consecuencia de la capacidad de rotación del carbono y de la formación de enlaces débiles (puentes de hidrógeno).

Los **tipos de estructuras secundarias** más comunes son la **hélice- α** y la hoja o **lámina plegada β** . Ambas **estructuras** mantienen su forma mediante puentes de hidrógeno que se establecen entre los grupos -CO- y -NH- del enlace peptídico. En este caso, el -CO- actúa como aceptor de H y el NH como donador de H, de esta manera, la cadena polipeptídica adoptará conformaciones de mayor estabilidad.

La estructura secundaria en α -hélice se forma al enrollarse helicoidalmente sobre sí misma la estructura primaria.

La **estructura terciaria** está representada por los superplegamientos y enrollamientos de la estructura secundaria, constituyendo formas tridimensionales geométricas muy complicadas que se mantienen por enlaces fuertes (puentes disulfuro entre dos cisteínas) y otros débiles (puentes de hidrógeno; fuerzas de Van der Waals; interacciones iónicas e interacciones hidrofóbicas).

Desde el punto de vista funcional, esta estructura es la más importante pues, al alcanzarla es cuando la mayoría de las proteínas adquieren su actividad biológica o función.

Muchas proteínas tienen estructura terciaria globular caracterizada por ser solubles en disoluciones acuosas, como la mioglobina o muchos enzimas. Las conformaciones globulares se mantienen estables por la existencia de enlaces entre los radicales R de los aminoácidos.

Las funciones de las proteínas dependen del plegamiento que adopten.

Esta estructura está altamente influenciada por la estructura primaria.

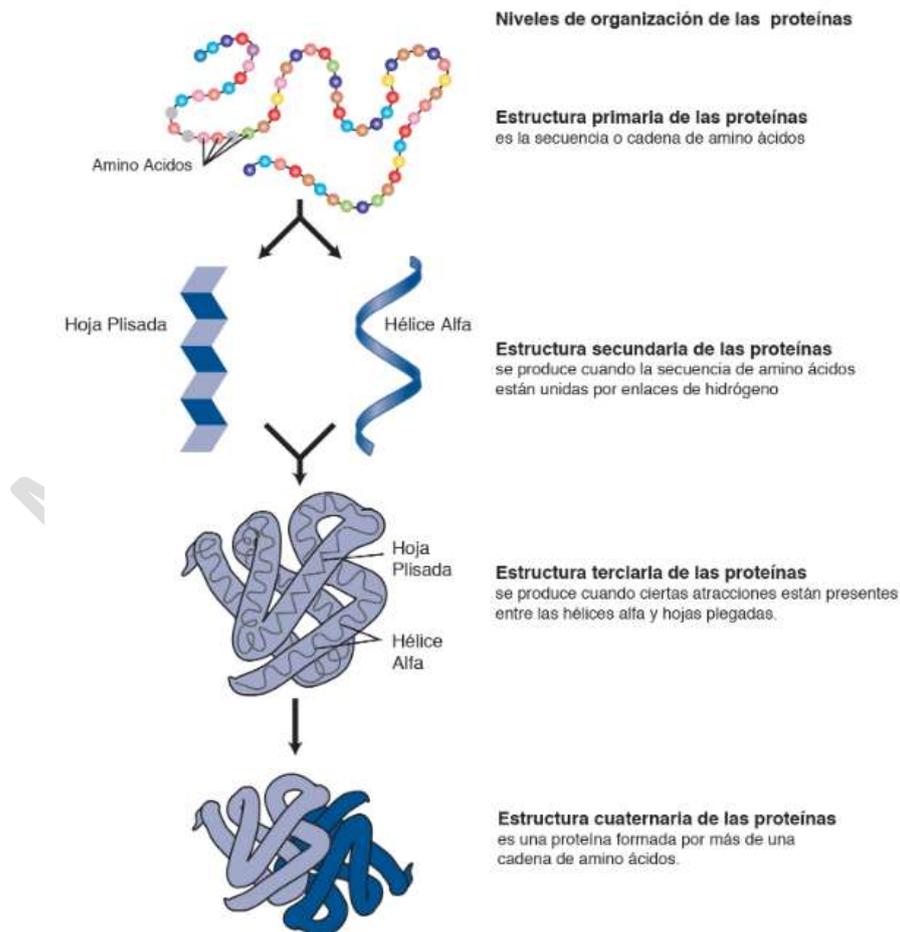
Sin embargo, no todas las proteínas llegan a formar estructuras terciarias. En estos casos mantienen su estructura secundaria alargada dando lugar a las llamadas proteínas

filamentosas, que son insolubles en agua y disoluciones salinas siendo por ello idóneas para realizar funciones esqueléticas. Entre ellas, las más conocidas son el colágeno de los huesos y del tejido conjuntivo; la queratina del pelo, plumas, uñas, cuernos, etc...; la fibroina del hilo de seda y de las telarañas y la elastina del tejido conjuntivo, que forma una red deformable por la tensión.

La **estructura cuaternaria** está representada por el acoplamiento de varias cadenas polipeptídicas, iguales o diferentes, con estructuras terciarias (protómeros) que quedan autoensambladas por enlaces débiles, no covalentes. Esta estructura no la poseen, tampoco, todas las proteínas. Algunas que sí la presentan son: la hemoglobina y los enzimas alostéricos.

Según el número de protómeros que se asocian, las proteínas que tienen estructura cuaternaria se denominan:

- -Dímeros: hexoquinasa.
- -Tetrámero: hemoglobina, canal de K⁺
- -Pentámeros, como la ARNpolimerasa.
- -Polímeros: cápsida del virus de la poliomiéltis, de 60 subunidades proteicas, y filamentos de actina y miosina de las células musculares, etc).



3.6 SÍNTESIS DE PROTEÍNAS

La síntesis proteica se produce mediante TRADUCCIÓN del ADN, en el citoplasma donde se encuentran los ribosomas, como en el retículo endoplasmático rugoso.

El ARN-m transporta la información genética codificada en forma de ribonucleótidos desde los cromosomas a los ribosomas.

Los ribonucleótidos son leídos en una secuencia de triplete de nucleótidos llamados CODONES (Cada uno de estos tripletes).

Se produce en tres fases:

INICIACION: es el resultado de la asociación de las subunidades del ribosoma y el acoplamiento del primer aminoacil-ARN-t con el codón de iniciación mediante el emparejamiento de bases anticodon-codón. El codón de iniciación suele ser el AUG.

ELONGACIÓN: Consiste en la adición de aa` al extremo carboxilo de la cadena, mediante un nuevo aminoacil-ARN-t. El ribosoma continúa trasladando los codones restantes hasta que llega al codón de terminación (UAA, UGA, UAG)

TERMINACIÓN: Se produce cuando 1 de los tres codones de terminación entra en el sitio A y no es reconocido por ningún ARN-t. Es reconocido por un tipo de proteína "factores de liberación" que produce la hidrólisis del enlace éster y libera la proteína recién sintetizada.

4. MÉTODOS DE AISLAMIENTO, CUANTIFICACIÓN Y APLICACIONES EN LABORATORIOS

El aislamiento de las proteínas es un método de segregación de un único tipo de proteína a partir de un grupo de proteínas que se encuentran en una mezcla. Este proceso es importante en el estudio de la función de la proteína, así como su estructura individual y cómo interactúa con otros nutrientes en el organismo. Existen diferentes técnicas de aislamiento de proteínas y, a través de ellas, se puede determinar las propiedades de las proteínas tales como tamaño, físico-química y la afinidad de unión.

En el Aislamiento/purificación de proteínas hay que tener en cuenta:

- -Naturaleza de la biomolécula: ADN, ARN, proteínas, lípidos.
- -Tipo de proteína: membrana, solubilidad.
- -Localización celular: citoplasma, extracelular, nuclear, agente.
- -Abundancia: complejidad (isoformas); rango dinámico.
- -Estabilidad de la proteína: hormona, enzima, otras proteínas, la temperatura.
- -Finalidad de la proteína: desnaturalización, actividad.
- -Complejidad de la muestra de partida: sangre / tejidos.
- -Contaminantes: proteasas, problemas purificación.

Es necesario:

- -Evitar la degradación, -Evitar la fosforilación

- tener en cuenta el almacenamiento, la temperatura.
- -Refrigeración, Hielo, Congelación/descongelación.
- -Tampones.
- -Uso de guantes.
- -Resuspensión/ agitación
- -Sales.

4.1 MÉTODOS

-Extracción

La extracción es una técnica de aislamiento de proteína en la que el tejido se divide en una solución para obtener la proteína a estudiar. El tejido se somete a procedimientos tales como ciclos de congelación, sonicación, homogeneización, filtración o permeabilización utilizando disolventes orgánicos. Después de que las proteínas solubles han sido separadas de las no solubles, la proteína de interés puede separarse de las membranas celulares y finalmente se extrae el ADN.

-Precipitación y solubilización diferencial

La precipitación y solubilización diferencial es una manera rentable de aislar proteínas a granel. Este método utiliza la precipitación con sulfato de amonio, durante el cual se añade al tejido este compuesto de manera creciente con el fin de recoger las diferentes fracciones de la proteína precipitada.

-Precipitación isoeléctrica

Las proteínas tienen un punto isoeléctrico (pI) diferente entre sí. Cuando igualamos el pH de la solución al pI de una proteína, ésta se encontrará con carga neta neutra y precipitará, quedando el resto en suspensión

-Ultracentrifugación

Otra técnica de aislamiento de proteína es la ultracentrifugación, que utiliza la fuerza centrífuga por medio de un dispositivo de ultracentrífuga para separar partículas de diferentes masas de una mezcla dada. Las partículas presentes en la mezcla se mueven hacia afuera de acuerdo con su masa, con las proteínas menos densas girando más lentamente que las más densas. Cuando se centrifuga el tiempo suficiente, las proteínas se segregan en función de su densidad, ya que permanecen en suspensión en los lugares en los cuales su densidad de flotación se equilibra con la fuerza centrífuga aplicada. Hay dos tipos de técnicas de ultracentrifugación: centrifugación y centrifugación en gradiente de sacarosa.

-Diálisis

Por su elevado peso molecular, las proteínas pueden separarse de otros solutos de bajo peso molecular de la solución por medio de los procedimientos de diálisis y ultrafiltración, por medio de membranas semipermeables sometidas a presión.

Tras la separación de las moléculas pequeñas, en el interior del saco queda una mezcla de proteínas que pueden separarse según su tamaño. Para ello, se utilizan dos técnicas: la cromatografía y la electroforesis.

-Cromatografía

También se pueden aislar proteínas por medio de un procedimiento de cromatografía. Una mezcla de proteínas se vierte en una columna rellena de diferentes materiales con los cuales pueden interactuar las proteínas presentes. Las proteínas se detectan de acuerdo al material con el que interactúan así como por su nivel de absorbencia. Existen muchos procedimientos de cromatografía, como exclusión de tamaño, interacción hidrófoba, intercambio iónico, de afinidad, de inmunoafinidad, de unión a metal y cromatografía líquida de alto rendimiento.

- **Cromatografía de exclusión molecular:** es un proceso de filtración por medio de un gel separador (sephadex).

La técnica se fundamenta en el distinto tamaño de las partículas proteicas. Al hacer pasar las proteínas disueltas en un tampón a través de la columna de cromatografía, aquellas de más bajo peso molecular quedan adsorbidas en los poros del gel, mientras que las de mayor tamaño van quedando excluidas a diferentes velocidades, dependiendo de su tamaño y forma.

- **Cromatografía de intercambio iónico:** se basa en la diferente carga de las moléculas proteicas a separar. La columna contiene una resina de intercambio iónico (aniónica o catiónica). Las proteínas son retenidas en función de su tipo de carga.

- **Cromatografía de afinidad:** se fundamenta en la actividad biológica de las moléculas proteicas a separar. Dependiendo del soporte empleado, algunas proteínas tienen una afinidad biológica por esta fase (ligandos), quedando separadas con respecto a las menos afines.

-Electroforesis

La mayoría de las biomoléculas poseen una carga eléctrica, cuya magnitud depende del pH del medio en el que se encuentran. Electroforesis a la técnica mediante la cual se separan las biomoléculas en disolución cuando se ven sometidas a un campo eléctrico.

Cada molécula se desplaza por efecto del campo, alcanzando una velocidad constante al equilibrarse la fuerza impulsora (fuerza del campo eléctrico) con la resistencia al avance (fuerza de fricción o rozamiento) impuesta por el medio en el que se desplaza.

Tipos: La electroforesis en gel de acrilamida con dodecil sulfato de sodio, que se conoce por su acrónimo SDS-PAGE (SDS-polyacrylamide gel electrophoresis) que es la más habitual, Isoelectroenfoque, electroforesis bidimensional.

Como las proteínas tienen carga eléctrica, para un pH determinado, tendrán una carga neta distinta entre sí: unas emigran más que otras, con una separación en bandas.

- Si el **pH** de la solución coincide con el **pI**: la carga de la proteína es nula.
- Si el **pH** está por debajo del **pI** (medio ácido): estarán con carga positiva (catión).
- Si el **pH** está por encima del **pI** (medio básico): estarán con carga negativa (anión).

Para la electroforesis de las proteínas en suero se utiliza un buffer con un pH de 8,6. Con este pH, las proteínas se van a comportar como aniones y la migración electroforética se va a realizar hacia el ánodo.

-Inmunotransferencia

Es una técnica utilizada para la detección y cuantificación de proteínas. Permite separar e identificar una proteína de interés específica a partir de una mezcla compleja de proteínas, por ejemplo, un lisado celular. La inmunotransferencia tiene aplicaciones en ámbitos como el diagnóstico, la biotecnología, la biología molecular o la proteómica, entre otros, y se usa mucho para evaluar los niveles de expresión proteica en las células, así como los cambios en el tamaño y otras propiedades.

-Concentración

Una vez terminado el proceso de aislamiento, la proteína separada se somete a un proceso de concentración como liofilización, en el que la proteína se seca y se separa de todas las demás partículas solubles mediante ultrafiltración, donde la solución de proteína se pasa a través de membranas permeables por medio de bombas o centrifugación. Una vez concentrada, la solución de proteína se puede utilizar para el estudio.

4.2 CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS

-Espectrofotometría. Método basado en la absorción de luz por una sustancia. Utiliza el espectro electromagnético, con equipos que miden en diferentes longitudes de onda.

Se basa en la Ley de Lambert-Beer que afirma que la cantidad de luz absorbida por un cuerpo depende de la concentración en la solución.

Los tipos de **Espectrofotómetros** son:

- Colorímetros (región visible del espectro).
- Densitómetros de geles de electroforesis (análisis de muestras en láminas)
- Espectrofotómetros de flujo continuo (cromatógrafos, p.ej.)
- Lector de placas de ELISA

Ensayos de cuantificación: Los principales métodos empleados para la determinación de proteínas totales son los siguientes:

-**Bradford:** utiliza Coomasie Blue. Absorbancia a 595 nm proporcional a la cantidad de colorante unido.

-**Micro BCA:** utiliza reacción del Cu^+ y enlaces peptídicos. Los iones cobre reaccionan con ácido bicinconínico. Absorbancia a 562 nm.

-**Lowry:** utiliza reacción del Cu^+ , producido por la de grupos OH con el reactivo de Folin-Ciocalteu fenol con Absorbancia a 750 nm, proporcional a la cantidad de colorante unido.

-**Biuret:** como BCA usa reacción del Cu^+ y enlaces peptídicos en solución alcalina. No lleva revelado y se mide a Absorbancia a 546 nm. Se determinan las proteínas totales existentes en el suero. Se utiliza el reactivo de Biuret. El reactivo reacciona con sales cúpricas en medio alcalino dando compuestos de color violáceo con una intensidad de color que depende de la cantidad de proteína.

El color obtenido se debe a un compuesto formado entre las sales cúpricas y los grupos carboxilo y amino de las proteínas. Se mide la absorbancia por fotolorimetría. Es el método más usado para la determinación de proteínas totales plasmáticas o séricas. Se puede utilizar para otras muestras biológicas siempre que tengan una concentración de proteínas superior a 1 g/dl.

-**Método de Kjeldahl:** se basa en determinar el contenido total de nitrógeno de la proteína. Las proteínas son aisladas del suero por medio de un precipitante (por ej. Ácido Túngstico). Se añade ácido sulfúrico (más calor) en un matraz de Kjeldahl hasta ser disueltas.

Después se valora el ácido y como conocemos la concentración inicial de éste, podemos conocer la concentración de NH_3 . Dado que lo que realmente medimos es el nitrógeno de la proteína y como sólo hay un 16% (valor medio) de N en las proteínas, se calcula:

$$\begin{array}{l} 100 \text{ ----- } 16 \\ X \text{ ----- } N \quad x = N * 6,25 \end{array}$$

4.3 APLICACIONES EN LABORATORIOS

La detección, cuantificación y análisis de proteínas son cruciales para investigar una gran variedad de procesos biológicos. La medición de la concentración de proteína es necesaria en procesos que abarcan desde la purificación y marcaje de proteínas hasta la preparación de muestras para electroforesis.

Se aplica para el diagnóstico de enfermedades, en biotecnología, en biología molecular y en proteómica.

En los laboratorios de Sanidad y Genética Animal se utilizan técnicas donde las proteínas son utilizadas como reactivo; o bien, para detectarlas y así comprobar:

- El estado sanitario ganadero.
- Detección de enfermedades de declaración obligatoria e investigar brotes.
- Mejora ganadera.
- Detección ETTs: Para la detección de proteína priónica patógena de las Encefalopatías Espongiformes Transmisibles por Inmunoensayo de doble anticuerpo (método sándwich); Detección de proteína priónica resistente a la proteinasa K de las Encefalopatías Espongiformes; Transmisibles por Western blot (Inmunotransferencia); Detección de proteína priónica patógena de las Encefalopatías Espongiformes Transmisibles por
- Inmunoensayo de captura utilizando un polímero químico.
- En el diagnóstico de enfermedades animales, una técnica que es ampliamente utilizada en los laboratorios de sanidad animal es el ensayo de inunoadsorción ligado a enzima (ELISA). Técnica que se puede utilizar tanto para detectar anticuerpos como antígenos.

BIBLIOGRAFÍA

Principios de Bioquímica. Lehninger. David L. Nelson. Michael M. Cox

MATERIAL NO OFICIAL

MATERIAL PARA LA PREPARACIÓN DEL TEMA 15

ÁCIDOS NUCLEICOS. CONCEPTO Y TIPOS. MÉTODOS DE AISLAMIENTO, CUANTIFICACIÓN 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. ÁCIDOS NUCLEICOS: CONCEPTO**
- 2. TIPOS DE ÁCIDOS NUCLEICOS**
 - 2.1. ÁCIDO DESOXIRRIBONUCLEICO (ADN)
 - 2.2. ÁCIDO RIBONUCLEICO (ARN)
- 3. MÉTODOS DE AISLAMIENTO**
- 4. MÉTODOS DE CUANTIFICACIÓN**
- 5. APLICACIONES EN LABORATORIOS**

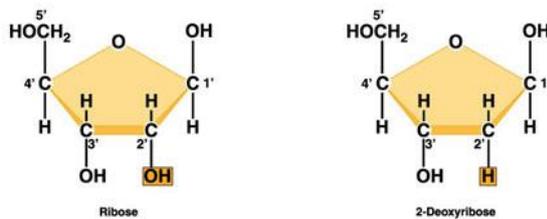
MATERIAL NO OFICIAL

1. ÁCIDOS NUCLEICOS: CONCEPTO

Los ácidos nucleicos son biomoléculas con función de **almacenamiento y expresión** de la información genómica en los organismos.

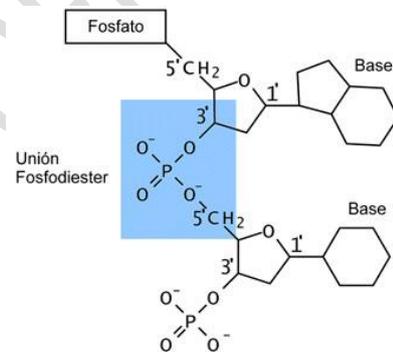
Su presencia es común a **todos los organismos vivos** y a los **virus**, y, dada su función, son las moléculas que permiten el almacenamiento de la información básica necesaria para el desarrollo de los organismos, así como su **transmisión** entre generaciones.

En cuanto a su estructura, se trata de **biopolímeros** compuestos por largas cadenas de subunidades denominadas **nucleótidos**. Estos nucleótidos están formados por **un azúcar estructural**, en concreto una **pentosa** (que puede ser una ribosa o una desoxirribosa) unida mediante



1. Pentosas presentes en los ácidos nucleicos. Fuente: Cultek

un enlace **N-glicosídico** a una molécula denominada **base orgánica nitrogenada**, conformando la estructura conocida como **nucleósido**. Los **nucleósidos** se unirán mediante un **enlace éster** a una molécula de **ácido fosfórico** (que en la estructura polimerizada aparece como un grupo **fosfato**), conformando así el **nucleótido**.



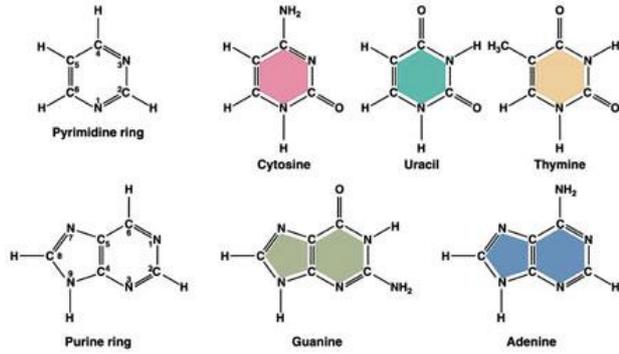
2. Estructura de los enlaces fosfodiéster. Fuente: Cultek

Las largas cadenas se forman a través de enlaces **fosfodiéster**, que permiten la unión del grupo fosfato de un nucleótido al azúcar estructural del nucleótido consecutivo.

Las bases orgánicas nitrogenadas que estas moléculas presentan en su estructura tienen algunas particularidades que hacen posible su conformación (y por tanto su función), y que también resultan clave para comprender su utilidad para el desarrollo de pruebas diagnósticas:

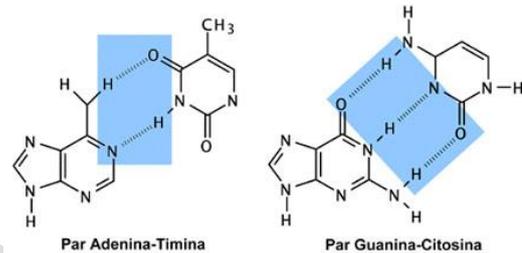
- Su estructura es **aromática** (y por tanto **plana**) y **son hidrofóbicas**, lo cual permite a los ácidos nucleicos adoptar su estructura característica.
- Son capaces de absorber luz en el espectro ultravioleta, lo cual resulta de utilidad para el desarrollo de técnicas para su detección.
- Existen cinco tipos de **bases orgánicas nitrogenadas**, y la presencia de una u otra dará lugar a la diferenciación de los nucleótidos. Pueden ser diferenciadas por su estructura química en dos grupos:

- **Pirimidinas.** Su estructura está conformada por un único anillo aromático (denominado anillo pirimidínico). Son la **citosa**, la **timina** (presente únicamente en el ADN) y el **uracilo** (exclusivo del ARN)



3. Estructura de las bases orgánicas nitrogenadas. Fuente: Cultek

- **Purinas.** En su estructura presentan dos anillos aromáticos (purínicos). Son la **adenina** y la **guanina**.
- Dada su estructura química, las bases orgánicas nitrogenadas pueden formar enlaces entre sí, **dos a dos, mediante puentes de hidrógeno**. La **complementariedad** que permite que se formen estos enlaces se da entre:



4. Unión entre las bases orgánicas nitrogenadas por complementariedad.

- La **guanina** y la **citosa**
- La **adenina** y la **timina** o el **uracilo**

Estas particularidades les confieren a los ácidos nucleicos algunas de sus **características básicas**:

- Presentan una **secuencia**, definida por el orden en que se presentan los nucleótidos (según la base nitrogenada que presentan) en la cadena. Esta secuencia determinará el orden en que se incorporarán los aminoácidos durante la síntesis de proteínas.
- Dada su **complementariedad**, los ácidos nucleicos pueden **replicarse**, generándose una cadena nueva al añadirse los nucleótidos complementarios a la cadena original. Además, esta complementariedad permite la formación de ARN a partir del ADN. Esta característica es la base para muchas de las técnicas que se utilizan en la actualidad para la detección de los ácidos nucleicos.

Para comprender la función de los ácidos nucleicos se debe atender a lo establecido por el **dogma central de la biología molecular**. Este relaciona estas moléculas con la transmisión de información genética, proponiendo que la síntesis de proteínas tiene lugar en dos pasos en los que interfieren los ácidos nucleicos:

- La **transcripción**, en la cual a partir de una molécula de ácido desoxirribonucleico (ADN) se forma una molécula de ácido ribonucleico (ARN, en concreto ARN mensajero)
- La **traducción**, consistente en la síntesis de polipéptidos mediante la incorporación secuencial de aminoácidos a partir de la secuencia del ARN mensajero. En esta fase,

además, actúan otros tipos de moléculas de ARN, como en ARN de transferencia y el ARN ribosómico.

2. TIPOS DE ÁCIDOS NUCLEICOS

Según su composición química y estructura, se pueden diferenciar dos tipos de ácidos nucleicos:

- **Ácido desoxirribonucleico (ADN)**. Es la principal molécula de **almacenamiento** de la información genética en los organismos. Se encuentra tanto en el **núcleo** como en algunas **organelas** (como las mitocondrias o los plastos) de los individuos eucariotas. En organismos procariotas se encuentra en el **nucleoide** y en otros elementos genéticos, como los **plásmidos**.
- **Ácido ribonucleico (ARN)**. Sus funciones están relacionadas con la formación de proteínas a partir de la información contenida en el ADN. En cualquier caso, en algunos virus también actúa como molécula de **almacenamiento** de esta información. De forma general, se encuentra y lleva a cabo su función en el **citoplasma** de las células.

2.1. ÁCIDO DESOXIRIBONUCLEICO (ADN)

El ADN es la biomolécula encargada de **almacenar la información genética** en todos los organismos celulares y en la mayoría de los virus.

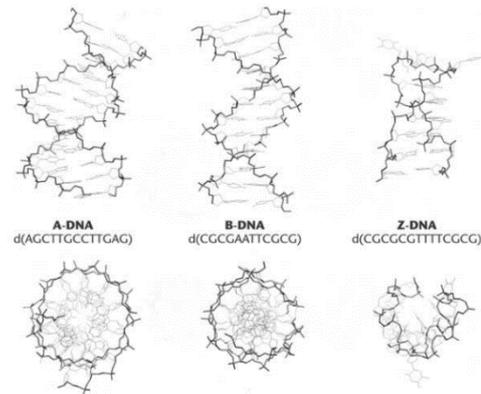
Las cadenas de ADN están conformadas por la polimerización de **desoxirribonucleótidos** (es decir, nucleótidos cuyo azúcar aromático es la **desoxirribosa**). Para su función es tremendamente importante su estructura, que puede ser definida a nivel primario, secundario, terciario y cuaternario.

La **estructura primaria** consiste en la **secuencia** de nucleótidos presentes en una cadena de ADN. Esta secuencia, como ya se ha definido en apartados anteriores, se define en función del orden en que las bases orgánicas nitrogenadas aparecen en los nucleótidos que conforman la cadena. Teniendo en cuenta los enlaces que intervienen en la polimerización (que se dan entre el carbono 3' de un nucleótido y el grupo fosfato unido al carbono 5' del nucleótido consecutivo), y dado que por tanto el primer nucleótido de la cadena tendrá libre el grupo unido al carbono 5' y el último tendrá libre el carbono 3', la secuencia de nucleótidos se **ordena en sentido 5' → 3'**.

En cuanto a su **estructura secundaria**, esta define la característica **doble hélice de ADN**. Esta fue propuesta por Watson y Crick a principios de la década de 1950, basándose en el análisis de la información disponible en ese momento, incluida la generada por otros grupos de investigación. Cabe mencionar las aportaciones de Rosalind Franklin (quien trabajaba en grupo de Maurice Wilkins), que utilizó la técnica de **cristalografía de rayos X** para dilucidar la estructura de esta molécula. Este descubrimiento supuso la concesión del Premio Nobel de Medicina a Watson y Crick en 1962.

Se trata de una **doble cadena**, conformada por **dos cadenas complementarias antiparalelas** (pues el extremo 5' de una cadena se enfrenta el extremo 3' de la opuesta) unidas a través de puentes de hidrógeno entre sus bases orgánicas nitrogenadas. Dada su estructura química, entre la adenina y la timina se forman dos puentes de hidrógeno, mientras que entre la citosina y la guanina se forman tres puentes de hidrógeno. Estas cadenas unidas giran en torno a un eje, estabilizándose estos giros mediante puentes de hidrógeno adicionales entre los nucleótidos. Según el sentido del giro (dextrógiro o levógiro) y su amplitud pueden definirse **tres modelos diferentes**:

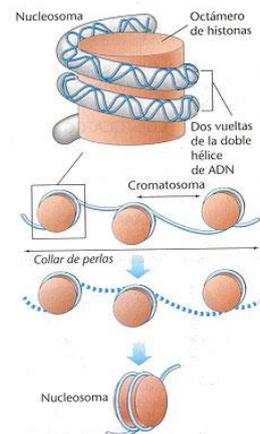
- En el **ADN-B**, el modelo propuesto por Watson y Crick, el giro es **dextrógiro**, y en cada vuelta hay **10,4 pares de bases**, con un paso de rosca (distancia que se avanza en un giro) de **34 Armstrong**.
- La conformación en **ADN-A** es más ancha, también con un giro dextrógiro, pero con **11 pares de bases** por vuelta y un paso de rosca de **28 Å**.
- El **ADN-Z** es un modelo de conformación **levógira** y en "zig-zag", con **12 pares de bases** por vuelta y un paso de rosca de **45 Å**.



5. Modelos de la hélice de ADN. Fuente: *Encyclopedia of life sciences*. DOI: 10.1038/npg.els.0003122

Dada esta estructura de **doble cadena**, siempre que en una de ellas se encuentre una base orgánica nitrogenada, en la cadena antiparalela se encontrará la base **complementaria a esta**. Por eso, el **contenido de la molécula en una base y su base complementaria siempre será el mismo**, es decir, el contenido en **adenina** igualará al de **timina**, y el contenido en **guanina** igualará al contenido en **citocina**. Por ello, el contenido total de **purinas y de pirimidinas** siempre será **coincidente**. Este hecho se conoce como **ley de Chargaff**.

Esta estructura secundaria se "empaqueta" en una **estructura terciaria**, conocida como **súper-hélice o ADN superenrollado**. Este empaquetamiento se da alrededor de proteínas, fundamentalmente **histonas**, pero también proteínas no histónicas (como las **protaminas**). La unión del ADN con las **histonas** da lugar a los denominados **nucleosomas**. La molécula de ADN superenrollada alrededor de las histonas (con una conformación en forma de "collar de perlas") se denomina **cromatina**.



6. Estructura terciaria del ADN. Fuente: *Cultek*

En los organismos **eucariotas**, la cromatina se enrolla dando lugar a una **estructura cuaternaria conocida como solenoide**. En la fase de **división celular**, se da una compactación a mayor nivel, dando lugar a la formación de los **cromosomas**.

2.2. ÁCIDO RIBONUCLEICO (ARN)

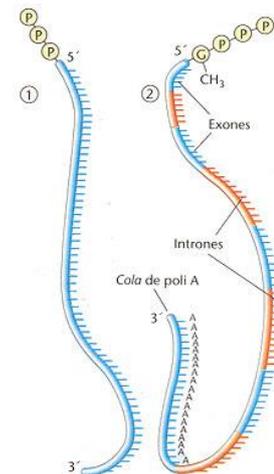
El **ARN** es una molécula que, en general, no presenta función de **almacenamiento de la información genética** (excepto en algunos virus), sino que interviene en diferentes fases de la síntesis de proteínas a partir de la información genética contenida en el ADN. Por ello, se sintetiza a partir de este, por polimerización de una cadena de ARN empleando el ADN como molde.

En cuanto a la conformación de las **cadena de ARN**, es muy similar a la expuesta para el ADN, pero formada por **ribonucleótidos** (nucleótidos cuya pentosa es la ribosa) en lugar de los desoxirribonucleótidos presentes en el ADN. Además, entre las bases orgánicas nitrogenadas presentes puede encontrarse el **uracilo**, en lugar de la timina.

Además, una diferencia fundamental con la estructura del ADN es que el ARN se presenta en diferentes conformaciones **monocatenarias**, en lugar de formar dobles cadenas.

Existen múltiples tipos de ARN, con diferentes funciones. Sin embargo, existen tres tipos principales de ARN que se encuentran en mayor proporción en los organismos y que participan a diferentes niveles en la síntesis de proteínas:

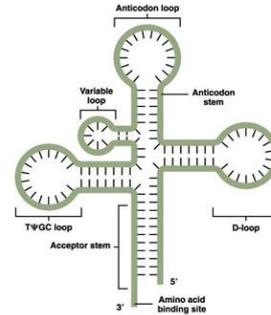
- El **ARN mensajero (ARNm)** consiste en una única molécula, lineal, formada por polimerización a partir de una cadena de ADN y que por tanto presentará una secuencia complementaria a esta. El ARNm es el producto de la fase de **transcripción**, y es la molécula intermedia que permite la transmisión de la información genética a la síntesis de proteínas. En los organismos eucariotas, es fundamental distinguir además entre las regiones **exónicas** (o exones), que serán las regiones de los genes que **codifican para la síntesis de proteínas**, y las regiones **intrónicas**, no codificantes. Para eliminar estas regiones no codificantes y que por tanto no intervendrán en la síntesis proteica, debe tener lugar un proceso de **"splicing"** o corte.
- El **ARN ribosomal (ARNr)** se encuentra conformando las subunidades ribosomales, unido a proteínas. La síntesis proteica tiene lugar en estos orgánulos, por lo que el ARNr tiene un papel activo, fundamentalmente **estructural**, en dicha síntesis. Así, permiten la unión de las moléculas de ARNm a los ribosomas por complementariedad de bases. En cualquier caso, se sabe que el ARNr también presenta una función **catalítica**.
- El **ARN de transferencia (ARNt)** presenta una estructura tridimensional característica, en forma de hoja de trébol, y se trata de la última molécula de ARN encargada de intervenir en la síntesis de proteínas, ya que permite la transferencia de un **aminoácido** (unido en su extremo 3') a la proteína en formación mediante su unión temporal al ribosoma. Esto lo hace gracias a la complementariedad entre el ARNm y una región del ARNt compuesta por **tres pares de bases**, denominada **anticodón**. La



ARN mensajeros (ARNm) de procarionotes (bacterias) (1) y de eucariotes (2).

7. Estructura del ARNm.
Fuente: Cultek

secuencia complementaria en el ARNm se denomina **codón**. Cada codón codificará para un aminoácido determinado, lo cual puede darse gracias a que el ARNt que presenta el **anticodón específico** estará unido a **dicho aminoácido**. Qué codón dará lugar a cada uno de los aminoácidos proteínogénicos está determinado en el denominado "**código genético**", que asocia ambos elementos. Este código genético es **degenerado** (existen más codones que aminoácidos, por lo que varios tripletes diferentes pueden dar codificar para el mismo aminoácido), y **no solapado** (cada nucleótido forma parte de un único codón). Además, es **universal**, ya que esta correspondencia se da en todos los organismos, existiendo algunas excepciones (principalmente, el código genético mitocondrial).



8. Estructura del ARNt. Fuente: Cultek

Existen además otros tipos de ARN, clasificados en el grupo de **ARN no codificante** (en el que también se incluyen los ya mencionados ARNr y ARNt), entre los cuales cabe destacar:

- **Micro-ARN (mi-ARN o miRNA)**, moléculas que intervienen en la regulación de la expresión génica.
- **ARN pequeño de interferencia (ARNpi o siRNA)**, que también interviene en la regulación de la expresión génica a través de la **supresión de la expresión** de ciertos genes mediante un proceso conocido como **ribointerferencia**.
- **ARN asociados a Piwi (piRNA)**, que regulan la expresión génica al impedir la expansión de **transposones**.

En cuanto al **ARN genómico presente en algunos géneros de virus**, puede tratarse de una molécula **lineal o circular**, y de **cadena doble o simple**. A su vez, el ARN monocatenario puede presentar **polaridad positiva o negativa**.

Para la traducción del material genético a una proteína, se requiere una molécula de ARNm, monocatenaria y de polaridad positiva. Así, en el caso de los virus que presenten ARN monocatenario de polaridad negativa, así como en los virus de ARN bicatenario, deberá tener lugar un paso intermedio de formación de ARNm complementario mediante la acción de ARN polimerasas.

En el caso particular de los **retrovirus**, se requiere la formación de ADN complementario intermedio para la replicación, para lo cual entra en juego la enzima **transcriptasa inversa o retrotranscriptasa**.

3. MÉTODOS DE AISLAMIENTO

El **aislamiento** de los ácidos nucleicos es un primer paso fundamental para la posterior aplicación de otros métodos para su detección, habiendo cobrado una gran importancia con el desarrollo e implementación de las **técnicas moleculares**, como la PCR o la secuenciación.

Para poder separar los ácidos nucleicos del resto de componentes celulares, se llevan a cabo las denominadas **técnicas de extracción**.

Existen múltiples técnicas para llevar a cabo esta extracción, así como múltiples kits comerciales e incluso **equipos robóticos** para su **automatización**.

En términos generales, en el caso de organismos celulares las técnicas para la extracción y aislamiento de ácidos nucleicos incluyen una **fase de lisis celular** para la destrucción de las estructuras celulares, permitiendo la liberación de los ácidos nucleicos. Para la separación de estas moléculas del resto, se pueden emplear diversos métodos que se basan en las **propiedades fisicoquímicas** de los ácidos nucleicos:

- Precipitación mediante el uso de **sales y alcoholes**. En primer lugar, las proteínas se desnaturalizan y eliminan por precipitación **salina**, tras lo cual se precipita el ADN en solución mediante la adición de alcoholes (como el isopropanol o el etanol).
- Extracción con **solventes orgánicos**. El uso de este tipo de solventes permite la eliminación de moléculas con diferentes características físicoquímicas, que se eliminarán al disolverse en estos. Mediante la adición secuencial de **fenol y cloroformo** y la posterior centrifugación se da lugar a la diferenciación de dos fases: un sobrenadante acuoso que se debe recoger, en el cual se encuentran en solución los ácidos nucleicos, y una fase orgánica que contiene las proteínas (disueltas en el fenol) o los lípidos (disueltos en el cloroformo).
- Extracción por **adsorción en columna de sílice**. Se trata de la técnica empleada en la mayoría de kits comerciales para la extracción. Para ello, se añaden soluciones salinas que permiten la retención de los ácidos nucleicos en la columna, tras lo cual se realiza el lavado para eliminar las partículas que no han quedado retenidas y finalmente la **elución** de los ácidos nucleicos con agua o soluciones hipotónicas.
- Extracción mediante **separación magnética**, empleando esferas magnéticas a las cuales se unen los ácidos nucleicos, que posteriormente se lavarán para alcanzar un alto nivel de purificación del material extraído. Es la técnica empleada en muchos de los **robots** que permiten la automatización de la extracción.

Es frecuente **combinar algunas** de estas técnicas, por ejemplo realizando en primer lugar una extracción con solventes orgánicos y posteriormente la precipitación del ADN aislado mediante la adición de alcoholes.

Tras este aislamiento de los ácidos nucleicos, en múltiples ocasiones resulta necesario **aumentar el número de moléculas** en la muestra para realizar los análisis pertinentes. Para

ello, se emplean **técnicas de PCR**, que además permiten **aislar únicamente el segmento genómico de interés para el análisis tras su amplificación**.

Además, también se puede hacer la separación de fragmentos de ácidos nucleicos mediante técnicas de **electroforesis**, que permiten la separación en función del **tamaño** de los mismos (ya que, en el caso de las moléculas de ácido nucleico, todos los fragmentos presentarán la misma carga eléctrica). Para ello, sin embargo, es necesario que exista la cantidad suficiente de cada uno de los fragmentos a separar para poder visualizarlos.

Así, mediante la **extracción de ácidos nucleicos** seguida de la realización de una PCR, se puede aislar de forma sencilla el **segmento genómico** de interés, obteniendo cantidad suficiente del mismo y separándolo del resto de componentes celulares.

4. MÉTODOS DE CUANTIFICACIÓN

La cuantificación de ácidos nucleicos es un paso **fundamental** previo a la utilización de los ácidos nucleicos extraídos para poder llevar a cabo las técnicas de biología molecular.

Conocer la cantidad de ácido nucleico extraído, así como su nivel de pureza, es fundamental para poder evaluar si la muestra es apta para el análisis posterior.

A este fin, las técnicas empleadas con mayor frecuencia son los métodos de **espectrofotometría**. Estos se basan en la capacidad de absorción de la luz emitida a una longitud de onda específica por parte de las moléculas presentes en una solución. Así, en función del nivel de absorción a una longitud de onda característica de los ácidos nucleicos, los **espectrofotómetros** son capaces de determinar la **cantidad de ácidos nucleicos presentes en la muestra**. Además, comparar este valor con la absorción obtenida a otra longitud de onda específica puede proporcionar información sobre otros compuestos potencialmente presentes en la solución, y por tanto sobre el **grado de pureza** de la muestra analizada.

- **Cuantificación de ADN.** Para la cuantificación, se realiza la lectura a una longitud de onda de **260 nm**. Además, se puede medir la absorción a **280 nm** y **230 nm** para obtener información sobre la pureza de la muestra:
 - En cuanto al **cociente A260/280**, se considera que el ADN de pureza óptima deberá presentar un valor de 1,8 a 2,0. Por debajo de valores de 1,6 para este cociente, se considera que puede existir una contaminación por compuestos aromáticos (por ejemplo, fenoles), mientras que cocientes por encima de 2,1 podrían indicar presencia de ARN en la muestra.
 - El cociente **A260/230** debe encontrarse entre 1,8 y 2,2 para muestras de pureza óptima. Un cociente por debajo de 1,8 es indicativo de presencia de contaminantes. Por debajo de 1,5, la muestra debe considerarse altamente contaminada. Algunas de las moléculas contaminantes que absorben a 230 nm son las sales, los fenoles o los carbohidratos.

- **Cuantificación de ARN.** Como en el caso del ADN, la longitud de onda empleada serán los **260 nm**. En cuanto a la pureza de la muestra:
 - El cociente **A260/280** debería encontrarse, en muestras de pureza óptima, entre 2,0 y 2,2. Muestras con cocientes inferiores a 1,7 se consideran contaminadas.
 - En cuanto al cociente **A260/A230**, debe encontrarse en valores de 2 o ligeramente superiores. Sin embargo, no existe consenso sobre el valor mínimo de este cociente para considerar aceptables las muestras de ARN. De forma general, se suelen considerar aceptables valores por encima de 1,5.

En cualquier caso, aunque las técnicas más empleadas sean las de **espectrofotometría**, existen otros métodos para la cuantificación de los ácidos nucleicos presentes en una muestra tras la extracción:

- Estimación de la concentración y la integridad de las muestras mediante **fluorimetría**, mediante el uso de fluoróforos de unión al ADN de doble cadena. Esta técnica presenta la desventaja de que el ADN presente en la muestra debe mantenerse íntegro, y además no es útil para el análisis de ARN monocatenario.
- Análisis de la calidad e integridad de los ácidos nucleicos mediante **electroforesis en gel de agarosa**. Cargando las muestras en un gel de agarosa se puede comprobar su integridad, ya que, en caso de que los ácidos nucleicos presentes se encuentren degradados, la banda predominante se presentará con menor definición y acompañada de una estela a lo largo de su trayectoria por el gel.
- Métodos **comerciales** para la determinación de la cantidad y calidad de los ácidos nucleicos presentes en la muestra, como los sistemas **TapeStation** de **Agilent®**, basados en sistemas de electroforesis.

A pesar de que hasta ahora se han mencionado técnicas empleadas para determinar la **cantidad y calidad de las muestras de ácidos nucleicos** como un paso previo a la realización de técnicas moleculares, resulta necesario mencionar que la **cuantificación** del ADN presente en una muestra puede ser **el fin último del análisis** en algunos casos. Resulta fundamental, por ejemplo, en el análisis de la presencia de eventos transgénicos, ya que la legislación establece límites legales a la misma.

Para estos fines, la **PCR cuantitativa** resulta la técnica de elección. Para realizar la cuantificación, se puede realizar **una PCR a tiempo real**, que permite determinar la cantidad de ADN presente en la muestra interpolando el valor de Ct de una muestra sobre los valores de una curva patrón, o bien una **PCR digital**. En cualquier caso, las técnicas de PCR serán objeto exclusivo de un tema (tema 20).

1. APLICACIONES EN LABORATORIOS

Los ácidos nucleicos son moléculas a partir de las cuales se puede obtener gran información sobre los organismos y su filogenia, lo cual resulta de vital importancia en áreas como la **sanidad y la genética**, tanto humana y animal como vegetal.

El área de la **genética** resulta el ejemplo más claro de la aplicabilidad del análisis de los ácidos nucleicos, ya que este análisis resulta la **base** de los estudios genéticos. Así, entre las múltiples aplicaciones, se pueden mencionar:

- En el caso de la **genética humana**, el estudio de los ácidos nucleicos, incluida su secuencia y organización estructural, ha permitido grandes avances en la determinación de **genes causantes de enfermedades hereditarias**. En genética veterinaria también se han realizado descubrimientos importantes en este sentido, pero se trata de un área que aún presenta un gran potencial de crecimiento.
- En **genética veterinaria**, ha permitido desarrollar análisis para determinar la **presencia de genes de interés ganadero** (fundamentales para los programas de mejora y fomento de razas), la determinación de **relaciones de parentesco entre animales y su identificación individual**, o la determinación de genes **relacionados con la susceptibilidad a enfermedades**, como por ejemplo el gen *Prnp*, que determina la susceptibilidad al scrapie.
- En el área de la **genética vegetal**, el estudio de los ácidos nucleicos permite determinar caracteres de interés, por ejemplo en relación con la resistencia o susceptibilidad frente a las **plagas**, o bien con **características como la forma o el tamaño** de los frutos. Además, permite la determinación y la cuantificación de **eventos transgénicos**, de gran importancia para asegurar el cumplimiento de la legislación vigente.

