

**PROGRAMAS NACIONALES  
DE ERRADICACIÓN:  
BRUCELOSIS BOVINA Y  
BRUCELOSIS OVINA Y  
CAPRINA**



**MANUAL DE TOMA DE MUESTRAS  
PARA EL DIAGNÓSTICO ETIOLÓGICO  
DE BRUCELOSIS  
POR MÉTODOS BACTERIOLÓGICOS  
(aislamiento, identificación y caracterización genética)**

# Índice

<b>Introducción</b>	<b>3</b>
<b>A. Recomendaciones generales</b>	<b>4</b>
<b>B. Tipo de muestras</b>	<b>5</b>
<b>B.1. Muestras en el animal vivo</b>	<b>5</b>
<b>B.2. Muestras en el cadáver</b>	<b>6</b>
<b>B.3. Muestras fetales</b>	<b>7</b>
<b>Verificaciones prácticas</b>	<b>8</b>
<b>Referencias</b>	<b>9</b>
<b>Anexo I</b>	<b>10</b>
<b>Anexo II</b>	<b>12</b>

# Introducción

*Este Manual es consecuente con las directrices de la OIE y con la Normativa Nacional y de la UE.*

La Brucelosis es una enfermedad infecciosa causada por bacterias encuadradas taxonómicamente en el Género *Brucella*. En España, la Brucelosis bovina ha sido una enfermedad causada por *Brucella abortus* y menos frecuentemente por *B. melitensis* mientras que el agente etiológico de la Brucelosis ovina y caprina ha sido casi exclusivamente *B. melitensis*. En los últimos años se han producido casos esporádicos por *B. suis* en bovino y ovino.



De acuerdo con el Manual de Pruebas de Diagnóstico y Vacunas de la OIE, clínicamente, la enfermedad se caracteriza por uno o más de los síntomas siguientes: aborto, retención de placenta, orquitis, epididimitis y, raramente artritis, con excreción de los microorganismos en las descargas uterinas y en la leche. El diagnóstico depende del aislamiento de *Brucella* del material infeccioso de los abortos, de las secreciones de la ubre y de tejidos analizados *post-mortem*. En las campañas oficiales de erradicación se realiza un diagnóstico preliminar determinando la respuesta serológica frente a los antígenos de *Brucella*. Cuando la prevalencia es muy baja en una región, el aislamiento y caracterización taxonómica, de biovariedades y de secuenciación, constituyen una herramienta epidemiológica de gran valor. Igualmente, los presuntos falsos reaccionantes positivos en zonas libres han de investigarse en profundidad (ver Guía).

El diagnóstico de la brucelosis debe siempre centrarse en la unidad epidemiológica, que debe ser el referente en la planificación de las labores de diagnóstico. El diagnóstico etiológico de la enfermedad permite confirmar la infección, aunque debido a su limitada sensibilidad el resultado negativo no permite excluir la presencia de la infección en la unidad epidemiológica.



**Retención placentaria**



# A. Recomendaciones generales

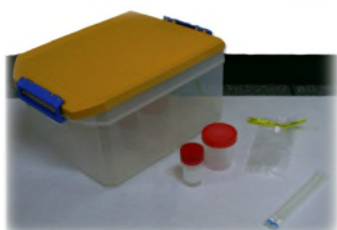
El éxito en la investigación etiológica del Género *Brucella* depende de la naturaleza y frescura de las muestras, el adecuado acondicionamiento y conservación durante el transporte de las mismas, y de las Buenas Prácticas de Laboratorio para su aislamiento.

En la medida de lo posible, las bacterias del Género *Brucella* deben aislarse en medios simples o selectivos, por cultivo a partir de flujos uterinos, placenta, fetos abortados, secreciones mamarias, semen o tejidos seleccionados, como linfonódulos y órganos reproductores masculinos y femeninos.

Las técnicas de PCR directo todavía no son tan sensibles como el aislamiento bacteriológico estándar

**La toma de muestras para investigación del germen debe acompañarse de la toma simultánea de sangre sin anticoagulante.**

## Toma de muestras, acondicionamiento e identificación



Como norma general, las muestras se tomarán bajo unas mínimas condiciones de asepsia, se acondicionarán en tubos o frascos apropiados estériles que se desinfectarán externamente. Los tapones de rosca de los frascos se sellarán con cinta de carrocero o similar y se almacenarán en neveras isoterma con dispositivos acumuladores de frío o en condiciones de refrigeración (+2-8°C).