En el área de **sanidad**, en la que también resultan fundamentales, se puede destacar su utilidad en:

- Análisis **moleculares** para determinar la **presencia de agentes patógenos**. Ya que la secuencia de ácidos nucleicos es exclusiva para cada individuo, y que en la misma existen regiones conservadas dentro de una misma especie, género, o familia, el análisis de los mismos permite determinar la **presencia de una determinada especie patógena** en la muestra.
- Análisis **filogenéticos** que permitan establecer el origen de cepas o la epidemiología de los brotes, analizando las relaciones entre las secuencias de ácidos nucleicos de los patógenos a analizar.
- Determinación de la presencia de **genes relacionados con las resistencias a antimicrobianos**.
- Determinación de la **patogenicidad** de los aislados en función de la secuencia de determinadas regiones genéticas. Se emplea frecuentemente en el caso de los virus *Influenza*, por ejemplo.

BIBLIOGRAFÍA

Verónica Burriel Coll. Estructura y propiedades de los ácidos nucleicos. Química aplicada a la ingeniería biomédica; Máster en Ingeniería Biomédica (Universidad de Valencia).

PNT Extracción de ácidos nucleicos (2011). Grupo de Trabajo de Banco de ADN, Red Nacional de Biobancos, Instituto de Salud Carlos III.

Programa de control de calidad de ácidos nucleicos. Bando Nacional de ADN Carlos III (Universidad de Salamanca).

MATERIAL NO OFICIAL

MATERIAL PARA LA PREPARACIÓN DEL TEMA 16

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 ESPECTROSCOPÍA 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 ESPECTROSCOPÍA UV-VIS

7. ESPECTROSCOPÍA 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. APLICACIONES.

8. APLICACIONES DE LA ESPECTROSCOPÍA UV-VIS Y FLUORESCENCIA. APLICACIONES EN LABORATORIOS DE SANIDAD Y GENÉTICA ANIMAL.

- 8.1. ESPECTROFOTOMETRÍA.
- 8.2. FLUORESCENCIA.

1. INTRODUCCIÓN

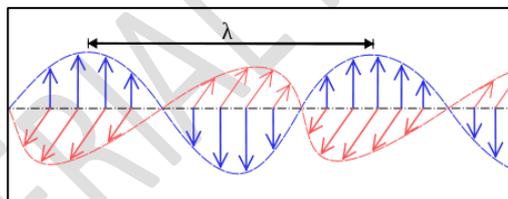
Desde un punto de vista histórico, el término espectroscopía significaba “la rama de la ciencia que estudiaba la resolución de la luz” (o sea, la radiación visible), es decir, el estudio de espectros. Con el paso del tiempo, el significado de la espectroscopía se amplió al estudio no sólo de la luz sino 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 (λ): 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 (ν): número de oscilaciones completas que realiza la onda por segundo. La frecuencia se expresa en ciclos por segundo (s^{-1} o Hertzios (Hz); 1 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:

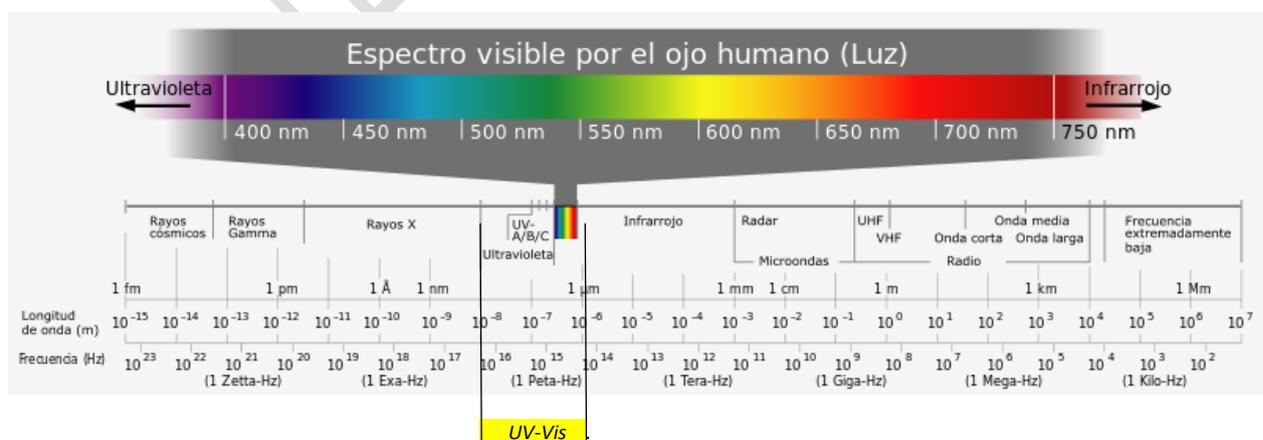
$$E = h \cdot \frac{c}{\lambda}$$

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.

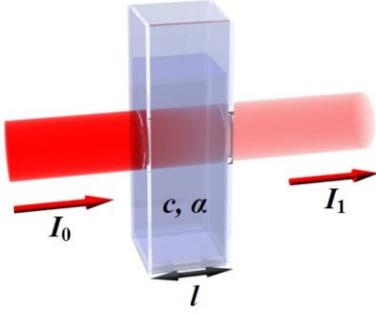
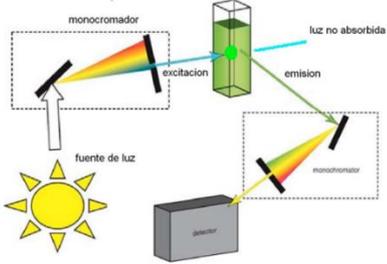
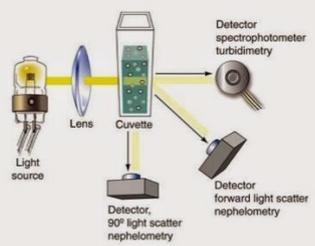
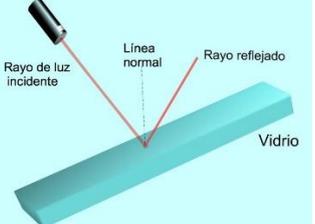
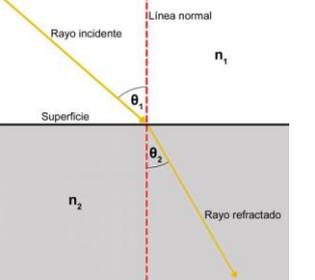
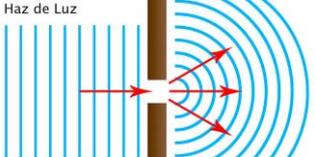
Cuando hablamos de una radiación determinada (de una única longitud de onda λ), físicamente es imposible aislar dicha radiación del resto que la acompaña. Existen dispositivos que pueden filtrar la luz, pero no se puede obtener una luz monocromática al 100% (una radiación monocromática es prácticamente 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.

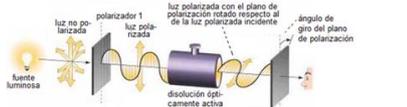


En el caso que nos ocupa, nos centraremos únicamente en la zona del ultravioleta, en adelante UV (190-350 nm) y visible (350-750 nm).

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

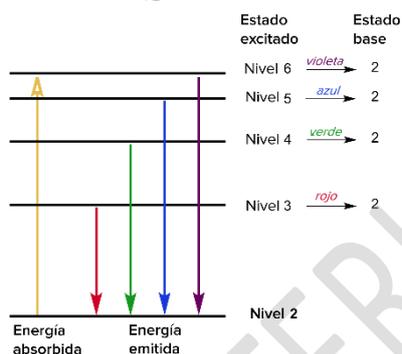
| Fenómeno | Esquema | Efecto | Métodos instrumentales empleados Ej. |
|-------------------|---|--|--|
| Absorción |  | La radiación (I_0) incide sobre la muestra y parte se absorbe disminuyendo la intensidad de la radiación emitida (I_1) | Espectrofotometría y fotometría (rayos X, UV, luz visible, IR) Resonancia magnética nuclear |
| Emisión |  | 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) |
| Dispersión |  | 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 |
| Reflexión |  | La radiación incidente se refleja | Espectroscopía infrarroja de reflexión-absorción (RAIRS) |
| Refracción |  | La radiación incidente se refracta | Refractometría Interferometría |
| Difracción |  | 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>Rotación</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.

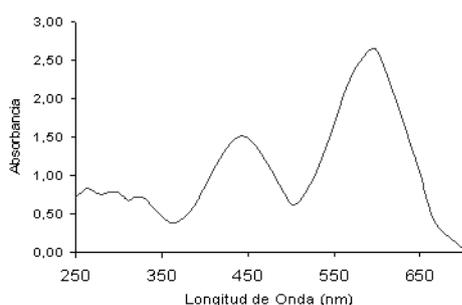
3.1. ABSORCIÓN DE RADIACIÓN

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 (λ). 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 absortividad 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 absortividad molar (ϵ) y se expresa en $L/mol \cdot cm$. La absortividad (normal o molar) es un valor constante característico de cada sustancia.

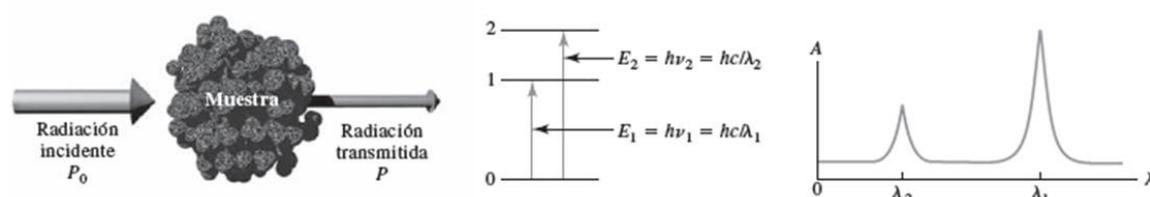
La Ley de Beer expresa la relación directa entre la absorbancia (A) de un analito y su concentración en disolución. Se puede definir la absorbancia como una medida de la cantidad de luz absorbida por una disolución.

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 las 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,

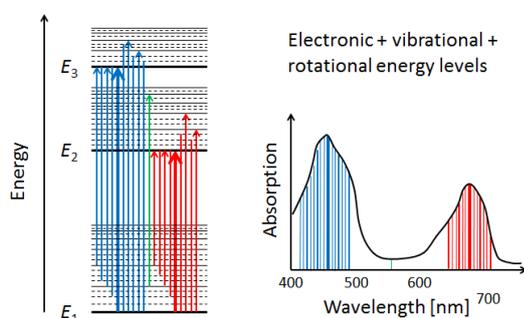
se puede medir la absorbancia de la muestra problema y mediante interpolación gráfica en la recta, o empleando la función de calibrado calcular la concentración del analito.

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 λ_1 y λ_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 juntamente 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)²⁻ rojo intenso.
- iones de metales de transición, de lantánidos y de actínidos. Ej. color azul de la disolución de Cu²⁺.

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 ₆ H ₆ | 204 | 7900 |
| Tolueno | C ₆ H ₅ CH ₃ | 207 | 7000 |
| <i>m</i> -Xileno | C ₆ H ₄ (CH ₃) ₂ | — | — |
| Clorobenceno | C ₆ H ₅ Cl | 210 | 7600 |
| Fenol | C ₆ H ₅ OH | 211 | 6200 |
| Ion fenolato | C ₆ H ₅ O ⁻ | 235 | 9400 |
| Anilina | C ₆ H ₅ NH ₂ | 230 | 8600 |
| Ion anilinio | C ₆ H ₅ NH ₃ ⁺ | 203 | 7500 |
| Tiofenol | C ₆ H ₅ SH | 236 | 10 000 |
| Naftaleno | C ₁₀ H ₈ | 286 | 9300 |
| Estireno | C ₆ H ₅ CH=CH ₂ | 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.

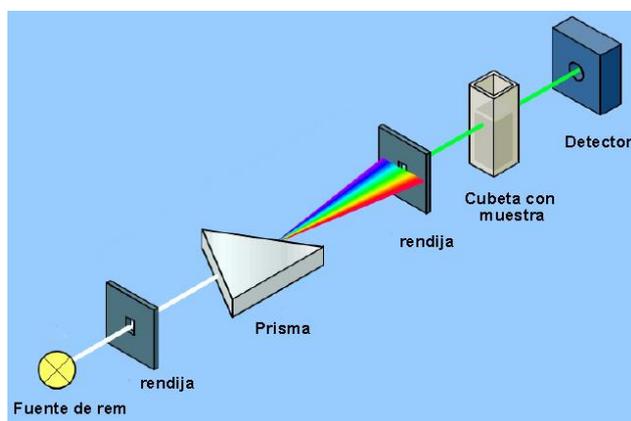
Como principal desventaja de la técnica está la posible interacción de partículas que interfieran el paso de luz. Por ello, las disoluciones han de estar exentas de sólidos en suspensión.

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

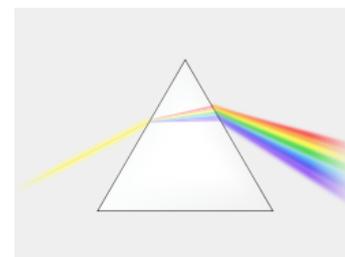
Fuente: es el dispositivo emisor de radiación electromagnética esto es, una lámpara. Las espectroscopías de absorción y de fluorescencia requieren una fuente de radiación externa de una intensidad constante y suficientemente intensa para facilitar la detección y medida. Generalmente emite una banda muy 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 (disproseo, holmio, erbio) o carburos (de silicio). Estos emiten radiación en IR (1,5 a 2,0 μm) a elevadas temperaturas (1000-2000°C).

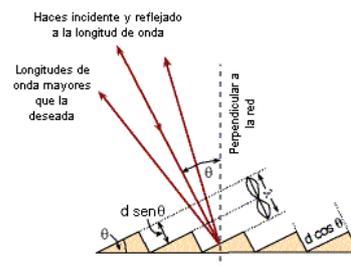
5.2. SELECTOR DE RADIACIÓN O DE LONGITUD DE ONDA

De toda la radiación que emite la lámpara mediante este dispositivo se selecciona la radiación de la energía deseada (λ). 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 (λ) 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:

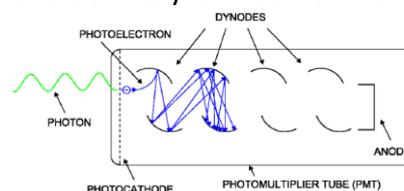
- Visible: se usan cubetas cuadradas de vidrio de, generalmente, 1 cm de lado.
- UV: se usan cubetas cuadradas de cuarzo de, generalmente, 1 cm de lado ya que el vidrio no es transparente a la radiación UV y la absorbería impidiendo que llegara a la muestra
- Infrarrojo: cubetas de cloruro sódico (NaCl) 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 positivamente) 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.

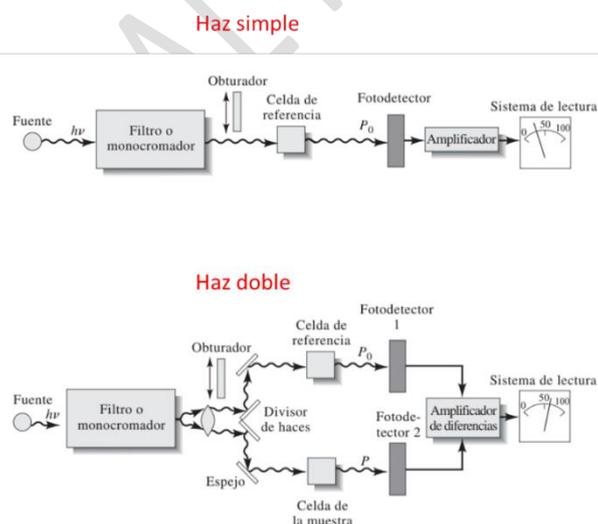
- FOTODIODO ARRAY (o detector de diodos en fila): sobre un semiconductor se fabrican diodos en serie, unos junto a otros, de manera que al incidir sobre él una radiación difractada, se puede tener una señal instantánea para un amplio rango de longitud de onda de forma simultánea, permitiendo así una 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 ultravioleta 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

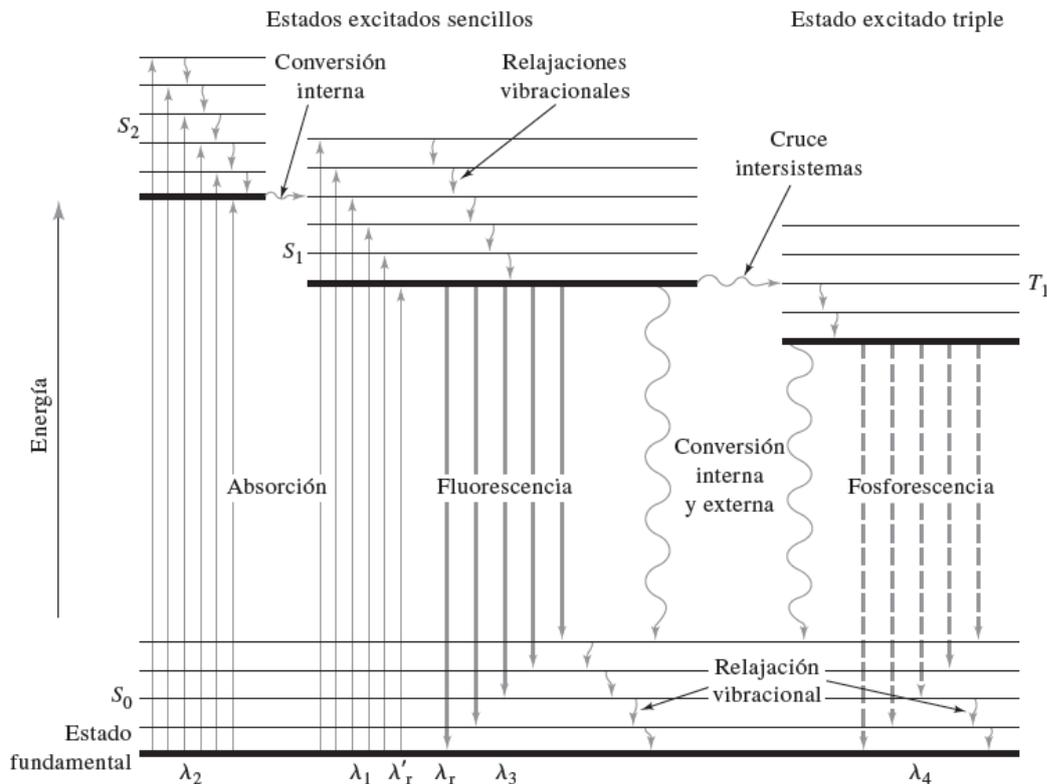
Análisis cualitativos: es decir, determinar la presencia de determinados grupos funcionales en las muestras. La presencia de absorción en UV puede ser indicativa de la presencia de dobles enlaces conjugados. Algo similar ocurre en el visible una coloración determinada puede indicar la presencia de alguna sustancia (por ej. coloración azulada puede indicar presencia de 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.

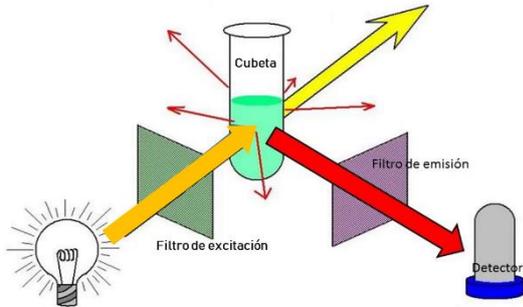


En ocasiones el proceso de relajación no conduce a los electrones al nivel fundamental directamente sino a un estado intermedio de menor energía desde el que sí regresan ahora al estado fundamental, pero desprendiendo energía en forma de radiación que no es de la misma magnitud (λ ó ν) que la absorbida.

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.

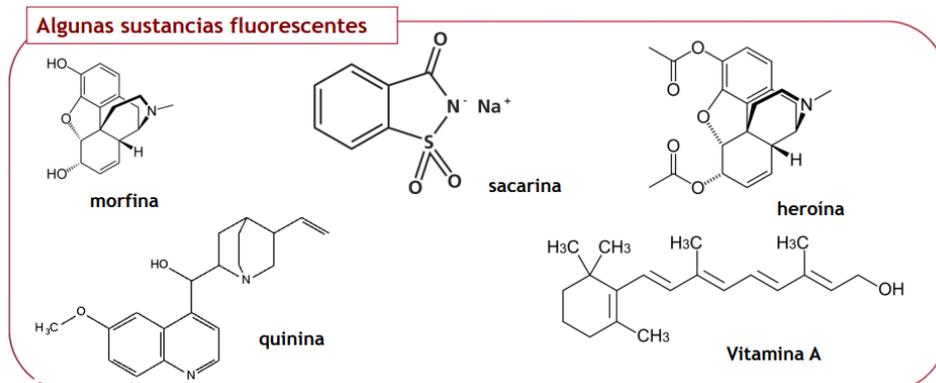
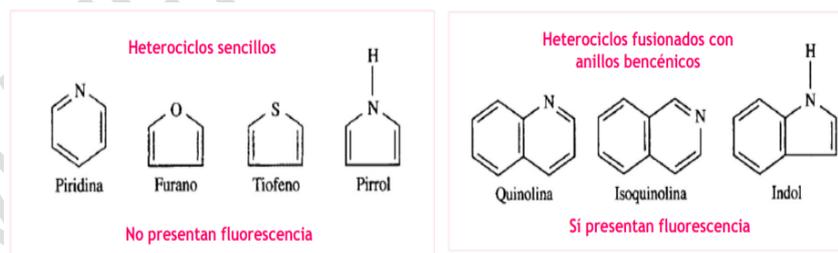


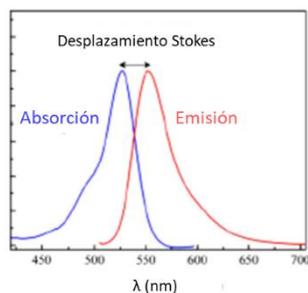
La fluorescencia y la fosforescencia se observan con más facilidad a un ángulo de 90° respecto al haz de excitación ya que de esta forma al detector solo llega la radiación fluorescente “emitida” sin interferencia de la radiación incidente no absorbida empleada en la excitación. Si el detector estuviera 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).





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.

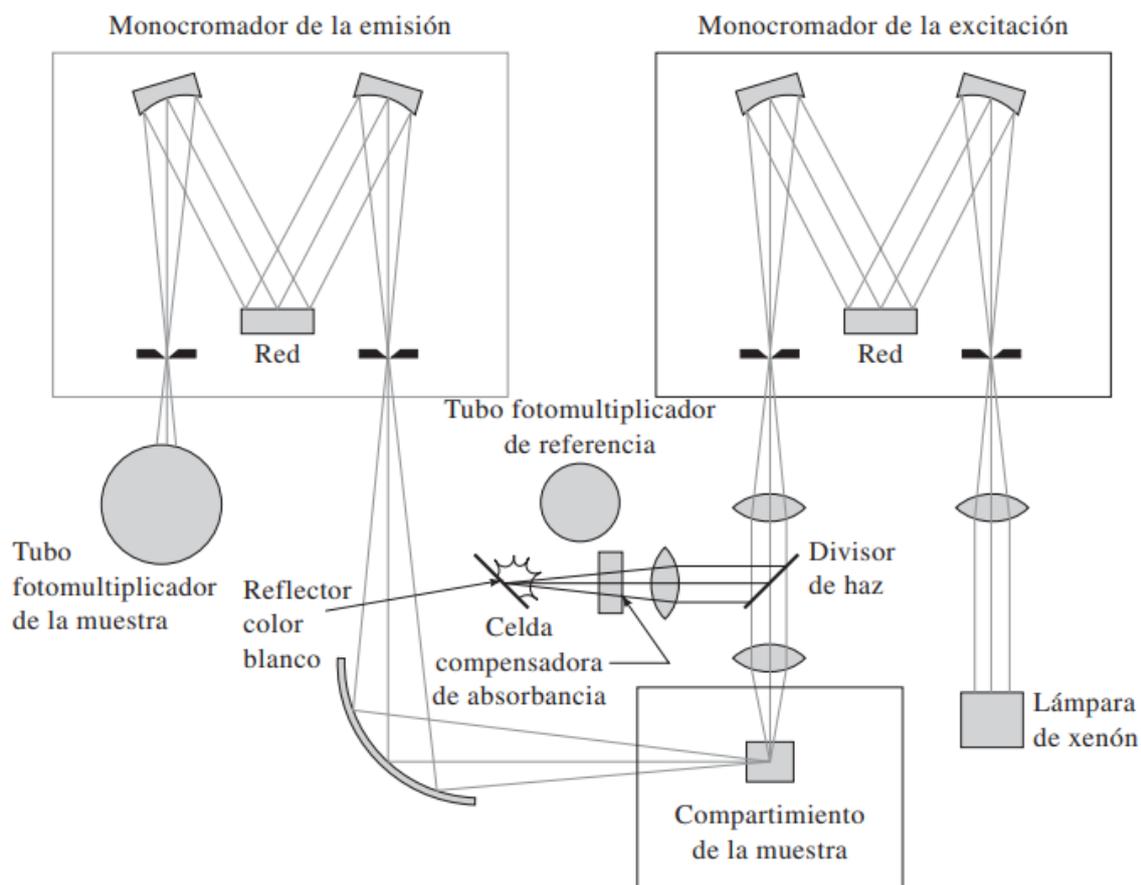
7.3. INSTRUMENTACIÓN EN FLUORESCENCIA

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:

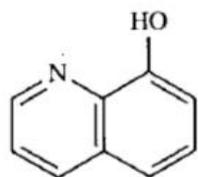
- a) dispone de dos monocromadores para seleccionar en cada caso la longitud de onda de los máximos de excitación y emisión.
- b) la cubeta debe ser de cuarzo en dos caras perpendiculares de las cuatro disponibles (o las cuatro lo que es más habitual), por una de ellas incide la radiación de excitación y por la perpendicular sale la fluorescencia emitida

7.4. APLICACIONES

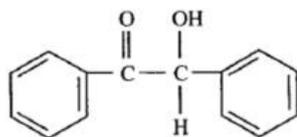
El fenómeno de la fluorescencia permite disponer de una técnica muy sensible (de uno a tres órdenes de magnitud mayor que la espectroscopía de absorción, obteniéndose límites de detección inferiores) y selectiva (ya que no todas las moléculas son fluorescentes).

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

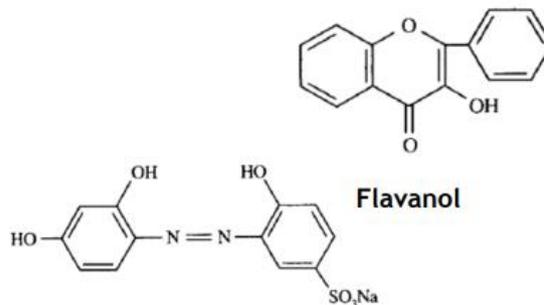
inorgánicas) mediante su reacción con otras que sí lo son llamadas fluorógenos como benzoína, 8-hidroxiquinoleína, rojo de alizarina, flavanol, etc.; su mayor aplicación es en el análisis de moléculas orgánicas (como los fármacos) o bioquímicas (adenina, cisteína, guanidina, proteínas, triptófano...).



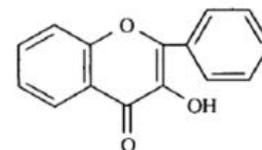
8-hidroxiquinoleína



Benzoína



Rojo de Alizarina R



Flavanol

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 Cu^{2+} de los enlaces peptídicos de los aminoácidos Tyr, Trp y Cys. Es rápido, sencillo y relativamente sensible.
 - ENSAYO BCA (Ácido bicinconínico) (562nm): El ácido bicinconínico es un compuesto capaz de formar un complejo púrpura intenso con iones 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 Cu^{2+} en medio alcalino (reacción de Biuret). La proteína presente en la muestra reduce el Cu^{2+} a 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 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 $Abs_{260\text{ nm}}/Abs_{280\text{ nm}}$. 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

MATERIAL NO OFICIAL

MATERIAL PARA LA PREPARACIÓN DEL TEMA 17

CROMATOGRFÍA. 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. CROMATOGRAFÍA. CONCEPTO

3. CROMATOGRAFÍA DE GASES

3.1. DESCRIPCIÓN DE UN CROMATÓGRAFO DE GASES

3.1.1. Gas portador

3.1.2. Muestreador automático

3.1.3. Sistema de inyección

3.1.4. Columna cromatográfica

3.1.5. Fase estacionaria

3.1.6. Horno de columna

3.1.7. Detectores

3.2. ANÁLISIS CUALITATIVO EN CROMATOGRAFÍA DE GASES. INDICE DE RETENCIÓN

4. CROMATOGRAFÍA LIQUIDA

4.1. COMPONENTES DE UN CROMATÓGRAFO DE LÍQUIDOS

4.1.1. BOMBA

4.1.2. SISTEMAS DE INYECCIÓN

4.1.3. COLUMNA

4.1.4. DETECTORES

5. PARÁMETROS DE INTERÉS EN CROMATOGRAFÍA

6. METODOLOGÍA DE TRABAJO

1. INTRODUCCIÓN

En la historia del análisis químico hay un antes y un después de la aparición de la cromatografía. Anteriormente, el análisis de cualquier sustancia era entendido como un proceso dedicado específicamente a esa sustancia, es decir, todas las etapas del proceso analítico estaban encaminadas a extraer y purificar dicho compuesto aisándolo de la matriz en la que se encontraba para poder posteriormente realizar la oportuna medida física o química. Esto suponía que existían tantos métodos de análisis como combinaciones de matrices-sustancias uno pueda imaginar.

Con el advenimiento de la cromatografía a mediados del siglo pasado, en una misma muestra podían ser analizados dos, tres, cinco, diez analitos simultáneamente, hasta los varios centenares que pueden determinarse simultáneamente hoy día gracias a los potentes equipos desarrollados que en conjunción con los sistemas informáticos permiten adquirir señales a una velocidad del orden casi de los milisegundos.

La cromatografía es una técnica de separación de mezclas de analitos presentes en una misma muestra que posteriormente pueden ser identificados y cuantificados de manera unívoca. Se basa en el principio de la retención selectiva, que consiste en el distinto comportamiento de los componentes de una mezcla sobre un soporte específico (como un papel, un sólido, un líquido, una resina) y una fase líquida o gaseosa que fluye a través del soporte.

2. CROMATOGRAFÍA. CONCEPTO

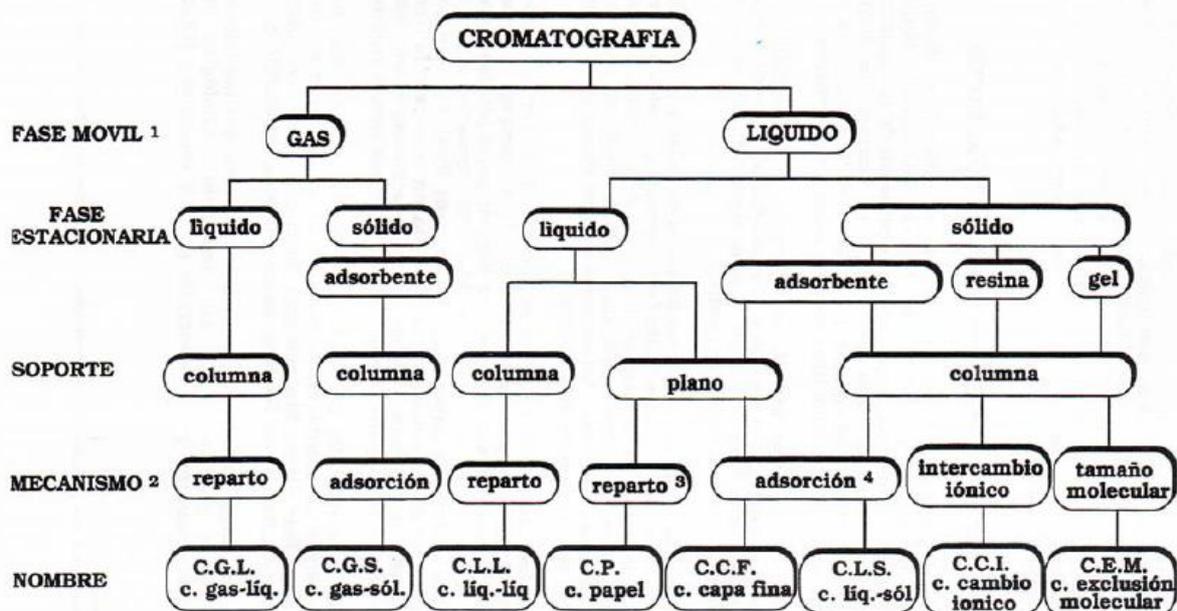
La etimología de la palabra cromatografía es curiosa. Por las palabras griegas que la forman significaría: “escritura en colores”. El desarrollo de la cromatografía se debe al botánico ruso Mikhail S. Tswet estudiando los pigmentos naturales que se encuentran en las plantas (conocidos como carotenoides 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:



3. CROMATOGRAFÍA DE GASES

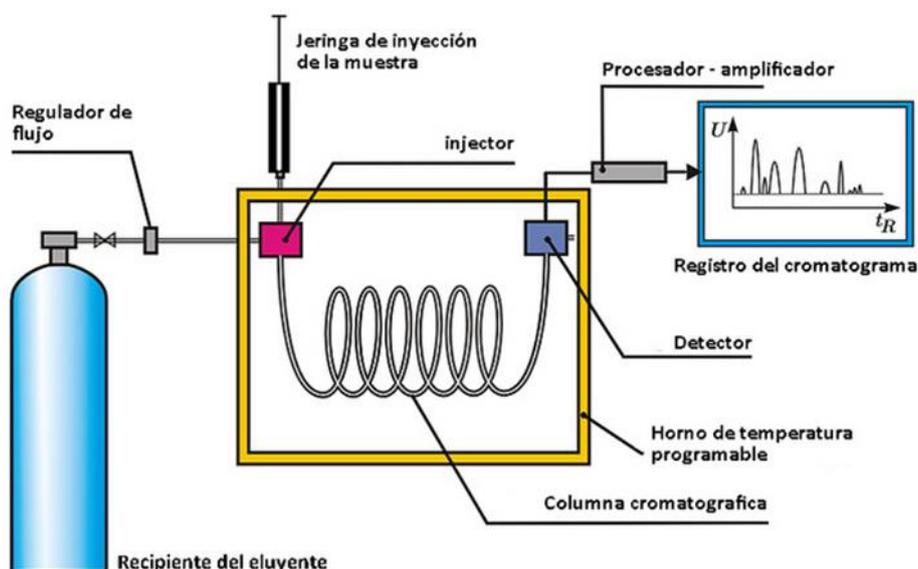
Su utilidad fundamental es para la separación de compuestos orgánicos que son volátiles (en un rango de temperaturas 30-500 °C). Es una técnica cromatográfica en la que la muestra se volatiliza y se inyecta en una columna cromatográfica contenida en un horno. La modificación de la temperatura del horno 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 (CG): la cromatografía gas-sólido (CGS) y la cromatografía gas-líquido (CGL), siendo esta última la que se utiliza más ampliamente, y que se puede llamar simplemente cromatografía de gases (CG). En la CGS la fase estacionaria es sólida y la retención de los analitos en ella se produce mediante el proceso de adsorción. La CGL utiliza como fase estacionaria moléculas de líquido inmovilizadas sobre la superficie de un sólido inerte.

3.1. 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,

- c) Columna cromatográfica
- d) Horno termostatzado 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).



3.1.1. Gas portador

El gas portador o fase móvil suele ser: He o N₂ fundamentalmente, aunque también se ha utilizado CO₂ e H₂. 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.

3.1.2. 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 permite enjuagar la jeringa con una muestra que contiene disolvente para lavar las trazas de analitos presentes en la muestra anterior, luego aspira una cantidad de la muestra medida con precisión, y la introduce en la columna. La operación que no requiere atención personal libera al operador para otras actividades.

3.1.3. 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 μL 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 de 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 reguladora de la proporción de gas que es introducido en la columna. Generalmente se inyecta una muestra de 1 μL pero sólo entra al capilar 0.01 μL ; el resto es desechado (split). 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" 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 dos fases (gas y líquido, o gas y sólido) 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.

3.1.4. 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). 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.);

3.1.5. 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): 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 además 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 en el horno de un cromatógrafo de gases, 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 mediante procesos químicos. 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.

3.1.6. 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.

3.1.7. 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 quemarse eléctricamente si en el efluente eluye algún compuesto orgánico. La mayoría de los compuestos orgánicos cuando se pirolizan a la temperatura de una llama de hidrógeno/aire, producen iones y electrones que generan 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 H₂O, CO₂, SO₂ y NO_x (no arden)

- Detector de captura de electrones.

En este caso el efluente de la columna pasa sobre un emisor β , 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 de masas.

Este detector se basa en las propiedades físicas que poseen las moléculas cargadas o ionizadas. Tras acelerarse por medio de campos eléctricos son introducidas en el seno de un campo magnético. Cualquier carga que acelerada penetra en el seno de un campo magnético experimenta simultáneamente una fuerza perpendicular al campo y al vector que describe su movimiento inicial acelerado. Esta fuerza depende entre otras magnitudes de la masa de la molécula. La desviación de su trayectoria será pues proporcional a su masa. Basado en este

principio opera del detector de masas. Una vez ionizada la molécula y antes de llegar al sistema de detección puede sufrir fragmentaciones como consecuencia de la estabilización de la carga presente en la molécula ionizada. Los enlaces pueden sufrir un reordenamiento que puede dar lugar a la aparición de fragmentos de la molécula (de diferente masa por tanto). La molécula ionizada adquiere cierta inestabilidad y es susceptible de producirse ciertas rupturas y/o reordenamientos de enlaces dando lugar a fragmentos de la molécula original. Un espectro de masas es, 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.

En cromatografía de gases el efluente de la columna es sometido a un bombardeo con electrones que producen la ionización y posterior fragmentación de la molécula lo que permite identificar la sustancia en base al ion que inicialmente se genera (que informa del peso molecular de la sustancia) y al resto aparecidos tras la fragmentación.

3.2. ANÁLISIS 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 como metano, etano, propano, ..., hexano, ... dodecano... etc.) que tengan unos tiempos de retención tales, que el del soluto considerado quede entre los dos alcanos. 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 sobradamente conocida.

4. 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 de la columna 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 que la componían eluirán (saldrán de la columna) con un tiempo diferente; esto es estarán separadas. La fase móvil suele ser un disolvente orgánico miscible con agua; en el 99 % de los métodos acetonitrilo o

metanol o mezclas de con agua. Estas mezclas podrán ser constantes en el tiempo durante la inyección de una muestra o bien variar durante el tiempo en una misma inyección (cromatograma o “run” como se conoce habitualmente el “análisis” de una muestra en un cromatógrafo)

La forma más habitual de clasificar la cromatografía líquida es 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:

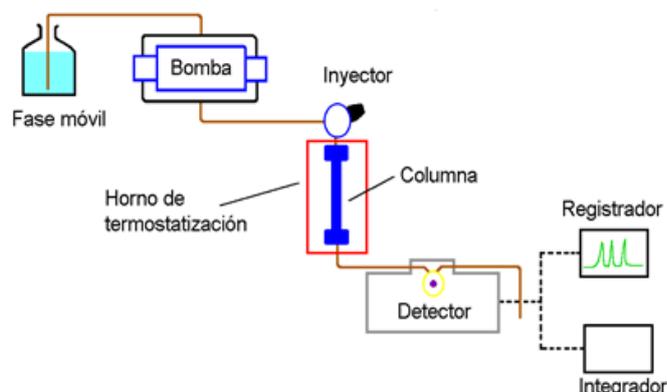
- a) Cromatografía de adsorción (líquido-sólido): La fase estacionaria es un adsorbente y la separación se basa en innumerables etapas de adsorción-desorción a nivel molecular.
- b) Cromatografía de reparto (las dos fases son líquidas; la fase estacionaria consiste en un relleno de sílice al que se encuentra 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 (ej. $R-NH_3^+$, $R-SO_3^-$, etc.)
- d) Cromatografía de exclusión molecular: La fase estacionaria, en este caso, es un material poroso de tamaño de poro controlado, que permite la entrada a través de sus poros de ciertas moléculas de manera selectiva dependiendo de su tamaño y dejando fuera otras de mayor tamaño; haciendo de esta forma que algunos compuestos de la muestra se retrasen frente a otros por ser más tortuoso su camino durante su permanencia en la columna.

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 SiO_2 o alúmina Al_2O_3), o bien, un soporte (sílice) al que se unen químicamente moléculas orgánicas que presentan grupos funcionales de alta polaridad (ciano -CN, amino $-NH_2$, 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.

4.1. COMPONENTES DE UN CROMATÓGRAFO LÍQUIDO

Los componentes básicos de un cromatógrafo de líquidos son:



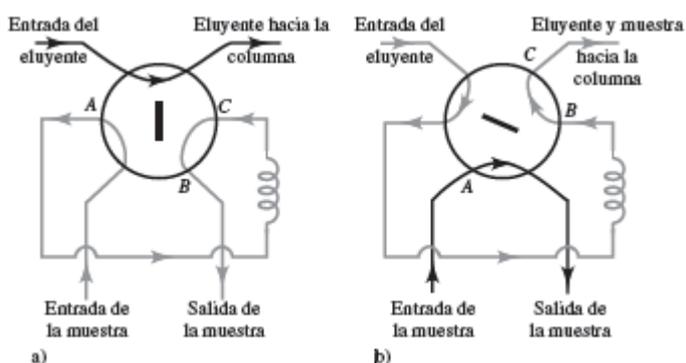
- 1) Bomba o dispositivo de suministro y mezcla de eluyentes.
- 2) Inyector
- 3) Columna
- 4) Detector y
- 5) Sistema de control, recogida y tratamiento de datos.

4.1.1. 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 $\mu\text{l}/\text{min}$ (columnas microbore, analíticas) hasta los 10 ml/min (columnas semipreparativas). Estas últimas se utilizan más que para análisis, para fraccionar una muestra recogiendo tras la separación cromatográfica cada uno de sus constituyentes o analitos en sendos tubos mediante el empleo de un colector de fracciones. Desde el punto de vista de la composición de la fase móvil en cromatografía líquida es posible trabajar en dos modalidades:

- a) isocrático, cuando la fase móvil mantiene la misma composición durante la elución (cromatograma, run) de una muestra.
- b) 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).

4.1.2. Sistemas de inyección



Existen dos tipos de inyectores manuales: de jeringa (casi en desuso) y de válvula (que son los más utilizados incluso en los sistemas de inyección automatizados). Este último (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 impulsado por la bomba a través de la válvula arrastrando la muestra hacia la columna (b) donde se inicia el proceso cromatográfico.

4.1.3. 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: Para las separaciones a escala analítica (algunos microlitros de muestra por inyección) se suelen usar columnas de pequeños diámetros (1 a 6 mm).

Longitud de la columna: mayores longitudes de la columna permitirán obtener mayores eficacias (mejores separaciones) al permitir mayor tiempo de interacción de los analitos con el relleno.

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.

Fase enlazada: Fase enlazada es una fase estacionaria que se une de forma covalente a las partículas de soporte (relleno) o a las paredes internas de la columna.

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 ya que se ofrece a los analitos mayor superficie de contacto durante el proceso

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 (inyecciones) sucesivas.

4.1.4. Detectores

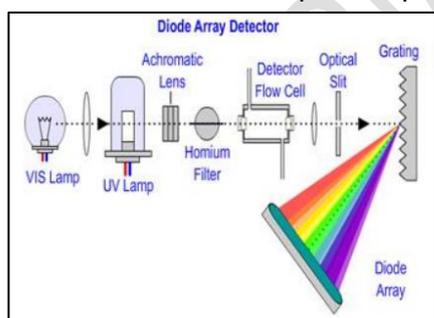
Un detector para cromatografía es un dispositivo que permite medir, a la salida de la columna, una propiedad física del eluyente que dependerá de su composición. Esto es tras la columna se dispone de una celda "transparente" (conocida como célula de flujo) por la que pasa el líquido conteniendo los analitos separados. Durante el tiempo que por la celda está pasando un analito previamente separado se produce un cambio de la propiedad analítica que está siendo continuamente medida (absorción, fluorescencia, conductividad, etc.) reflejándose en

el cromatograma como un cambio (pico). La detección en cromatografía se realiza como es obvio en continuo a lo largo de cada inyección. Seguidamente se describen los más habituales:

- 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:

- 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.
- Detectores de longitud de onda variable: En estos detectores, se puede cambiar la longitud de onda de medida, esto es: puede programarse la longitud de onda de trabajo en función del tiempo; esto permite trabajar a diferentes longitudes de onda y por tanto detectar cada uno de los analitos a la longitud de onda más adecuada para cada uno (su máximo de absorción para disponer de la máxima sensibilidad).



- Detector de diodos: Con este detector en cada inyección se puede obtener el espectro de cada analito una vez separado del resto (= el espectro característico del analito). Este detector ha sido muy utilizado gracias a que permite hacer comparaciones con espectros guardados en librerías.

- 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 de masas.

Este detector se basa en las propiedades físicas que poseen las moléculas cargadas o ionizadas cuando tras adquirir una velocidad (aceleración) son introducidas en el seno de un campo magnético.... *Idem aptdo 3.1.6.3*

El efluente de la columna de cromatografía líquida se encuentra en estado líquido por lo que antes de introducirlo en el detector de masas debe separarse de los componentes de la fase móvil (acetonitrilo, metanol, agua, ... etc.) mediante una evaporación intensa para disponer de las moléculas de los analitos en estado gaseoso a la vez que se ioniza por la adsorción de protones (H^+) del medio acuoso o bien por pérdida de ellos si la molécula tiene facilidad para ionizarse perdiéndolos. Una vez formados los iones se les hace moverse en un medio que permite discernirlos en base a su masa. Los más pesados se diferencian de los más ligeros porque corren menos o se desvían menos etc. pudiendo por tanto diferenciar unos de otros.

El detector de masas puede aportar información muy valiosa acerca de los compuestos como por ejemplo su peso molecular (correspondiente al primer ion generado (M^+)). Con este detector se obtiene el peso molecular con una precisión que no puede alcanzarse por ningún otro método; el segundo es que se puede deducir la fórmula del compuesto a través del estudio de los diferentes fragmentos que aparecen en el espectro de masas. También puede informar de la presencia de heteroátomos (Cl, Br, S, etc.) basándose en las abundancias relativas de los distintos isótopos de esos elementos. Así en un espectro de masas un ion molecular con un pico a m/q $M+2$ con una abundancia relativa del 37 % puede indicar la presencia de Cl, en cambio si la abundancia relativa es del 97 % puede indicar la presencia de Br en la molécula, ... etc.

5. PARÁMETROS DE INTERÉS EN CROMATOGRAFÍA

Tiempo de retención (t_r): Tiempo que tarda en salir de la columna (eluir) un analito.

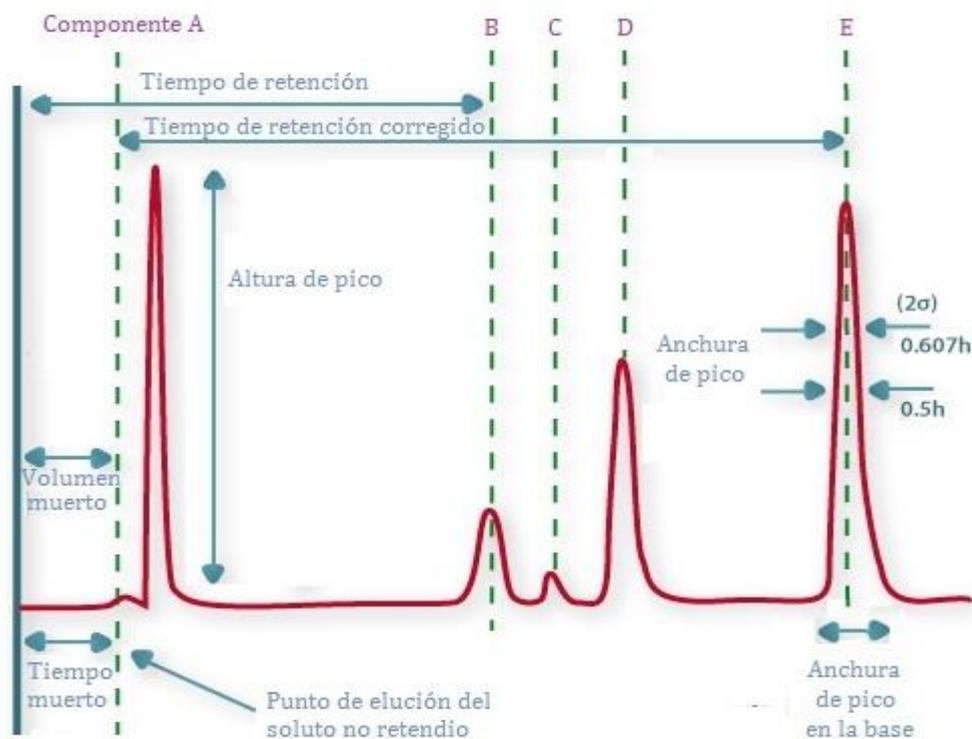
Tiempo muerto (t_0): Tiempo que tarda en eluir un analito no retenido (que no ha interactuado con el relleno). Equivalente al volumen de la columna no ocupado por el relleno, o sea el espacio libre en el interior de la columna

Tiempo de retención corregido (t_r'): Diferencia entre el tiempo de retención de un analito y el tiempo muerto:

$$t_r' = t_r - t_0$$

Altura (o Area) 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 del analito en la fase móvil 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).



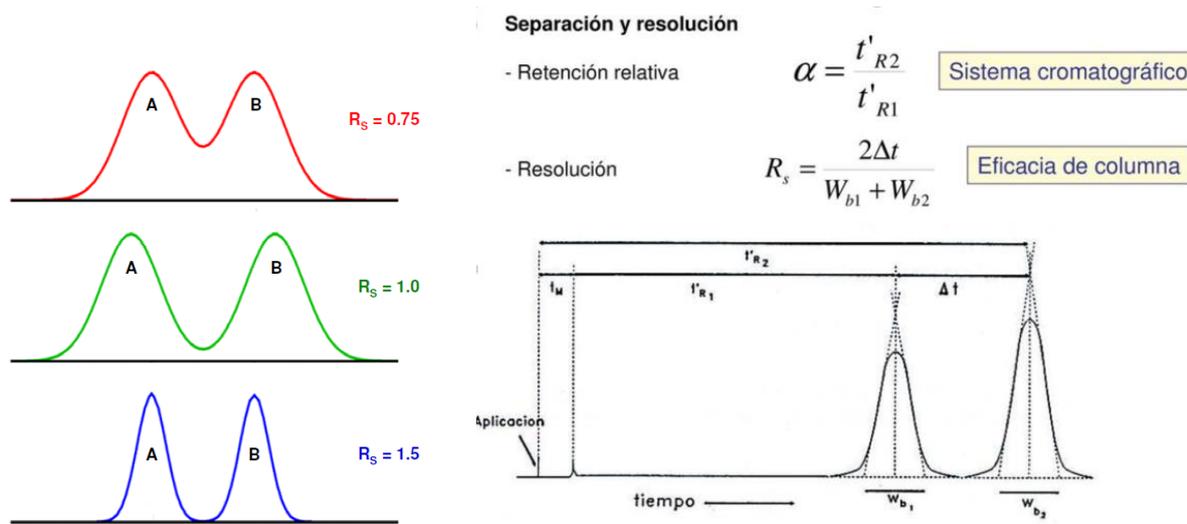
Factor de capacidad (o factor de retención) (K): El factor de retención mide la relación entre

$$K = \left(\frac{t_A - t_0}{t_0} \right)$$

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 naturaleza del relleno 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 (α) (adimensional): Se utiliza para comparar la eficacia entre columnas. 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.

$$\alpha = \frac{t'_B}{t'_A}$$

6. 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 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

MATERIAL NO OFICIAL

MATERIAL PARA LA PREPARACIÓN DEL TEMA 18

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.

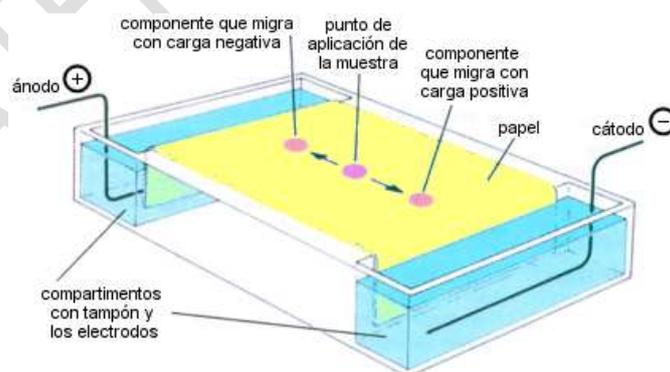


Imagen 1: Soporte horizontal (Fuente: Electroforesis de proteínas y ácidos nucleicos. Biomodel)

- **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).

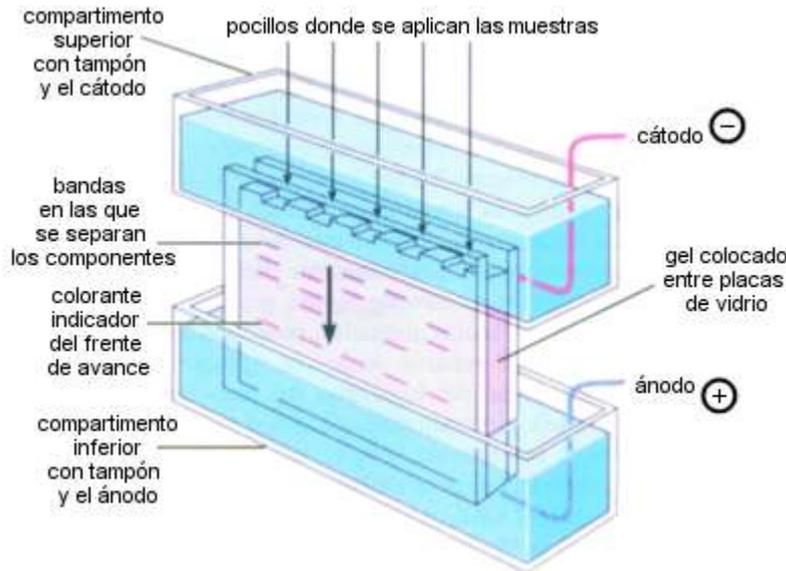


Imagen 2: Soporte vertical (Fuente: Electroforesis de proteínas y ácidos nucleicos. Biomodel)

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:

- AGAROPECTINA: 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 95°), 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

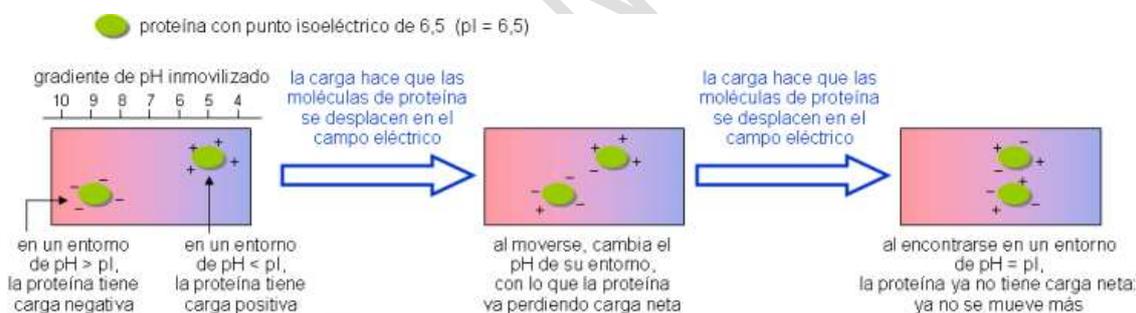
4.1. ELECTROFORESIS EN GEL

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.

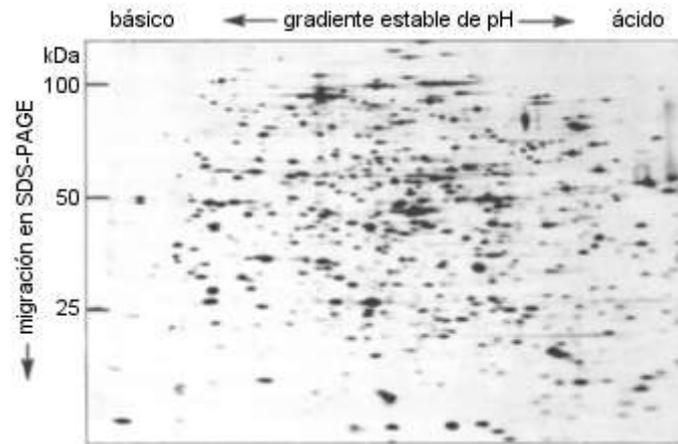


4.3. ELECTROFORESIS BIDIMENSIONAL

Tras realizar una primera separación su resultado se somete a otra de diferente mecanismo en dirección perpendicular. Generalmente la primera es un isoelectroenfoque 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

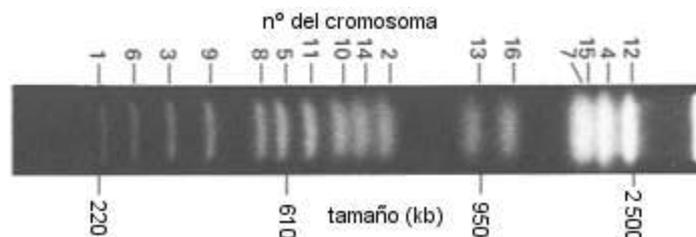
la cadena (tamaño); y la forma de la proteína. Es el método de electroforesis empleado con mayor profusión para analizar proteínas.

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 geles 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 geles 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_i 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, α -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. 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.

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.

Así 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, α -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 19

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 (μm . $1 \mu\text{m}=10^{-6} \text{ m}$). 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 la 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

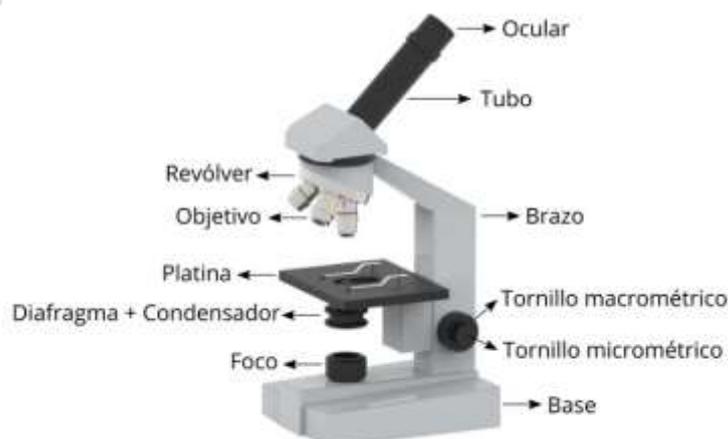
Las partes de un microscopio se pueden clasificar entre las que pertenecen a su sistema mecánico, las que pertenecen a su sistema óptico y el sistema de iluminación.

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.

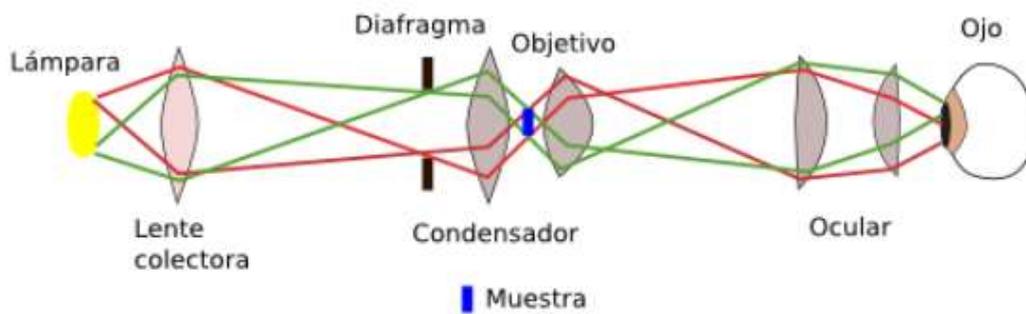
Además, se compone del **sistema de iluminación**. La **fuente de luz** es muy importante ya que una correcta iluminación de la preparación que deseamos observar es una condición necesaria para poder realizar una buena observación. Podemos obtener la fuente de luz a través de un

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 μm .

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 la 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 *espato 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.

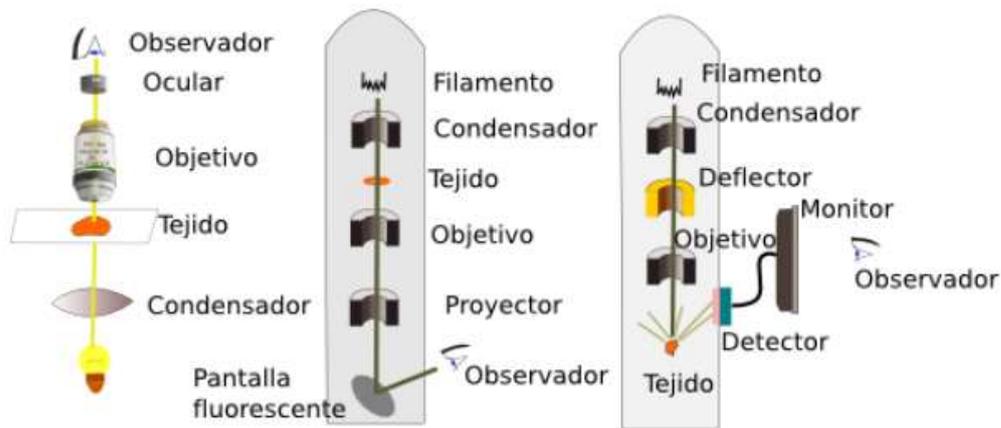
La función de estos metales es similar a las tinciones usadas en el microscopio óptico, dar color, pero sólo en tonalidades de grises, a las estructuras celulares ya que se concentran fundamentalmente en membranas y en los complejos macromoleculares.

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 20

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 μL , 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 (Mg^{+}), una solución amortiguadora o buffer y H_2O . 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, Mg^{+} , buffer y H_2O .

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.

Conlleve 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.

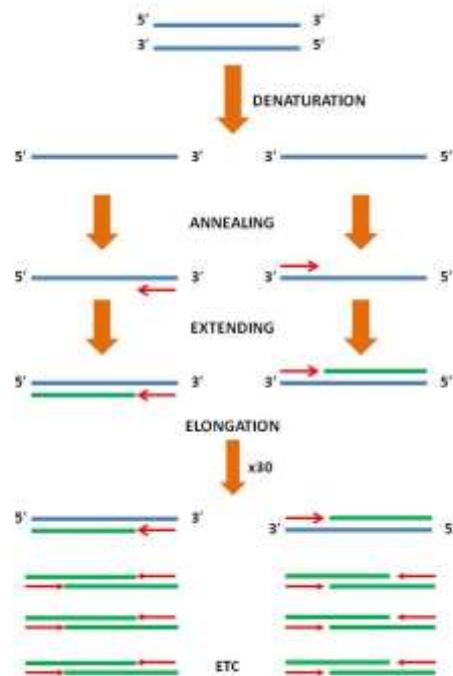


Figura 1. Esquema fases de PCR.

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.

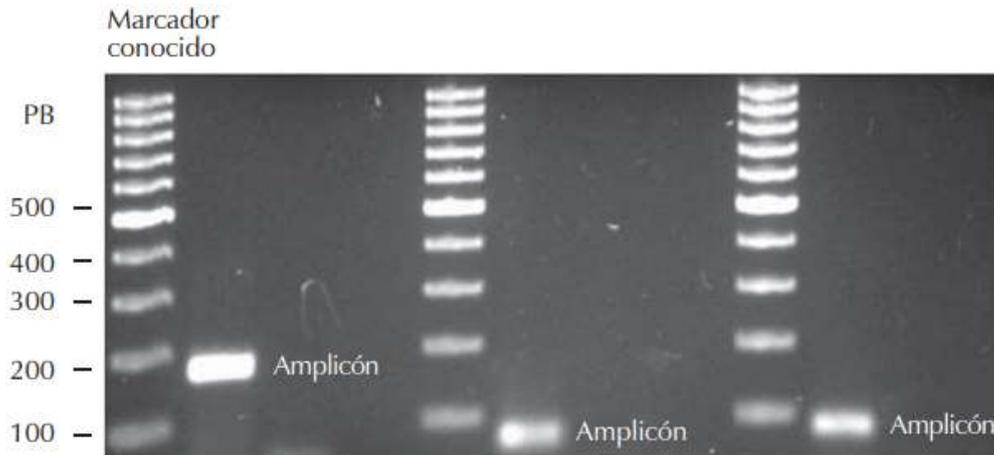


Figura 2. Gel de agarosa. Los productos de la PCR o amplicones están representados mediante bandas de un tamaño específico y se comparan con un marcador de peso molecular conocido para determinar la especificidad de la reacción.

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_{dop}): Como control de los posibles inhibidores de la PCR que pudieran dar un resultado falso negativo, se puede utilizar un control dopado C_{dop} o un control interno de PCR (C_{int}). 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 situ¹ 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

¹ 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

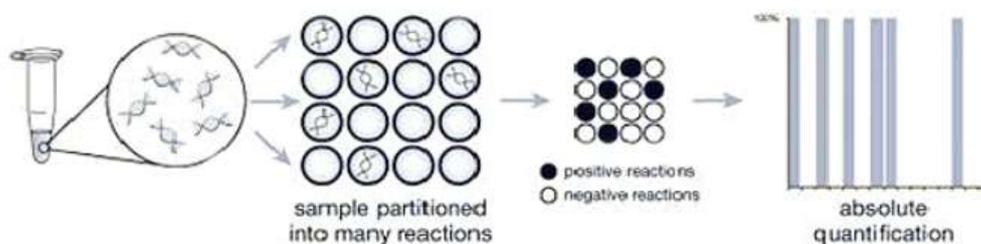


Figura 3. La PCR digital utiliza la relación de reacciones de PCR positivas (negro) a negativas (blanco) para contar el número de moléculas objetivo.

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.

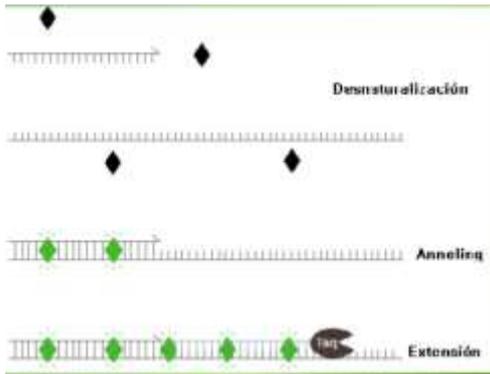


Figura 4a

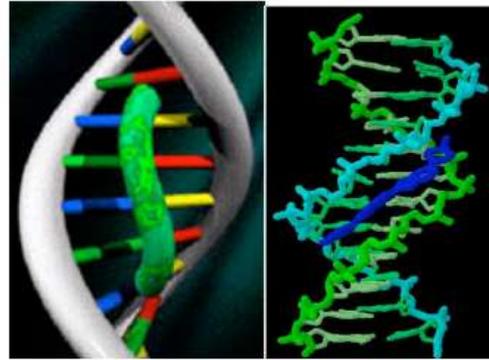


Figura 4b.

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 marcadas 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.

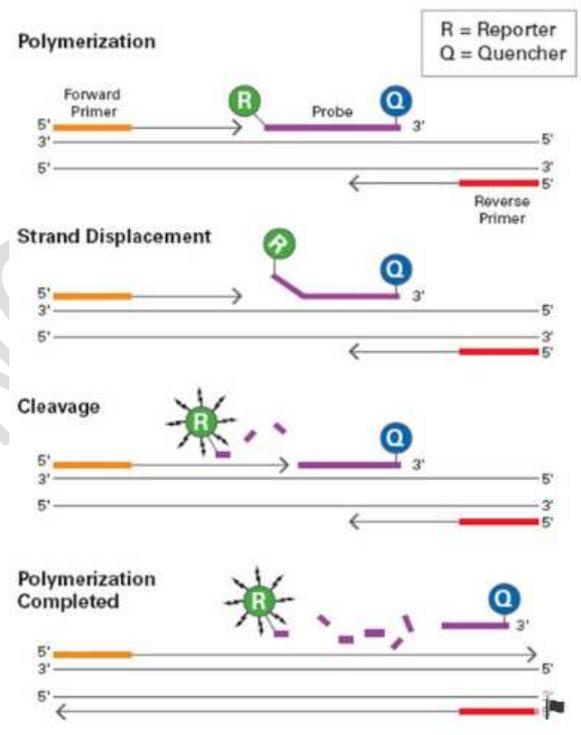


Figura 5. Sonda de Hidrólisis

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.

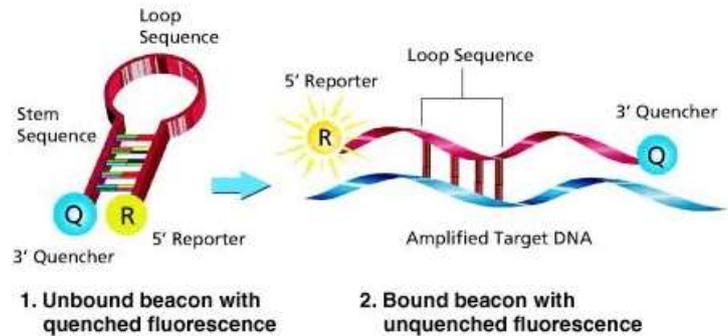


Figura 6. Sonda molecular beacons

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.

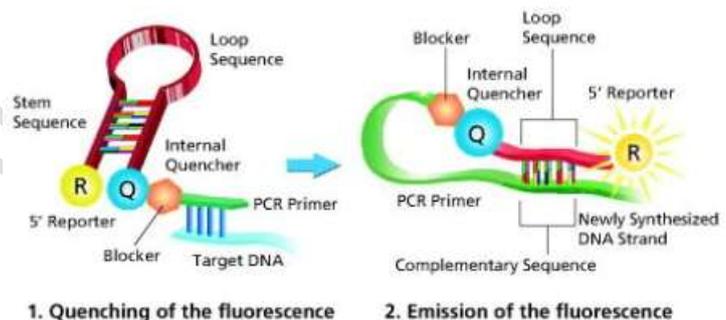


Figura 7. Sonda Scorpions

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.

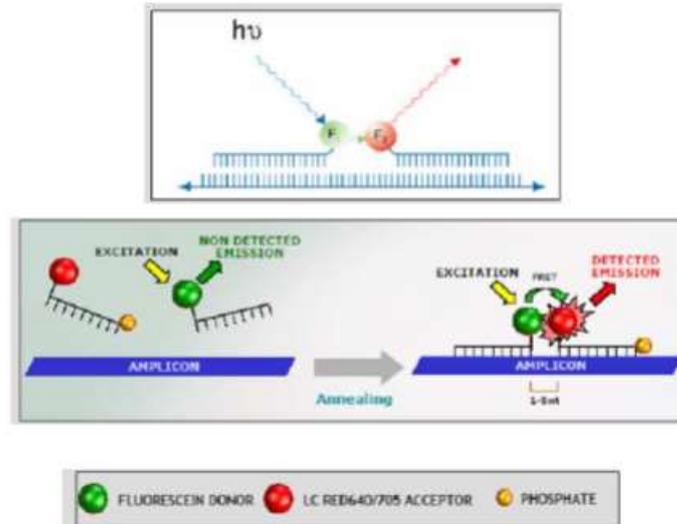


Figura 8. Sonda FRET

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.

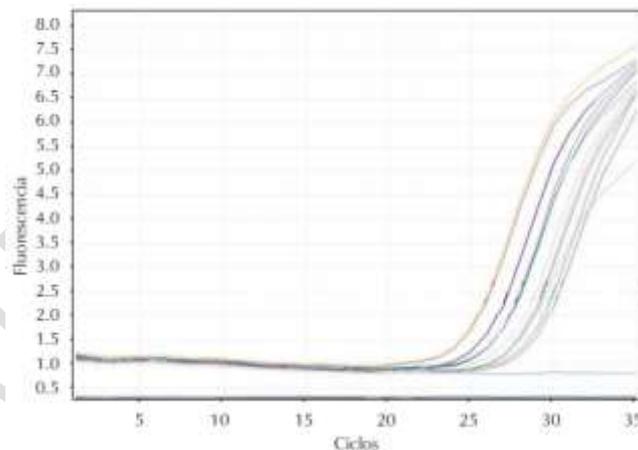


Figura 9. Curva de amplificación 1. En el eje Y se muestra la cantidad de fluorescencia y en el eje X los ciclos de la reacción. La amplificación se detecta en cada ciclo de la reacción, midiendo el incremento de la fluorescencia que es proporcional al aumento de ADN.

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

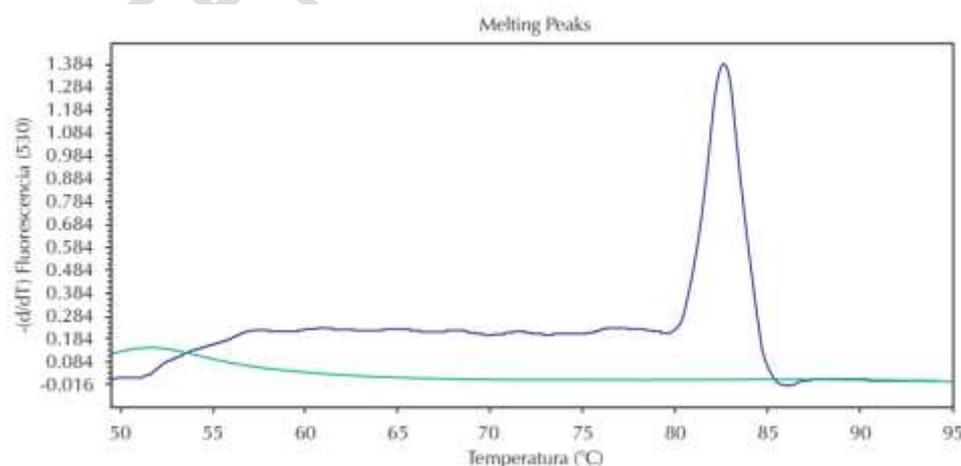


Figura 11. Melting peaks. Se puede observar un único pico de amplificación que corresponde a la curva de disociación o curva melting que indica la especificidad de la reacción, es decir, que los amplicones que se formaron son del tamaño esperado. La línea de abajo corresponde al control negativo, el 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

Y₀ 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

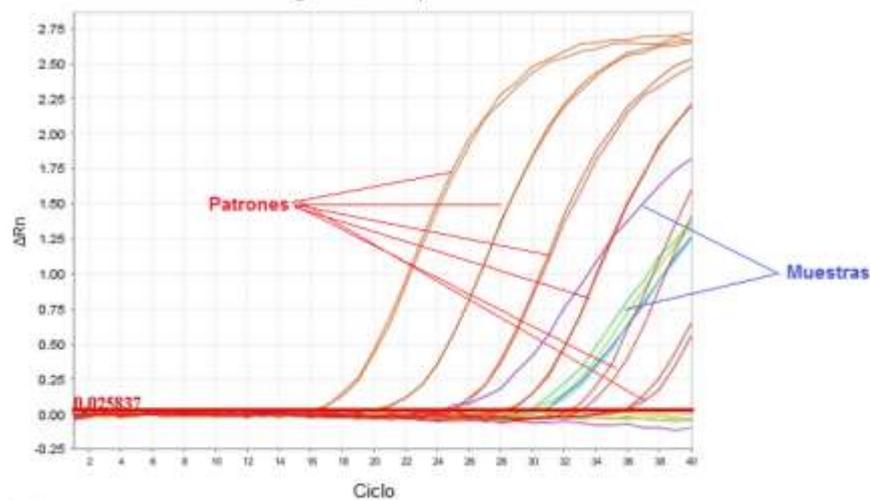


Figura 12. Curva de amplificación

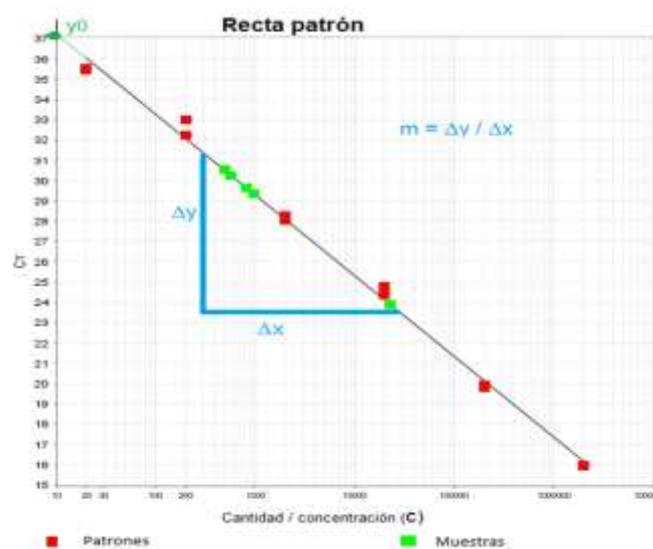


Figura 13. Recta de Calibrado

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.

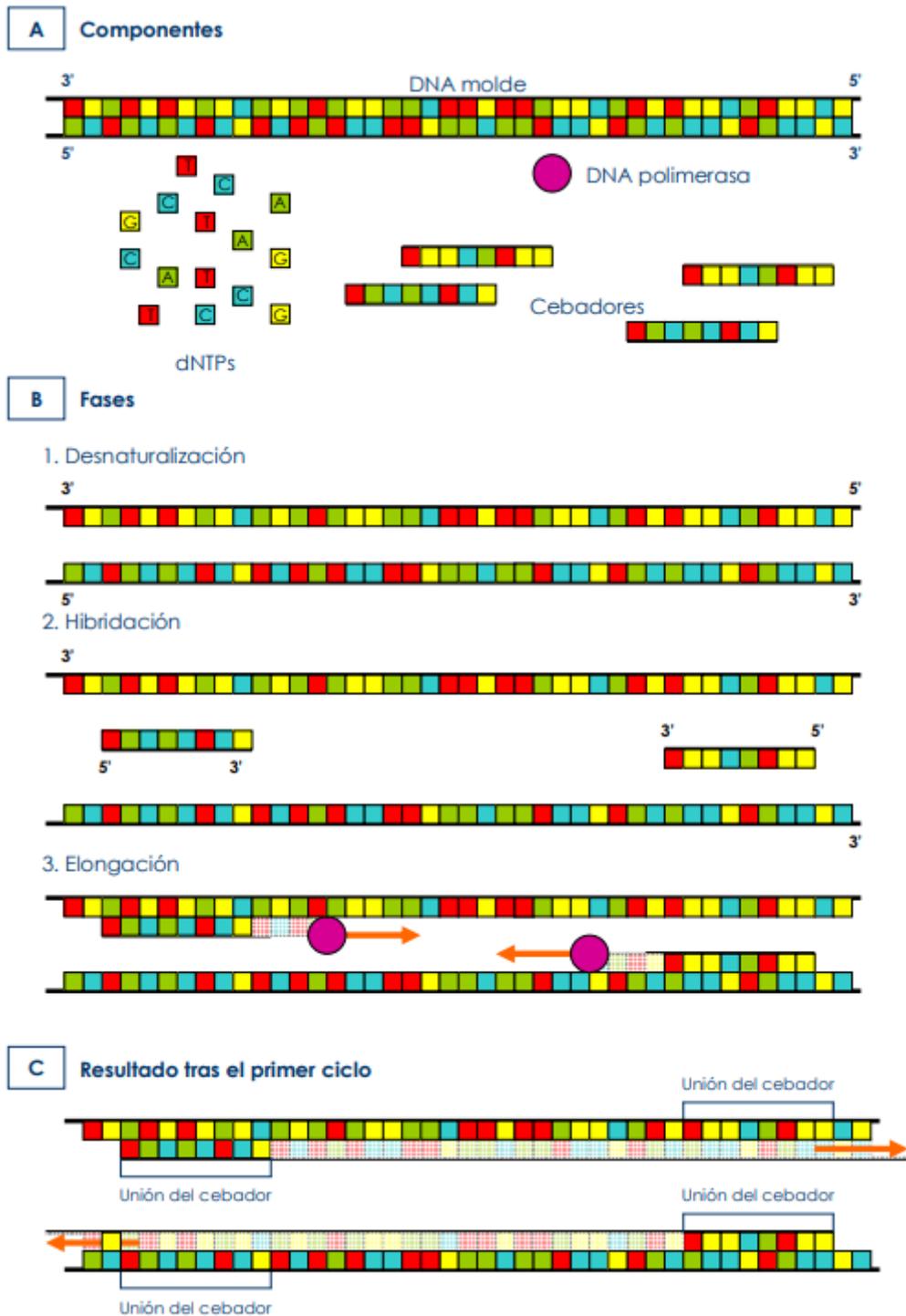
ANEXO 1

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 21

SECUENCIACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS: CONCEPTO, TIPOS Y APLICACIONES EN LABORATORIOS DE SANIDAD Y GENÉTICA ANIMAL. MÉTODOS MOLECULARES PARA EL ANÁLISIS DE GENOMAS.

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)

3. APLICACIONES DE LAS TÉCNICAS DE SECUENCIACIÓN

4. MÉTODOS MOLECULARES PARA EL ANÁLISIS DE GENOMAS

4.1. GENÓMICA ESTRUCTURAL

4.2. GENÓMICA FUNCIONAL

4.3. GENÓMICA COMPARATIVA

4.4. APLICACIONES DEL ANÁLISIS DE GENOMAS

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.**

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**.

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**. 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**.

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 será tratada mediante una determinada reacción química que se dirigirá a una región determinada según las bases orgánicas nitrogenadas presentes. 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**.

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)

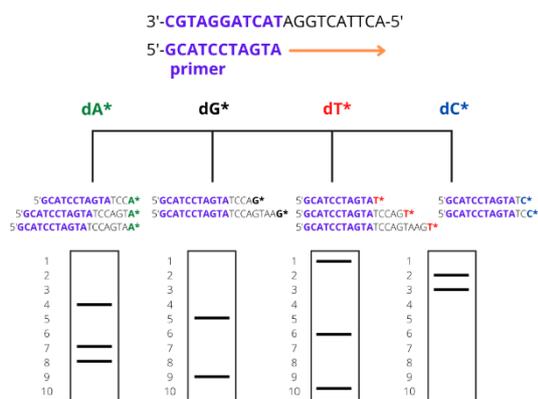
La técnica de secuenciación enzimática fue propuesta por **Sanger**, también en la década de 1970. Su fundamento es también la generación de fragmentos de diferente tamaño, de tal manera que puede determinarse cuál es la base presente en cada una de las posiciones. En

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 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**. Estos ddNTPs se añadirán **marcados con fluorescencia**, de tal forma que los fragmentos generados en cada una de las cuatro alícuotas puedan analizarse



1. Ejemplo de secuenciación de Sanger. Fuente: elaboración propia

mediante técnicas de **electroforesis en gel de poliacrilamida**, de forma similar a lo descrito para la secuenciación química, o bien mediante **electroforesis capilar**.

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**, que 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. Así, surge el concepto de la secuenciación **automática**, en la cual 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.

2.3. SECUENCIACIÓN DE NUEVA GENERACIÓN

Las 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**, han evolucionado rápidamente en los últimos años, como también lo han hecho 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**.

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.

El primer paso para llevar a cabo la secuenciación 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 cualquier caso, en primer lugar será necesario **fragmentar el ADN** y, mediante ligación, añadirle **secuencias adaptadoras a los extremos**. Las moléculas de ADN molde que comprenden la biblioteca generada se **inmovilizarán sobre una superficie** o soporte con **suficiente separación espacial** entre ellos, permitiendo así que se lleven a cabo miles de reacciones simultáneamente.

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.

En contrario, si 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”**.

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**.

Una vez que las moléculas que servirán como molde para la secuenciación se encuentran fijadas físicamente al soporte y con una separación suficiente entre ellas, puede dar comienzo la fase de secuenciación propiamente dicha.

En el marco de las técnicas de NGS, existen **múltiples métodos de secuenciación** que son utilizados por las diferentes plataformas disponibles:

- Secuenciación por **hibridación**. Se trata de técnicas basadas en la **unión de hebras de ácidos nucleicos** a otras con sus secuencias **complementarias**. 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.
- Secuenciación por **síntesis**. 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. 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. Algunas de las técnicas que emplean la síntesis como método para la secuenciación incluyen:
 - **Terminación reversible cíclica**. Se basan en **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.
 - **Pirosecuenciación**. Se basan en que cuando se añade el **dNTP correcto** (complementario en la posición concreta a la cadena molde), este se añade a la cadena en síntesis, **liberándose un pirofosfato**. Dicho **pirofosfato liberado** sufrirá una reacción enzimática, generando **luz de intensidad variable** en función del número de nucleótidos incorporados en las diferentes cadenas que se encuentren en síntesis simultáneamente.
 - **Ion Torrent** (secuenciación por semiconducción). 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).
- 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.
- Secuenciación en **tiempo real**. Esta tecnología ha sido incorporada en la plataforma SMRT (por sus siglas en inglés, de Single Molecule Real Time) de Pacific Biosciences. Se basa en llevar a cabo la reacción de síntesis en pequeñas cámaras (denominadas **zero-mode waveguide, ZMW**), que por su 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.

- Secuenciación mediante **nanoporos**. 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. También existe la posibilidad de emplear **lectores ópticos** para la lectura anclando moléculas fluorescentes a los nucleótidos.
- Técnicas complementarias para la secuenciación. Algunos métodos empleados para completar o confirmar el orden de las bases en el genoma incluyen el **mapeo óptico** mediante el marcaje de nucleótidos en moléculas largas de ADN, o la **secuenciación mediante visualización directa de las moléculas al microscopio electrónico**.

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.

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.

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**.

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**. Algunas de sus principales funciones han incluido:

- **Caracterizar** en profundidad los **agentes patógenos**.
- **Detectar, identificar y caracterizar microorganismos previamente no identificados**.
- **Desarrollar pruebas de diagnóstico simples**, y aplicables a múltiples grupos de microorganismos diferentes.
- 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.
- 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**.

3.1. 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. Algunas de sus aplicaciones pueden incluir:

- **Genotipado de los animales** con respecto a genes de interés, por ejemplo el gen *Prnp*, que determina la susceptibilidad al Scrapie.
- **Estudio de regiones genómicas 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.
- **Identificación de animales de interés a nivel individual**.

4. MÉTODOS MOLECULARES PARA EL ANÁLISIS DE GENOMAS

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.

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

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.

4.1. 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**.

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 (en la técnica denominada **"FISH"**), de tal manera que hibridarán con las secuencias complementarias en el ADN de estudio y permitirán la **observación directa con el microscopio óptico o de fluorescencia** sobre un extendido cromosómico.

En cualquier caso, además pueden emplearse 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.
- **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 por la acción capilar. Tras la transferencia, se emplean

sondas de hibridación para la detección de los fragmentos complementarios presentes.

- **Footprinting del ADN.** Se emplea para determinar las secuencias de ADN que actúan como sitios de fijación para algunas proteínas.
- Uso de animales de experimentación **transgénicos**, siendo una de sus variantes más empleadas el uso de **ratones “knock-out”**.
- **PCR y secuenciación** genómica.

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”**.

Los mapas citogenéticos 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. Las **técnicas más empleadas** para el estudio citogenético son aquellas basadas en la **generación de células híbridas** en las que estudiar los diferentes cromosomas, pudiendo emplearse **híbridos de células somáticas o híbridos de radiación**.

Para generar mapas de **“contigs”**, 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) y se analizarán para **determinar cuáles contienen regiones de secuencias superpuestas**. Este tipo de estudios suponen una herramienta indispensable para el **ensamblado de secuencias genómicas completas**.

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** están **conectados físicamente** y por tanto deben segregarse juntos durante el proceso de meiosis. 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.

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, basados en la generación de clones que presentan secuencias superpuestas**:

- Métodos de **Shotgun Sequencing** (“secuenciación de escopeta”) y de **Hierarchical Shotgun Sequencing** (“secuenciación jerárquica de escopeta”). Permiten realizar la secuenciación en un único paso o en dos, de forma ordenada.
- Método de **secuenciación clone-by-clone** (“secuenciación clon a clon”). Requiere un mapeo previo de los cromosomas para poder realizar la clonación y posteriormente la secuenciación.

4.2. 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.

El enfoque 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 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. 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.
- **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.
- Secuenciación masiva del **ARN o RNA-Seq**.

- 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**. Para el análisis de proteínas también se pueden emplear métodos como el **Western Blot** o la **electroforesis en gel**.

4.3. 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 organizan 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 alejadas filogenéticamente. Estas regiones altamente conservadas contendrán, con mayor probabilidad, **genes importantes para ciertas funciones vitales**.

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.

4.4. 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. Algunas de las aplicaciones incluyen:

- Desarrollo de **técnicas de diagnóstico moleculares**.
- **Caracterización de agentes patógenos**.
- Descripción de la **estructura cromosómica** en las diferentes especies. Permite 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.
- Caracterización de los **transcriptomas**, por ejemplo para estudiar los patrones de **expresión genética asociados a procesos como las infecciones** por diferentes agentes.
- **Identificación de la función de los genes** de los agentes patógenos.
- Determinación de genes **implicados en caracteres de producción u otros** que puedan resultar de interés, por ejemplo en **programas de conservación de razas**.
- Realización de análisis **filogenéticos** entre patógenos, pudiendo determinar la proximidad o distancia de las diferentes especies o grupos de los mismos.

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.

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

Genómica. Facultad de Biología, Universidad Tecnológica de Pereira (Colombia). [Internet]

MATERIAL PARA LA PREPARACIÓN DEL TEMA 22

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.

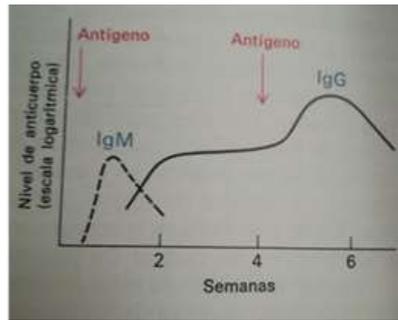


Figura 1. respuesta primaria y secundaria frente a un antígeno.
Fuente: L. Stryer.

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 cristalizante), 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 (λ)

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**.

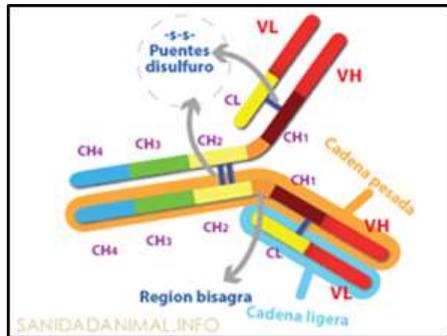


Figura 2. Estructura de las inmunoglobulinas.

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 IgG₃ y nula para la IgG₄; las IgG₁, IgG₂ e IgG₃ 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 IgG₁ es la subclase más frecuente seguida de la IgG₂. 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 policlones**, se pueden definir como colecciones de inmunoglobulinas **producidas por diferentes linajes de linfocitos B** que, aunque reconocen un mismo antígeno, reaccionan frente a **distintos epítomos** 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 epítomo** del mismo.