En cada envase debe indicarse la identificación completa del animal, tipo de muestra biológica y fecha de recogida.

## Transporte de muestras al laboratorio

Las muestras para la investigación etiológica se congelarán ( $\leq -20^{\circ}\text{C}$ ) (no así la sangre sin anticoagulante para estudios serológicos), si no se prevé la llegada al Laboratorio el mismo día en que se toman. Igualmente, se congelarán ( $-20^{\circ}\text{C}$ , y si es posible,  $-80^{\circ}\text{C}$ ) a la llegada al Laboratorio si no se analizan en dos días.

## Condiciones de Seguridad biológica

Durante todo el proceso se observará la normativa vigente, incluso en materia de seguridad e higiene en el trabajo, y de transporte de sustancias con riesgo biológico.



La documentación que acompañe a las muestras no debe estar en contacto con las mismas y se debe adherir en sobre cerrado al exterior del paquete de envío.

## B. Tipo de muestras

Las probabilidades de aislamiento se incrementan a medida que se muestrea un mayor número de órganos y linfonódulos del animal infectado.

En el caso del cadáver, por razones prácticas y de seguridad, es necesario ceñirse a los tipos de muestras que a continuación se relacionan, teniendo presente que la toma de las mismas en el ganado bovino es en el matadero, y en el caso del ganado ovino y caprino puede ser en la propia explotación, y en otras ocasiones el matadero.



### B.1. Muestras en el animal vivo:

- Sangre sin anticoagulante (tubo estándar de 5 ml).
- Sangre con anticoagulante (EDTA) (tubo estándar de 5 ml).
- Escobillón vaginal en tubo con medio de transporte (Amies).
- En el caso de hembras en lactación, leche (2 tubos estándares de 5 ml).

## B.2. Muestras en el cadáver:

- Sangre sin anticoagulante (tubo estándar de 5 ml).
- Sangre con anticoagulante (EDTA) (tubo estándar de 5 ml).
- Escobillón vaginal en tubo con medio de transporte (Amies).
- Linfonódulos supramamarios, o inguinales en el caso del macho (frascos con tapón de rosca de 50-100 ml de capacidad).
- Parénquima mamario colindante con la cisterna al pezón (frascos con tapón de rosca de 50-100 ml de capacidad)
- Leche (tubo estándar de 5 ml), cuando sea posible.
- En el caso de bovinos sacrificados en matadero, también linfonódulos retrofaríngeos (frascos con tapón de rosca de 50-100 ml de capacidad). Estos últimos se toman durante la inspección sanitaria de la cabeza.
- Bazo (frascos con tapón de rosca), cuando sea posible.
- En el caso de bovinos gestantes, un tubo de líquido amniótico obtenido por punción directa o cotiledones placentarios.



Si se trata del sacrificio de un número amplio de animales del mismo rebaño o unidad epidemiológica, se tomarán muestras de al menos 5 animales, preferentemente hembras gestantes o recién paridas con títulos altos a la Reacción de Fijación del Complemento.



En el caso particular de los **animales impúberes** las muestras de elección se centran en torno a la puerta de entrada del agente etiológico (ver Anexo II):

- Ganglios retrofaríngeos
- Ganglios parotídeos
- Ganglios mandibulares

### B.3. Muestras fetales

Si bien estas muestras presentan un elevado interés por la información potencial que pueden aportar, el **enorme peligro de contagio y diseminación** a partir de las mismas pone de manifiesto la necesidad de ser conservadores a la hora de manipular muestras de los abortos. Se recomienda recoger para su análisis las siguientes muestras sobre el feto:

- Contenido estomacal, con jeringuilla.
- Bazo, mediante pequeña incisión abdominal (pulmón si no se observa congestión en el bazo).



Aborto por *B. melitensis*



# Verificaciones prácticas:

Las recomendaciones contenidas en este manual se han tomado de la bibliografía disponible, y de la práctica del día a día en el laboratorio.