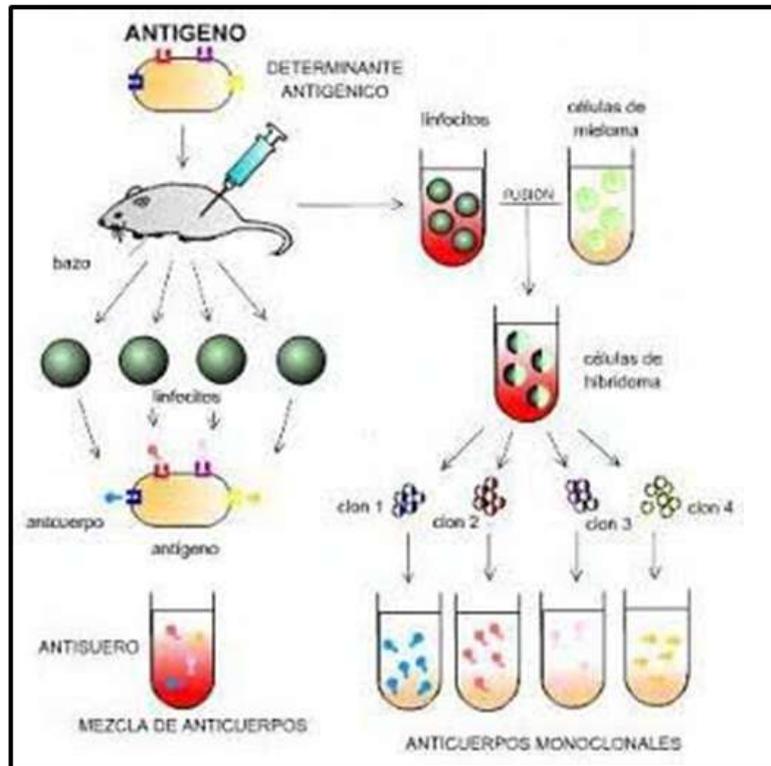
3.2.2. Producción de anticuerpos (Figura 3)

La **producción de anticuerpos policlones** 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 policlones 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 23

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**¹ 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.
- Específica², por interacción complementaria (aunque en algunos casos, puede darse reactividad cruzada³ con otro antígeno).

¹ Antígeno: sustancia extraña al organismo capaz de estimular la respuesta inmune de éste.

² Especificidad: capacidad del Ac para discriminar e interactuar diferencialmente con un Ag de estructura similar.

³ 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= Inmunocromatografía
- 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 antiespecie/grupo de especies (ej Conjugado antirumiante). Se trata de una antiglobulina 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 antiespecie 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 antiespecie 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 H₂O₂ 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.

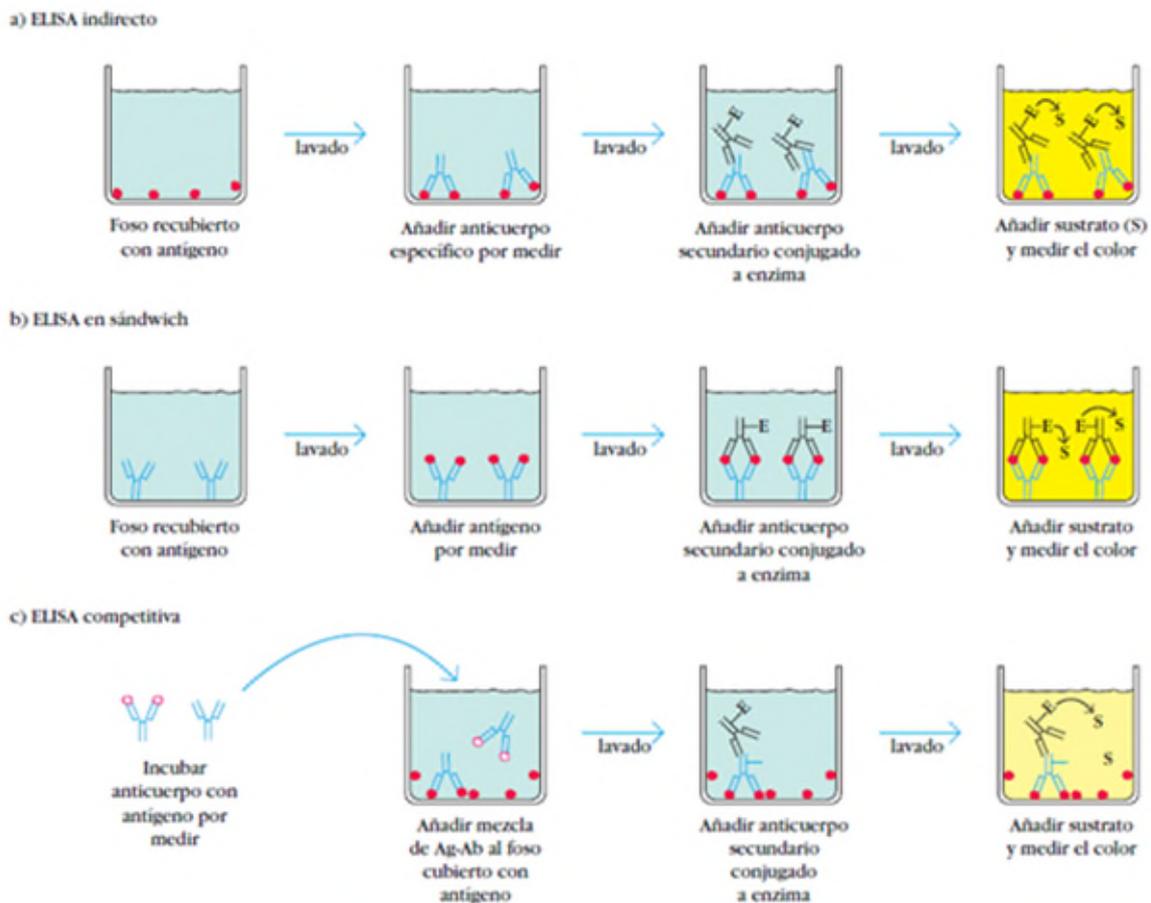


Figura 1. Las variaciones en la técnica del ensayo de inmunosorbente ligado a enzima (ELISA) permiten determinar anticuerpo o antígeno. Cada prueba puede utilizarse de manera cualitativa o cuantitativa mediante la comparación con curvas estándar elaboradas con concentraciones conocidas de anticuerpo 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. 4PRUEBA ELISPOT

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.

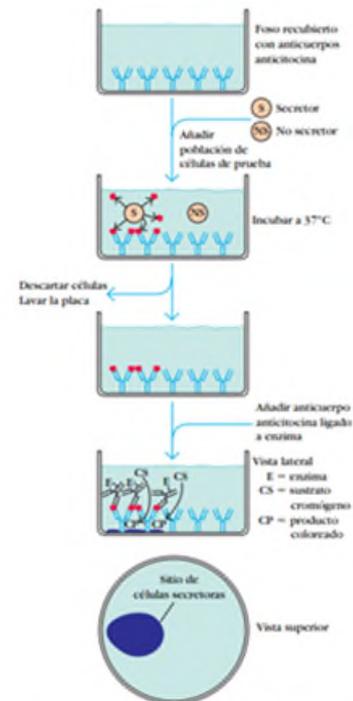


Figura 2 En la prueba ELISPOT, un foso se recubre con anticuerpo contra el antígeno de interés, en este ejemplo una citocina, luego una capa de una suspensión de la población celular que se piensa que contiene algunos miembros que sintetizan y secretan la citocina se coloca en el fondo del foso y se incuba. La mayoría de las moléculas de citocina secretadas por una célula particular reaccionan con los anticuerpos cercanos unidos al foso. Después del período de incubación, se lava el foso 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 sólida en las áreas del foso 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

⁴ Fuente imagen: "Inmunología de Kuby" 6ª Ed.

la verdadera DO resultante. Del mismo modo, debemos asegurarnos que no se han formado burbujas en los pocillos que puedan alterar la lectura.

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.

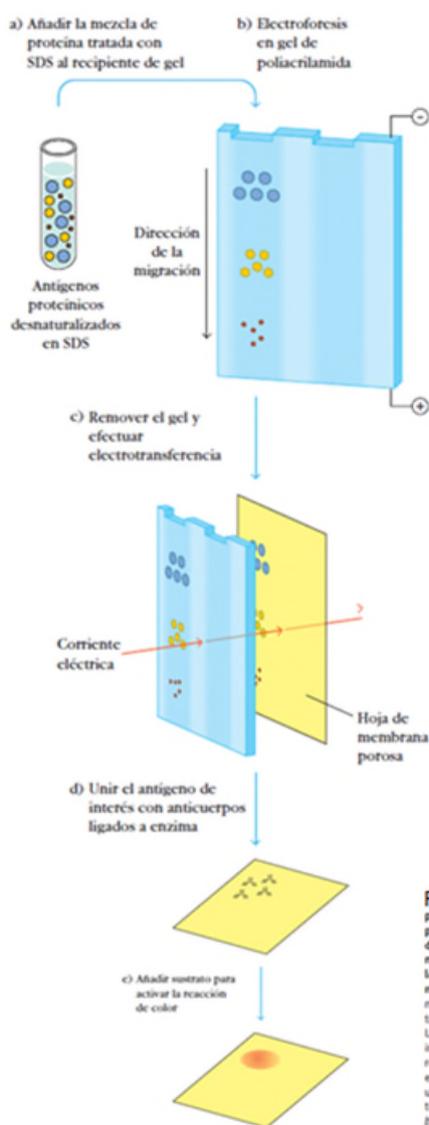
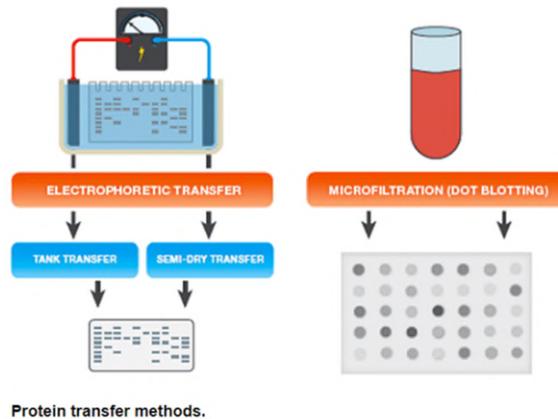


Figura 3 La técnica de Western blotting, una mezcla proteínica a) se trata con SDS, un detergente desnaturalizador potente, b) luego se separa mediante electroforesis en un gel de SDS-poliacrilamida (SDS-PAGE) que discrimina los componentes según su peso molecular; los componentes de peso molecular más 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

⁵ 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)

⁶ 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 proteicos, 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.

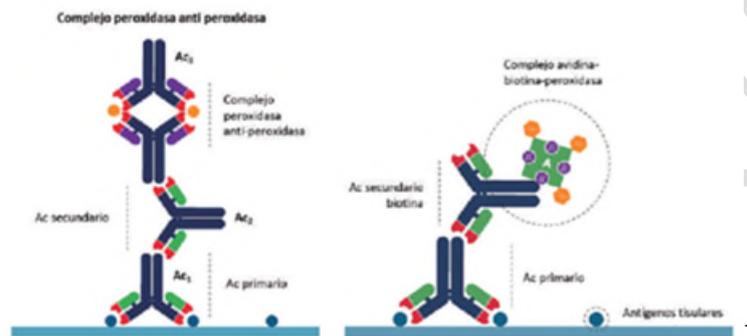


Figura 5. Esquema técnicas inmunohistoquímicas

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

⁷ Fuente imagen: <https://revistamedicina.net/ojsanm/index.php/Medicina/article/view/1587/2034>

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

Anexo técnico de acreditación LCSA:

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/articulos/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%25D10219%2526ISID%253D478%2526PRT%253D10207,00.html#:~:text=T%C3%A9cnica%20del%20complejo%20avidina%20Dbiotina,en%20la%20clara%20de%20huevo.

MATERIAL PARA LA PREPARACIÓN DEL TEMA 24

**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**¹ 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.
- Específica², por interacción complementaria (aunque en algunos casos, puede darse reactividad cruzada³ con otro antígeno).

¹ Antígeno: sustancia extraña al organismo capaz de estimular la respuesta inmune de éste.

² Especificidad: capacidad del Ac para discriminar e interactuar diferencialmente con un Ag de estructura similar.

³ 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), etc.

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. INMUNOFUORESCENCIA (IFAT= IMMUNOFUORESCENCE 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 encuentran 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.

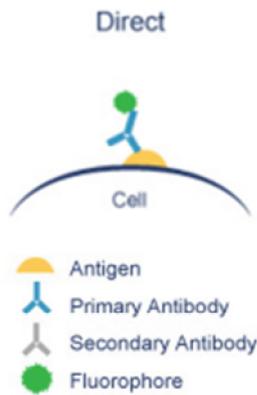


Figura 1

⁴El siguiente paso es añadir el antisero 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

⁴ 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 antiviral 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.

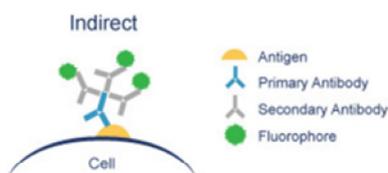


Figura 2

⁵La 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*.

⁵ 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 enfrentarlas 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 antiespecie, 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.

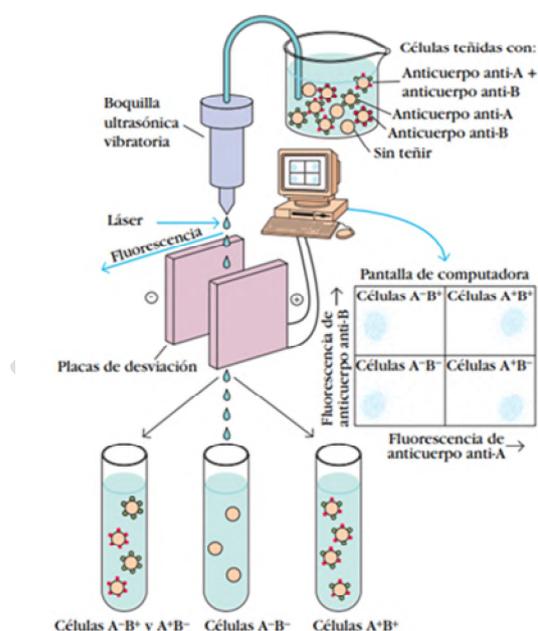


FIGURA 3

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⁻B⁻ y A⁺B⁺ se seleccionaron cada una hacia tubos separados. La tinción con anticuerpos fluorescentes anti-A y anti-B permite distinguir cuatro subpoblaciones: A⁻B⁻, A⁺B⁻, A⁻B⁺ y A⁺B⁺.

6

⁶ 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:

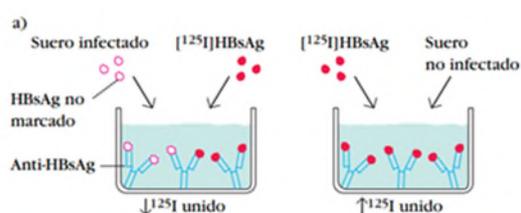
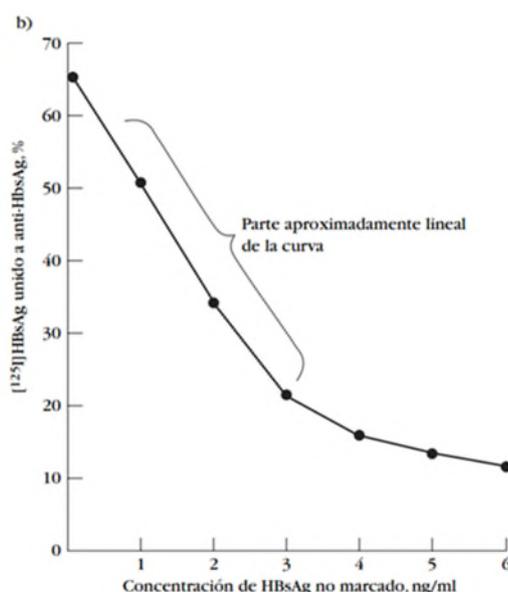


Figura 4 Radioinmunoensayo (RIA) de fase sólida para detectar virus de hepatitis B en muestras de sangre. a) Fosforos de microtitulo se cubren con una cantidad constante de anticuerpo específico para HbsAg, el antígeno de superficie en viriones de hepatitis B. A continuación se añaden una muestra de 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.



⁷ 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.

⁷ 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 antiespecie).

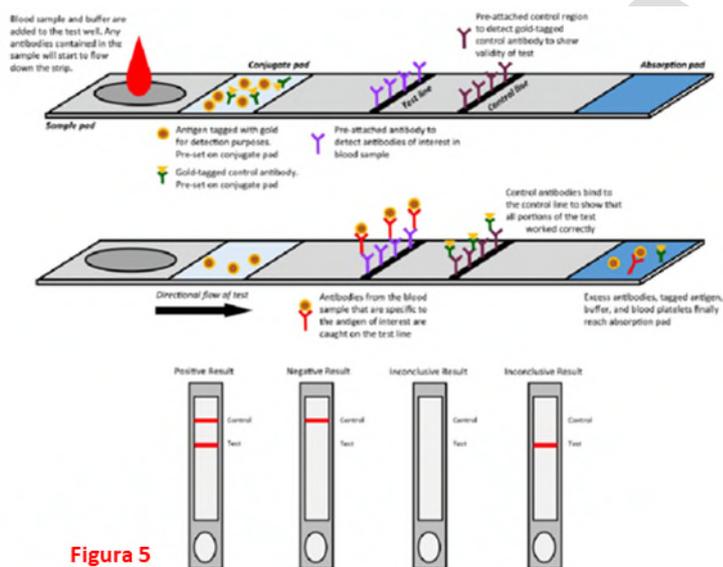


Figura 5

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

⁸Generalmente 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

⁸ Fuente Figura 5: 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

⁹Si 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

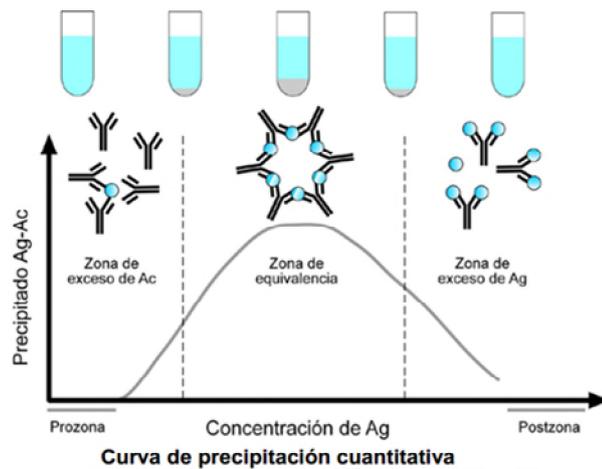


Figura 6

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.

⁹ 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

¹⁰También 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.

¹¹**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 epítomos 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.

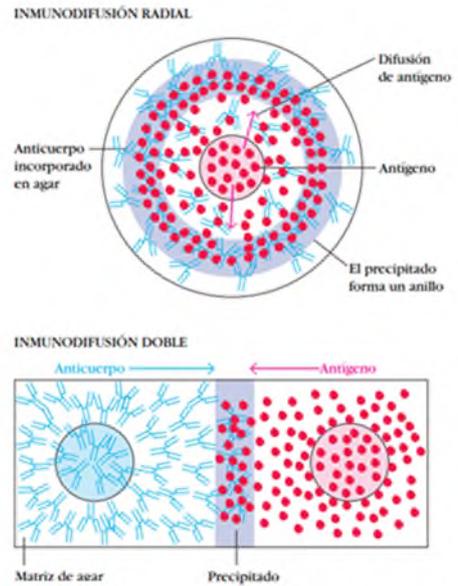
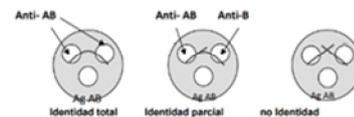


Figura 7 Diagramas de la inmunodifusión radial (método de Mancini) y la inmunodifusión doble (método de Ouchterlony) en un gel. En ambos casos se forman complejos insolubles grandes en el agar en la zona de equivalencia, visibles como líneas de precipitación (regiones púrpura). En la inmunodifusión radial 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):



¹⁰ 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>)

¹¹ 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).

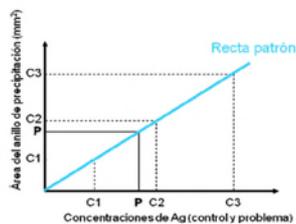


Figura 9 Curva estándar para determinar la concentración de la solución antigénica problema.

¹²En 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

¹² Fuente Figura 9: Compendio de guiones para clases teóricas en la asignatura Inmunología en Veterinaria III: técnicas inmunolectológicas (<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:

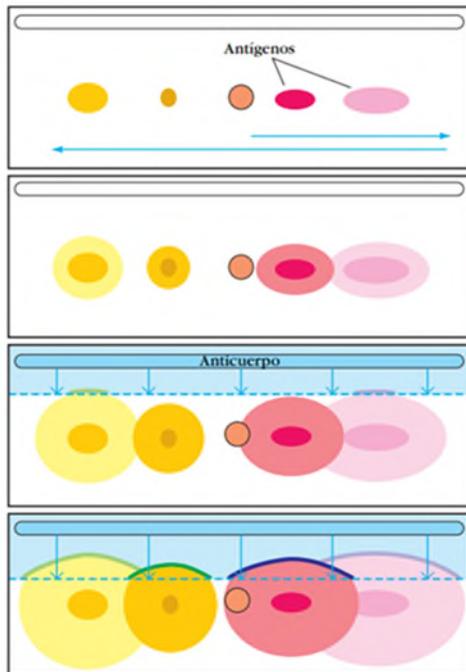


Figura 10 Inmunoelectroforesis de una mezcla de antígeno. Un preparado de antígeno (anaranjado) se somete primero a electroforesis, que separa los antígenos componentes con base en la carga. Luego se añade antisuero (azul) a cuencos en uno o ambos lados de los antígenos separados y se permite que se difundan; con el tiempo se forman líneas de precipitación (arcos de color) en los que interactúan anticuerpo y antígeno específicos.

¹³La 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.

¹⁴Si 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”.

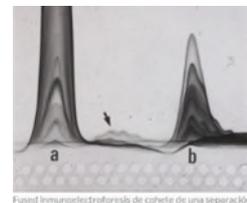


Figura 11

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

¹³ 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>)

¹⁴ Fuente Figura 11: <https://hmong.es/wiki/Inmunoelectrophoresis>

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.

- ¹⁵**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.

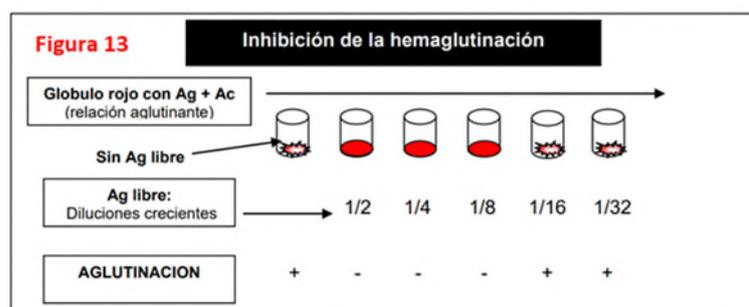
- ¹⁶**La inhibición de la hemaglutinación vírica por Ac**

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.]



¹⁵ 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>)

¹⁶ 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 Ac].

Reacción de Fijación de Complemento: resultado positivo

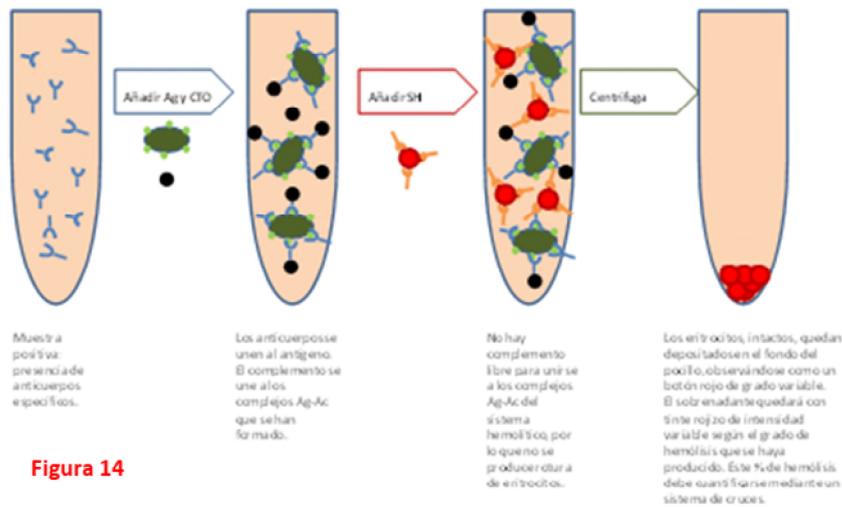


Figura 14

Reacción de Fijación de Complemento: resultado negativo

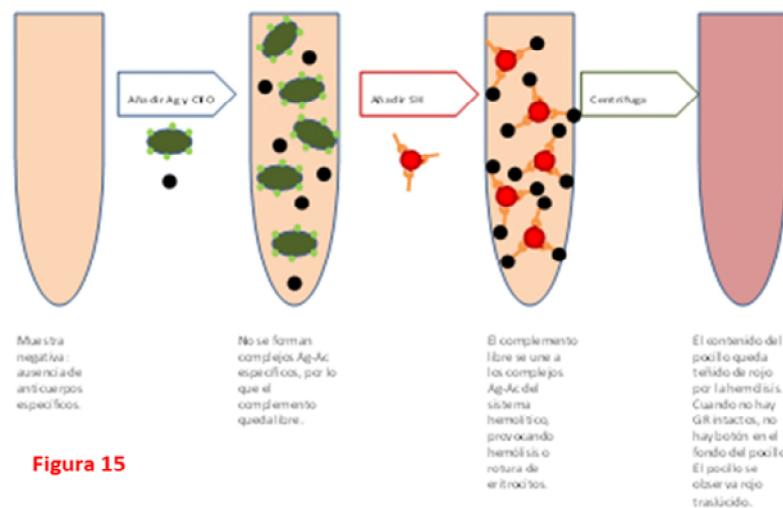


Figura 15

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 α de Clostridium perfringens o toxina α 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 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- γ):

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 γ** : consiste en detectar mediante un ELISA tipo sándwich la cantidad de IFN- γ 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/13anexotecnicoacreditacionlc_v_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

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 25

**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

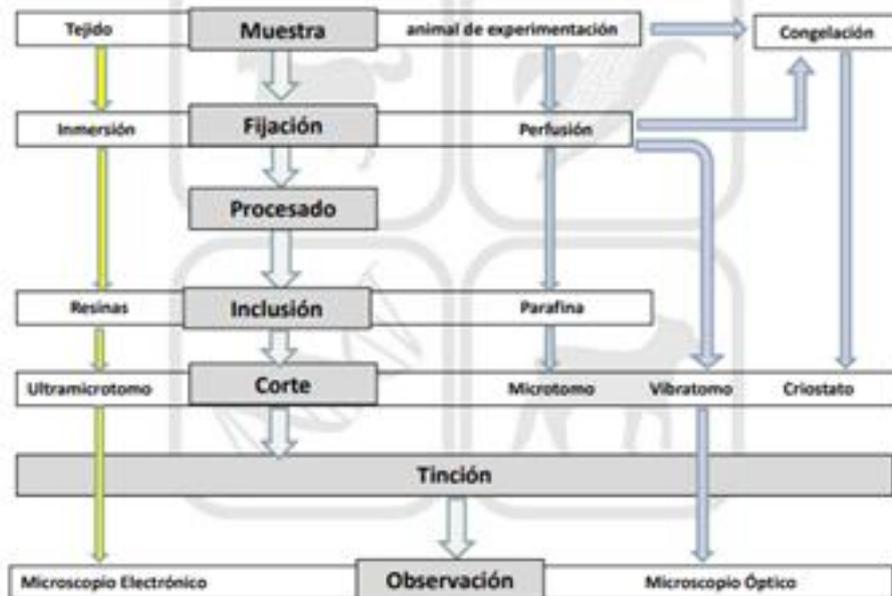
El término **Histología** procede del griego y significa: "ἵστος/*histós*, "tejido", y λογία/*logía*, "tratado, estudio, disciplina", por lo que se puede definir la **Histología** como la disciplina que estudia **todo lo relacionado con los tejidos: su estructura, desarrollo y sus funciones**.

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 μm a 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 polietilenglicol), 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**: [*mikr(o)*- μικρός gr. 'pequeño' + *-tomo-* -τομος gr. 'cortador']; instrumento mecánico con el que se realizan secciones de espesor **micrométrico (μm)**.

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 T^a 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)

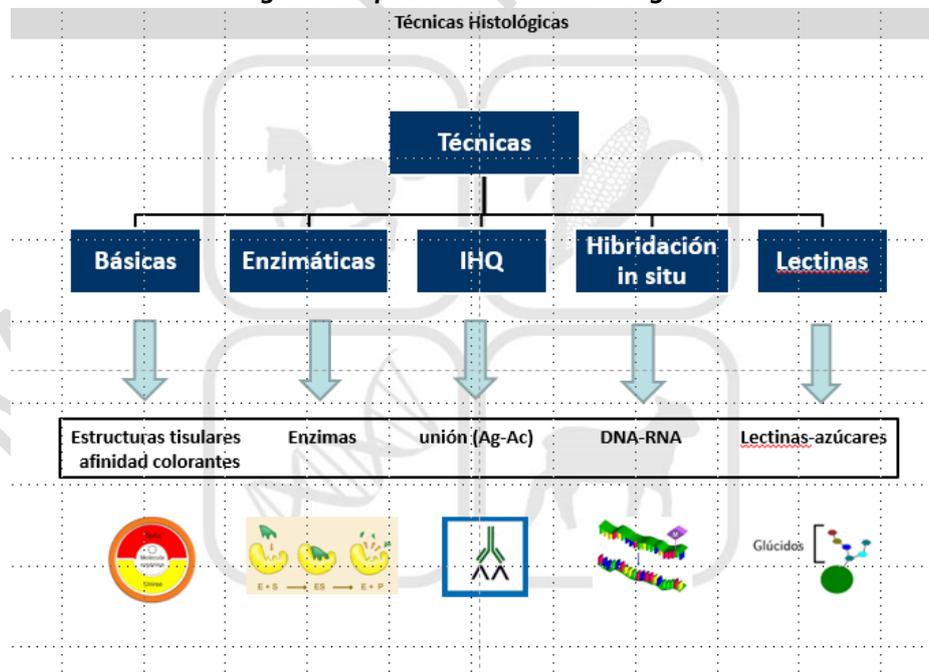
1.2.6. Observación al Microscopio

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** (sotiocianatos) 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 |
| Relaciones electrostáticas | Ácido-Base |
| 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

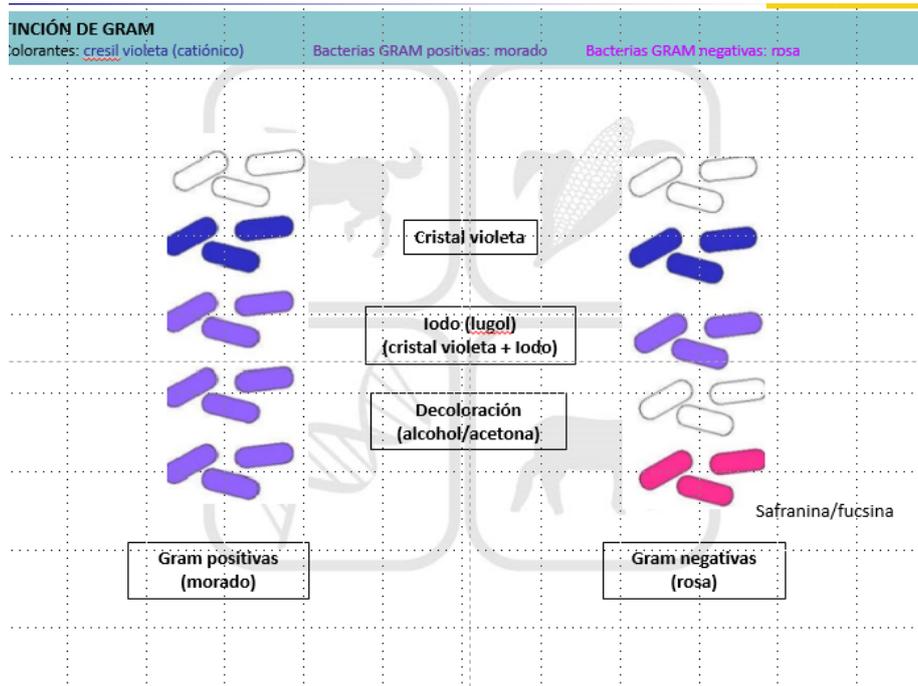


Figura 4b. Estructura pared celular de bacterias



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:

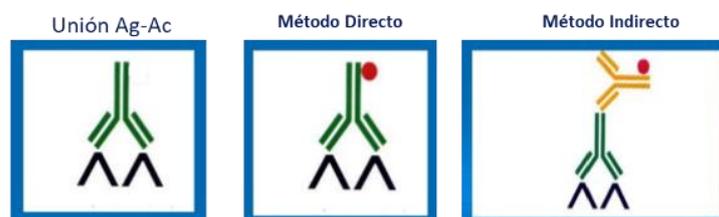
a. Inmunohistoquímica directa

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)

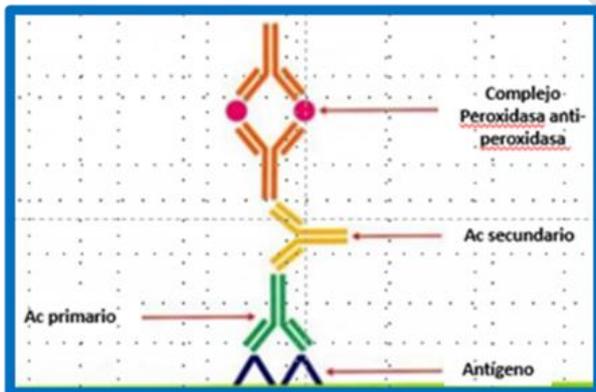
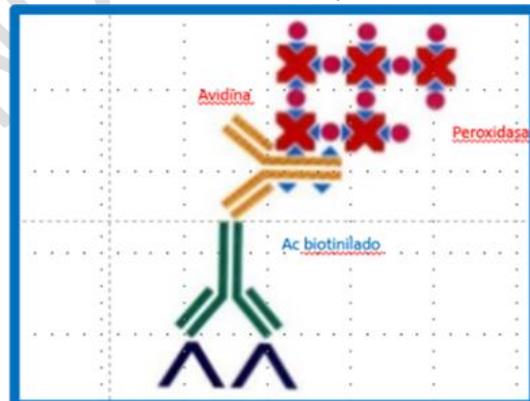


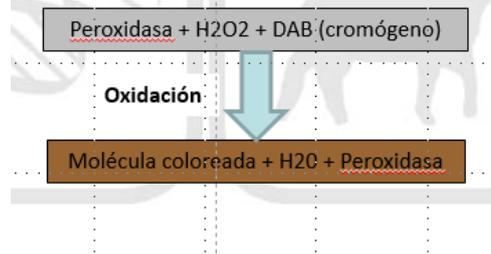
Fig. 6b. Complejo ABC (Strept/avidina-Biotina peroxidasa) 1974 Heitzman, Richardson)



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

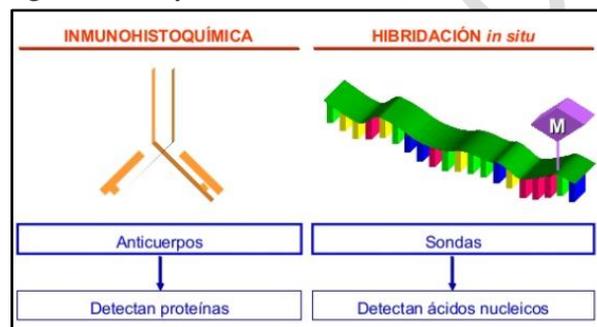


2.4. TÉCNICAS DE HIBRIDACIÓN *IN SITU*

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 26

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

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.

Hasta llegar a lo que conocemos actualmente como cultivos celulares, se tuvieron que superar y buscar soluciones a diferentes dificultades que surgieron a medida que se avanzaba en su desarrollo, entre otras fueron las relacionadas con conseguir un medio nutritivo adecuado para las células extraídas, prolongar la vida del cultivo durante un tiempo superior a la vida del animal del que procedía (se consiguió con los frascos de Carrel), conseguir trabajar en condiciones estériles. Fue la aparición de los primeros **antibióticos**, y su utilización con cultivos celulares lo que 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 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 | LÍNEA CELULAR (nombre completo) | DESCRIPCIÓN LÍNEA 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/SALMÓN | 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.
- ✓ *Microsoportes* ("microcarriers"). Se trata de soportes plásticos (poliestireno), de sephadex o poliacrilamida 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.
- ✓ *Matrices tridimensionales*. Son sustratos en los que las células penetran, estableciendo una distribución tridimensional. En estas matrices muchos tipos celulares crecen y se establecen de una manera análoga a como lo hacen en el tejido de origen.
- ✓ *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..).

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 varios tamaños. 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.

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.

- *Osmolaridad*. Muchas células en cultivo tienen una amplia tolerancia frente a la osmolaridad del medio. 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).* 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.
- ✓ *Antibióticos y antifúngicos,* para evitar el crecimiento de bacterias y hongos. Los más utilizados son penicilina, estreptomina, 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%).

- 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 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*. Debe estar en una zona tranquila y poco transitada.
- La *ropa de trabajo* debe ser específica para trabajar en esa zona.
- 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. 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.
- b) *Incubador*: Según las necesidades de las células, proporcionarán o no también CO₂. 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.
- e) *Equipos de frío*: neveras de 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, unidad de almacenamiento en nitrógeno líquido a -196°C (para el almacenamiento de las líneas celulares).

- f) *Equipos de esterilización:* Los recipientes que contactan con el cultivo, los medios líquidos o sólidos y los instrumentos que puedan entrar en contacto con éste en algún momento de su manipulación deben estar estériles (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, entre otros.
- 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 y 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.

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.* 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°C , durante largos periodos de tiempo. El nitrógeno está a una temperatura de -196°C en fase líquida y en la fase de vapor está entre -178°C y -150°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°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:

a) Control de reactivos y material.

- b) **Control de origen e integridad de las líneas celulares.** Es importante adquirir líneas celulares de fuentes reconocidas, como son las colecciones acreditadas
- c) **Control de contaminaciones microbianas.** Las contaminaciones microbianas más frecuentes pueden ser producidas por: Bacterias y hongos, virus y *Mycoplasma spp.* La presencia de *Mycoplasmas* 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.
- d) **Control medioambiental.** Incluye a su vez un control microbiológico de las superficies de trabajo y un control del ambiente. 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 Infecciosa 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).

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 Primavera 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

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 27

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.

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.

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 bipo-tásicos, 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 en slant de superficie inclinada.

- **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.

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.

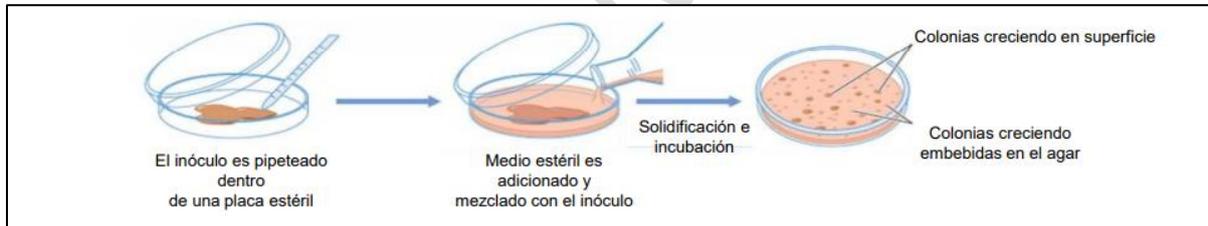


Imagen 1: <http://agro.unc.edu.ar/~microbiologia/wp-content/uploads/2014/04/Trabajo-Pr%C3%A1ctico-N%C2%BA-4.pdf>

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.

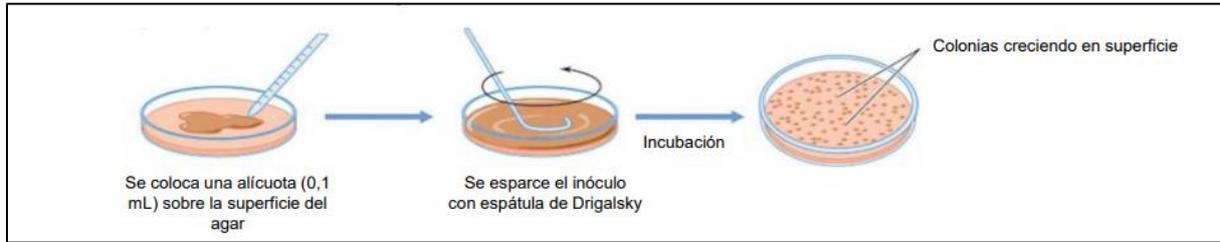


Imagen 2: <http://agro.unc.edu.ar/~microbiologia/wp-content/uploads/2014/04/Trabajo-Pr%C3%A1ctico-N%C2%BA-4.pdf>

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.

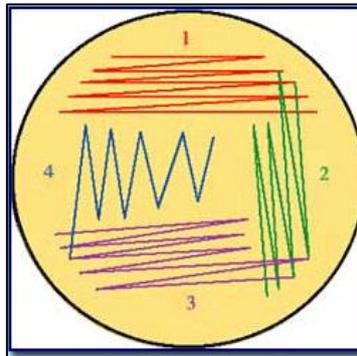


Imagen 3: http://aulacidta5.usal.es/aulavirtual/Demos/microbiologia/unidades/curso/UNI_02/imagenes/02050205.gif

Existen diversas variantes de la siembra en estría:

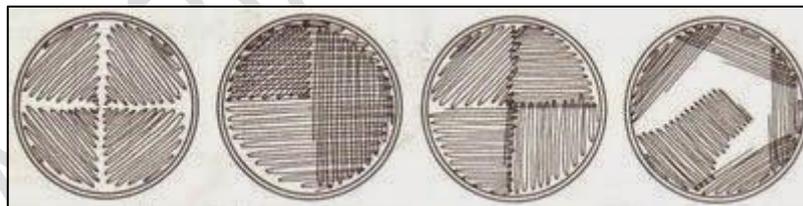


Imagen 4: <http://microbiologia3bequipo5.blogspot.com/2014/10/tecnicas-y-metodos-de-estriado-en-caja.html>

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.

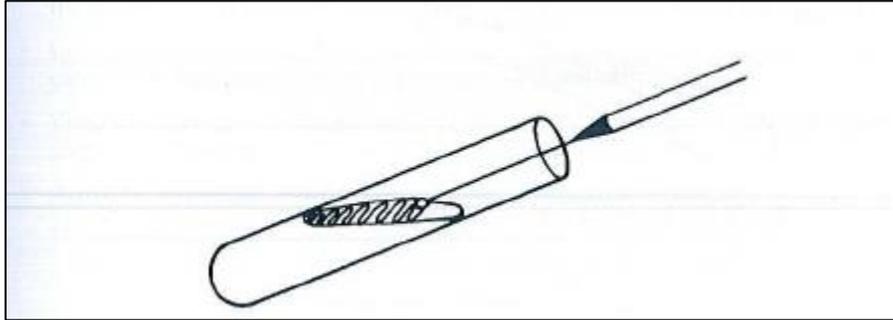


Imagen 5: <https://fiestadelosmicroorganismos.wordpress.com/2016/12/15/practica-7-2-diferentes-tecnicas-de-siembra-de-microorganismos-siembra-por-estria-en-tubos-con-medio-solido/>

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).

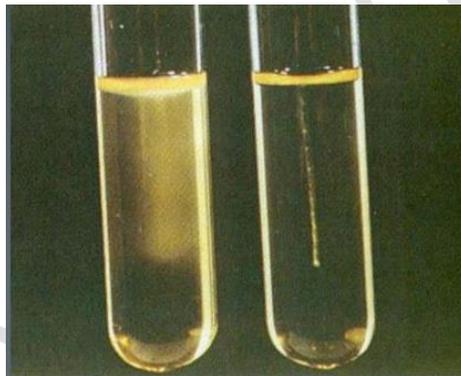


Imagen 6: <https://slideplayer.es/slide/12899855/>

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 37º, 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 CO₂.

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.

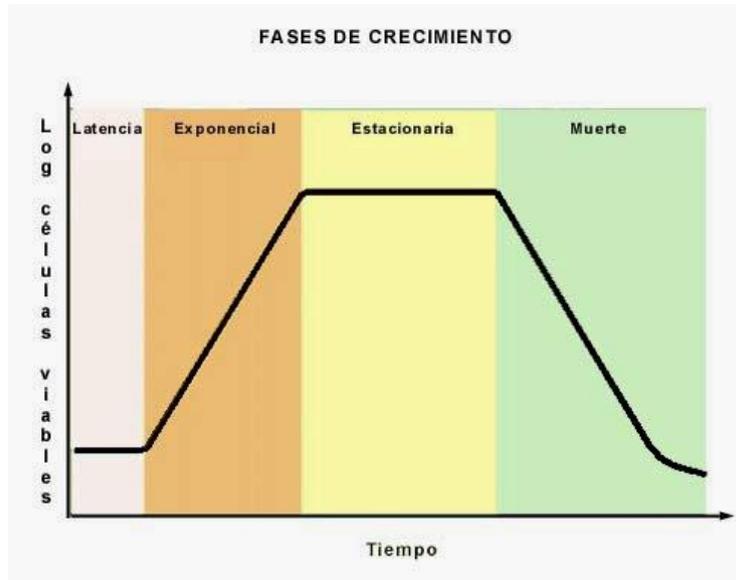


Imagen 7: <http://microbiologia3bequipo5.blogspot.com/2014/10/curva-del-crecimiento.html>

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 cm² 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 circundante. Los microorganismos aparecen refringentes sobre un fondo negro.

Existen multitud de tinciones y modificaciones de estas mismas. Las tinciones más empleadas en el laboratorio son:

- **Tinción por azul de metileno**

- **Tinción por fucsina**

- **Tinción de Gram:** 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. 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. Las bacterias Gram positivas retienen el cristal violeta tras la decoloración, mientras que las Gram negativas no lo pueden retener y se tiñen con la safranina, la cual funciona como un colorante secundario o de contratinción. 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).

- **Tinción de Ziehl-Neelsen:** 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. Algunos microorganismos (como Mycobacterium) poseen una pared rica en ácidos micólicos que junto con lípidos libres proveen a la célula de una barrera hidrofóbica. La tinción se basa en colocar carbol-fucsina (con una enorme afinidad por los ácidos micólicos) y calentar la preparación ligeramente. 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.
- **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. La observación debe realizarse en un microscopio de fluorescencia.
- **Tinción de esporas:** 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.
- **Tinción de flagelos:** Se pueden teñir usando un mordiente para incrementar su grosor y hacerlos visibles al microscopio óptico.
- **Tinción de cápsula:** se puede realizar una tinción negativa con tinta china y un colorante de contraste. 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. También se puede utilizar 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.