Por regla general, en animales infectados sólo se produce un aborto. Sin embargo, la persistencia de la infección puede ser de por vida, y los partos sucesivos son generalmente asintomáticos pero las hembras paridas pueden ser excretoras activas de *Brucella*. En cualquier caso, la excreción del agente patógeno y por tanto su diseminación en el medio ambiente y hacia el resto de los animales dura de hecho meses de manera continua, incluso durante casi toda la lactación de manera intermitente a través de leche y flujo vaginal (10, 11).

En bovinos, se ha comprobado que esta intermitencia es extensible incluso a la serología, de tal manera que un animal puede ser simultáneamente portador del agente etiológico y seronegativo. Por esa razón, cuando en una unidad epidemiológica la incidencia es alta tras sucesivas tandas de serodiagnóstico y sacrificio, una de las decisiones a tomar en la campaña puede ser el cambio de manejo o el vaciado sanitario.

La información que la bacteriología aporta en las campañas de erradicación se muestra en los ejemplos prácticos de los Anexos I y II.

En el Anexo I (8) se muestran ejemplos de los resultados de la bacteriología en ovinos de diferentes situaciones epidemiológicas y en rebaños vacunados y no vacunados.

Igualmente, en el Anexo II se muestran algunos ejemplos de los resultados de la bacteriología en focos agudos y crónicos de bovinos no vacunados.



# Referencias

- 1.** Anexo 2 del Real Decreto 2611/1996, modificado por Orden ARM/2166, que traspone la Directiva 64/432/CEE.
- 2.** Directiva 64/432/CEE, relativa a problemas de policía sanitaria en materia de intercambios intracomunitarios de animales de las especies bovina y porcina.
- 3.** Directiva 91/68/CEE, relativa a las normas de policía sanitaria que regulan los intercambios intracomunitarios de animales de las especies ovina y caprina.
- 4.** Office International des Epizooties. Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals. París. Francia.
- 5.** Alton, G.G., JONES, L.M., PIETZ, D.E. 1976. Las técnicas de laboratorio en la brucelosis. Organización Mundial de la Salud. Ginebra.
- 6.** Alton, G.G., JONES, L.M., ANGUS, R.D., VERGER, J.M. 1988. Techniques for the Brucellosis Laboratory. Institut National de la Recherche Agronomique. París. Francia
- 7.** Miguel Ángel González García, Laboratorio de Sanidad Animal de Sevilla, Alberto Pacios, Servicio de Sanidad Animal de la Junta de Andalucía. Comunicación Personal.
- 8.** Álvarez, L., DURÁN, M., GÓMEZ, B., GARRIDO, F., YUSTES, C., VENDRELL, J., DOMINGUEZ, L., FERNÁNDEZ-GARAYZABAL, J.F., VELA, A.I., LATRE, M.V. 2010. Determinación de los tejidos y medios de elección para la confirmación microbiológica de los resultados serológicos de las campañas de control de *Brucella melitensis* en el ganado ovino. *Arch. Med. Vet.* 42 (43-49).
- 9.** Crespo, F.1985. Contribución al estudio de la etiología y la epidemiología de la brucelosis en España. *Tesis Doctoral.*, Facultad de Veterinaria, UCM.
- 10.** Crespo, F. 1994. Brucelosis ovina y caprina. Office International des Epizooties, Paris, France.
- 11.** Animal Brucellosis. 1991. Ac. Press.
- 12.** Marín, C.M., JIMÉNEZ DE BAGÜÉS, M.P., BARBERÁN, M., BLASCO, J.M. 1996. Comparison of two selective media for the isolation of *Brucella melitensis* from naturally infected sheep and goats. *Vet Rec* 38 (409-411).



**LABORATORIO CENTRAL DE  
SANIDAD ANIMAL DE SANTA FE**

SUBDIRECCIÓN GENERAL DE SANIDAD E  
HIGIENE ANIMAL Y TRAZABILIDAD

DIRECCIÓN GENERAL DE SANIDAD DE LA  
PRODUCCIÓN AGRARIA



PROGRAMAS NACIONALES DE ERRADICACIÓN:  
BRUCELOSIS BOVINA Y BRUCELOSIS OVINA Y CAPRINA