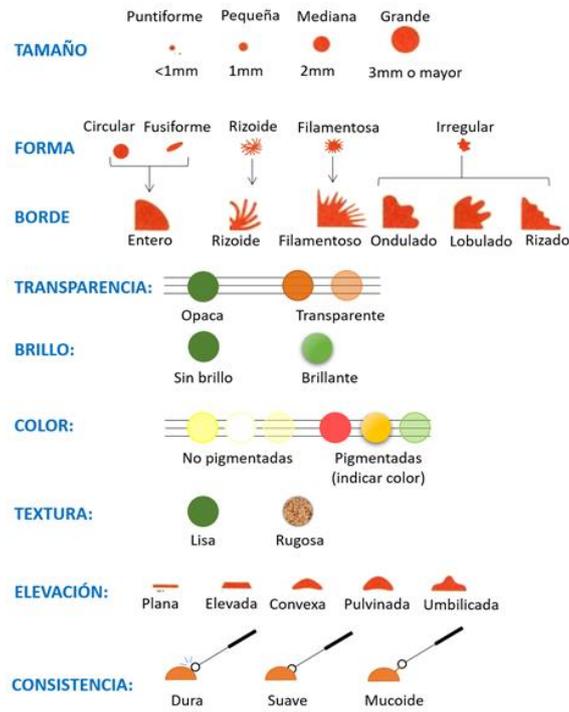


Imagen 8: <https://dingmicrolab.files.wordpress.com/2020/10/image-12.png>

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).

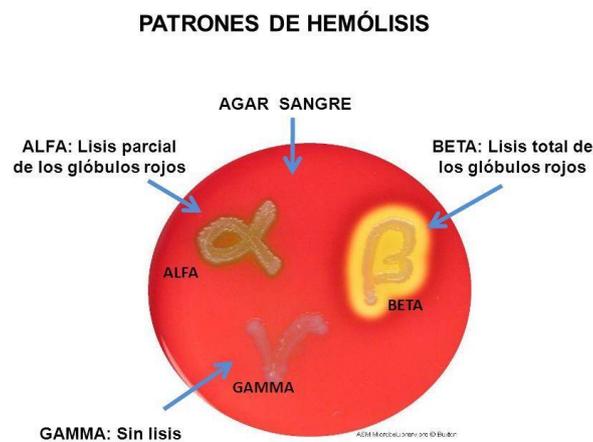


Imagen 9: <https://pbs.twimg.com/media/EF8UC7PWsAAAwbl.jpg>

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 μm hasta 250 μm .

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

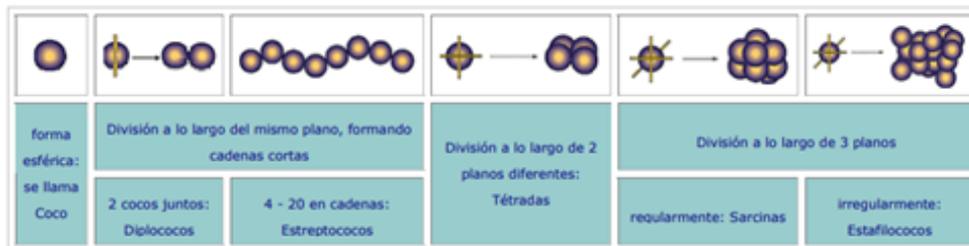


Imagen 10: <http://www.bio-nica.info/biblioteca/TincionBacterias.pdf>

Bacilos: existen grandes variaciones morfológicas, desde bacilos fusiformes, estreptobacilos, cocabacilos, bacilos filamentosos, bacilos curvos o vibrios, espirilos y espiroquetas.

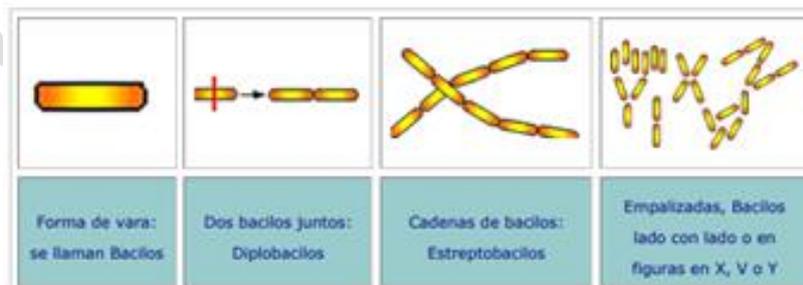


Imagen 11: <http://www.bio-nica.info/biblioteca/TincionBacterias.pdf>



Imagen 12: <http://www.bio-nica.info/biblioteca/TincionBacterias.pdf>

El término Pleomorfismo indica la adopción de diferentes formas en una misma especie.

5.2.1 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 pueden servir para la identificación bacteriana.

TIPO DE DISTRIBUCION DE LOS FLAGELOS

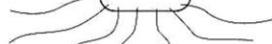
| Estructura | Tipo de flagelo | Ejemplo |
|---|-----------------|---------------------------------|
|  | Monotrico | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> |
|  | Lofotrico | <i>Bartonella bacilliformis</i> |
|  | Anfitrico | <i>Campylobacter jejuni</i> |
|  | Peritrico | <i>Escherichia coli</i> |

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

- Pruebas de lectura inmediata:
 - **Catalasa:** evidencia la presencia de la enzima catalasa que desdobra el peróxido de hidrógeno.
 - **Oxidasa:** evidencia la presencia de la enzima oxidasa.
- Pruebas rápidas, con lectura en menos de 6 h:
 - **Galactosidasa (ONPG):** evidencia la presencia de la enzima β -galactosidasa que fermenta la lactosa.
 - **Ureasa:** evidencia la presencia de la enzima ureasa que desdobra la urea en amoníaco.
 - **Indol:** evidencia la producción de indol procedente de la degradación del triptófano por la enzima triptofanasa.
 - **Prueba del amoníaco:** evidencia la producción de amoníaco.
- Pruebas lentas, con lectura de 18 a 48 h:
 - **Fermentación y oxidación de carbohidratos:** estudia la utilización de carbohidratos por la vía oxidativa o la fermentativa
 - **Reducción de nitratos:** evidencia la capacidad de reducir nitratos a nitritos por actividad de la nitrataasa.
 - **Rojo de metilo:** estudia la capacidad de fermentación de la glucosa por la vía ácidomixta.
 - **Voges-Proskauer:** estudia la capacidad de metabolizar la glucosa por la vía butanodiólica.
 - **Producción de sulfuro de hidrógeno:** estudia la capacidad de los cultivos de producir este compuesto.
 - **Hidrólisis de la esculina:** estudia la capacidad de hidrolizar la esculina.
 - **Coagulasa:** estudia la presencia de la enzima coagulasa que coagula el plasma.
 - **Fenilalanina-desaminasa:** estudia la desaminación de la fenilalanina a ácido pirúvico
 - **DNasa:** estudia la capacidad de hidrolizar el ADN.
 - **Hidrólisis de la gelatina:** estudia la presencia de la enzima gelatinasa
 - **Decarboxilasas:** estudia la presencia de enzimas que actúan sobre el grupo carboxilo de aminoácidos, formando aminas.
 - **Utilización de citratos:** estudia la capacidad de metabolizar el citrato
 - **Utilización de malonato:** estudia la capacidad de utilizar malonato como única fuente de carbono

- **Hidrólisis de la arginina:** indica la capacidad para hidrolizar este aminoácido
- **Hidrólisis de la caseína:** indica la capacidad para hidrolizar esta proteína de la leche.
- **Prueba del manitol:** estudia la capacidad de fermentar el manitol.
- **Prueba de la fosfatasa:** estudia la presencia de esta enzima capaz de descomponer los ésteres fosfóricos.

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 de manera que 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.

MATERIAL NO OFICIAL

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 28

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 (OMG): 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. 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.

La sociedad ha demandado, en consecuencia, que estas normas y procedimiento estén enfocados en **la inocuidad** de los Organismos Modificados Genéticamente, especialmente de los alimentos; en los **efectos** directos o indirectos que éstos pudieran producir **sobre el medio ambiente**; y en una **transmisión completa de la información** de estos OMG a la ciudadanía incluyendo la comunicación de los riesgos asociados (transparencia en la comunicación y en la información por las instituciones encargadas en su control y vigilancia).

Teniendo en cuenta la creación, comercialización y transporte de organismos que hayan sido modificados genéticamente, se celebró en 1975 la Conferencia de Asilomar, seguidas de 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 el uso de la Biotecnología de manera particular y de 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**.

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 modernos¹.

De igual manera, en la industria agroalimentaria, podemos considerar a los **alimentos modificados genéticamente o transgénicos** tanto aquellos OMG destinados al 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.

¹ 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.

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.

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 DNA 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.

- 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 espermatozoides (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.

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. Sin embargo, 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

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, es decir, 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.

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.

- **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.

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).

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 ésta 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.

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.

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.

- **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 y 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, 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.

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 (OMG): 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.**
- **Directiva 2009/41/CE, relativa a la utilización confinada de OMG.** 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.
- **Directiva 2001/18/CE, sobre la liberación intencional en el medio ambiente de OMG.** Contempla tanto los ensayos experimentales que se realizan a pequeña y mediana escala como la comercialización de productos (no solo alimentos) que incorporen OMG. Esta directiva tiene por objeto incrementar la eficacia y transparencia del procedimiento de autorización de la liberación intencional y la comercialización de OMG, limitar la validez de las autorizaciones a 10 años renovables e introducir un control obligatorio posterior a la comercialización de dichos organismos.

Esta directiva refuerza las normas sobre la liberación de OMG en el medio ambiente, estableciendo principios de evaluación del riesgo ambiental, obligaciones de seguimiento tras la comercialización, información al público, etiquetado y trazabilidad en todas las fases de la comercialización y la creación de un registro molecular entre otras medidas.

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.**
- **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.**

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 641/2004 de la Comisión, de 6 de abril de 2004, sobre las normas de desarrollo del Reglamento 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.
- **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.
- **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.²
- Ensayos de campo de OMG para la producción de alimentos y piensos MG autorizados con arreglo a la normativa comunitaria y/o nacional.³
- Semillas para la producción de alimentos y piensos modificados genéticamente.⁴

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.

El Reglamento (CE) 1830/2003 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 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

³ 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.

⁴ El Laboratorio Central de Sanidad Animal en Algete es el responsable de los controles de OMG en semillas.

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.
- **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. **El Real Decreto 191/2013, de 15 de marzo, por el que se modifica el Real Decreto 178/2004** 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.
- **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.

- **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.

La 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 OGM.

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 OMG resultante.

Tras esta evaluación, el OGM se clasificará en una de las cuatro categorías que la normativa recoge (de OMG tipo 1 hasta OMG de tipo 4). 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

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 que 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 es muy similar al adoptado en otros Acuerdos internacionales relativos al movimiento de sustancias peligrosas

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.

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.

MATERIAL NO OFICIAL

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_espaiola.aspx

Gobierno de España. Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición

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

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

Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación

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/notainformativametodos_deanalis11-01-2022_tcm30-584547.pdf

Asociación Nacional de Obtentores Vegetales.

<https://www.anove.es/>

MATERIAL PARA LA PREPARACIÓN DEL TEMA 29

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, Mg²⁺, 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:

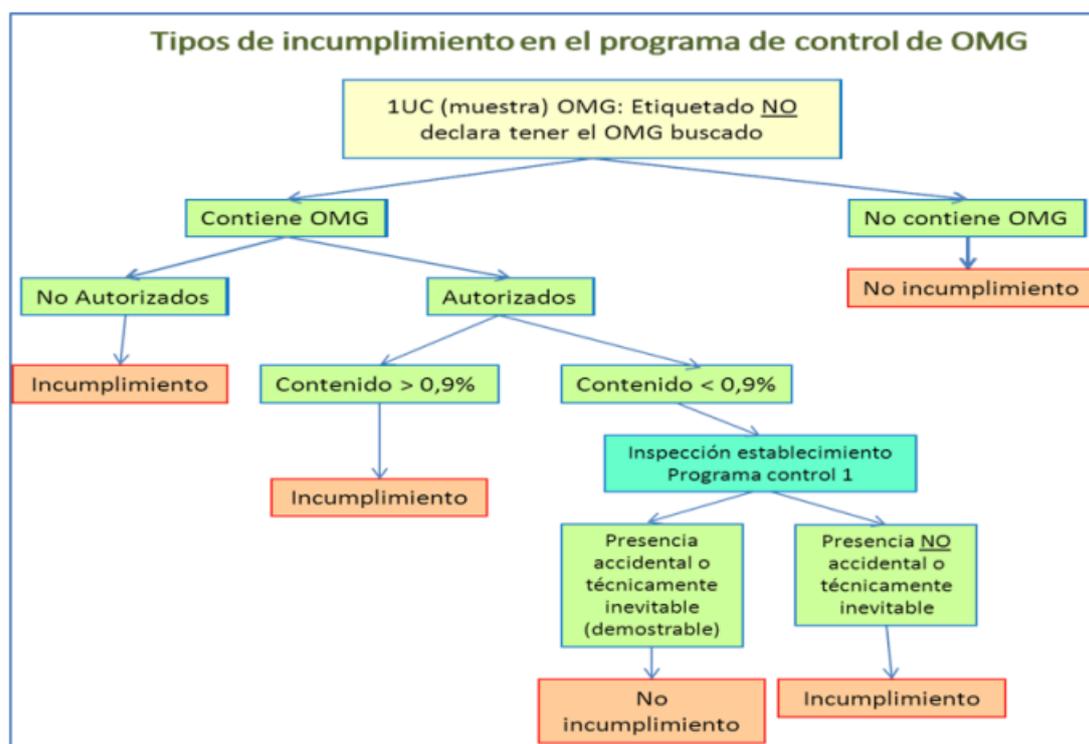


Figura 1: Plan Nacional de Control Oficial de la Cadena Alimentaria 2021-2025 Programa 6 Organismos Modificados Genéticamente (OMG) Versión 1 Aprobado en Comisión Institucional 16 de diciembre de 2020 AESAN

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®- BF417b

| | DRIED MAIZE POWDER | |
|----------------------------|---|---------------------------------------|
| | Mass Fraction | |
| | Certified value ¹⁾ [g / kg] | Uncertainty ²⁾ [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®-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® 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®- BF417c

| | DRIED MAIZE POWDER | |
|----------------------------|---|---------------------------------------|
| | Mass Fraction | |
| | Certified value ¹⁾ [g / kg] | Uncertainty ²⁾ [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®-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® 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®- BF417d

| | DRIED MAIZE POWDER | |
|----------------------------|---|---------------------------------------|
| | Mass Fraction | |
| | Certified value ¹⁾ [g / kg] | Uncertainty ²⁾ [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®-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® 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:

$$\% \text{ OMG} = \frac{N^{\circ} \text{ de copias evento transgénico}}{N^{\circ} \text{ copias endógeno}} \times 100$$

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

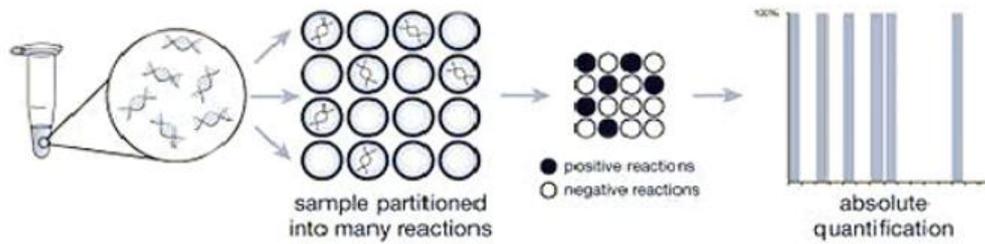
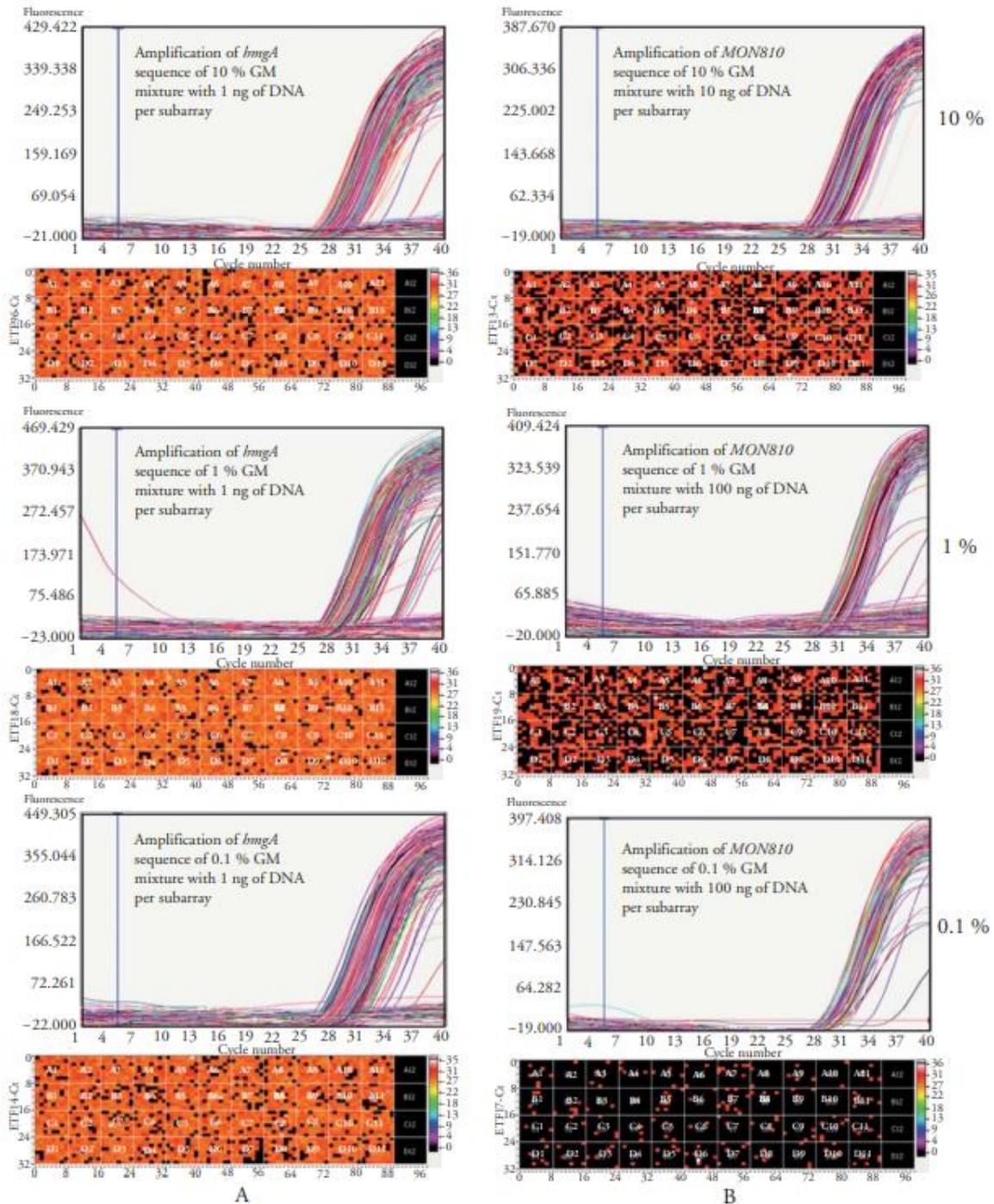


Figura 3. La PCR digital utiliza la relación de reacciones de PCR positivas (negro) a negativas (blanco) para contar el número de moléculas objetivo.

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

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

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 30

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. LABORATORIOS OFICIALES Y LABORATORIOS NACIONALES DE REFERENCIA

2.1. DESIGNACIÓN Y REQUISITOS

2.2. FUNCIONES

2.3. LABORATORIOS DEL MAPA

3.3.1. Laboratorios de sanidad de la producción agraria

3.3.2. Laboratorios agroalimentarios

3. LABORATORIOS DE REFERENCIA DE LA UNIÓN EUROPEA

3.1. DESIGNACIÓN Y REQUISITOS

3.2. FUNCIONES

MATERIAL NO OFICIAL

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, 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

En este sentido, la normativa de referencia 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. 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.

2.1. 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

2.2. 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.

2.3. 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*.

2.3.1. 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, Encefalomiелitis 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. Anejo 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.

2.3.2. 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.

3. 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.

3.1. 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 765/2008¹. 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;
- 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

¹ 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

cuentan 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.

3.2. 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) nº 882/2004 del Parlamento Europeo y del Consejo. Además, el LCV es Laboratorio de referencia de la OIE para la Peste Equina Africana.

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 PARA LA PREPARACIÓN DEL TEMA 31

**LEYES DE SANIDAD ANIMAL DE LA UNIÓN EUROPEA Y ESPAÑOLA.
PROGRAMAS SANITARIOS. 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. Actos complementarios al Reglamento 2016/429

1.2. OTROS ACTOS LEGISLATIVOS RELEVANTES EN MATERIA DE SANIDAD ANIMAL

2. LEGISLACIÓN ESPAÑOLA

2.1. LEY 8/2003 DE SANIDAD ANIMAL

2.2. OTROS ACTOS LEGISLATIVOS RELEVANTES

3. ORGANIZACIÓN DE LA SANIDAD ANIMAL EN ESPAÑA. AUTORIDADES COMPETENTES

4. PROGRAMAS SANITARIOS

MATERIAL NO OFICIAL

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.

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. 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.

Este reglamento se estructura en **nueve partes**:

- Parte I, de **disposiciones generales**. En ella se establecen los ámbitos objetivos y subjetivos de la ley, los principios de categorización de enfermedades y las **responsabilidades** en materia de sanidad animal.
- Parte II, de **notificación de enfermedades y envío de informes, vigilancia, programas de erradicación y estatus libre de enfermedad**, incluyendo la obligación de vigilancia por

diferentes actores y disposiciones relativas a la metodología, frecuencia e intensidad de la vigilancia.

- Parte III, de **concienciación, preparación y control** ante la enfermedad.
- Parte IV, de **inscripción registral, autorización, trazabilidad y desplazamientos**. Como novedad con respecto a la legislación previa, se establece la **obligatoriedad de registro de todos los establecimientos**.
- Parte V, de **entrada en la Unión y exportación**. 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. Sobre la exportación, se contempla la posibilidad de hacer derogaciones por requerimiento de las autoridades competentes del destino, así como la posibilidad de firmar acuerdos bilaterales con terceros países.
- 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**. Las normas se fijan 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.
- Partes VIII y IX, de **disposiciones comunes** y de **disposiciones transitorias y finales**, respectivamente.

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.

En cuanto a su ámbito **objetivo**, 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.

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**.

En cuanto a la **definición de responsabilidades**, que pone un mayor peso en los operadores, lo cual supone una de las principales diferencias con las estrategias previas.

1.1.1. 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.

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, entre los cuales cabe destacar:

- Reglamento (CE) 999/2001 por el que se establecen disposiciones para la prevención, el control y la erradicación de determinadas **encefalopatías espongiformes transmisibles**
- 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").
- Reglamento (UE) 2017/625, relativo a los **controles oficiales** y otras actividades oficiales.

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**. En él se hace referencia a la **ordenación sanitaria de las explotaciones de animales**

- Título IV, de **productos zosanitarios y para la alimentación animal**.
- Título V, sobre **inspecciones, infracciones y sanciones**.
- Título VI, sobre **tasas**.
- Título VII, sobre **información, formación y sensibilización**.

Los fines de la ley se definen 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 zosanitarios, 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** zosanitarios, 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.

En cuanto a la **prevención de las enfermedades** de los animales, se establecen diversas disposiciones, incluyendo las siguientes:

- **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, facilitar la información** que les sea requerida, **aplicar las medidas sanitarias** impuestas, **tener debidamente identificados a sus animales**, comunicar a las Administraciones los **datos sanitarios**, proceder a la **eliminación** de cadáveres de la forma establecida, 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.
- **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. 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.

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.

- **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.
- 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**.

En cuanto al **Comité Nacional del sistema de Alerta Sanitaria Veterinaria**, se define como el órgano de coordinación en materia de sanidad animal entre el Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación y las Comunidades Autónomas.

Además, 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.

En cuanto a los **productos zoonosanitarios**, la regulación incluye:

- **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.
- **Otros productos zoonosanitarios.** Ningún producto zoonosanitario distinto de los medicamentos veterinarios podrá ser puesto en el mercado sin la previa autorización expedida por el Ministerio de Agricultura.
- **Productos para la alimentación animal.** No podrán ser puestos en el mercado sin una autorización previa.

Además, 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**.

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.

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.

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 dicho 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
- 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).
- En cuanto al marco legislativo estatal, se debe atender a lo dispuesto en la **Ley 8/2003, de Sanidad Animal**.

A nivel de la Administración General del Estado, según lo dispuesto en el Real Decreto 139/2020, dentro de la Secretaría General de Agricultura y Alimentación se enmarca la **Dirección General de Sanidad de la Producción Agraria**. Sus funciones (según el Real Decreto 430/2020) 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**, 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**, que establece la **cadena de mando** en caso de una alerta sanitaria veterinaria. 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.

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**. Sus responsabilidades incluirán la **notificación a la Comisión** de la aparición de sospecha o foco de la enfermedad, y la **comunicación a la Comisión y otros Estados miembros** de cualquier información epidemiológica, así como la **recepción de información del comportamiento de la enfermedad a escala mundial**.

Ante la aparición de enfermedades de la lista de declaración obligatoria, se constituirán además tantos **Gabinetes de Crisis** como Comunidades Autónomas haya 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 estas. 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 sus funciones incluirán **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**. Serán las 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. Se compone por el Comité Nacional y el SIR. 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 integra toda la información sanitaria disponible, permitiendo en tiempo real la conexión entre las aplicaciones informáticas existentes en materia de Sanidad y Producción Animal y de Seguridad Alimentaria.

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 32

**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)¹.

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.**

¹ 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 los 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

| CONTROL DE LOTES DE REACTIVOS DE DIAGNÓSTICO | Contrastación |
|---|---------------|
| 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 zoonos sanitarios y otras sustancias utilizadas en la producción animal**, donde se definían y clasificaban los productos zoonos sanitarios 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 zoonos sanitarios 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 zoonos sanitarios. **En su Título IV, Capítulo II** sobre otros productos zoonos sanitarios,

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

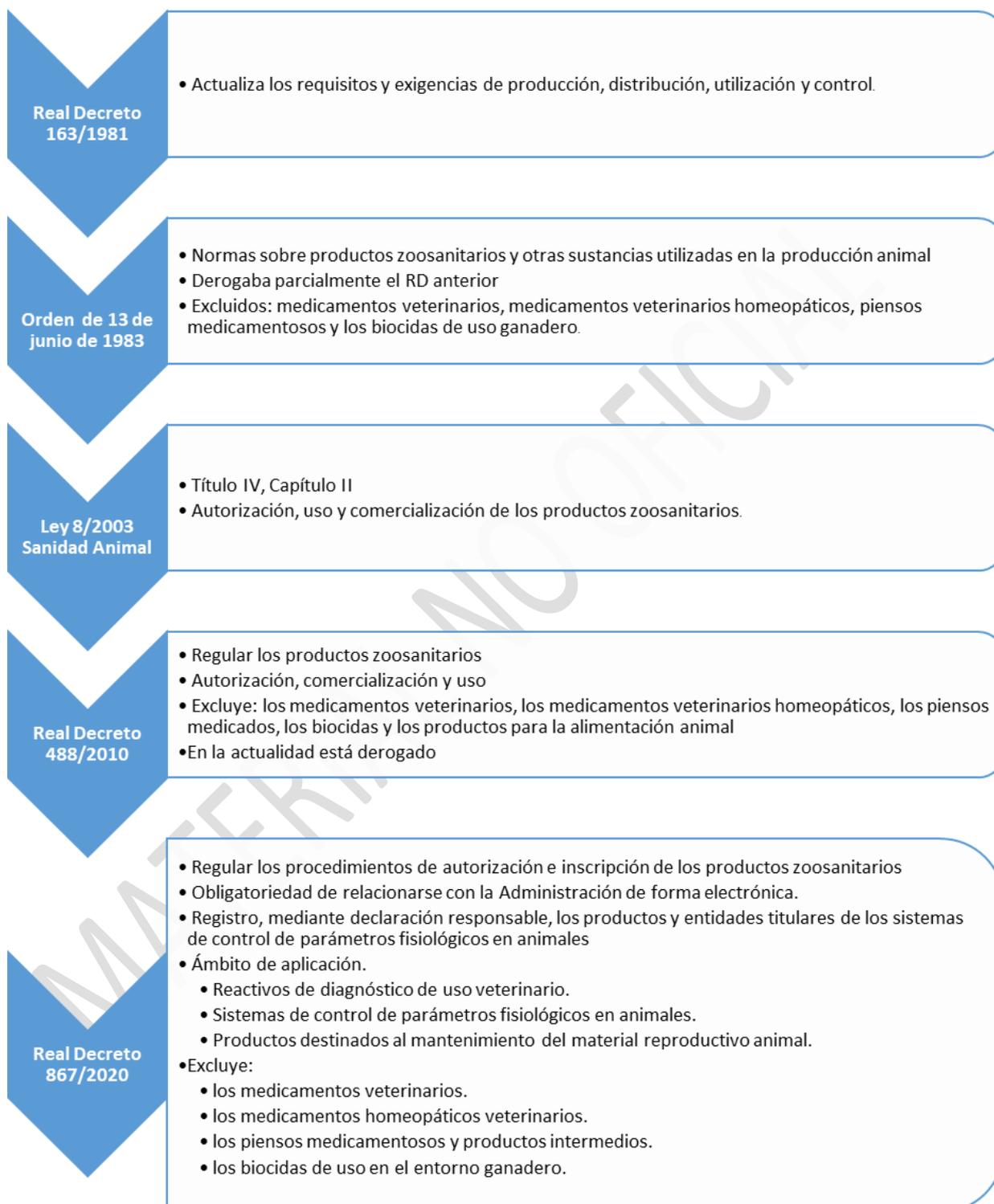
El ámbito de aplicación de este RD es:

- **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 33

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 delección

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. Desarrolló 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 Tuberculosis* 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 |
|----------------------------|--|--|
| Vacunas atenuadas | <ul style="list-style-type: none"> -Estimulación de inmunidad humoral y celular -Infección similar a natural (multiplicación) -Inmunidad duradera y efectiva -Necesidad de pocas inoculaciones y dosis -Coste de producción relativamente bajo -Adyuvantes no tan necesarios | <ul style="list-style-type: none"> -Virulencia residual y reversión a tipo virulento -Diseminación en la población -Enfermedad asociada a la vacuna -Presencia de microorganismos contaminantes -Problemas de almacenamiento |
| Vacunas inactivadas | <ul style="list-style-type: none"> -No virulencia residual -Más seguras -Menos efectos secundarios -Estables en almacenamiento -Coste de producción relativamente bajo | <ul style="list-style-type: none"> -Estimulación de inmunidad humoral, no celular -Menor inmunidad (no hay multiplicación) -Mejor para infecciones sistémicas que en mucosas -Necesidad de inoculaciones repetidas y más dosis -Adyuvantes muy necesarios (reacciones locales y de hipersensibilidad) |

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 delección

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 delección 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 encontrando 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 de 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.

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.

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.

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).

Pruebas de interferencia: debe tenerse en cuenta las posibles interferencias entre dos vacunas distintas del mismo fabricante que se recomiende 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 en 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.

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. María Mercedes Grande Preciados.

https://dehesa.unex.es/bitstream/10662/4432/1/TFGUEx_2016_Grande_Preciado.pdf

MATERIAL PARA LA PREPARACIÓN DEL TEMA 34

**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

3.1. LA COMISIÓN NACIONAL.

3.2. PLAN NACIONAL DE INVESTIGACIÓN DE RESIDUOS (PNIR)

3.3. CLASIFICACIÓN DE LAS SUSTANCIAS OBJETO DE INVESTIGACIÓN

3.4. CONTROLES. DINÁMICA. ESTRATEGIA, FRECUENCIA

3.5. LABORATORIOS OFICIALES

3.6. PROCEDIMIENTO DE ACTUACIÓN ANTE LA APARICIÓN DE RESULTADOS POSITIVOS.

4. METODOS ANALÍTICOS

4.1. CARACTERÍSTICAS DE LOS MÉTODOS DE ANÁLISIS DE RESIDUOS

4.2. MÉTODOS OFICIALES DE ANÁLISIS DE RESIDUOS

4.3. TIPOS DE MÉTODOS DE ANÁLISIS DE RESIDUOS

4.4. CRITERIOS MÍNIMOS DE FUNCIONAMIENTO

4.5. CARACTERÍSTICAS DE FUNCIONAMIENTO DE LOS MÉTODOS DE ANÁLISIS.
VALIDACIÓN.

4.6. CRITERIOS DE FUNCIONAMIENTO DE LOS MÉTODOS DE ANÁLISIS.

4.7. REQUISITOS ESPECÍFICOS DE FUNCIONAMIENTO PARA LA ESPECTROMETRÍA DE
MASAS.

4.8. CONTROL DE CALIDAD DE LOS ENSAYOS.

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.

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 de efectuar la vigilancia y recoger los resultados de los controles y las informaciones que se deben comunicar a la Comisión Europea.

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”.

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. 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 transformación de alimentos animales 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.

En este Tema se describe la estructura del sistema de control de residuos, así como lo concerniente a los métodos de análisis en España. Se indica la legislación aplicable y se describe el órgano encargado de coordinar a las partes intervinientes, así como sus funciones y todo lo concerniente a los controles. Se muestran las normas aplicables específicamente a los métodos de análisis y las características que necesitan ser establecidas para definir un método como apto. Así mismo se resume las características más importantes que debe tener la espectrometría de masas. Finalmente se muestran los procedimientos para el control de calidad en los lotes diarios para garantizar que en el día a día se no presentan desviaciones o errores que permitan dudar de la calidad de los resultados.

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 que se introdujeran en la cadena alimenticia.

La trasposición de la Directiva 96/23 al fuero español a través del Real Decreto 1749/98 aún permanece vigente. En dicho marco legal 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.

3.1. 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.
- ✓ 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.

3.2. PLAN NACIONAL DE INVESTIGACIÓN DE RESIDUOS (PNIR)

El objetivo de este plan 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.

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

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.

3.3. CLASIFICACIÓN DE LAS SUSTANCIAS OBJETO DE INVESTIGACIÓN

En el RD 1749/98 se describen 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 entre los que se encuentran esteroides o β -agonistas, por ejemplo.

B. MEDICAMENTOS VETERINARIOS Y CONTAMINANTES, como las sulfamidas o quinolonas dentro de las sustancias antibacterianas o los antihelmínticos, nitroimidazoles o tranquilizantes...dentro de otros medicamentos veterinarios.

3.4. CONTROLES. DINÁMICA. ESTRATEGIA. FRECUENCIA

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.

La toma de muestras será realizada por la autoridad competente (inspectores) en presencia del responsable o representante de la explotación ganadera investigada. Todo ello se hará levantando el correspondiente acta formalizada de toma de muestra donde se indicarán todos los datos para identificar la muestra inequívocamente. 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 después más detalladamente.

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 %

3.5. LABORATORIOS OFICIALES

Para garantizar unos resultados sólidos y fiables los laboratorios deben estar acreditados para aplicar sus métodos con arreglo a la norma EN ISO/IEC 17025. 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;

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.

3.5.1. 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.

3.5.2. 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. Istituto Superiore di Sanità (ISS) I-00161 Roma, Italia

Sus funciones son:

- a) Fomentar y coordinar la búsqueda de nuevos métodos de análisis
- b) Suministrar a los Laboratorios Nacionales de Referencia detalles sobre los métodos analíticos y los ensayos comparativos
- c) 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.
- d) 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.
- e) Organizar cursos de formación y perfeccionamiento para los expertos de los laboratorios nacionales.
- f) Proporcionar asistencia técnica y científica a la Comisión, incluido el programa de normas, medidas y ensayos comparativos.

3.6. 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 se procederá a la identificación de los animales, y realizar una investigación adicional para determinar la causa de aparición de residuos.

- En el caso de tratamiento ilegal, los animales serán inmovilizados y destinados a sacrificio
- 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. 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.

4. METODOS ANALÍTICOS

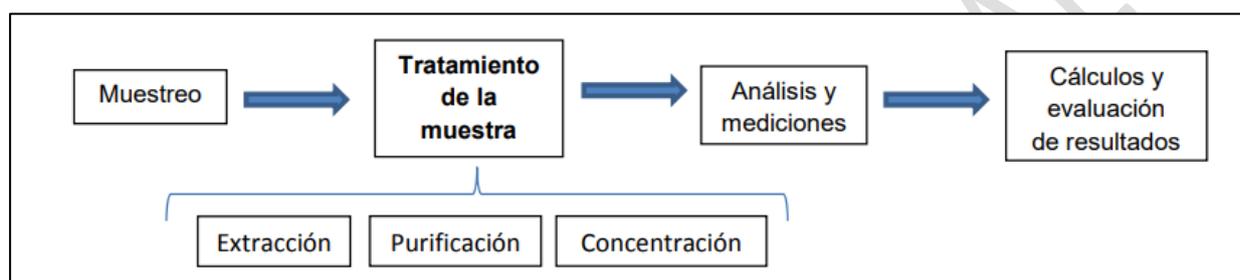
Una técnica analítica es el medio utilizado para llevar a cabo el análisis químico (asociable en ocasiones a un instrumento), mientras que el método analítico es un concepto más amplio pues no sólo incluye a la o las técnicas analíticas empleadas en un análisis sino también todas las operaciones

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.

4.1. CARACTERÍSTICAS DE LOS MÉTODOS DE ANÁLISIS DE RESIDUOS

La gran mayoría de los métodos descritos presenten una sistemática común como se esquematiza en la figura:

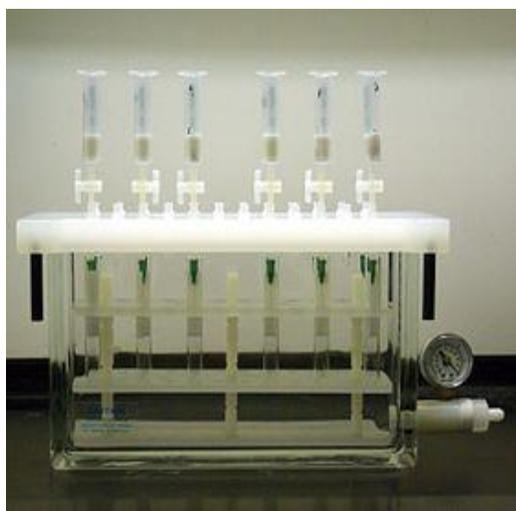
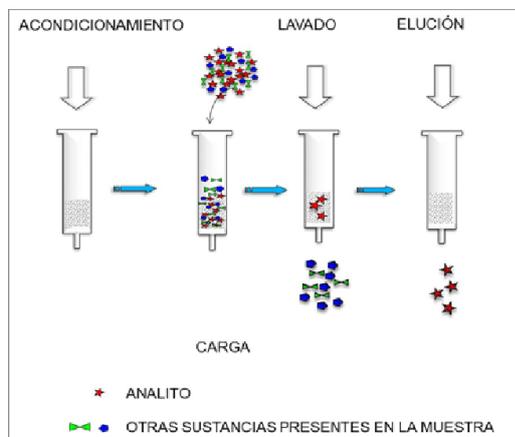


Este tipo de muestras requieren un tratamiento físico-químico exhaustivo que permita por un lado separar los analitos de interés del grueso de la matriz, purificarlos eliminando más sustancias interferentes que pudieran acompañarlos y finalmente, concentrarlos para poder ser “visualizados” por las técnicas analíticas empleadas que ya de por sí deben ser extremadamente sensibles y selectivas. Así pues, la etapa de tratamiento de las muestras 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 a la naturaleza tanto de los analitos a extraer como de la matriz implicada.
2. Una vez separados del grueso de la matriz los analitos deber ser purificados. Es posible utilizar la extracción líquido-líquido (LLE) con distintos tipos de solventes para la purificación de extractos. 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. 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.



Se producen 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.).

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 μ l el factor de concentración será de $10000\mu\text{l}/100\mu\text{l} = 100$.

4.2. MÉTODOS OFICIALES DE ANÁLISIS DE RESIDUOS

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 y distribuidos por los laboratorios de referencia, o desarrollados por los propios laboratorios de control o, incluso métodos publicados en revistas de investigación de prestigio.

El procedimiento de establecimiento de métodos oficiales era largo, tedioso y no permitía dar una respuesta inmediata y rápida a las situaciones de alerta desencadenadas. Las experiencias vividas en materia de crisis alimentarias como las recientemente vividas:

- 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)
- Aceite de colza desnaturalizado España 1981
- Clenbuterol 1990 Asturias hígado ternera

d) Melanina 2008 China en leche

donde en muy breve intervalo de tiempo se requería disponer de resultados que permitieran conocer el problema, socorrer y proteger al ciudadano hizo cambiar la idea del establecimiento de métodos oficiales.

En ausencia de métodos oficiales el rigor y robustez necesarios disponer en lo concerniente a los métodos analíticos se consiguió fundamentándose en cuatro pilares:

1. Se estableció normativamente la obligatoriedad de que los laboratorios dedicados al análisis de residuos estuvieran acreditados por la norma ISO UE-EN17025, etc.
2. La necesidad de validar los métodos de análisis recogidos en el alcance de los laboratorios conforme a unas exigencias mínimas recogidas en dos normas: la Decisión 2002/657 (CE) y posteriormente el Rgto 808/2021 CE.
3. Adicionalmente, estas dos normas dispusieron unas características mínimas de resolución, así como unos criterios de funcionamiento comunes para los métodos analíticos.
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 adecuados de ensayo 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.

Las muestras tomadas y posteriormente empleadas en los análisis se distribuyen 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” por cuenta del responsable de la explotación investigada.
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.

4.3. TIPOS DE MÉTODOS DE ANÁLISIS DE RESIDUOS

Los métodos de análisis se clasifican en:

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.

4.4. 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. Como principio fundamental para el análisis de residuos se exige la validación de los métodos.

4.5. CARACTERÍSTICAS DE FUNCIONAMIENTO DE LOS MÉTODOS DE ANÁLISIS. VALIDACIÓN.

Por lo que respecta a los métodos de análisis se indica que deberán:

- ✓ 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 podrá validar conforme a los criterios establecidos en el Reg. 8080/2021. 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 α : | SI | SI | | | |
| CC β : | | | 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)

4.6. CRITERIOS DE FUNCIONAMIENTO DE LOS MÉTODOS DE ANÁLISIS.

4.6.1. Veracidad

Se establecen los criterios que se aceptarán para la veracidad obtenida durante la validación:

| 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 % |

4.6.2. 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.

4.6.3. Requisitos aplicables a la separación cromatográfica:

Para la cromatografía líquida (LC) o de gases GC), el tiempo de retención mínimo aceptable para los analitos será el doble del tiempo muerto (o tiempo que tarda en salir de la columna un analito “no retenido.”)

El tiempo de retención del analito en el extracto corresponderá al del patrón de calibración, con una tolerancia de $\pm 0,1$ minuto. 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 con una desviación máxima del 0,5 % para la cromatografía de gases y del 1 % para la cromatografía líquida.

4.7. REQUISITOS ESPECÍFICOS DE FUNCIONAMIENTO PARA LA ESPECTROMETRÍA DE MASAS¹

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:

- registro de espectros de masa de barrido completo (FS, *Full Scan*). Esto es registrar el espectro de la sustancia para posteriormente ser comparado con un patrón de la biblioteca espectral disponible.
- registro selectivo de iones (SIM). Registro/adquisición de un único ión (M+)
- técnicas de espectrometría de equipos más modernos (Orbitrap, triples cuadrupolos, etc.) 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.

¹ 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.

Todos los análisis mediante espectrometría de masas deberán combinarse con una técnica de separación (LC o GC).

4.8. CONTROL DE CALIDAD DE LOS ENSAYOS.

Para cada serie (tanda) de análisis realizado, se analizará simultáneamente un conjunto de las siguientes muestras de control de calidad del método:

- a) muestra de control de la adecuación del instrumento que permita verificar el buen estado del equipo. Bien podría ser un patrón en disolución, ST (en ausencia de matriz) que contenga todos los analitos contemplados en el método;
- b) muestra de control de calidad enriquecida en una concentración $MST_{control}$ (próxima al LMR o CM para las sustancias farmacológicamente activas o próxima al VRI o al NMC para las sustancias prohibidas o no autorizadas), esto es muestras de control *no conformes*. Serían estas muestras añadidas al nivel de interés.
- c) muestra de control conforme MBL (muestras en blanco)
- d) blancos de reactivos RBL, 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).

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 |
| Grupo A. ANABOLIZANTES Y SUSTANCIAS NO AUTORIZADAS | 1. Estilbenos | CNA | WAG | G | A | P | | | C | |
| | 2. Antitiroideos | LCSA | WAG | G | A | | | | C | |
| | 3. Esteroides | CNA | WAG | G | A | | | | C | |
| | 4. Lactonas del ác. Resorcílico | CNA | WAG | G | A | | | | C | |
| | 5. β -agonistas | CNA | BVL | G | A | P | | | C | |
| | 6. Sustancias prohibidas (Reg. 2377/90) | CNA/ LCSA | - | G | A | P | L | H | C | |
| Grupo B. MEDICAMENTOS VETERINARIOS Y CONTAMINANTES | 1. Sustancias antibacterianas (incl. sulfamidas y quinolonas) | CNA | ANSES | G | A | P | L | H | C | M |
| | 2. Otros medicamentos veterinarios: | | | | | | | | | |
| | a) Antihelmínticos | LCSA | BVL | G | A | P | L | | C | |
| | b) Anticoccidiales y nitroimidazoles | LCSA | BVL | G | A | | | H | C | |
| | c) Carbamatos y piretroides | LCSA | | G | A | | | | C | M |
| | d) Tranquilizantes | LCSA | WAG | G | | | | | | |
| | e) Antiinflamatorios no esteroideos | LCSA | BVL | G | A | | L | | C | |
| | f) Otras sustancias con actividad | LCSA | BVL | | | | | | | |
| | 3. Contaminantes Ambientales: | | | | | | | | | |
| | a) Compuestos Organoclorados y PCB's | LAA | ISS | G | A | P | L | H | C | M |
| | b) Compuestos Organofosforados | LAA | ISS | G | | | L | | | M |
| | c) Elementos químicos | LAA | ISS | G | A | P | L | | C | M |
| | d) Micotoxinas | LAA | WAG | G | A | P | L | | | |
| e) Colorantes | LAA | ANSES | G | | P | | | | | |
| f) Otros: | LAA | | | | | | | | | |

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/>

MATERIAL PARA LA PREPARACIÓN DEL TEMA 35

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 36

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**
- 5. APLICACIONES EN LABORATORIOS DE SANIDAD Y GENÉTICA ANIMAL**

MATERIAL NO OFICIAL

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.

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. 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.

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**.
- **Polimorfismo.** Debe tratarse de regiones **polimórficas**, pudiendo identificarse al menos dos 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**.

Estas secuencias se encuentran localizadas en el genoma en regiones **no codificantes**, y se encuentran distribuidos a lo largo de todo el genoma.

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**.

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 en cuanto a su análisis:

- 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.
- Puesto que los diferentes alelos se definen por la **longitud de la secuencia, no existen alelos nulos**.
- 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**.

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. 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**

propriadamente dicho como 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 propriadamente dichos.

Para la visualización y análisis de los fragmentos obtenidos, se emplean técnicas para la **separación de los fragmentos**, que permitan su visualización individualizada.

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. 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. Los geles de **poliacrilamida** poseen generalmente mayor capacidad de resolución que los geles de agarosa.

En cualquier caso, la electroforesis **capilar** es la técnica empleada más frecuentemente, ya que permite una **altísima resolución**, pudiendo diferenciar fragmentos con hasta un único nucleótido de diferencia en su longitud.

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.

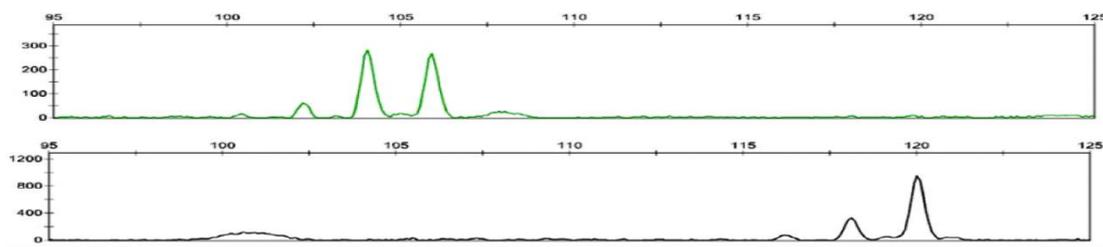
Además, para la interpretación es fundamental **diferenciar los microsatélites de otros picos**, que pueden aparecer en el electroferograma debido a interferencias de la técnica. Para ello, se debe atender a **dos características fundamentales**:

- 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**. 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 NUCLEÓTIPO 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)**.

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).

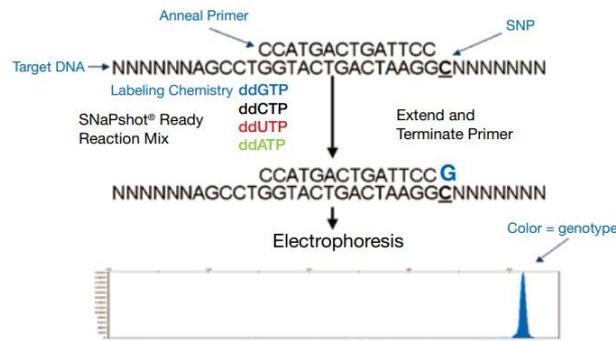
El **haplotipo** es la combinación de los **alelos** de marcadores de tipo SNP presentes en **diferentes loci de un cromosoma** y que por lo tanto están **ligados** y se transmiten de forma conjunta. Dado el número de alelos que conforman el haplotipo, la probabilidad de que dos individuos no relacionados 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 empleada para la detección de SNPs y el análisis de haplotipos, ya que permite la detección simultánea de múltiples SNPs. Consisten en matrices bidimensionales en cuya superficie se encuentran unidas múltiples **sondas**, consistentes en moléculas de ADN que hibridarán con las moléculas problema únicamente en caso de que su secuencia sea complementaria.
- **Secuenciación**. Los métodos de secuenciación más empleados son los métodos de primera generación, fundamentalmente la secuenciación de **Sanger** y la **secuenciación automática**.
- **Primer extension** (también denominada tecnología **SNaPshot o minisequenciación**). 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.



2. Desarrollo de la técnica SNaPshot. Fuente: Applied Biosystems.

- **PCR específica de alelo.** 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. 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.

- Polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción (RFLPs). Son marcadores genéticos determinados por la **presencia o ausencia de sitios de restricción** que actúan como diana de **endonucleasas**. 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.
- 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**. 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**. 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 10pb. 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**.
- 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**. Posteriormente, se acoplan **adaptadores específicos a los extremos de los fragmentos generados**. Estos **adaptadores específicos**, de secuencia

conocida, permitirán llevar a cabo la **amplificación selectiva mediante PCR** empleando cebadores dirigidos a estos.

- Minisatélites. Los minisatélites son **secuencias repetitivas en tándem**, que se diferencian de los microsatélites fundamentalmente en la **longitud de la secuencia de los motivos básicos repetidos**. Así, si en el caso de los microsatélites 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 microsatélites. 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 microsatélites a lo largo del genoma.
- Multiple locus variant analysis (MLVA). El análisis MLVA es 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**. Presentan, de forma general, un **bajo número de alelos** en comparación con los mini y microsatélites. Se debe tener en cuenta que en bacterias existe **un único cromosoma**, por lo que nunca se presentarán dos picos para el mismo marcador.

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.
- Estudio de **genes causantes de enfermedades hereditarias**.
- Determinación del **sexo**, fundamentalmente en **aves**.
- 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.

- **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.

En especies de interés ganadero o económico, 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.

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. 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, que debería encontrarse entre 10^{-5} y 10^{-14} , pudiendo obtener estos valores con un panel de microsatélites que incluya entre 8 y 15 marcadores.

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%.

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**.

BIBLIOGRAFÍA

Marcadores genéticos. Universidad Tecnológica de Pereira (Colombia). [Internet]. Disponible en: <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 37

ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN Y LEGISLACIÓN APLICABLE. PROYECTOS Y PROCEDIMIENTOS. TIPOS DE ANIMALES, INSTALACIONES 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. INTRODUCCIÓN.

2. LEGISLACIÓN APLICABLE.

3. PROYECTOS Y PROCEDIMIENTOS.

4. TIPOS DE ANIMALES.

4.1. CLASIFICACION DE LOS ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN

5. INSTALACIONES.

6. APLICACIONES EN LOS LABORATORIOS DE SANIDAD Y GENÉTICA ANIMAL.

7. BIBLIOGRAFÍA.

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.

Los animales utilizados con fines experimentales están sujetos a una normativa específica, 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 (establecido por Russell y Burch en 1959): Reemplazo, Reducción y Refinamiento. Dicho principio representa el pilar sobre el que se cimienta toda normativa sobre bienestar animal en animales de experimentación.

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. 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 líneas 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.

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.

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 53/2013¹ 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.
- **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.**

¹ 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.

3. PROYECTOS Y PROCEDIMIENTOS

Toda utilización de animales con fines experimentales debe estar incluida dentro de un proyecto de investigación (constituido por uno o varios procedimientos) *evaluado* por un órgano independiente y *autorizado* por el órgano competente de la CCAA.

En la Directiva 2010/63/UE se definen los conceptos de “Procedimiento” y “Proyecto” de la siguiente forma:

Se entiende por “**Procedimiento**” cualquier utilización invasiva o no invasiva de un animal para fines experimentales u otros fines científicos, con resultados predecibles o impredecibles, o para fines educativos, que pueda causarle un nivel de dolor, sufrimiento, angustia o daño duradero, equivalente o superior al causado por la introducción de una aguja conforme a la buena práctica veterinaria.

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.

En cuanto al término de “**Proyecto**” se define como el programa de trabajo con un objetivo científico establecido y en el que se realicen uno o varios procedimientos.

En el Capítulo V del RD 53/2013 se establece todo lo referente a los Procedimientos (Sección 1ª del citado capítulo) y a los Proyectos (Sección 2ª). A continuación, pasaremos a detallar lo establecido en cada una de las dos secciones de este Capítulo V:

SECCIÓN PRIMERA: PROCEDIMIENTOS.

Elección de los métodos.

No se realizará un procedimiento si hay un método alternativo para el mismo fin que no implique la utilización de animales vivos.

Cuando haya varios procedimientos candidatos, se elegirán los que tengan mayor probabilidad de tener resultados satisfactorios y cumplan el mayor número de los siguientes requisitos:

- utilicen el mínimo nº de animales posibles,
- causen el menor dolor, sufrimiento, angustia o daño duradero
- afecte a animales con menor capacidad de sentir dolor, sufrimiento, angustia o daño duradero (no es lo mismo un primate que un pez cebra).

Condiciones generales de los procedimientos.

Los procedimientos deberán estar incluidos dentro del marco de un proyecto autorizado, se evitará a los animales cualquier dolor, sufrimiento, angustia o daño duradero que sean innecesarios, se llevarán a cabo en centros autorizados y por personal capacitado autorizado.

La muerte como criterio de punto final debe evitarse en lo posible, y sustituirse por un criterio de finalización más humanitario.

Las condiciones de utilización de Anestesia y analgesia durante el procedimiento.

Los procedimientos deberán llevarse a cabo con anestesia general o local, salvo que se considere que es inapropiada porque:

- a) Es más traumática para el animal que el procedimiento en sí.
- b) Es incompatible con los fines del procedimiento

Deberán utilizarse analgésicos u otros métodos idóneos para garantizar, en la medida de lo posible, que el dolor, el sufrimiento, la angustia o la lesión sean mínimos.

Clasificación de la severidad de los procedimientos.

Los procedimientos se clasificarán como «sin recuperación», «leves», «moderados» o «severos», no realizándose si implican un nivel severo de dolor, sufrimiento o angustia que con probabilidad vaya a ser duradero y que no pueda ser aliviado.

Fin del procedimiento.

Un veterinario (o en casos justificados otra persona capacitada) decidirá al término del procedimiento, si los animales se mantienen con vida o se sacrifican.

Reutilización de animales en procedimientos.

1. Un animal que ya haya sido utilizado en uno o varios procedimientos, no deberá ser reutilizado en un nuevo procedimiento cuando en su lugar pudiera ser utilizado otro animal con el que no se haya realizado previamente ningún procedimiento, a menos que se den las condiciones siguientes:

- a) Que la severidad real de los procedimientos anteriores haya sido clasificada como «leve» o «moderada».
- b) Que se haya demostrado la recuperación total del estado de salud general y de bienestar del animal.
- c) Que el nuevo procedimiento se haya clasificado como leve, moderado o sin recuperación.
- d) Que cuente con asesoramiento veterinario favorable, realizado teniendo en cuenta las experiencias del animal a lo largo de toda su vida.

2. El órgano competente, en circunstancias excepcionales y previo examen veterinario, podrá autorizar la reutilización de un animal aunque no se cumpla lo dispuesto en la letra a) del apartado 1. Dicho animal no podrá haber sido utilizado más de una vez en un procedimiento que le haya provocado angustia y dolor severos o un sufrimiento equivalente.

Puesta en libertad y realojamiento de animales.

El órgano competente podrá autorizar que un animal pueda ser dado en adopción, realojado o devuelto a un hábitat, explotación u otro medio que sea adecuado para la especie de que se trate. Para ello deberán cumplirse las siguientes condiciones:

- a) Que su estado de salud lo permita.
- b) Que no suponga un peligro para la salud pública, la sanidad animal ni el medio ambiente.
- c) Que se hayan tomado las medidas adecuadas para salvaguardar el bienestar del animal.
- d) Que en el caso de realojamiento o adopción, los criadores, suministradores y usuarios tengan un programa adecuado que garantice su socialización.
- e) Que en el caso de liberación de animales silvestres en su hábitat, se disponga de un programa de adaptación adecuado.

SECCIÓN SEGUNDA: PROYECTOS.

Tipos de proyectos.

Los proyectos se pueden clasificar en tres tipos:

1. Proyectos de tipo I: son aquellos procedimientos clasificados como «sin recuperación», «leves» o «moderados», que no utilicen primates y que se realizan para cumplir requisitos legales o reglamentarios, o con fines de producción o diagnóstico por métodos establecidos.

Dichos proyectos podrán ser tramitados por un procedimiento simplificado y no ser sometidos a evaluación retrospectiva.

2. Proyectos tipo II: procedimientos clasificados como «sin recuperación», «leves» o «moderados» y que no utilicen primates.

Son proyectos sujetos al procedimiento de autorización y podrán no ser sometidos a evaluación retrospectiva.

3. Proyectos de tipo III: son los proyectos diferentes de los tipos I o II. Sin perjuicio de las autorizaciones adicionales a las que puedan estar condicionados determinados proyectos, todos los proyectos tipo III quedarán sujetos al procedimiento de autorización y serán sometidos posteriormente a una evaluación retrospectiva.

Condiciones generales de los proyectos.

Todos los proyectos tendrán una persona física que será responsable de su ejecución general, y en particular, garantizará que se detenga cualquier procedimiento en el que se esté infringiendo dolor, sufrimiento angustia o daño duradero innecesario a un animal

No se podrá realizar ningún proyecto que no haya sido previamente evaluado con resultados favorables por el órgano habilitado.

Cualquier cambio del proyecto que pueda tener un impacto negativo en el bienestar de los animales implicará una nueva evaluación y, cuando proceda, autorización del proyecto.

Solicitud y autorización de proyectos.

Una vez diseñado (teniendo en cuenta siempre el Principio de las 3Rs), estandarizado y redactado el proyecto de experimentación animal, el Comité Ético de Experimentación Animal (CEEA) del centro deberá evaluarlo y realizar un informe sobre el mismo, determinando si lo considera favorable o desfavorable.

Obtenido el informe favorable por parte del CEEA del centro, éste se enviará junto con la memoria del proyecto y los informes no técnicos (en los proyectos tipo II y III) a uno de los Órganos Habilitados (libremente elegido por el solicitante) designados por los Órganos competentes.

Tras el informe favorable del Órgano Habilitado (OH), el usuario o la persona responsable del proyecto, o el OH a instancias de éste, deberá presentar al órgano competente (en la CCAA de donde se localiza el centro):

1. la propuesta o memoria del proyecto,
2. el informe favorable del comité ético de experimentación animal del centro,
3. copia de la solicitud de evaluación del proyecto, y al menos la información correspondiente de entre la que se relaciona en el anexo X del RD 53/2013,
4. En el caso de los proyectos de tipo II y III, se aportará también el resumen no técnico.
5. El informe de evaluación favorable del OH.

El plazo máximo para resolver y notificar la correspondiente resolución será de 40 días hábiles.

Las autorizaciones de proyectos se concederán por un período máximo de cinco años.

En la autorización del proyecto se especificará, al menos:

- a) El usuario que llevará a cabo el proyecto.
- b) El responsable del proyecto.
- c) El establecimiento.
- d) La necesidad, en su caso, de realizar una evaluación retrospectiva y, en tal caso, el plazo para su presentación.

El órgano competente podrá suspender la autorización de un proyecto si éste no se lleva a cabo de acuerdo con la autorización, y retirarla, previo expediente tramitado con audiencia del interesado.

Evaluación de proyectos.

La evaluación del proyecto se realizará por el órgano habilitado, con un nivel de detalle apropiado al tipo de proyecto, y consistirá en verificar que el proyecto cumple una serie de requisitos:

- a) Está justificado desde el punto de vista científico o educativo, o debe realizarse por imposición legal o reglamentaria;
- b) su finalidad justifica la utilización de animales;
- c) está diseñado de manera que los procedimientos se realicen de la forma más humanitaria y respetuosa con el medio ambiente que sea posible.

La evaluación del proyecto incluirá:

- a) Una evaluación de su finalidad, de los beneficios científicos que se prevén alcanzar o de su valor docente;
- b) una evaluación de su conformidad con los requisitos de reemplazo, reducción y refinamiento;
- c) una evaluación y clasificación de sus procedimientos en función del grado de severidad;
- d) una determinación en cuanto a si el proyecto debe evaluarse de forma retrospectiva y, en su caso, cuándo debería realizarse.

La evaluación del proyecto deberá ser transparente, imparcial, pudiendo integrar la opinión de partes independientes.

La Evaluación retrospectiva

Se realizará básicamente en los proyectos severos, en algunos tipo II moderados y en los que se utilicen primates.

Finalmente, se establecen las condiciones de publicación de los **Resúmenes no técnicos de los proyectos** por los órganos competentes.

Dichos resúmenes, que serán presentados por los responsables de los proyectos, incluirán, al menos, lo siguiente:

- a) Información sobre los objetivos del proyecto, incluidos los perjuicios y los beneficios previstos, así como el número y tipo de animales que van a utilizarse;
- b) La demostración del cumplimiento del requisito de reemplazo, reducción y refinamiento.

4. 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.

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 53/2013, 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 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.

4.1. 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.
- **Consanguíneas:** son líneas genéticamente estandarizadas, caracterizadas por ser genéticamente idénticos entre sí, con características propias a esta línea que las diferencian de otras, uniformidad fenotípica y estabilidad genotípica a largo plazo.
- **Híbridos F1:** obtenido por el cruce de dos líneas consanguíneas.
- **Coisogénicas:** son líneas genéticamente idénticas pero difieren en un locus, normalmente debido a una mutación. Ej. ratones nude.
- **Congénicas:** 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.

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.
- 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.
- 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. 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.

5. INSTALACIONES.

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
- Los establecimientos o centros deben cumplir lo establecido en el Anexo II.

En la Sección A del Anexo II del RD53/2013 , 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.

3.2 Alojamiento y enriquecimiento.

a) 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.

b) 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.

3.3 Zonas de descanso.

a) 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.

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 reciente serían las vacunas 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.

BIBLIOGRAFIA

J. Martín Zúñiga. J.M^a 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.

MATERIAL NO OFICIAL

MATERIAL PARA LA PREPARACIÓN DEL TEMA 38

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 LABORATORIO

- 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

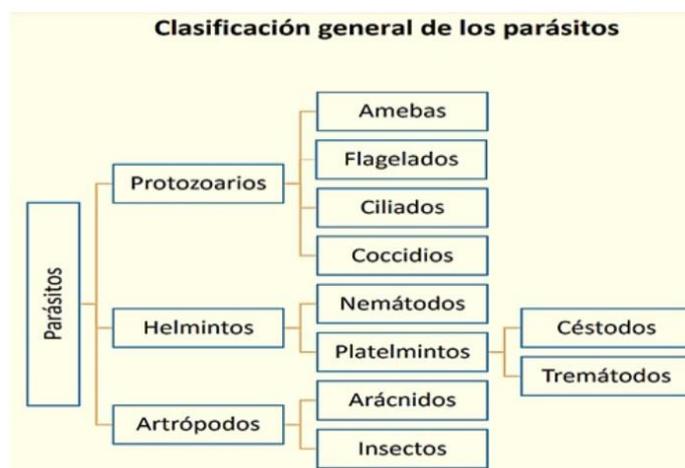
1. INTRODUCCIÓN: CONCEPTO DE ZONOSIS PARASITARIAS

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.¹



2. MARCO LEGAL

¹ Fuente imagen: <https://corporacionbiologica.info/microbiologia/atlas-de-parasitologia/>

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 (lamblisis), 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 obligatoria².

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

²Desde 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 LABORATORIO

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 enzimoinmunoanálisis, 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

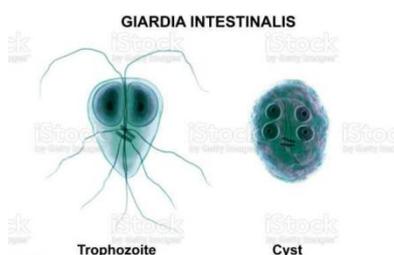
| Método | Propósito | | | | | |
|--|---|---|--|--------------------------|--|---|
| | Demostrar ausencia de infección en la población | Demostrar ausencia de infección en animales individuales antes de los desplazamientos | Contribuir a las políticas de erradicación | Confirmar casos clínicos | Determinar la prevalencia de la infección – vigilancia | Determinar el estado inmunitario en animales o poblaciones tras la vacunación |
| Identificación del agente¹ | | | | | | |
| Microscopía convencional | - | - | - | +++ | ++ | - |
| FAT | - | - | - | +++ | ++ | - |
| Detección de antígeno por IC | - | - | - | + | + | - |
| Detección de antígeno por ELISA | - | - | - | +++ | +++ | - |
| PCR | - | - | - | +++ | +++ | - |
| Detección de respuesta inmunitaria | | | | | | |
| 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



³La 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

³ 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

Assay⁴, que presente sensibilidad y especificidad muy altas. Según un estudio comparativo⁵, 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) Inmunocromatografía⁶: 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.

⁴ <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/R2458496>

⁵ Comparación de técnicas de laboratorio para el diagnóstico de *Giardia intestinalis*. Calchi L. C. Marinella^{1*}, Acurero E.¹, Villalobos R.², Colina M.³, Di Toro L.³, Villalobos C³

⁶ <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 intermediario 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 personas lo comportan principalmente *T. Spiralis* y, en menor grado, *T. britovi*, *T. Nelsoni*, *T. Pseudospiralis*, *T. Papuae* y *T. Zimbabweensis*, 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 un **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 × 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 Triquinosis) 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 triquinosis 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 de 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 equinococosis, o enfermedad hidática, es una infección provocada por cestodos del género *Echinococcus*, unos gusanos de pocos milímetros de longitud.

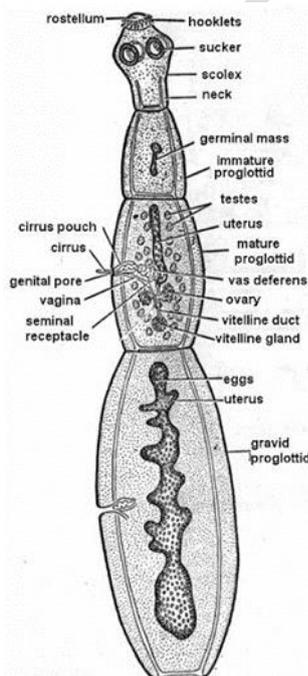
Hasta hace poco se aceptaba que en este género había cinco especies morfológicamente bien diferenciadas: *E. granulosus*, *E. multilocularis*, *E. oligarthra*, *E. vogeli* y *E. shiquicus*, pero actualmente *Echinococcus granulosus* está reconocida como conjunto de especies crípticas, que difieren considerablemente 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 latinoamericanas 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 larvianas quísticas, que pueden encontrarse en casi todos los órganos, pero particularmente en hígado y pulmones. Habitualmente estas **formas larvianas** 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°C (temperatura interna central) durante 48 horas o a -70°C durante 4 días o por calentamiento a 70°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 los 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 pueden 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 pre-mortem 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 multispecie. 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 podrían 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 cisticerco 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 las 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 enzoinmunoanálisis 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 anisakirosis 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 anisakirosis 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 animales⁷.

⁷ "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>

<http://www.facmed.unam.mx/deptos/microbiologia/parasitologia/trichinelosis.html>.

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/>

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:

<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

MATERIAL PARA LA PREPARACIÓN DEL TEMA 39

**ZOONOSIS 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. INTRODUCCIÓN

2. ZONOSIS BACTERIANAS OBJETO DE CONTROL EN LA UE: MARCO LEGAL

3. BRUCELOSIS

3.1. DIAGNÓSTICO DE LABORATORIO

3.1.1. Identificación del agente

3.1.2. Diagnóstico serológico

4. SALMONELOSIS

4.1. DIAGNÓSTICO DE LABORATORIO

4.1.1. Identificación del agente

4.1.2. Diagnóstico serológico

5. CAMPILOBACTERIOSIS

5.1. DIAGNÓSTICO DE LABORATORIO

5.1.1. Identificación del agente

6. LISTERIOSIS

6.1. DIAGNÓSTICO DE LABORATORIO

6.1.1. Identificación del agente

7. TUBERCULOSIS

7.1. DIAGNÓSTICO DE LABORATORIO

7.1.1. Pruebas en el animal vivo

7.1.2. Pruebas post-mortem

8. ESCHERICHIA COLI VEROTOXIGÉNICA

8.1. DIAGNÓSTICO DE LABORATORIO

8.1.1. Identificación del agente

9. BORRELIOSIS

9.1. DIAGNÓSTICO DE LABORATORIO

9.1.1. Identificación del agente

9.1.2. Diagnóstico serológico

10. BOTULISMO

10.1. DIAGNÓSTICO DE LABORATORIO

10.1.1. Identificación del agente/toxina

10.1.2. Diagnóstico serológico

11. LEPTOSPIROSIS

11.1. DIAGNÓSTICO DE LABORATORIO

11.1.1. Identificación del agente

11.1.2. Diagnóstico serológico

12. PSITACOSIS

12.1. DIAGNÓSTICO DE LABORATORIO

12.1.1. Identificación del agente

12.1.2. Diagnóstico serológico

13. VIBRIOSIS

13.1. DIAGNÓSTICO DE LABORATORIO

13.1.1. Identificación del agente

14. YERSINIOSIS

14.1. DIAGNÓSTICO DE LABORATORIO

14.1.1. Identificación del agente

15. CARBUNCO

15.1. DIAGNÓSTICO DE LABORATORIO

15.1.1. Identificación del agente

16. FIEBRE Q

16.1. DIAGNÓSTICO DE LABORATORIO

16.1.1. Identificación del agente

16.1.2. Diagnóstico serológico

17. MUERMO

17.1. DIAGNÓSTICO DE LABORATORIO

17.1.1. Identificación del agente

17.1.2. Diagnóstico serológico

1. INTRODUCCIÓN.

El término zoonosis hace referencia a aquellas enfermedades que pueden transmitirse de animales al hombre y viceversa. 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.

Los mecanismos de transmisión son muy variados y en ocasiones complejos. En función de éstos, se pueden agrupar en:

- **Zoonosis no alimentarias:** patologías transmitidas de un animal al hombre, con o sin vector y para las cuales la transmisión no es estricta o esencialmente alimentaria.
 - Por contacto con el animal
 - Transmitidas a través de vectores, como mosquitos o garrapatas.
- **Zoonosis alimentarias:** aquellas cuya vía de transmisión es esencial o fundamentalmente alimentaria, es decir asociada al consumo de alimentos:

En los últimos años, se ha asistido a un incremento del número de casos asociados a 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. Por otro lado, hay múltiples factores que se pueden asociar al aumento de la importancia de las zoonosis, entre los que podemos destacar los siguientes:

- La intensificación de las producciones, asociada a un aumento en el número de animales que actúan como portadores intestinales de agentes zoonóticos.
- Los nuevos hábitos alimentarios humanos: comidas colectivas y rápidas, etc.
- El desarrollo de nuevas tecnologías para el almacenamiento y conservación de alimentos, que en ocasiones determinan una mayor predisposición a la multiplicación de determinados agentes microbianos, por ejemplo, las Listerias en alimentos envasados al vacío.
- El contacto de la fauna salvaje con la fauna doméstica y el traslado de patógenos desde los reservorios salvajes a los domésticos y, desde éstos, al hombre.
- La aparición y difusión de resistencias a los antibióticos.
- La presencia de grupos de riesgo más susceptibles, como ancianos, niños, personas inmunodeprimidas.

Se estima que 6 de cada 10 enfermedades infecciosas conocidas en el ser humano pueden tener su origen en los animales. Además, 3 de cada 4 enfermedades infecciosas nuevas o emergentes en las personas provienen de los animales.

En función a la naturaleza del agente causal, las zoonosis se pueden clasificar en zoonosis bacterianas, víricas o parasitarias. Las primeras son las que se tratarán en este tema.

2. ZONOSIS BACTERIANAS OBJETO DE CONTROL EN LA UE: MARCO LEGAL

La alta incidencia que pueden presentar ciertas zoonosis, así como su importante repercusión sanitaria, económica o social, justifican la necesidad de establecer herramientas normativas que permitan realizar una permanente vigilancia epidemiológica, así como adoptar medidas para impedir su presentación o difusión.

A nivel nacional la Ley 8/2003 de Sanidad Animal establece que las Administraciones públicas deben adoptar programas y actuaciones necesarias en materia de Sanidad Animal, implicando a los particulares y con una serie de obligaciones y responsabilidades.

A nivel europeo y en materia específica frente a zoonosis, surge la Directiva 2003/99/CE sobre la vigilancia de las zoonosis y los agentes zoonóticos y que modifica a otros textos anteriores. Esta directiva tiene el objetivo de mejorar los sistemas de vigilancia y recopilación de datos establecidos anteriormente. A través de esta norma se establecen ciertas obligaciones para los EEMM:

- Implementación de programas nacionales de vigilancia de las zoonosis y los agentes zoonóticos y de programas nacionales de vigilancia de las resistencias a los antimicrobianos relacionadas con dicho agentes/zoonosis.
- Investigación epidemiológica de los brotes de las enfermedades transmitidas por alimentos.
- Intercambio de información con la Comisión y los EEMM, sobre las zoonosis y los agentes zoonóticos, instaurando los mecanismos para la recogida, análisis y publicación de las fuentes y las tendencias de las zoonosis y 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.

La trasposición de esta Directiva a nuestro ordenamiento jurídico se realizó a través de Real Decreto 1940/2004 sobre la vigilancia de las zoonosis y los agentes zoonóticos, en cuyo anexo I se clasifican las zoonosis en dos apartados:

- A. Zoonosis y agentes zoonóticos que deben ser objeto de vigilancia. En este apartado se incluyen las siguientes zoonosis bacterianas:
 - Brucelosis y sus agentes causales.
 - Salmonelosis y sus agentes causales.
 - Campilobacteriosis y sus agentes causales.
 - Listeriosis y sus agentes causales.
 - Tuberculosis por *Mycobacterium bovis*.
 - *Escherichia coli* productora de verotoxina.

B. Zoonosis y agentes zoonóticos que deben ser objeto de vigilancia en función de la situación epidemiológica. En este apartado se incluyen las siguientes 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.
- Otras zoonosis y agentes zoonóticos

Con la entrada en vigor del Reglamento (UE) 429/2016, 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»), se pretende realizar una gestión más integral de las enfermedades de los animales. Este Reglamento se desarrolla a través de un amplio abanico de Reglamentos Delegados y de Ejecución.

En este sentido, el Reglamento de Ejecución (UE) 2018/1882 de la Comisión, establece un listado de enfermedades categorizadas para las que se deberán adoptar determinadas normas de prevención y control, estableciendo una relación de especies y grupos de especies animales que suponen un riesgo considerable para la propagación de dichas enfermedades. Algunas de ellas son consideradas además zoonosis (Brucelosis, Tuberculosis, Carbunco, Fiebre Q, Muermo, Clamidiosis aviar).

Por último, el Reglamento (UE) 2017/625 sobre control y otras actividades oficiales se aplica con el fin de comprobar el cumplimiento de legislación de la Unión en diferentes ámbitos, entre los que se encuentran los requisitos en materia de sanidad animal.

3. BRUCELOSIS

Brucelosis es la denominación genérica de las infecciones, animales o humanas, causadas por cualquier especie del género *Brucella*, un cocobacilo gramnegativo (Stamp positivo), intracelular facultativo de la familia *Brucellaceae*. En el ganado bovino, la infección por *Brucella* suele deberse a *B. abortus*, menos frecuentemente a *B. melitensis* y en ocasiones a *B. suis*. *B. melitensis* es el principal agente causal de la infección por *Brucella* en ovejas y cabras. La infección por *Brucella* en cerdos se debe a las biovariedades 1-3 de *B. suis*, pero la enfermedad causada por la biovariedad 2 difiere en cuanto a gama de hospedadores, a la distribución geográfica, que es limitada, y a la patogenicidad.

Estas tres especies de *Brucella* son muy patógenas en el ser humano, en el que causa un proceso febril (fiebre ondulante) que puede avanzar a una forma más crónica y también producir complicaciones graves que afecten a los sistemas musculoesquelético y cardiovascular y al sistema nervioso central.

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, con excreción de los microorganismos en las secreciones uterinas y en la leche.

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 nódulos linfáticos de la cabeza, el bazo y los órganos asociados a la reproducción (útero, epidídimo y testículos), así como de lesiones artríticas.

3.1. DIAGNÓSTICO DE LABORATORIO

3.1.1. Identificación del agente

Para el diagnóstico de la brucelosis animal mediante cultivo, la elección de las muestras en general depende de los signos clínicos observados. Las muestras más adecuadas son secreciones vaginales (hisopos), fetos abortados (contenido gástrico, bazo y pulmones), membranas fetales, leche, semen y líquidos de las artritis o de los higromas. Los tejidos preferidos para cultivo de las canales animales son nódulos linfáticos de la cabeza, mamarios y genitales, bazo, útero inmediatamente antes o después del parto, y las ubres

El aislamiento y cultivo directo de *Brucella* suelen realizarse en un medio sólido. Como medios basales se destaca el medio para *Brucella* y el agar triptosa (o tripticasa)-soja (TSA). Todos los medios basales indicados anteriormente se pueden utilizar para la preparación de medios selectivos, añadiendo los antibióticos apropiados para evitar el crecimiento de microorganismos distintos a *Brucella*. Los medios selectivos más empleados son el Farrell y el Thayer Martin modificados, aunque en los últimos años ha surgido el medio CITA como una alternativa intermedia entre ambos. Tanto a los medios basales como a los selectivos es necesario añadir un 2–5% de suero bovino o equino ya que algunas cepas de *B. abortus* necesitan de su presencia para el crecimiento.

Suele aparecer crecimiento pasados 3 a 4 días, pero los cultivos no deben considerarse negativos hasta que hayan pasado 7 a 10 días.

La identificación de *Brucella* se puede realizar mediante una combinación de las siguientes pruebas: morfología celular mediante la tinción de Gram o de Stamp, observación directa de la morfología de las colonias, propiedades de crecimiento, pruebas de ureasa y oxidasa, y la prueba de la aglutinación en porta con un suero policlonal anti-*Brucella*. La identificación de especies y de biovariedades requiere pruebas adicionales, como la lisis por fagos, la aglutinación con sueros monoespecíficos anti-A, anti-M o anti-R, el requerimiento de CO₂ para crecer, la producción de H₂S y el crecimiento en presencia de fucsina básica y tionina.

La PCR, incluido el formato en tiempo real, constituye otro medio de detección e identificación de *Brucella* spp. a partir del cultivo aislado. Para poner de manifiesto el agente en diversas muestras biológicas, también se pueden utilizar métodos directos basados en sondas de ADN o la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), pero por el momento, la sensibilidad y la especificidad de estos sistemas siguen siendo menores que las de la bacteriología clásica.

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* y algunas de sus biovariedades.

La primera prueba de PCR múltiple específica de especie para la diferenciación de *Brucella* fue denominada PCR AMOS, se basaba en el polimorfismo resultante de la localización, específica de especie, de la secuencia de inserción IS711 en el cromosoma de *Brucella*, sin embargo, esta PCR no era capaz de detectar algunas biovariedades de *B. abortus* y *B. suis*. La prueba de PCR múltiple (Bruce-ladder) permitió identificar y diferenciar en un solo paso la mayoría de las especies de *Brucella*, así como las cepas vacunales *B. abortus* S19, *B. abortus* RB51 y *B. melitensis* Rev.1. Además, Bruce-ladder también permite detectar ADN de *B. neotomae*, *B. pinnipedialis* y *B. ceti* y las biovariedades de *B. abortus* y *B. suis* que no era capaz de detectar la PCR AMOS.

Otros métodos pueden añadir información epidemiológica útil, como utilización de análisis de repeticiones en tándem de un número variable de locus múltiples (MLVA). 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.

3.1.2. Diagnóstico serológico

Existe un gran abanico de pruebas serológicas para el diagnóstico de Brucelosis: prueba de la seroaglutinación (SAT), prueba de la fijación del complemento (CFT), enzoinmunoanálisis (ELISA), prueba de polarización de la fluorescencia (FPA), prueba con rosa de bengala (RBT), prueba de aglutinación en placa con antígeno tamponado (BPAT), pruebas en leche, etc.

No existe ninguna prueba serológica que sea adecuada en todas las situaciones epidemiológicas ni en todas las especies animales; todas tienen limitaciones, sobre todo cuando se trata de detectar la enfermedad en animales aislados.

Las pruebas del Rosa de Bengala y Fijación de Complemento se han utilizado en las campañas de erradicación establecidas por el MAPA en los últimos años. La primera es una prueba sencilla y es muy sensible. Sin embargo, a veces puede originar reacciones serológicas positivas falsas. Por lo tanto, las reacciones positivas deben confirmarse. Para ello, se utiliza la Prueba de Fijación de Complemento, que es una técnica cuantitativa, que permite evaluar el título de anticuerpos que tiene el animal, Sin embargo, es difícil de ejecutar y requiere unas buenas instalaciones y una formación específica del personal para titular y conservar los reactivos adecuadamente.

4. SALMONELOSIS

El género *Salmonella* es un género bacteriano de la familia *Enterobacteriaceae* constituido por bacilos gramnegativos, móviles, con flagelos peritricos (excepto *S. Gallinarum* y *S. Pullorum*, agentes causales de la Tifosis aviar y la Pullorosis, que son inmóviles). 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. 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*.

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. 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.

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. 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.

La salmonelosis está presente a nivel mundial, aunque es más frecuente en aquellas zonas donde se practica la ganadería intensiva. 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.

El contagio se produce de forma horizontal, vía fecal-oral. 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. La presencia de vectores, tales como roedores o insectos, juega un papel muy importante.

4.1. DIAGNÓSTICO DE LABORATORIO

4.1.1. Identificación del agente

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. Existen muchos métodos para aislar y detectar *Salmonella* que se utilizan a nivel internacional. 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.

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.*

Por norma general, se utilizan medios de pre-enriquecimiento como paso previo para facilitar el aislamiento (agua de peptona tamponada). Los medios de enriquecimiento selectivos son medios de agar líquidos o semisólidos que contienen aditivos que permiten el crecimiento selectivo de las salmonelas a la vez que inhiben el crecimiento de otras bacterias. Algunos ejemplos son el tetracionato, 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). Los medios selectivos en placa 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. Algunos ejemplos son el MSRVS semisólido modificado y el DIASALM, el agar xilosa-lisina-dexosicolato (XLD), el agar desoxicolato/citrato (DCA), el agar verde brillante (BGA) o el agar sulfito de bismuto (BS), el agar Rambach y el SMID.

La identificación del serotipo se realiza mediante aglutinación directa en porta o por aglutinación en tubo utilizando antiseros específicos utilizando las fórmulas antigénicas del esquema de White-Kauffmann–LeMinor. El método MALDI-TOF MS también resulta aceptable para la identificación de *Salmonella*.

Existen métodos alternativos para la identificación de *Salmonella*. Estos incluyen la separación inmunomagnética (IMS), PCR en tiempo real y cuantitativa, los ensayos de inmunoenzimología (ELISA), la PCR con sondas génicas o el análisis por microchip.

4.1.2. Diagnóstico serológico

Los métodos serológicos deben utilizarse para identificar poblaciones infectadas más que para identificar animales específicos infectados. La mayoría se basa en la aglutinación, como la prueba en sangre total, la prueba rápida de aglutinación en porta o la prueba de aglutinación sérica. 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.

5. CAMPILOBACTERIOSIS

Campylobacter es un género de bacterias perteneciente a la familia *Campylobacteraceae*. Las especies de este género son bacilos gramnegativo con forma de coma y móviles por la presencia de uno o dos flagelos polares.

La campilobacteriosis es una zoonosis de distribución mundial causada por bacterias del género *Campylobacter*. Esta bacteria es la causa más frecuente de gastroenteritis en el mundo desarrollado. Dentro del género *Campylobacter* existen varias especies de interés para la

salud pública y animal. *Campylobacter jejuni* y *C. coli* pueden colonizar el tracto intestinal de la mayoría de los mamíferos y aves.

La campilobacteriosis se caracteriza por 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.

Los reservorios son principalmente aves de corral y el ganado porcino y vacuno. 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.

5.1. DIAGNÓSTICO DE LABORATORIO

5.1.1. Identificación del agente

No existen pruebas serológicas de uso rutinario para la detección de la colonización de ganado por *C. jejuni*/*C. coli*, así que el diagnóstico se basa en el aislamiento e identificación del agente.

Las muestras de elección para el aislamiento son heces, frotis rectales y contenidos del ciego. Se utilizan medios selectivos como el agar modificado con carbón vegetal, cefoperazona y deoxicolate (mCCDA), aunque existen muchos medios selectivos. Entre los medios selectivos, se diferencian los que contienen sangre y los que contienen carbón. Se puede evitar el uso de medios selectivos a través de la técnica de filtración pasiva.

Tras la incubación a 37°C-42°C en atmósfera microaerobia, la identificación de colonias sospechosas se realiza mediante la morfología de las colonias, que será diferente en función del tipo de medio (con sangre o con carbón), examen microscópico de la morfología y la movilidad (bacilos finos en espiral o curvados que se mueven), pruebas de oxidasa (positiva), prueba de aglutinación en látex, prueba de hidrólisis de hipurato (para diferenciar *C. jejuni* de otras especies), hidrólisis de acetato de indoxil (*C. jejuni* y *C. coli* son positivas).

Sin embargo, la especificación bioquímica puede completarse o incluso sustituirse por métodos moleculares. Se han descritos PCR para la detección de *Campylobacter* en muestras de heces de los animales y en muestras de carne enriquecida.

6. LISTERIOSIS

La causa de la listeriosis suele ser la infección por *Listeria monocytogenes*, un bacilo grampositivo de la familia *Listeriaceae*. Este microorganismo es un patógeno intracelular facultativo. Existen 13 serovariedades de *L. monocytogenes*. Aunque todas éstas son consideradas potencialmente virulentas, las serovariedades 4b, 1/2b, y 1/2a causan la mayoría de las enfermedades en humanos y animales. *L. monocytogenes* está diseminada por todo el mundo y se encuentra ampliamente distribuida en el medio ambiente.

Los reservorios de la infección son el suelo y el tracto intestinal de los animales asintomáticos, entre ellos los mamíferos silvestres, las aves, los peces y los crustáceos. Los animales infectados pueden excretar *L. monocytogenes* en las heces, la leche y las descargas uterinas. La contaminación fecal o del suelo causa su presencia en las plantas y el forraje.

La enfermedad clínica se da especialmente en los rumiantes, con casos esporádicos y ocasionales en otras especies. Los principales signos clínicos de la listeriosis animal son la encefalitis, la septicemia y el aborto, y a menudo se relaciona con forrajes almacenados, normalmente ensilados. Puede darse lo que se denomina “enfermedad de los círculos” por una tendencia de los animales a desplazarse en círculos en un único sentido. Este es el signo más frecuente de la enfermedad en los rumiantes.

Como zoonosis, es una de las enfermedades más importantes transmitida por los alimentos. Los signos clínicos de la enfermedad en el ser humano comprenden la septicemia, la meningitis (o meningoencefalitis) y la encefalitis. En las mujeres gestantes, las infecciones intrauterinas o del cuello del útero pueden provocar abortos espontáneos o nacidos muertos, y pueden ir precedidas de signos gripales, como la fiebre. También pueden aparecer signos gastrointestinales acompañados de fiebre.

6.1. DIAGNÓSTICO DE LABORATORIO

6.1.1. Identificación del agente

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, por lo que el diagnóstico se enfoca en la identificación del agente.

Existen multitud de métodos aceptados con fines de regulación internacional (EN ISO, FDA, USDA y AOAC) que deben utilizarse según su ámbito de aplicación, pero cubren una gran variedad de matrices alimentarias.

En el caso de la listeriosis animal, las muestras deben escogerse de acuerdo a 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, pene 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.

El método ISO 11290 Parte 1, que cubre todas las muestras de la cadena alimentaria y la producción primaria, utiliza un enriquecimiento en caldo Fraser y posteriormente la siembra en agar sólido selectivo para *Listeria*. Las colonias sospechosas se subcultivan en un medio no selectivo y se confirman mediante las pruebas morfológicas, fisiológicas y bioquímicas apropiadas descritas en la norma. Algunos de los medios selectivos para *Listeria* son medios cromógenos, de manera que permiten diferenciar *L. monocytogenes* de otras especies de *Listeria*.

La identificación por métodos tradicionales se puede sustituir por métodos rápidos de identificación, que incluyen pruebas comerciales convencionales y no convencionales y kits de

análisis del ácido nucleico para facilitar la identificación de *L. monocytogenes*. Entre los métodos rápidos destacan la PCR dirigida al gen *hly* o el MALDI-TOF MS.

Listeria monocytogenes puede subtipificarse mediante varias estrategias, como la serotipificación, la fagotipificación, el análisis del ADN mediante enzimas de restricción (empleando enzimas con alta frecuencia de corte y electroforesis en gel convencional o utilizando enzimas con baja frecuencia de corte y electroforesis en gel de campo pulsado [PFGE] para separar los fragmentos), la tipificación basada en la secuencia de los ácidos nucleicos y el análisis mediante chips de ADN.

7. TUBERCULOSIS

Hoy en día se considera que la Tuberculosis (TB) es la infección por cualquiera de las especies de micobacterias del complejo *Mycobacterium tuberculosis* (CMTB), prestando especial interés a las especies *M.bovis*, *M.caprae* y *M.tuberculosis*.

En el mundo animal son numerosas y muy diferentes las especies de animales, tanto domésticos como silvestres que son sensibles al CMTB, siendo diversos los taxones de mamíferos que son susceptibles a la infección.

El ser humano puede verse afectado por *M. bovis* considerándose 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.

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, 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.

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 nódulos linfáticos y tos, en concreto en los casos de tuberculosis avanzada.

Las lesiones características del cuadro tuberculoso son granulomas o tubérculos de color blanquecino a amarillento y de consistencia caseosa, caseosa-calcárea o calcificada, recordando al queso, abarcando desde lesiones milimétricas en un solo nódulo linfático hasta grandes lesiones diseminadas por todo el organismo.

7.1. DIAGNÓSTICO DE LABORATORIO

7.1.1. Pruebas en el animal vivo

La Prueba de Intradermorreacción (IDTB) es la técnica oficial por antonomasia empleada para el diagnóstico de la TB. Se basa 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.

Consiste en la inoculación intradérmica en el tercio anterior del cuello del animal de un antígeno que consiste en 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. Existen dos variantes de la técnica: la IDTB simple (IDTBs) y la comparada o de comparación (IDTBc). La interpretación se basa en la observación de signos clínicos y en los aumentos del espesor del pliegue cutáneo registrados en los animales que estuvieran previamente sensibilizados por motivo de una infección.

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.

Otra prueba basada en la inmunidad celular es la Prueba de gamma-interferón (IFN- γ), en la que una muestra de sangre completa heparinizada se estimula con antígenos de micobacterias (en la prueba oficial del programa de erradicación de TB bovina serán PPD bovina y aviar) y se incuba a 37°C durante 18-24 h. 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 y como respuesta producirán una cantidad significativa de IFN- γ que será detectado y cuantificado a partir del plasma sobrenadante a través de una técnica inmunoenzimática ELISA (ELISA de captura comercial).

Por otro lado, 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- γ). El ELISA indirecto es la técnica serodiagnóstica más ampliamente utilizada para detectar anticuerpos circulantes frente al MTBC.

7.1.2. Pruebas post mortem

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. 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.

2) estudio histopatológico al microscopio: los cortes histológicos, se tiñen con la tinción Hematoxilina-Eosina. 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.

3) identificación de la presencia de micobacterias o de sus antígenos: mediante tinciones especiales como la tinción de Ziehl-Neelsen o mediante técnicas de inmunohistoquímica. 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, 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).

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.

Las muestras (al igual que para el diagnóstico anatomopatológico) se toman tanto de los linfonodos como de los órganos parenquimatosos afectados. Cuando el animal no presente lesiones patológicas se debe recoger para su examen diferentes linfocentros, incluyendo de la cabeza, cavidad torácica y cavidad abdominal.

Las muestras se someten a un proceso de descontaminación y neutralización y se siembran en medios de cultivo apropiados, tanto líquidos como sólidos. 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.

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.

Entre las técnicas de detección de ADN, la técnica más empleada es la PCR. Actualmente, el uso de la PCR directamente sobre tejidos en el diagnóstico de la TB se utiliza como complemento a la microbiología. 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 multicopia (1->25) en el genoma de los miembros del complejo, lo que incrementa la sensibilidad de la prueba. La identificación de los aislamientos se realiza mediante la amplificación de secuencias específicas que permiten la diferenciación del CMTB y de las especies dentro del complejo. 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).

8. ESCHERICHIA COLI VEROTOXIGÉNICA (VTEC)

Escherichia coli es un bacilo gramnegativo de la familia *Enterobacteriaceae*. La mayoría de las *E. coli* son comensales normales que se encuentran en el tracto gastrointestinal de los animales y de los humanos. Algunas cepas se han llegado a adaptar para producir diarrea y varias enfermedades intestinales adicionales.

Escherichia coli se caracteriza rutinariamente por la identificación serológica de los antígenos O somáticos, H flagelares y K capsulares. Algunos serotipos se correlacionan completamente con algunos síndromes clínicos. Algunas cepas diarreicas de *E. coli* producen toxinas que tienen un efecto citopático irreversible sobre las células Vero cultivadas (VTEC). Existen más de 100 serotipos distintos de VTEC. *Escherichia coli* O157:H7 es el serotipo predominante y más virulento de la VTEC, designado *E. coli* enterohemorrágico (EHEC). Esta designación se basa en su capacidad para producir colitis hemorrágica y el síndrome de uremia hemolítica en humanos, en su habilidad para producir verotoxinas (VT), para causar daños en células epiteliales, y en que tiene un gran plásmido característico. Otros serotipos no-O157, incluyendo O26:H11, O104:H21, O111: H- y O145: H-, se han asociado con brotes de la enfermedad en humanos, y otros más con casos esporádicos.

Los rumiantes son el principal hospedador natural de VTEC y son, por lo general, portadores sanos de los microorganismos. VTEC también se ha aislado de cerdos, gatos, perros, pollos y aves salvajes. A pesar de su patogenicidad para los humanos, la infección de animales con *E. coli* O157:H7 es invariablemente asintomática.

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. VTEC se transmiten también a través del agua contaminada y por contacto directo con personas o con animales infectados.

8.1 DIAGNÓSTICO DE LABORATORIO

8.1.1 Identificación del agente

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. Sin embargo, las pruebas serológicas no se utilizan para el diagnóstico de la infección animal con VTEC. Existen reacciones cruzadas entre LPS O157 y los antígenos de LPS de otras bacterias incluyendo *E. coli* O55, *Salmonella* spp., *Yersinia enterocolitica*, *Brucella abortus* y cepas de *V. cholerae*.

Por tanto, el diagnóstico de laboratorio se basa en la identificación del agente. Las muestras se pueden tomar del recto o de heces recién evacuadas en la granja o de contenidos

intestinales después del sacrificio. Existe una variedad de VTEC presente en animales sanos y no todas son patógenas. Los animales infectados pueden excretar la bacteria de forma intermitente y en pequeñas cantidades, actuando como portadores.

En cuanto al aislamiento, el enriquecimiento (caldos de cultivo con o sin antibióticos) de medios líquidos mejora la recuperación de microorganismos de la muestra. La separación inmunomagnética es una técnica de concentración selectiva para mejorar el aislamiento de *E. coli* O157:H7.

Se puede realizar un cultivo selectivo de *E. coli* O157:H7 en agar MacConkey con 1% de D-sorbitol en el que, aprovechando la característica de ser incapaz de fermentar el D-sorbitol, las colonias se verán blanco-grisáceas, diferenciándose de aquellas cepas que sí lo fermentan. Por otro lado, la falta de actividad beta-glucuronidasa también se puede explotar con el uso de medios que contengan glucurónidos cromogénicos o fluorogénicos, de manera que las colonias de *E. coli* O157:H7 que carecen de esta capacidad se verán blancas.

En cuanto al aislamiento de otras VTEC no-O157, crecen bien en medios que permiten el crecimiento en general de *E. coli*, como agar sangre o agar MacConkey, y la mayoría solo se puede diferenciar de otras *E. coli* por su capacidad para producir TV. El gran número de serotipos diferentes de VTEC impide el uso de antisueros O para la detección rutinaria y la identificación presuntiva de colonias en estos medios. La separación inmunomagnética también puede ser utilizada para la concentración selectiva de los serogrupos O26, O103, O111 y O145. Actualmente se encuentran disponibles perlas producidas comercialmente ya que estos serogrupos son los VTEC no-O157 más comúnmente asociados con enfermedades humanas.

Por tanto, una vez aisladas, deben confirmarse las colonias sospechosas de *E. coli*. El perfil antigénico de los antígenos "O" somáticos y los "H" flagelares se identifican serológicamente, para lo cual existen kits comerciales de látex para O157, O26, O91, O103, O111, O128, O145 y H7. El diagnóstico, además, debe incluir la demostración de los factores de virulencia conocidos. Estos incluyen las verotoxinas VT1 (Stx1) y VT2 (Stx2) y sus genes, además de la intimina, que es la proteína anclada en la membrana exterior, relacionada con las lesiones de los enterocitos, codificada por el gen *eae*. La producción de verotoxinas se puede demostrar mediante un método estándar en la línea celular Vero.

Existen métodos para la subtipificación de *E. coli* O157 con el objetivo de realizar estudios epidemiológicos, basados en la tipificación por fagos, RFLP, ribotyping, electroforesis en campo pulsado u otros análisis basados en PCR.

Existen métodos rápidos de detección de VTEC que no requieren del cultivo y están basados en métodos inmunológicos y de hibridación de ácidos nucleicos, aunque puede ser necesario un paso previo de enriquecimiento para mejorar la sensibilidad de dichas técnicas.

9. BORRELIOSIS

La enfermedad de Lyme (borreliosis) es una enfermedad infecciosa causada por la bacteria (espiroqueta) *Borrelia burgdorferi*, que puede ser transmitida a las personas por medio de las picaduras de garrapata. 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.

Es una enfermedad de distribución mundial, aunque la mayor parte de los casos humanos se ha descrito en el hemisferio norte. La enfermedad está condicionada a la presencia de su vector principal. La mayor parte de los casos humanos se manifiestan a mediados o finales de verano, debido a que las garrapatas son especialmente activas.

La enfermedad de Lyme tiene un curso lento y se desarrolla en tres estadios. Uno de los síntomas típicos, que se manifiesta poco después de la infección, es el enrojecimiento en la zona de la picadura denominado eritema crónico migratorio (ECM). A medida que avanza la enfermedad, puede afectar a diversos tejidos y órganos (por ejemplo, articulaciones, nervios, meninges, corazón, ojos o la piel). La enfermedad atraviesa distintos estadios, que se prolongan en ocasiones a lo largo de meses o incluso años.

En las áreas endémicas y zonas cercanas, varias especies de animales domésticos (perros, caballos y bovinos) están infectados por *B. burgdorferi*. El síntoma predominante en el perro es una cojera debida a artritis en diferentes articulaciones, que puede ser migratoria. Las artralgiás se acompañan muchas veces de fiebre, anorexia, fatiga y linfadenitis. La artritis generalmente es temporal, pero puede volverse crónica. En los equinos infectados se han observado diferentes síntomas como artritis, encefalitis, uveítis, dermatitis y edema de los miembros, así como la muerte de potrillos asociada con la infección natural de yeguas preñadas. En los bovinos también se asocia la infección por *B. burgdorferi* con la presencia de cojera. Respecto a los animales silvestres, es posible que transcurra de forma asintomática.

9.1. DIAGNÓSTICO DE LABORATORIO

9.1.1. Identificación del agente

Se basa en la visualización del microorganismo o su aislamiento. Para la realización de ambos se puede partir de sangre, muestras cutáneas (tomadas preferentemente de la periferia de la lesión del eritema), líquido cefalorraquídeo (LCR), sinovial o incluso orina. Si el cultivo no puede realizarse de forma inmediata, se recomienda transportar la muestra en caldo infusión corazón o tioglicolato.

El medio más utilizado es el de Barbour-Stoenner-Kelley (BSK-I). Posteriormente, al mismo medio se le suprimió la glutamina (BSK-II) y, posteriormente, se ha apostó por el BSK-H, idéntico al anterior pero sin gelatina. Además, todos deben contener L-cisteína, dilitotritol y antimicrobianos. En teoría, la utilización de medios de cultivo es el procedimiento ideal para confirmar el diagnóstico etiológico, pero su complejidad, lentitud de crecimiento (3-4

semanas y, a veces, meses) y bajos índices de recuperación hacen que no se lleve a cabo de forma habitual.

El diagnóstico debe sustentarse en un ambiente epidemiológico adecuado (zonas en las que exista el artrópodo vector) y el antecedente de picadura de garrapata o su posibilidad.

La visualización directa presenta dificultades, ya que *B. burgdorferi* se observa muy difícilmente en tejidos (debido al pequeño número de microorganismos), así como en LCR o muestras sinoviales. Se puede realizar con preparaciones no teñidas, en fondo oscuro, o teñidas, con tinciones fluorescentes (con anticuerpos monoclonales o con naranja de acridina) y no fluorescentes (impregnación con plata). Estas tinciones también son válidas para confirmar el crecimiento en cultivo.

Al considerarse *B. burgdorferi* un microorganismo fastidioso, las técnicas de biología molecular basadas en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y secuenciación se han incorporado a la rutina diagnóstica de la EL en muchos hospitales, si bien no están estandarizadas. Como dianas de la PCR se utilizan diferentes fragmentos de genes de *Borrelia spp.* (*ospA*, *ospB*, *flaB*, *p66*, *rrs* o el espacio intergénico ARNr 5S/23S, entre otros).

9.1.2. Diagnóstico serológico

Los métodos más utilizados son la inmunofluorescencia indirecta (IFI), el ELISA indirecto o de captura y el Western-Blot o Immunoblot.

La Inmunofluorescencia indirecta es difícil de estandarizar. Se observan títulos elevados de anticuerpos en estadios tardíos de la enfermedad, especialmente cuando la manifestación que se presenta es el eritema crónico migratorio (ECM). El ELISA (indirecto o de captura IgM) tiene la ventaja de su automatización y una mejor estandarización. El Western-blot se utiliza para la confirmación de las pruebas de IFI y ELISA en base a que permite conocer frente a qué antígenos ocurre la síntesis de anticuerpos.

10. BOTULISMO

El botulismo es una enfermedad grave pero infrecuente. Está causada por toxinas producidas habitualmente por *Clostridium botulinum*. Existen tres formas clínicas de botulismo: la forma clásica o botulismo transmitido por alimentos, el botulismo intestinal, causado por la colonización intestinal del aparato digestivo, normalmente en los lactantes, y el botulismo por heridas. La neurotoxina botulínica produce una parálisis flácida por la acción de en la unión neuromuscular. En el cuadro clásico de botulismo se desarrolla de forma aguda una neuropatía craneal bilateral asociada a una parálisis (o debilidad) simétrica descendente. En el botulismo transmitido por alimentos, aunque el paciente puede presentar síntomas gastrointestinales como náuseas, vómitos o diarrea, los síntomas iniciales son una marcada astenia, debilidad y vértigo seguidos de visión borrosa, boca seca, disfagia y disartria como consecuencia de la afectación por la toxina de los pares craneales. Esta enfermedad al estar causada por las toxinas (no por la bacteria) no se produce fiebre.

El *C. botulinum* es un anaerobio obligado que produce esporas termorresistentes ampliamente difundidas en el medio ambiente, que en ausencia de oxígeno germinan, crecen y excretan toxinas. Se conocen siete tipos antigénicos 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.

Los brotes en bovinos suelen asociarse con la deficiencia de fósforo y con la consecuente osteofagia y hábito compulsivo de ingerir restos de cadáveres (“pica”) que contienen toxinas botulínicas. El síntoma principal es la parálisis parcial o completa de los músculos de la locomoción, masticación y deglución. Los animales tienen dificultad para desplazarse, permanecen mucho tiempo inmóviles o en decúbito y al progresar la enfermedad no pueden mantener la cabeza levantada y doblan el cuello sobre el flanco. La tasa de letalidad es alta. En los ovinos el botulismo está asociado con deficiencia proteínica y de hidratos de carbono, lo que induce a los animales a comer canales de pequeños animales que encuentran en el pastoreo. En los equinos, como en los demás mamíferos, el período de incubación es muy variable, según la dosis de toxina ingerida. En los casos sobreagudos, la muerte puede sobrevenir en un día o dos. Cuando el curso es más lento, la enfermedad se inicia generalmente con parálisis del tren posterior y avanza a otras regiones, hasta producir la muerte por paro respiratorio. En potrillos jóvenes se ha descrito una toxiinfección botulínica similar al botulismo infantil y al botulismo por heridas.

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. 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 mal esterilizados o preservados.

10.1. DIAGNÓSTICO DE LABORATORIO

10.1.1. Identificación del agente/toxina

En el diagnóstico de laboratorio, la prueba más concluyente es la presencia de la toxina botulínica en el suero, las heces o los alimentos. Para detectar la toxina se lleva a cabo la inoculación de suero sospechoso o de un extracto filtrado del alimento sospechoso en animales de experimentación (ratones) que desarrollarán una sintomatología paralítica, seguida de muerte, si se les inoculó toxina botulínica. 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.

Además, puede investigarse la presencia de toxina tras el cultivo en medios adecuados (Caldo entriquecido Tarozzi), a través de un filtrado del cultivo. El cultivo se obtiene a partir del

alimento involucrado y de muestras de materia fecal o vómito. Cuando se sospecha que el origen de la intoxicación es una herida, se aspira el fluido de esta y se efectúan biopsias para realizar el examen bacteriológico. A partir del medio enriquecido se realiza una siembra en agar yema de huevo para obtener colonias aisladas (a 35°C, en anaerobiosis y durante 48 horas). A partir de las colonias lipasa positivas se realizarán los ensayos de identificación, de toxicidad y neutralización.

Se ha elaborado una prueba ELISA para la detección de toxina A y B en muestras de heces de niños, que puede ser útil como un ensayo tamiz en especímenes clínicos.

10.1.2. Diagnóstico serológico

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 (DL₅₀), se mezcla con varias diluciones 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).

Esta prueba es laboriosa, costosa y de larga duración, por lo que se han buscado alternativas basadas en métodos de enzimoanálisis (ELISA) utilizando microplacas recubiertas de toxina botulínica.

La detección de anticuerpos antitoxina botulínica tiene interés en 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, en pacientes con sospecha de botulismo infantil o botulismo del adulto en los que no se haya podido encontrar la bacteria *C. botulinum* o su toxina en heces, ni la toxina en suero y en individuos vacunados en los que interese comprobar el estado de protección.

11. LEPTOSPIROSIS

La leptospirosis es una enfermedad transmisible de los animales y del hombre producida por la infección por la espiroqueta *Leptospira*.

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. Serológicamente, hay más de 300 serovares leptospirales distintos reconocidos y estos están organizados en 30 serogrupos.

Teóricamente, cualquier *Leptospira* puede infectar a cualquier especie animal, pero afortunadamente, solo una pequeña cantidad de serotipos serán endémicos en cualquier zona o país. Cada serotipo tiende a mantenerse en hospedadores específicos. Por lo tanto, en

cualquier región una especie animal doméstica resultará infectada por serotipos propios de esa especie o por serotipos mantenidos en otras especies animales presentes en la zona.

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 oftalmia periódica en los caballos. La localización y la persistencia de leptospiras en el riñón y en el tracto genital de los machos y las hembras son dos secuelas microbiológicas crónicas importantes de la infección por leptospiras que presentan problemas de diagnóstico concretos. Los animales infectados crónicamente pueden ser portadores durante toda la vida y servir de reservorios de la infección para otros animales y para los humanos.

11.1. DIAGNÓSTICO DE LABORATORIO

11.1.1. Identificación del agente

La demostración de la presencia de leptospiras en la sangre y la leche de los animales que muestran signos clínicos que sugieren leptospirosis aguda tiene un valor diagnóstico. Sin embargo, el aislamiento a partir de la sangre no es siempre satisfactorio, porque la bacteriemia es pasajera y no siempre se acompaña de síntomas clínicos. También tiene valor diagnóstico la detección de una infección generalizada por *Leptospira* en una serie de órganos tomados en la necropsia, como el hígado, el pulmón, el cerebro y el riñón y en líquidos cerebroespinal, torácico y peritoneal. La demostración de la presencia de leptospiras en el tracto genital, los riñones o la orina solo debe interpretarse considerando en conjunto los síntomas clínicos y los resultados serológicos, ya que puede que estos hallazgos solo indiquen que el animal era portador. El tratamiento previo con antibióticos aumenta la probabilidad de fracaso en el aislamiento.

El cultivo debe realizarse en un medio líquido o semisólido con BSA o bien con Tween 80 o una combinación de Tween 80 y Tween 40, incubado a una temperatura de $29 \pm 1^\circ\text{C}$ 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. La contaminación se puede controlar añadiendo una serie de agentes selectivos. Sin embargo, se puede reducir las posibilidades de aislamiento cuando solo haya un número pequeño de leptospiras viables, y algunas cepas de leptospiras no crecerán en los medios selectivos que contengan múltiples antibióticos. Los cultivos deben examinarse con un microscopio de campo oscuro cada 1–2 semanas.

La presencia de leptospiras se puede poner de manifiesto también mediante una serie de técnicas de tinción inmunológicas, por ejemplo, la inmunofluorescencia y diversas técnicas inmunohistoquímicas. 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.

Las pruebas basadas en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se emplean cada vez más para detectar leptospiras en tejidos y líquidos corporales de animales debido a la sensibilidad percibida y a la capacidad de dar un diagnóstico temprano. Las pruebas se clasifican en dos posibles grupos en función de si se detectan los genes que están siempre presentes en la bacterias, como *gryB*, *rrs* (gen del ARNr de la subunidad 16S) y *secY*, o genes restringidos a especies patógenas de *Leptospira*, como *lipL21*, *lipL32*, *lipL41*, *ligA* y *ligB*, aunque los que se indican más a menudo son los que se basan en el gen *lipL32*.

Para realizar una identificación completa, debe utilizarse una combinación de procedimientos que determinen si la cepa es un patógeno o un saprofito, la especie de *Leptospira* a la que pertenece la cepa y el serogrupo y el serotipo de la cepa.

11.1.2. Diagnóstico serológico

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.

La prueba de aglutinación microscópica (MAT), en la que se emplean antígenos vivos, es la prueba serológica más ampliamente utilizada. Se puede mejorar la sensibilidad de la prueba utilizando aislamientos locales en vez de cepas de referencia, pero las cepas de referencia ayudan en la interpretación de los resultados entre los laboratorios. La especificidad de la MAT es buena; normalmente los anticuerpos frente a otras bacterias no dan reacción cruzada con *Leptospira* de manera significativa. Sin embargo, existen reacciones serológicas cruzadas significativas entre serotipos y serogrupos de *Leptospira*.

Los ELISA para la detección de anticuerpos antileptospira 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 recientemente, pruebas en las que se utilizan OMP recombinantes.

12. PSITACOSIS

También llamada Clamidiosis aviar u ornitosis. Está causada por la bacteria *Chlamydophila psittaci*, una bacteria gramnegativa intracelular estricta de la familia *Chlamydiaceae*. *C.psittaci* puede dividirse en serotipos/serovares o, alternativamente, en genotipos, diferenciándose nueve genotipos distintos en base al gen *ompA* que codifica la principal proteína de la membrana externa (MOMP). Siete de estas “serovariedades clásicas” se considera que tienen lugar principalmente en un orden o clase específicos de aves y dos en hospedadores no aviares. Las cepas que producen enfermedad grave en una especie aviar pueden ser levemente virulentas o asintomáticas en otras.

Los signos clínicos son generalmente inespecíficos y varían mucho en lo referente a la gravedad, dependiendo de la especie y la edad del ave y la virulencia de la cepa de *Chlamydia*,

pero la dificultad respiratoria es el signo más habitual. Muchas aves, especialmente aves psitácidas y aves de corral más viejas, pueden no mostrar signos clínicos; sin embargo, a menudo pueden excretar el agente durante largos períodos de tiempo.

Los humanos pueden infectarse con cualquiera de los genotipos. En los seres humanos, los síntomas son fiebre, dolor de cabeza, escalofríos y en algunos casos, neumonía.

12.1. DIAGNÓSTICO DE LABORATORIO

12.1.1. Identificación del agente

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. Sin embargo, ninguna de estas tinciones detecta específicamente las clamidias. Por lo tanto, el uso de una tinción citológica está perdiendo popularidad.

Para el aislamiento de *C. psittaci*, los cultivos celulares son el método más cómodo. 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. Las células se cultivan como monocapas usando medios de cultivo tisular estándar que contengan un 5–10% de suero fetal bovino y antibióticos no inhibidores de clamidias. Se pueden emplear varios métodos de tinción para demostrar las inclusiones de las clamidias en las células. El método preferido es la inmunofluorescencia directa. Para el aislamiento primario de clamidias todavía se utilizan los embriones de pollo. Las infecciones por clamidias producen una congestión vascular típica de las membranas del saco vitelino. Los sacos se recogen y se homogeneizan para hacer una suspensión e identificar el antígeno por varios métodos (tinción directa, pruebas serológicas, inmunofluorescencia tras pase por cultivo celular).

La detección de antígenos se puede llevar a cabo mediante técnicas inmunohistoquímicas, para detectar clamidias en preparaciones citológicas o histológicas. La detección de antígeno puede llevarse a cabo utilizando anticuerpos anti-*Chlamydia* comerciales dirigidos contra LPS o MOMP. Otra alternativa para la detección de antígenos es el ELISA. En humana existen kits que detectan el antígeno del lipopolisacárido (LPS) (antígeno de grupo) y detectan todas las especies de *Chlamydiaceae*. En algunos kits elaborados más recientemente, se evitan reacciones cruzadas con otras bacterias gramnegativas mediante el uso de anticuerpos monoclonales.

Sin embargo, los métodos de elección para la identificación del agente son las pruebas de amplificación de ácido nucleico. Las muestras que se han de recoger dependen de los signos de la enfermedad. En los casos agudos, las muestras deben incluir exudados inflamatorios o fibrinosos del interior y la periferia de los órganos que presenten lesiones, secreciones oculares y nasales, frotis por impronta de hígado, sangre completa, y muestras de tejido de riñón, pulmón, pericardio, bazo e hígado. En los casos con diarrea, debe utilizarse el contenido del colon o las heces. En las aves vivas, las mejores muestras son los hisopos faríngeos y

nasales. También deben tomarse muestras de heces, hisopos de la cloaca, raspado conjuntival y exudado peritoneal.

Estas técnicas incluyen la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) convencional y en tiempo real, que tienen por objetivo los genes *ompA* o el del ARNr 16S–23S. La detección basada en microchips de ADN es una potente herramienta que se basa en la amplificación, mediante PCR, del gen *rARN 23S* y la posterior identificación de *C. psittaci* y los otros agentes aviares *C. avium* y *C. gallinacea* mediante hibridación con sondas específicas de especie.

12.1.2. Diagnóstico serológico

En la mayoría de las especies de aves, existe una alta tasa de antecedentes de anticuerpos anti-clamidia. Por lo tanto, para determinar si un ave en concreto está infectada, la serología debe usarse siempre junto con la detección del antígeno o del ADN. Una prueba positiva es evidencia de que el ave ha sido infectada por la bacteria, pero no necesariamente indica una infección activa.

La prueba de la aglutinación de los corpúsculos elementales (EBA) detecta principalmente anticuerpos IgM y, por lo tanto, puede detectar infecciones tempranas.

La fijación de complemento directa detecta IgG aviar pero no IgM, por lo que las infecciones recientes pueden pasar desapercibidas. Para la Clamidiosis aviar, se utiliza una prueba modificada que difiere de la directa en que a la dilución de complemento se añade suero normal no calentado de pollo sin anticuerpo contra las clamidias. El suero normal incrementa la sensibilidad, de modo que puede usarse para analizar sueros de especies aviares cuyos anticuerpos normalmente no fijan complemento de cobaya.

La CF está siendo reemplazada cada vez más por ELISA altamente sensibles y específicos basados en el uso de proteínas recombinantes o antígenos peptídicos. Los ELISA pueden detectar IgM, IgG e IgA aviares siempre que se use el conjugado correcto específico del isotipo.

Otras pruebas son la prueba de inmunodifusión en medio sólido, la prueba de aglutinación con látex (LA) y la prueba de micro-inmunofluorescencia (MIFT).

13. VIBRIOSIS

Los vibrios son bacterias Gram negativas, pertenecientes a la familia *Vibrionaceae*. La infección con especies patógenas de esta familia puede causar dos categorías de infección: el cólera y la vibriosis. El cólera está causada por la especie *V.cholerae* y no es objeto de este tema.

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 superior al 1%. De este modo, los vibrios halófilos son habitantes naturales de la flora marina y se encuentran con frecuencia en el marisco, como en camarones silvestres y de cultivo. La mayoría son patógenos

oportunistas y producen enfermedad sólo cuando el sistema inmune de los animales se deprime por alguna causa.

Los humanos son propensos a padecer trastornos gastrointestinales a causa de especies de vibrios potencialmente patógenas. Por lo general, *V. parahaemolyticus*, *V. mimicus*, y *V. cholerae* causan brotes de diarrea de origen alimentario que suelen involucrar a alimentos de origen marino mal cocidos. El *V. alginolyticus* y el *V. vulnificus* pueden causar infecciones graves de las heridas, sin producir enteritis. El *V. vulnificus*, cuando es ingerido por un paciente inmunocomprometido, puede producir septicemia, causando shock, lesiones ampollares en la piel, y a menudo manifestaciones de coagulación intravascular diseminada.

13.1. DIAGNÓSTICO DE LABORATORIO

13.1.1. Identificación del agente

El diagnóstico está basado en el aislamiento e identificación de las especies halófilas del género *Vibrio* a partir de agua o de animales infectados. El medio de cultivo ideal para vibrios se llama TCBS (Tiosulfato Citrato Bilis Sacarosa), el cual permite diferenciar la especie que fermenta la sacarosa (amarilla) de la que no posee esta capacidad (verde). También se utiliza ChromAgar® para diferenciación colorimétrica de algunas especies de *Vibrio*, como una forma preliminar de identificación (se deben confirmar género y especie mediante pruebas bioquímicas o con identificación molecular).

Para la detección de bacterias extracelulares tipo *Vibrio*, existen pruebas moleculares como la PCR y la Hibridación in situ. Aunque existen primers para PCR específicos para algunas cepas bacterianas de vibrios, la aplicación más frecuente de esta técnica se basa en el uso de primers universales para bacterias, y posterior secuenciación del producto amplificado. Este proceso permite obtener la identificación molecular a nivel de género y especie. La técnica de hibridación in situ suele utilizarse con sondas genéticas para bacterias y se realiza sobre cortes histológicos sin teñir, en los cuales se quiere confirmar o descartar la presencia de bacterias en los tejidos.

También se ha descrito el diagnóstico histopatológico a partir de láminas histológicas preparadas a partir de larvas, postlarvas, juveniles, preadultos o adultos.

14. YERSINIOSIS

El género *Yersinia*, compuesto por cocobacilos gramnegativos, pertenece a la familia *Enterobacteriaceae* e 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*.

Yersiniosis es la infección causada por yersinias enteropatógenas: *Y. enterocolitica* y *Y. pseudotuberculosis*.

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).

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").

Son varios los genes que codifican para los factores de virulencia y se ubican tanto a nivel cromosómico como plasmídico.

Los principales síndromes clínicos asociados a estos microorganismos son enterocolitis, adenitis mesentérica, ileitis terminal, septicemia y varias enfermedades inmunorreactivas, especialmente artritis reactiva. La enterocolitis es la principal manifestación clínica de las infecciones sintomáticas por *Y. enterocolitica*. La linfadenitis mesentérica aguda, que puede simular una apendicitis, es la manifestación más frecuente de infección por *Y. pseudotuberculosis*.

El reservorio son los animales. El cerdo es el principal reservorio de *Y. enterocolitica* biotipo 4, siendo común en éstos el estado de portador faríngeo asintomático, especialmente en invierno. Se han aislado otros biotipos en ganado ovino, bovino y caprino. *Y. pseudotuberculosis* es una zoonosis de las aves y los mamíferos salvajes y domésticos, en particular roedores y mamíferos pequeños.

La transmisión es fecal-oral, por el consumo de alimentos y agua contaminados o por contacto con personas o animales infectados. La mayoría de los casos de infección por *Y. enterocolitica* 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. *Y. enterocolitica* puede multiplicarse en refrigeración y en condiciones microaerófilas, por lo que hay mayor riesgo de infección si la carne no está curada o está insuficientemente cocinada y se almacena en bolsas de plástico. La dosis infectiva es relativamente alta. Se han notificado casos de infección por *Y. pseudotuberculosis* relacionados con mascotas enfermas en el hogar. Los casos se producen, en su mayoría, durante la temporada fría. También se han notificado casos de transmisión nosocomial y por transfusión de sangre obtenida de donantes asintomáticos o que tenían una afección digestiva leve.

14.1. DIAGNÓSTICO DE LABORATORIO

14.1.1. Identificación del agente

El diagnóstico se hace mediante el cultivo 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.

La mayoría de las especies patógenas de *Yersinia* pueden aislarse en los medios utilizados rutinariamente para el aislamiento de enteropatógenos (MacConkey, Salmonella-Shigella), dando lugar generalmente a unas colonias lactosa-negativas de un tamaño muy pequeño, lo

cual permite diferenciarlas de otras enterobacterias. Sin embargo, la incubación a 37°C no favorece el crecimiento preferencial de estas especies. Un paso previo de enriquecimiento con caldos no selectivos, como tampón fosfato salino (PBS), o caldos selectivos, como caldo Rappaport o bilis-oxalato-sorbosa, incubados a 4°C durante períodos prolongados de tiempo puede aumentar el número de cepas de *Yersinia* aisladas de las heces. No obstante, se pueden aislar también serotipos, biovariedades o especies ambientales no implicadas en patología humana. Por lo tanto, no parece recomendable la siembra rutinaria de caldos de enriquecimiento en las infecciones entéricas humanas.

De los diferentes medios de cultivos estudiados para el aislamiento de las especies patógenas de *Yersinia*, el que ha mostrado un mayor rendimiento es el designado como agar CIN (Cefsulodin-Irgasan-Novobiocina). En este medio las colonias de *Y. enterocolitica* aparecen (tras 24 horas de incubación a 25-30 °C) con una morfología peculiar designada en "ojo de buey" y consistente en un centro rojo rodeado de una zona transparente.

Tras el aislamiento, es recomendable estudiar la presencia de algunos factores de virulencia en los aislamientos. El serotipado puede ser un buen marcador de virulencia. Aunque existen más de 50 serogrupos de *Yersinia enterocolitica* distintos, la mayoría de las cepas patógenas humanas (más del 90%) corresponden a los serogrupos determinados (O:3, O:8, O:9 y O:5,27). También el biotipado, y en particular el estudio de algunas pruebas bioquímicas concretas (pirazinamidasas, fermentación de la salicina, hidrólisis de la esculina y formación de colonias pequeñas en el medio CR-MOX), permiten definir aquellas cepas con un marcado carácter virulento frente a las cepas no pertenecientes a los serotipos patógenos o de predominio ambiental.

El estudio de la presencia de los factores de virulencia indicará de una forma definitiva la naturaleza virulenta y el grado de patogenicidad de una determinada cepa. Para ello, las pruebas de expresión fenotípica de los factores de virulencia han pasado a ser sustituidas por otras herramientas como la PCR para la detección de los genes *ystA*, *ail*, *yadA*, *ystB* y *invA*, la tecnología MALDI-TOF MS y la secuenciación de genoma completo (WGS).

15. CARBUNCO

El carbunco bacteridiano es una enfermedad de distribución mundial causada por *Bacillus anthracis*, una bacteria capsulada, aerobia o anaerobia facultativa, grampositiva, formadora de esporas y con forma bacilar. El carbunco bacteridiano recibe muchos nombres distintos, como ántrax cutáneo, enfermedad de los laneros, enfermedad de los traperos, carbunco maligno, pústula maligna y úlcera de Siberia.

Es principalmente una enfermedad de animales herbívoros, aunque todos los mamíferos, incluidos los humanos, y algunas especies aviares, pueden contraerlo. La mortalidad puede ser muy alta, especialmente en los herbívoros.

Esta enfermedad está mediada principalmente por exotoxinas. Se han descrito formas hiperagudas, agudas, subagudas y a veces crónicas de la enfermedad. Las señales clínicas antemortem pueden estar ausentes en las formas hiperagudas y agudas de la enfermedad. La

forma subaguda puede estar acompañada de fiebre progresiva, depresión, inapetencia, debilidad, postración y muerte. En sus formas subaguda, aguda y crónica, la enfermedad puede mostrar una hinchazón localizada y fiebre. En la forma crónica, el único signo puede ser el aumento de tamaño de los órganos linfáticos.

Los animales se infectan por ingestión de esporas o posiblemente por picadura de moscas que se han alimentado en animales o canales infectadas. Los animales infectados se encuentran normalmente muertos porque la muerte ocurre en 24 horas. Un cuidadoso examen postmortem de los que han muerto recientemente puede mostrar diversas lesiones, ninguna de las cuales es patognomónica o constante. Sin embargo, para evitar la contaminación ambiental con las esporas, no se recomienda el examen postmortem de los cadáveres. El reservorio es el medio (suelo y vegetación) contaminado con esporas.

En el hombre, más del 95% de los casos de carbunco presentan la manifestación cutánea y son consecuencia del manejo de las canales, o de cueros, pieles, pelos, carne o huesos de los cadáveres (las esporas se introducen a través de la piel no intacta). La forma digestiva es extremadamente rara. La forma respiratoria puede darse en ocupaciones que impliquen el procesamiento de subproductos de origen animal para la fabricación de bienes (carbunco industrial). Estas incluyen el procesamiento del cuero, la lana, el pelo de animales, la piel para alfombras, los huesos, y otras ocupaciones en industrias similares donde el potencial de aerosolización de una cantidad importante de esporas incrementa el riesgo de exposición a dosis infecciosas.

15.1. DIAGNÓSTICO DE LABORATORIO

15.1.1. Identificación del agente

La detección de anticuerpos en suero de animales infectados se usa raramente para el diagnóstico de esta enfermedad y es esencialmente una herramienta de investigación, por lo que el diagnóstico se basa en la identificación del agente.

La demostración de *B. anthracis* encapsulado en frotis de sangre o de tejidos de cadáveres frescos infectados de carbunco, y el crecimiento del organismo en placas de medio sólido con sangre, no resulta muy complicado.

En muestra frescas (sangre principalmente, ya que no se recomienda la necropsia para la obtención de tejidos) se puede conseguir el aislamiento en agar sangre de caballo o de oveja al 5-7%. Una alternativa cuando no puede obtenerse la sangre del animal muerto es tomar muestras de hisopos a partir de los orificios naturales del animal. En este caso, suele haber microorganismos contaminantes por lo que se emplearán medios de cultivo con inhibidores. El medio PLET se utiliza en estos casos. También puede emplearse este medio selectivo para tratar el aislamiento de otro tipo de muestras (reses antiguas en descomposición, suelo contaminado, cuero, lana, etc.), aunque el aislamiento es complicado en estos casos.

Una vez obtenido el aislamiento, se pueden utilizar la prueba de la lisis del fago gamma y la de la sensibilidad a la penicilina para confirmar la identidad de *B. anthracis*. La presencia de la cápsula puede ser difícil de detectar, sobre todo si el animal lleva muerto más de 24 horas.

Con la prueba de Ascoli se emplea antisuero obtenido en conejos para producir una reacción de precipitina.

Sin embargo, la identificación de la especie y la confirmación de la virulencia se realiza habitualmente mediante PCR (convencional o en tiempo real) en la que se amplifica un marcador cromosómico (Ba813) y los factores de virulencia del antígeno protector (PA) y la cápsula, presentes en los plásmidos pXO1 y pXO2, respectivamente.

16. FIEBRE Q

La Fiebre Q es la enfermedad causada por *Coxiella burnetii*, bacteria Gram negativa intracelular estricta de la familia *Coxiellaceae*. *C. burnetii* posee 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*.

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. Los rumiantes domésticos se consideran el principal reservorio de *C. burnetii*, pero se ha observado que gatos, perros, conejos, aves, etc. pueden intervenir también en la enfermedad/infección humana.

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.

En los humanos, las formas agudas van de un síndrome gripal autolimitante a una neumonía o hepatitis granulomatosa que puede requerir hospitalización. El principal signo clínico de la fiebre Q crónica es una endocarditis valvular, infecciones vasculares o aneurismáticas, hepatitis, neumonía o síndrome de fatiga crónica. Además, la infección de mujeres embarazadas por *C. burnetii* puede provocar inflamación de la placenta y comporta nacimientos prematuros, limitaciones del crecimiento, aborto espontáneo o muerte fetal.

C. burnetii tiene la capacidad de adoptar formas de resistencia (pseudo-espora) y 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.

16.1. DIAGNÓSTICO DE LABORATORIO

16.1.1. Identificación del agente

El aislamiento de *C. burnetii* se realiza por inoculación de huevos de gallina embrionados o en cultivos celulares (fibroblastos de pulmón de embrión humano). Para lograr el aislamiento, se recomienda una concentración superior a las 10^5 bacterias por ml.

La tinción de frotis de tejidos como cotiledones placentarios, bazo, pulmón, hígado o rumen de los fetos abortados o las secreciones vaginales sobre portas de microscopio pueden demostrar la presencia de las bacterias en el interior de las células. Se pueden seguir varios métodos: Tinción de Stamp, Giménez, Macchiavello, Giemsa y Koster modificada. Con las tres primeras técnicas se obtienen los mejores resultados.

La detección directa y específica sobre la muestra se puede realizar con técnicas de inmunodetección específica (ELISA de captura, inmunohistoquímica), hibridación in-situ o amplificación del ADN (PCR y PCR a tiempo real).

Cuando se confirma la infección son varias las herramientas empleadas en 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.

16.1.2. Diagnóstico serológico

El ELISA presenta una gran sensibilidad y una buena especificidad. Existen kits comerciales listos para usar con los que se pueden detectar mezclas de anticuerpos de fase I y de fase II.

En medicina humana, la inmunofluorescencia indirecta (IFA) adaptada como una técnica de micro-inmunofluorescencia es el método actual para el serodiagnóstico de la fiebre Q en humana. El procedimiento se puede adaptar para realizar una prueba de inmunoperoxidasa.

La prueba de Fijación de Complemento se considera menos sensible que el ELISA o la IFA

17. MUERMO

Enfermedad contagiosa fatal de los caballos, burros y mulas causada por la *Burkholderia mallei*, bacteria aeróbica, bacilo gramnegativo, no esporulado y no encapsulado e inmóvil. Este microorganismo ha sido conocido durante mucho tiempo como "*Pseudomonas mallei*".

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. Se caracteriza por la presencia de nódulos, abscesos y úlceras en las vías respiratorias y la piel.

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.

17.1. DIAGNÓSTICO DE LABORATORIO

17.1.1. Identificación del agente

El diagnóstico se realiza a través del estudio de la morfología de la bacteria en frotis de lesiones frescas en las que se puede observar los bacilos mediante el uso de tinciones como la de azul de metileno o la de Gram.

El crecimiento en medios de cultivo como el agar sangre puede ser lento, aunque el uso de medios enriquecidos con glicerol favorece el crecimiento. Una vez obtenido el aislamiento, la identificación se puede realizar mediante pruebas bioquímicas (reducción de nitratos, uso de arginina, asimilación de glucosa) o mediante el uso de pruebas moleculares basadas en la PCR.

17.1.2. Pruebas serológicas

La Fijación de Complemento es la técnica serológica más utilizada para el diagnóstico de esta enfermedad, revelando los animales positivos en la primera semana postinfección y reconociendo también los positivos de casos crónicos.

Se han desarrollado varios métodos de ELISA, indirecto y de competición. Existe un sistema de ELISA de competición comercial que ha mostrados resultados de sensibilidad mayor que la fijación de complemento.

Recientemente se ha desarrollado un método basado en inmunoblotting con el antígeno del LPS de *B.mallei* con el objetivo de reevaluar los falsos positivos de fijación de complemento. Sin embargo, esta técnica no diferencia el muermo de otra enfermedad de los equinos denominada Meloidosis (*Burkholderia pseudomallei*).

BIBLIOGRAFÍA

CDC. One health

<https://www.cdc.gov/onehealth/>

ISCII. Enfermedades transmisibles.

<https://www.isciii.es/QueHacemos/Servicios/VigilanciaSaludPublicaRENAVE/EnfermedadesTransmisibles/Paginas/Enfermedades-A-Z.aspx>

Manual de las Pruebas de Diagnóstico y de las Vacunas para los Animales Terrestres 2021. OIE. Edición online.

Zoonosis y Enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales. Volumen I. Bacteriosis y Micosis. Pedro N. Acha y Boris Szyfres. Organización Panamericana de la Salud.

Gastroenteritis bacterianas, víricas, parasitarias y toxi-infecciones alimentarias. Procedimientos en Microbiología Clínica. Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica.

Diagnóstico de laboratorio de la infección por *Borrelia burgdorferi*. MC Maroto Vela, J Gutiérrez Fernández. Control Calidad. Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica.

Enfermedad de Lyme. A.Portillo, S. Santibáñez, JA. Otero. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2014;32(Supl 1):37-42

Vibriosis. 2013. Jorge Cuéllar-Anjel. The Center for Food Security and Public Health. Iowa State University.

Hunter E, Greig DR, Schaefer U, Wright MJ, Dallman TJ, McNally A, Jenkins C. Identification and typing of *Yersinia enterocolitica* and *Yersinia pseudotuberculosis* isolated from human clinical specimens in England between 2004 and 2018. *J Med Microbiol.* 2019 Apr;68(4):538-548. doi: 10.1099/jmm.0.000943. Epub 2019 Mar 19. PMID: 30888316.

MATERIAL PARA LA PREPARACIÓN DEL TEMA 40

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

2.3. 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 infecciosos 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 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 (β -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.

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. 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.

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.

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

porcinocultura, 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, tómatelos 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**.

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 tipos 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 20776-1:2021¹ 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.
- **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.

¹ 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)

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, β -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 β -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 β -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 (β -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

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

OIE. Resistencia antimicrobiana. <https://www.oie.int/es/que-hacemos/iniciativas-mundiales/resistencia-antimicrobiana/>

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 41

**ZOONOSIS 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. 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 DE LA GRIPE

3.4. VIRUS DE LA RABIA

3.5. VIRUS TRANSMITIDOS POR ARTRÓPOS

3.5.1. Fiebre del Valle del Nilo Occidental

3.5.2. Usutu

3.5.3. Encefalitis japonesa

3.6. FIEBRE HEMORRÁGICA CRIMEA CONGO

3.7. FIEBRE DEL VALLE DEL RIFT

3.8. ENCEFALOMIELITIS EQUINA DEL ESTE (EEE), DEL OESTE (EEO) Y VENEZOLANA (EEV)

3.9. ENCEFALITIS TRANSMITIDA POR GARRAPATAS

1. 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 enlace 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.

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 DE LA GRIPE

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.

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.

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 piaras. 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.

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. No tiene carácter zoonótico.

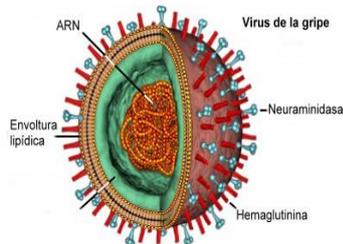
Los virus de Influenza pertenecen a la familia *Orthomyxoviridae*, género *Alphainfluenzavirus* (influenzavirus A o influenza A virus). Son virus envueltos (sensibles al éter) y contienen una cadena sencilla de ácido nucleico (ARN) que es segmentada y tiene una polaridad negativa. Tiene dos componentes 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 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:

- Influenza aviar de baja patogenicidad (IABP), que suele causar una enfermedad leve que, en muchas ocasiones, pasa desapercibida e, incluso, sin presentar sintomatología.
- Influenza aviar de alta patogenicidad (IAAP), provoca signos clínicos graves y altas tasas de mortalidad.

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**.

Diagnóstico de laboratorio

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.

Se vienen realizando programas de vigilancia de influenza aviar desde el año 2005. Son programas anuales que cada año se revisan y modifican, según la situación epidemiológica de la enfermedad y bajo la supervisión de la Comisión.

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**.

Y un **programa de vigilancia de la influenza aviar en las aves silvestres** para poder 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. 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).

Uno 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, por lo cual, es muy importante el diagnóstico de Laboratorio.

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).

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 biocontención protegido contra virus.
- 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. PQRERRRKR/GLF PEIPKKKKR/GLF R = arginina K = lisina

Pueden ser escindidos por mayor número de proteasas, dando lugar infecciones sistémicas. Virus influenza de alta patogenicidad, HPAI

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

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 las especies.
- **ELISA.** Técnica más sensible que el AGID. Detectar 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 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.

Deberíamos hacer una mención a **la Enfermedad de Newcastle**, muy íntimamente ligada a la influenza aviar, son dos enfermedades muy contagiosas y severas. Con unos síntomas, lesiones y diagnóstico similares. Siempre hay que hacer diagnóstico diferencial entre las dos enfermedades.

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, como hemos dicho, 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. Está causada por cepas virulentas de Paramixovirus tipo 1 (APMV-1), del género *Orthoavulavirus*, perteneciente a la subfamilia *Avulavirinae*, familia *Paramyxoviridae*. 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.

3.4. VIRUS DE LA RABIA

La rabia es una zoonosis vírica producida por un virus neurotrópico de tipo ARN lineal monocatenario de la familia *Rhabdoviridae*, género *Lyssavirus*.

Tiene forma de bala con envoltura en cuya membrana se inserta la proteína G importante para el diagnóstico laboratorial. También posee hacia el interior la proteína de matriz o proteína M y la nucleocápside con tres proteínas, la N, la P y la L.

Afecta a todos los mamíferos, inclusive el hombre, de carácter agudo, que afecta al sistema nervioso central, provocando la muerte si no es tratada con máxima urgencia. El perro es el principal hospedador implicado, aunque existen otros hospedadores en función del área geográfica, en Europa es particularmente importante el murciélago y el zorro.

La transmisión del virus se produce, fundamentalmente, mediante la mordedura de un animal enfermo, o cuando su saliva se pone en contacto íntimo con heridas frescas y abiertas. Por regla general se calcula un periodo de incubación de 2 a 8 semanas, en ocasiones puede ser de tan solo 10 días, dependiendo de la localización de la herida, de la cantidad de tejido nervioso afectado y su distancia al cerebro.

El Laboratorio Nacional de Referencia es el Centro Nacional de Microbiología, Instituto de Salud Carlos III, en Majadahonda tanto para los casos de rabia humana como animales sospechosos.

MARCO REGLAMENTARIO

Unión Europea

A parte de los mencionados en el apartado legislación (2.1) en el caso de la rabia tenemos:

- **Reglamento (UE) 576/2013** a los desplazamientos sin ánimo comercial de animales de compañía.
- **Reglamento (UE) 2016/429** relativo a las enfermedades transmisibles de los animales.
- **Reglamento de Ejecución (UE) 2018/1882** de la Comisión relativo a la aplicación de determinadas normas de prevención y control de 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, estableciendo el virus de la rabia como enfermedad de categoría E (vigilancia) en las siguientes especies de 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 el movimiento).
- **Reglamento Delegado (UE) 2020/692** del Parlamento Europeo y del Consejo referente a la entrada en la Unión y los desplazamientos y la manipulación de determinados animales, productos reproductivos y productos de origen animal.
- **Reglamento Delegado (UE) 2020/688** de la Comisión relativo a los requisitos zoonosanitarios para los desplazamientos dentro de la UE de animales y de huevos para incubar.
- **Reglamento de Ejecución (UE) 2021/620** de la Comisión, sobre las normas para la aprobación del estatus libre de enfermedad y el estatus libre de enfermedad sin vacunación.

Diagnóstico de laboratorio

Se diagnostica a partir de muestras de tálamo, corteza cerebral y bulbo raquídeo y suero.

Los métodos de diagnóstico son:

- **Identificación inmunoquímica del antígeno del virus de la rabia.**
 - **Prueba de inmunofluorescencia directa (FAT).** Es la prueba más utilizada. Puede utilizarse directamente sobre un frotis de impresión o para confirmar la presencia del virus en un cultivo celular o en tejido encefálico de ratones que se hayan inoculado con fines de diagnóstico. Es muy sensible y específica. Da resultados fiables en muestras frescas en 2 horas.
 - **Prueba de Inmunohistoquímica directa rápida (dRIT).** Especificidad y sensibilidad similar a la FAT. En vez de un conjugado fluorescente se utiliza estreptoavidina-biotina peroxidasa.
- **ELISA.** Detecta el virus de la rabia y es una variación de la prueba inmunohistoquímica. Útil en los estudios epidemiológicos a gran escala.

Aislamiento del virus

En cultivos celulares o en animales de laboratorio (ratones) y deben emplearse como pruebas de confirmación si la FAT, la dRIT o la PCR dan resultados inciertos.

Cultivos celulares de neuroblastoma, como las células Neuro-2^a, CCI-131.

- **Identificación histológica** de lesiones celulares características.

Es una técnica lenta y menos sensible y más cara que la FAT y la dRIF.

- **PCR** es una prueba sensible y no se requiere la presencia de virus vivo. Se puede realizar PCR convencional y la RT-PCR
- **Pruebas serológicas** como la seroneutralización, tinción directa de los anticuerpos fluorescentes y ELISA.

3.5 VIRUS TRANSMITIDOS POR ARTRÓPODOS.

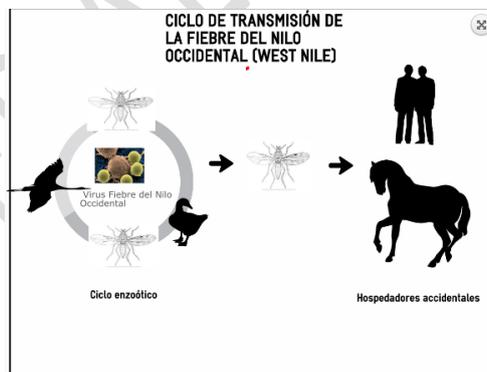
Los **Arbovirus** (virus transmitidos por artrópodos) son todos los virus que se transmiten al ser humano o a otros vertebrados por ciertas especies de artrópodos hematófagos, especialmente insectos (moscas y mosquitos) y arácnidos (garrapatas).

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.

3.5.1 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*, genero *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.

3.5.2 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. 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 co-circulación de 3 cepas de Usutu en Italia (2008-2011).

Este Virus junto con el virus de Bagaza también perteneciente al mismo género del Grupo Ntaya son diagnosticados en los LNR como diagnóstico diferencial con el Virus de la Fiebre del Valle del Nilo Occidental.

3.5.3. 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 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.

3.6. FIEBRE HEMORRÁGICA CRIMEA CONGO

Enfermedad zoonótica en muchos países de Asia, África, Oriente Medio y el sureste de Europa. Es de declaración obligatoria. Es asintomático en animales.

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 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).

FHCC en España

La detección de casos autóctonos y los hallazgos de los estudios posteriores en garrapatas y animales, confirma que en algunas zonas de España hay un porcentaje importante de garrapatas infectadas y zonas de circulación del virus, habiéndose instaurado posiblemente un ciclo cerrado entre garrapatas y hospedadores.

La probabilidad de infección para las personas viene determinada fundamentalmente por la intensidad de exposición a las garrapatas, ya que el periodo de viremia en los animales

infectados es muy reducido, y el mecanismo de transmisión a partir de animales infectados tiene mucha menos importancia.

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.

3.7. VIRUS DE LA FIEBRE DEL VALLE DE RIFT (FVR)

Las únicas FHV en las que intervienen animales domésticos, y por tanto tienen implicaciones en la sanidad animal son la Fiebre del Valle del Rift y la Fiebre Hemorrágica Crimea Congo.

La Fiebre del Valle del Rift es una enfermedad vírica aguda que puede afectar gravemente a los animales domésticos (tales como búfalos, camellos, bovinos, cabras y ovejas) y al hombre, en el que suele cursar de forma leve auto limitante, aunque en ocasiones puede producir un cuadro grave de final fatal. Por lo tanto **es considerada como una zoonosis**.

La enfermedad en los animales se caracteriza por fiebre, debilidad aguda, abortos y altas tasas de morbilidad y de mortalidad. La especie más afectada parece ser la ovina, donde los abortos suelen llegar a tasas de morbilidad del 100%.

La transmisión en los animales se produce principalmente a través de mosquitos del género *Aedes*, que son capaces de transmitir el virus de forma vertical a los huevos que eclosionarán al próximo año cuando se den las condiciones favorables de humedad y temperatura.

En el ser humano la infección se suele producir a través de la manipulación de tejidos animales durante el sacrificio o el despiece, la asistencia al parto de los animales, la realización de procedimientos veterinarios o la eliminación de animales o fetos muertos. Así, algunos grupos profesionales como los pastores, granjeros, matarifes y veterinarios corren mayor riesgo de contraer la infección. Hasta la fecha no se ha documentado la transmisión de persona a persona y tampoco ha habido casos de transmisión al personal sanitario cuando se han tomado las precauciones básicas para el control de las infecciones.

Virus de la familia *Bunyaviridae*, género *Phlebovirus*. Virus ARN monocatenario. Varios virus de esta familia pueden causar fiebre y encefalitis. Es una **enfermedad de declaración obligatoria**.

De acuerdo a la actual normativa en vigor, se notificará la detección de focos de la enfermedad 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.

LNR: Laboratorio Central de Veterinaria de Algete.

El Ministerio ha desarrollado un manual práctico de operaciones en la lucha contra la Fiebre del Valle del Rift sirve como guía de trabajo a los Servicios Veterinarios Oficiales para poder ofrecer una respuesta rápida y eficaz en caso de sospecha y de confirmación de un foco de FVR, así como para luchar contra los vectores de enfermedad, y debe utilizarse junto con el Plan Coordinado Estatal de Alerta Sanitaria Veterinaria, así como con la normativa vigente en materia de Sanidad y Bienestar Animal en nuestro país.

Y una Guía de Campo, que es una versión resumida del manual práctico de operaciones, para que pueda servir de guía de consulta rápida.

Para garantizar una desinsectación eficaz es necesario, entre otros aspectos, usar un insecticida que sea efectivo frente al vector en cuestión.

Programa Nacional de Vigilancia frente a la Fiebre del Valle del Rift (2022)

El programa de vigilancia cuenta con dos componentes principales: una **vigilancia pasiva** basada en la notificación inmediata de sospecha por parte del sector ganadero o veterinario a los servicios veterinarios oficiales, y un **componente activo** basado en muestreos serológicos

de en animales susceptibles en explotaciones centinelas localizadas en el área considerada de riesgo, por lo tanto un componente activo enfocado a zonas de mayor riesgo.



La enfermedad se encuentra distribuida principalmente por el este y sur de África, si bien también se ha descrito en Egipto y países Subsaharianos como Mauritania. Se encuentra habitualmente vinculada con las épocas de grandes lluvias que ocasiona la presencia de poblaciones densas de mosquitos vectores: las lluvias hacen que eclosionen los huevos de los mosquitos del año anterior que ya nacen infectados, con los que se producen brotes epidémicos explosivos.

La amplia distribución geográfica en territorios cercanos a la cuenca del Mediterráneo hace que resulte una enfermedad de importante riesgo de introducción para España.

Actualmente España está considerada libre de FVR.

Para el diagnóstico de la enfermedad es necesario disponer de muestras de sangre completa (EDTA), plasma o suero de los animales enfermos o sospechosos. También se pueden emplear muestras de hígado, cerebro, bazo o ganglios linfáticos de animales muertos o sacrificados.

Las técnicas de diagnóstico incluyen:

- Aislamiento vírico en células VERO y BHK, produce ECP y confirmación por RT-PCR.
- Histología de lesiones citológicas en el hígado.
- Las muestras de suero se analizarán mediante ELISA para la detección de anticuerpos frente al VFVR.
- Los sueros cuyo resultado sea positivo o dudoso se analizarán por la técnica de seroneutralización.
- De igual modo, en caso de obtenerse resultados no concluyentes mediante alguna de las pruebas serológicas, se analizarán las muestras pareadas de sangre mediante PCR-RT para confirmar o descartar la presencia del virus en la explotación.

Si las muestras pueden ser enviadas dentro de las 48 horas siguientes a su extracción, deberán conservarse a 4°C, mientras que si no es posible su envío en 48 horas, las muestras de suero deberán congelarse a -20°C (las muestras de sangre no se pueden congelar en ningún caso).

3.8. 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 genéticamente 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.

En el siguiente punto haremos mención a las Encefalitis Transmitida por garrapatas enfermedad que no está presente en España pero se debe tener presente por su posible entrada en nuestro país.

3.9. 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.

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.

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

Manual de pruebas diagnósticas y vacunas para los animales terrestres y acuáticos

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.

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.

Informe de situación y evaluación del riesgo de transmisión del virus de fiebre hemorrágica de Crimea-Congo (fhcc) en España julio 2019

https://www.mscbs.gob.es/profesionales/saludPublica/ccayes/analisisituacion/doc/ER_FHC_C.pdf

MATERIAL PARA LA PREPARACIÓN DEL TEMA 42

PRINCIPALES ENFERMEDADES ANIMALES NO ZONÓTICAS 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. PRINCIPALES ENFERMEDADES ANIMALES NO ZONÓTICAS OBJETO DE CONTROL EN LA UNIÓN EUROPEA.

1.1. INTRODUCCIÓN

2. MARCO LEGAL.

3. DIAGNÓSTICO DE LABORATORIO.

3.1. ENFERMEDADES CATEGORIA A

3.1.1. Enfermedades víricas:

3.1.2. Enfermedades bacterianas:

3.2. ENFERMEDADES CATEGORIA C

3.2.1. Enfermedades víricas:

3.3. ENFERMEDADES CATEGORIA D+E

3.3.1. Enfermedades víricas

3.3.2. Enfermedades bacterianas

3.3.3. Enfermedades parasitarias

MATERIAL NO OFICIAL

1. PRINCIPALES ENFERMEDADES ANIMALES NO ZONÓTICAS OBJETO DE CONTROL EN LA UNIÓN EUROPEA.

1.1. INTRODUCCIÓN

Las enfermedades objeto de estudio están recogidas en 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.

Para la categorización de las enfermedades, la Comisión, con ayuda de la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) y utilizando los conocimientos científicos de los laboratorios de referencia de la UE en Sanidad Animal, llevó a cabo una evaluación sistemática de las enfermedades que requieren una intervención de la Unión. También tuvo en cuenta información disponible de la Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE).

La evaluación sistemática efectuada por la Comisión también tuvo en cuenta varios factores, como las especies susceptibles, los reservorios y los portadores, así como el hecho de que una enfermedad de la lista esté o no presente actualmente en la Unión, la forma en que la enfermedad de la lista se transmite entre los animales y de los animales a los humanos, y su posible impacto sobre la salud humana y de los animales, incluidas sus tasas de morbilidad y mortalidad. La evaluación sistemática consideró asimismo el impacto en un sentido más amplio de estas enfermedades de la lista, como su impacto en la economía, la sociedad, el bienestar de los animales, el medio ambiente o la biodiversidad.

En el artículo 1 del citado Reglamento se definen las diferentes categorías de enfermedades:

- 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. Se tomarán medidas de emergencia.
- 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. Se aplicarán normas sobre programas de erradicación obligatoria.
- 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. Se aplicarán normas sobre programas de erradicación voluntaria.
- 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 vigilar dentro de la Unión, como señala el artículo 9, apartado 1, letra e), del Reglamento (UE) 2016/429. Se aplicarán normas sobre notificación.

Las categorías A, B y C son excluyentes.

Así las enfermedades objeto de estudio, excluyendo las enfermedades zoonóticas (parasitarias, bacterianas y víricas), enfermedades de los peces, enfermedades de las abejas y encefalopatías espongiiformes y transmisibles, tratadas en otros temas del temario, serán las siguientes:

| ENFERMEDAD | CATEGORÍA DE LA ENFERMEDAD INCLUIDA EN LA LISTA |
|---|---|
| Fiebre aftosa (FA) | A+D+E |
| Peste bovina (PB) | A+D+E |
| Dermatosis nodular contagiosa (DNC) | A+D+E |
| Infección por Mycoplasma mycoides subespecie mycoides SC (perineumonía contagiosa bovina) (PCB) | A+D+E |
| Viruela ovina y viruela caprina (VOVC) | A+D+E |
| Peste de los pequeños rumiantes (PPR) | A+D+E |
| Pleuroneumonía contagiosa caprina (PCC) | A+D+E |
| Peste equina africana (PEA) | A+D+E |
| Peste porcina clásica (PPC) | A+D+E |
| Peste porcina africana (PPA) | A+D+E |
| Enfermedad de Newcastle (ENC) | A+D+E |
| Infección por el virus de la lengua azul (serotipos 1-24) | C+D+E |
| Rinotraqueitis infecciosa bovina/vulvovaginitis pustular infecciosa (RIB/VPI) | C+D+E |
| Diarrea viral bovina (DVB) | C+D+E |
| Leucosis bovina enzoótica (LBE) | C+D+E |
| Enfermedad de Aujeszky (ADV) | C+D+E |
| Enfermedad hemorrágica epizootica | D+E |
| Surra (Trypanosoma evansi) | D+E |
| Tricomonosis | D+E |
| Epididimitis ovina (Brucella ovis) | D+E |
| Arteritis viral equina | D+E |
| Anemia infecciosa equina | D+E |
| Durina | D+E |
| Metritis contagiosa equina | D+E |
| Síndrome disgenésico y respiratorio porcino | D+E |
| Micoplasmosis aviar (Mycoplasma gallisepticum y M. meleagridis) | D+E |

2. MARCO LEGAL.

Marco legal a nivel nacional:

- **Ley 8/2003**, de sanidad animal, establece medidas de control para determinadas enfermedades.
- **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 PCC.
- **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.

Marco legal a nivel de la Unión Europea:

- **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» (LSA)).
- **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.
- **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.
- **Reglamento Delegado (UE) 2019/2035** de la Comisión de 28 de junio de 2019 por el que se completa el Reglamento (UE) 2016/429 del Parlamento Europeo y del Consejo en lo referente a las normas sobre los establecimientos que tengan animales terrestres y las plantas de incubación, y a la trazabilidad de determinados animales terrestres en cautividad y de los huevos para incubar, en cuyo Anexo II se establece un programa de control microbiológico en plantas de incubación y programas de vigilancia de enfermedades en establecimientos que tienen aves de corral y en plantas de incubación para Mycoplasma gallisepticum y Mycoplasma meleagridis.

En la siguiente tabla se recoge de forma esquemática las medidas de actuación a tomar según la categoría de enfermedad a tratar y la legislación general que le aplica:

| CATEGORÍA ENFERMEDAD | CARACTERÍSTICAS | LEGISLACIÓN QUE APLICA |
|----------------------|---|--|
| CATEGORÍA A | Enfermedades que normalmente no están presentes en la UE y para las que deben adoptarse medidas de erradicación inmediata tan pronto como se detecten. | LSA Parte III + RDel. (UE) 2020/687 Normas de prevención y control Recuperar: libre de enfermedad |
| CATEGORÍA B | Enfermedades que deben controlarse en todos los EEMM con el objetivo de erradicarlas en toda la UE . | LSA Parte II + RDel. (UE) 2020/689 Reglas para <u>Programas de erradicación obligatoria</u> . Estatus de "libre de enfermedad" LSA Parte III + RDel. (UE) 2020/687 Normas de prevención y control Recuperan "libre de enfermedad" |
| CATEGORÍA C | Enfermedades que son relevantes para algunos EEMM y para las que se necesitan medidas para evitar que se propaguen a partes de la UE oficialmente indemnes de enfermedades o que cuenten con programas de erradicación de la enfermedad de la lista en cuestión. | LSA Parte II + RDel. (UE) 2020/689 Reglas para <u>Programas de erradicación opcional</u> . Estatus de "libre de enfermedad" LSA Parte III + RDel. (UE) 2020/687 Normas de prevención y control Recuperan "libre de enfermedad" |

| | | |
|--------------------|---|--|
| CATEGORÍA D | Enfermedades para las que se necesitan medidas para evitar que se propaguen debido a desplazamientos entre EEMM o entrada en la UE. | LSA Parte IV + RDel. (EU) 20020/688 Reglas para movimientos entre EEMM LSA Parte V + RDel. (UE) 2020/692 Reglas para entrada en la UE |
| CATEGORÍA E | Enfermedades para las que es necesario vigilar dentro de la UE. | LSA Parte II + RDel. (UE) 2020/689 Reglas para vigilancia, diagnóstico, definiciones caso |

3. DIAGNÓSTICO DE LABORATORIO.

Las enfermedades a tratar se pueden agrupar de varias formas para facilitar su estudio y exposición:

- Según categoría a la que pertenecen en el Reglamento de Ejecución (UE) 2018/1882.
- Enfermedades víricas, parasitarias o bacterianas.
- Según el diagnóstico de laboratorio, si solo se basa en un diagnóstico directo (aislamiento e identificación del agente), o si también se realiza un diagnóstico serológico.

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 el análisis de riesgo que se realice en cada centro. Además, el envío de las muestras al laboratorio deberá seguir las medidas de bioseguridad adecuadas, utilizando triple envase, para evitar la difusión de las enfermedades.

A continuación, las enfermedades objeto de estudio en este tema se agruparán por categoría a la que pertenecen:

3.1 ENFERMEDADES CATEGORIA A:

3.1.1. ENFERMEDADES VÍRICAS:

- **Fiebre aftosa (FA)** o Glosopeda es una enfermedad infecciosa causada por un virus de la *Familia Picornaviridae*, *Género Aphthovirus*. Se trata de un virus pequeño y sin envuelta lipídica, **ARN monocatenario** cuyo genoma se encuentra incluido en una cápside proteica de morfología icosaédrica formada por **4 proteínas estructurales** distintas VP1, VP2, VP3 y VP4. La proteína **VP1** constituye uno de los antígenos más inmunógenos, al intervenir en la formación de **anticuerpos neutralizantes**. Esta proteína es, además, altamente variable, lo que la hace responsable en gran medida de la variabilidad antigénica. Hay descritos **7 serotipos** del virus (O, A, C, Asia1, SAT1, SAT2, SAT3), sin que exista inmunidad cruzada entre ellos.

Es un virus epiteliotropo, se caracteriza por originar lesiones de tipo vesicular o aftas en mucosas y epitelio de animales de especies de pezuña hendida, tanto doméstica como salvaje, afectando a animales de todas las edades.

Es una de las enfermedades víricas de mayor importancia debido a su gran poder de difusión, al elevado número de especies a las que afecta (la especie más sensible es el

ganado vacuno y la más resistente el cerdo) y a las pérdidas de producción que origina. Su presencia en un país o región ocasionará restricciones comerciales con graves pérdidas económicas.

Diagnóstico de laboratorio:

El virus es extremadamente sensible a las variaciones de pH, por lo que las muestras deben enviarse al laboratorio en un medio de transporte que tenga capacidad tampón y garantice la estabilidad del pH entre 7,2 y 7,6.

El diagnóstico comprende:

- a) *Diagnóstico virológico (identificación del agente)*: Las muestras de elección serán sangre con anticoagulante, epitelio y fluido de vesículas, saliva (ovino), muestra faringo-esofágica (bovino) (Probang cups), hisopos faríngeos y nasales (porcino, ovino, caprino), sangre con anticoagulante, leche y tejidos (corazón, riñón, ganglios e hígado). Se analizarán por las siguientes técnicas:
- Aislamiento del virus en cultivos celulares, donde sí produce efecto citopático.
 - Detección de antígenos virales mediante ELISA de antígeno tipo sándwich.
 - Prueba del dispositivo de flujo lateral.
 - Técnicas de diagnóstico molecular: RT-PCR basada en gel de agarosa, RT-PCR en tiempo real, secuenciación para estudios epidemiológicos.
- b) *Diagnóstico serológico*: La muestra de elección es el suero. Se analizará por las siguientes técnicas:
- ELISA de proteínas no estructurales (NS) para diferenciar entre animales infectados y vacunados.
 - ELISA de proteínas estructurales detectan anticuerpos frente a todo tipo de proteínas. Son específicos de serotipo. Existen reacciones cruzadas entre serotipos.
 - Seroneutralización. Es específica de serotipo. Se recomienda para la confirmación de sueros con resultado positivo o dudoso a ELISA.
- **Peste bovina (PB)** es una enfermedad viral altamente contagiosa que afecta el ganado de pezuña hendida, en especial el ganado bovino y los búfalos, se caracterizaba por una alta morbilidad y mortalidad, se propaga por contacto directo. Actualmente se la considera erradicada de todos los países. Está causada por un virus con ARN de sentido negativo, que pertenece al género *Morbillivirus*, dentro de la familia *Paramyxoviridae*. Este virus tiene un solo serotipo con al menos tres clados geográficamente restringidos: Estirpe africano 1 y 2, y estirpe asiático 3, que presentan protección cruzada total y solo se diferencian por caracterización molecular. El virus está inmunológicamente relacionado con el virus de la Peste de los pequeños rumiantes. Los signos que aparecen son fiebre, falta de apetito, depresión, caquexia, erosiones superficiales en el labio superior e inferior y en las encías, secreción ocular serosa o mucopurulenta y/o rinorrea, diarrea y postración terminal.

Diagnóstico de laboratorio:

a) *Diagnóstico virológico (identificación del agente):* Las muestras de elección son las siguientes: sangre con anticoagulante, secreciones oculares y nasales de animales infectados durante la fase prodrómica o erosiva y tejidos (bazo, ganglios linfáticos preescapulares o mesentéricos).

Se analizarán por las siguientes técnicas:

- Aislamiento del virus en cultivos celulares.
- Detección de antígeno por inmunodifusión en gel de agar.
- Técnicas de diagnóstico molecular: RT-PCR

b) *Diagnóstico serológico:* La muestra de elección es el suero. Se analizará por las siguientes técnicas:

- ELISA de competición.
- Detección de anticuerpo mediante inmunodifusión en gel de agar.
- Seroneutralización.

- **Dermatitis nodular contagiosa (DNC)** es una enfermedad del ganado bovino producida por un virus ADN de la familia *Poxviridae*, género *Capripoxvirus*, que se caracteriza por fiebre, nódulos en la piel, en membranas mucosas y órganos internos, extenuación, inflamación de los nódulos linfáticos, edema cutáneo y en ocasiones la muerte. La enfermedad tiene importancia económica porque causa un elevado descenso en la producción, particularmente en vacas de leche. 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.

Diagnóstico de laboratorio:

a) *Diagnóstico virológico (identificación del agente):* Las muestras de elección son las siguientes: sangre con anticoagulante, nódulos de la piel, lesiones pulmonares o nódulos linfáticos mediante biopsia o post-mortem.

Se analizarán por las siguientes técnicas:

- Aislamiento del virus en cultivos celulares.
- Técnicas de diagnóstico molecular: PCR.
- Microscopía electrónica de transmisión.
- Pruebas de inmunofluorescencia.

b) *Diagnóstico serológico:* La muestra de elección es el suero. Se analizará por las siguientes técnicas:

- ELISA.
- Seroneutralización.
- Técnica de inmunofluorescencia indirecta.
- Análisis Western blot.

- **Viruela ovina y viruela caprina (VOVC)** es una enfermedad infecto-contagiosa producida por un virus ADN, perteneciente al género *Capripoxvirus* dentro de la familia *Poxviridae*. Produce un cuadro clínico en ganado ovino y caprino caracterizado por la

aparición de fiebre, nódulos y pápulas generalizadas, raramente vesículas, lesiones internas particularmente en pulmones y, finalmente, la muerte.

Se transmite por contacto directo entre los animales enfermos y los susceptibles, e indirectamente mediante fómites contaminados y vehículos de transporte.

Diagnóstico de laboratorio:

a) *Diagnóstico virológico (identificación del agente):* Las muestras de elección son las siguientes: sangre con anticoagulante, pápula cutánea, lesiones pulmonares o nódulos linfáticos mediante biopsia o post-mortem.

Se analizarán por las siguientes técnicas:

- Aislamiento del virus en cultivos celulares.
- Técnicas de diagnóstico molecular: PCR.
- Microscopía electrónica de transmisión.
- Pruebas de inmunofluorescencia.

b) *Diagnóstico serológico:* La muestra de elección es el suero. Se analizará por las siguientes técnicas:

- ELISA.
- Seroneutralización.
- Técnica de inmunofluorescencia indirecta.
- Análisis Western blot.

- **Peste de los pequeños rumiantes (PPR)** es una enfermedad vírica aguda de los pequeños rumiantes caracterizada por fiebre, secreciones oculonasales, estomatitis, diarrea y neumonía, y respiración con olor fétido y molesto. Debido a los signos respiratorios, la PPR puede confundirse con la pleuroneumonía caprina contagiosa (PCC) o la pasteurelosis. Está causada por un virus ARN del género *Morbilivirus* de la familia *Paramyxoviridae* que está relacionado con la peste bovina, el sarampión y el moquillo canino. Para la transmisión de la enfermedad se requiere un estrecho contacto entre los animales infectados y los susceptibles.

Diagnóstico de laboratorio:

a) *Diagnóstico virológico (identificación del agente):* Las muestras de elección son las siguientes: sangre con anticoagulante, hisopos nasales y conjuntivales, pulmón, bazo, ganglios linfáticos mesentéricos, tonsilas y secciones de íleon e intestino grueso.

Se analizarán por las siguientes técnicas:

- Aislamiento del virus en cultivos celulares.
- ELISA de captura.
- Inmunodifusión en gel de agar.
- Técnicas de diagnóstico molecular: RT-PCR.

b) *Diagnóstico serológico:* La muestra de elección es el suero. Se analizará por las siguientes técnicas:

- ELISA.
- Seroneutralización.

- **Peste equina africana (PEA)**. Es una enfermedad vírica no contagiosa que afecta a ganado equino, transmitida por medio de insectos del género *Culicoides* y que puede cursar de forma hiperaguda, aguda, crónica o inaparente, con alteraciones respiratorias y circulatorias. Causada por un virus ARN bicatenario segmentado con doble envoltura, incluido dentro de la *familia Reoviridae*, género *Orbivirus*, habiéndose descrito un total de 7 serotipos con estrecha relación antigénica entre sí.

Diagnóstico de laboratorio:

- a) *Diagnóstico virológico (identificación del agente)*: Las muestras de elección son las siguientes: sangre con anticoagulante, muestras de pulmón, bazo y ganglios linfáticos.

Se analizarán por las siguientes técnicas:

- Aislamiento del virus en cultivos celulares.
- ELISA Sándwich directo.
- Técnicas de diagnóstico molecular: RT-PCR.

- b) *Diagnóstico serológico*: La muestra de elección es el suero. Se analizará por las siguientes técnicas:

- ELISA.
- Seroneutralización. Para serotipado.

- **Peste porcina clásica (PPC)**, es una enfermedad altamente contagiosa que afecta a suidos, tanto domésticos como salvajes. Está causada por un virus ARN de la *familia Flaviviridae*, género *Pestivirus*, y se caracteriza por originar lesiones hemorrágicas y tener normalmente un curso fatal en sus formas agudas, afectando a animales de todas las edades. La PPC debe ser descartada ante cualquier caso que curse con cuadro hemorrágico (diagnóstico diferencial con otras enfermedades hemorrágicas, la más importante la peste porcina africana (PPA)) o de sintomatología nerviosa (diagnóstico diferencial con la enfermedad de Aujeszky (ADV)). La mortalidad y morbilidad suelen ser muy elevadas, si bien también se han descrito cepas de menor virulencia que causan infecciones crónicas o leves, con importantes pérdidas de neonatos y alteraciones de la fertilidad.

A nivel nacional hay un Programa de vigilancia sanitaria porcina en el que se vigilan la PPA, PPC y ADV en explotaciones porcinas y en poblaciones de jabalíes. En los últimos años este programa se ha reforzado dada la situación de la PPA en la Unión europea.

Diagnóstico de laboratorio:

- a) *Diagnóstico virológico (identificación del agente)*: Las muestras de elección son las siguientes: sangre con anticoagulante, tonsilas, ganglios linfáticos (retrofaríngeos, mandibulares o mesentéricos), pulmón, bazo, riñón, íleon y hueso largo o esternón (muestra de médula ósea).

Se analizarán por las siguientes técnicas:

- Aislamiento del virus en cultivos celulares. Los *Pestivirus* no producen efecto citopático.

- ELISA de captura para detección de antígenos virales.
 - Técnicas de diagnóstico molecular: RT-PCR y tipificación genética de las cepas aisladas del virus.
- b) **Diagnóstico serológico:** La muestra de elección es el suero. Se analizará por las siguientes técnicas:
- ELISA. Técnica utilizada en la vigilancia activa de la enfermedad.
 - Neutralización del virus con marcado inmunológico (NPLA). Es la técnica de confirmación serológica. Los sueros con resultado positivo o dudoso a ELISA se analizan por NLPA.
- **Peste porcina africana (PPA)** es una enfermedad de carácter hemorrágico y altamente contagioso que afecta exclusivamente al ganado porcino, tanto doméstico como salvaje, de todas las razas y edades. Está causada por un virus ADN de la familia *Asfarviridae*, género *Asfivirus*, existiendo cepas que pueden provocar cuadros agudos o hiper agudos con niveles de mortalidad y morbilidad próximos al 100%, si bien otras cepas cursan con cuadros clínicos subagudos o incluso crónicos con menor mortalidad. A diferencia de la PPC, no cursa con cuadros nerviosos. La PPA y la PPC sólo se pueden diferenciar a nivel laboratorial.
- 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*, actúan como vectores y como reservorios del virus.
- El jabalí también es susceptible a la infección del virus y origina un cuadro clínico similar al observado en el cerdo. 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.

Diagnóstico de laboratorio:

- a) **Diagnóstico virológico (identificación del agente):** Las muestras de elección son las siguientes: sangre con anticoagulante, tonsilas, ganglios linfáticos (retrofaríngeos, mandibulares o mesentéricos), pulmón, bazo, riñón y hueso largo o esternón (muestra de médula ósea). También garrapatas del género *Ornithodoros*.
- Se analizarán por las siguientes técnicas:
- Aislamiento del virus en cultivos primarios de leucocitos de porcino.
 - Técnica de hemoadsorción.
 - Detección de antígeno mediante la prueba de inmunofluorescencia directa (FAT)
 - Técnicas de diagnóstico molecular: PCR y tipificación genética de las cepas aisladas del virus.
- b) **Diagnóstico serológico:** La muestra de elección es el suero. Se analizará por las siguientes técnicas:
- ELISA. Técnica utilizada en la vigilancia activa de la enfermedad.
 - Inmunofluorescencia indirecta.

- Técnica de inmunoperoxidasa (IPT).
- Técnica de inmunoblotting (IB)

Los sueros con resultado positivo o dudoso a la técnica de ELISA se analizan por las técnicas de confirmación serológica IPT e IB.

3.1.2. ENFERMEDADES BACTERIANAS:

- **Perineumonía contagiosa bovina (PCB)**, es una enfermedad respiratoria contagiosa caracterizada por originar perineumonía fibrinosa en el ganado bovino y otros ruminantes, causada por *Mycoplasma mycoides* subespecie *mycoides* SC (biotipo bovino), que normalmente se transmite por vía inhalatoria tras un contacto estrecho entre animales. Se manifiesta con anorexia, fiebre y signos respiratorios, aunque pueden existir infecciones asintomáticas.

Diagnóstico de laboratorio:

a) *Diagnóstico bacteriológico (identificación del agente)*: Las muestras de elección son las siguientes: sangre; secreciones nasales tomadas mediante un hisopo con medio de transporte y/o lavados alveolares, fluido pleural, pulmón; ganglios linfáticos mediastínicos; y líquido sinovial en animales con artritis.

Se analizarán por las siguientes técnicas:

- Cultivo en medio de crecimiento de micoplasmas (hasta 10 días por pase).
- Identificación mediante: inmunofluorescencia, pruebas metabólicas, inhibición de crecimiento y PCR.

b) *Diagnóstico serológico*: La muestra de elección es el suero. Se analizará por las siguientes técnicas:

- Fijación de Complemento (FC) de Campbell & Turner modificada. En muestras pareadas.

- **Pleuroneumonía contagiosa caprina (PCC)**, es una enfermedad infecciosa muy contagiosa ocasionada por *Mycoplasma capricolum* subsp. *capripneumoniae* (Mccp), antiguo biotipo F-38, que afecta a los pequeños ruminantes produciendo un cuadro respiratorio grave y frecuentemente fatal.

Diagnóstico de laboratorio:

a) *Diagnóstico bacteriológico (identificación del agente)*: Las muestras de elección son las siguientes: tejido pulmonar y líquido pleural y ganglios linfáticos.

Se analizarán por las siguientes técnicas:

- Cultivo en medio de crecimiento de micoplasmas (hasta 10 días por pase).
- Identificación mediante: PCR.

3.2. ENFERMEDADES CATEGORÍA C

Del **Reglamento Delegado (UE) 2020/689**, destacamos dos artículos relacionados con la Categoría C de enfermedades:

Artículo 6: Indica que en el anexo III se establecen los métodos de diagnóstico para la concesión y mantenimiento del estatus de libre de enfermedad con respecto a determinadas enfermedades de animales terrestres, entre otras enfermedades, para la LEB, RIB/VPI, ADV y DVB.

Estos métodos son lo que se indicarán en la información recogida en el tema sobre estas enfermedades.

Artículo 12: Recoge los artículos de la norma en los que se establece la estrategia de control de enfermedades para la erradicación de enfermedades de categoría B y C en animales terrestres, entre otras enfermedades, para LEB, RIB/VPI, ADV y DVB y lengua azul.

3.2.1. Enfermedades víricas

- **Infección por el virus de la lengua azul (serotipos 1-24)**, enfermedad producida por un virus ARN de la familia Reoviridae, género Orbivirus, que afecta a los rumiantes tanto domésticos como salvajes (afecta principalmente a ovinos además de bovinos, caprinos, bufálidos, antílopes, cérvidos, camélidos, entre otros), originando cuadros clínicos agudos o subagudos en la especie ovina, con inflamación de las membranas mucosas, hemorragias y edemas. Se transmite por la picadura de ciertas especies de mosquito del género Culicoides donde la gravedad de la enfermedad varía según la especie y serotipo.

Diagnóstico de laboratorio:

a) *Diagnóstico virológico (identificación del agente):* Las muestras de elección son las siguientes: sangre con anticoagulante, de abortos o nacidos muertos se tomarán muestras de bazo, hígado, ganglios linfáticos, y sangre cardiaca.

Se analizarán por las siguientes técnicas:

- Aislamiento del virus en cultivos celulares y en embrión de pollo.
- Técnicas de diagnóstico molecular: RT-PCR y secuenciación.

b) *Diagnóstico serológico:* La muestra de elección es el suero. Se analizará por las siguientes técnicas:

- ELISA.
- Seroneutralización.

- **Rinotraqueítis infecciosa bovina/vulvovaginitis pustular infecciosa (RIB/VPI)** (causada por un virus ADN, Familia Herpesviridae, género Varicellovirus, Herpevirus de tipo 1 (VHBo-1))

Métodos de diagnóstico serológico que recoge el Reglamento:

1. *Bovinos no vacunados:*

- ✓ I-ELISA para el HVBo-1: muestras individuales de suero y muestras de leche.
- ✓ B-ELISA basado en la gB: muestras individuales de suero y muestras individuales de jugo de carne.

2. *Bovinos vacunados con estrategia DIVA con una vacuna de delección de la glucoproteína E:*

- ✓ B-ELISA basado en la gE: muestras individuales de suero y muestras individuales de jugo de carne.

- **Diarrea vírica bovina (DVB)** (causada por un virus ARN, género Pestivirus, familia Flaviviridae).

Métodos de diagnóstico que recoge el Reglamento:

1. *Métodos directos:*

- a) RCP-RT en tiempo real.
- b) ELISA para la detección del antígeno del virus de la DVB.

2. *Pruebas serológicas:*

- a) I-ELISA
- b) B-ELISA

- **Leucosis bovina enzoótica (LBE)** (causada por un virus ARN, virus de la leucemia bovina (VLE), familia Retroviridae).

Métodos de diagnóstico serológico que recoge el Reglamento:

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) I-ELISA

b) *pruebas para muestras de leche:*

- i) I-ELISA

- **Infección por el virus de la enfermedad de Aujeszky (ADV)** (causada por un virus ADN, género Varicellovirus, familia Herpesviridae).

Métodos de diagnóstico serológico que recoge el Reglamento:

1. *Porcinos no vacunados:*

- ✓ ELISA para virus la enfermedad de Aujeszky: muestras individuales o mezclas de hasta cinco muestras de suero (o plasma), muestras individuales o

mezclas de hasta cinco muestras en papel de filtro y muestras individuales de jugo de carne.

2. Porcinos vacunados con estrategia DIVA con una vacuna de delección de la glucoproteína E:

- ✓ ELISA basado en la gE: muestras individuales de suero.

3.3. ENFERMEDADES CATEGORIA D+E

3.3.1. Enfermedades víricas

- **Enfermedad hemorrágica epizootica** (causada por un virus ARN, género *Orbivirus* familia *Reoviridae*).
- **Arteritis viral equina** (causada por un virus ARN del género *Arterivirus*, familia *Arteriviridae*).
- **Anemia infecciosa equina** (causada por un virus ARN del género *Lentivirus*, Familia *Retroviridae*).
- **Síndrome disgénico y respiratorio porcino** (causada por un virus ARN del género *Arterivirus*).

Como técnicas de diagnóstico para las enfermedades víricas destacan:

- a) Diagnóstico virológico: Aislamiento en cultivos celulares y RT-PCR (para virus ARN).
- b) Diagnóstico serológico: ELISA, inmunofluorescencia indirecta, ELISA, AGID.

3.3.2. Enfermedades bacterianas

- **Epididimitis ovina** (causada por *Brucella ovis*).
- **Metritis contagiosa equina** (causada por el agente *Taylorella equigenitalis*).
- **Micoplasmosis aviar** (causada por *Mycoplasma gallisepticum* y *M. meleagridis*).

Como técnicas de diagnóstico para las enfermedades víricas destacan:

- a) Diagnóstico bacteriológico: Cultivo técnicas de identificación, PCR.
- b) Diagnóstico serológico: ELISA, inhibición de la hemaglutinación, Fijación de complemento.

3.3.3. Enfermedades parasitarias

- **Surra** (causada por *Trypanosoma evansi*).
- **Tricomosis** (causada por *Trichomonas foetus*).
- **Durina** (causada por *Trypanosoma equiperdum*).

Como técnicas de diagnóstico para las enfermedades parasitarias destacan:

- a) Diagnóstico directo: observación al microscopio y tinción, PCR.
- b) Diagnóstico serológico: ELISA, Fijación de complemento.

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 (OIE)
<https://www.woah.org/es/que-hacemos/normas/codigos-y-manuales/acceso-en-linea-al-manual-terrestre/>

MATERIAL NO OFICIAL

MATERIAL PARA LA PREPARACIÓN DEL TEMA 43

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 rhabdovirus 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 primavera 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 spora 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>Sprivirus</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 epizootico.**

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 zoonosarios 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%. |
| | Frótis 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 -20° 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 70-80° para la identificación del parásito. |
| Análisis virológicos | Fragmentos de tejidos usando bisturí estéril 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 estéril 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 Epizootico (*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 serosanguinolento 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.

<https://www.oie.int/es/que-hacemos/normas/codigos-y-manuales/acceso-en-linea-al-manual-acuatico/>

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

Patología en Acuicultura, J. Espinosa de los Monteros U. Labarta (editores). Plan de Formación de Técnicos Superiores en Acuicultura (FEUGA) 1988

MATERIAL PARA LA PREPARACIÓN DEL TEMA 44

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.

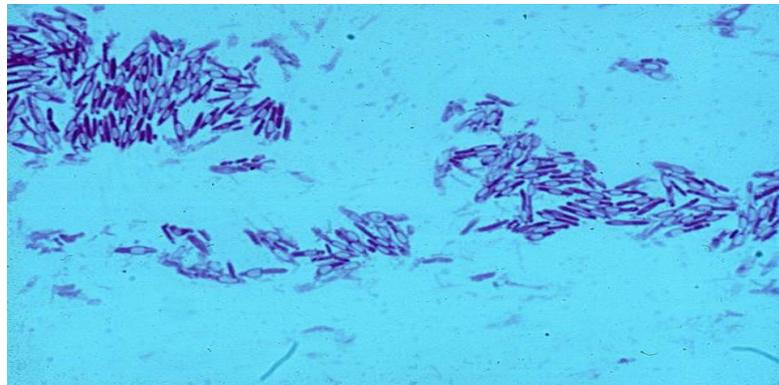
Las abejas, al igual que los animales, son sensibles a las bacterias, virus y parásitos. Aunque ninguna enfermedad de las abejas es zoonótica para el ser humano. Muchas de las enfermedades que afectan a las abejas, han sido relacionadas con pérdidas de colmenas en todo el mundo con el consiguiente impacto 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)

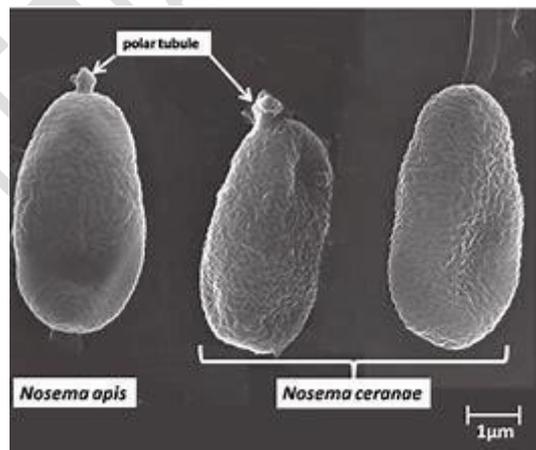
1.3.2. Nosemiosis

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/tropilaeptosis/tropilaelaps.aspx#prettyPhoto\[pp_gall\]/9/](https://www.mapa.gob.es/es/ganaderia/temas/sanidad-animal-higiene-ganadera/sanidad-animal/enfermedades/tropilaeptosis/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

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 epiteliales 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 | - | - | - | - | - | - |
| viris 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 | - | - | - |
| Varroosis (<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*), Tropilaeptosis (*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 μ 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 μ 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 CO₂, 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 (CO₂) 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-eec5e172939f_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 45

**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^{sc}) 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 con 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

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

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

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/>