



MANERA APROPIADA PARA RECOLECTAR Y MANEJAR LAS MUESTRAS PARA DIAGNÓSTICOS

PARTE 1: SEROLOGÍA Y TOMA DE MUESTRAS DE SANGRE

Las muestras para diagnósticos se utilizan para determinar el estado de salud o para identificar patógenos específicos en lotes de pollonas, ponedoras y reproductoras. Las pruebas de rutina incluyen muestras de sangre, suero, tejidos y muestras de gasas o hisopos en formalina: traqueal, orofaríngeal, cloacal, de órganos y articulaciones. Para investigaciones específicas, se puede utilizar las tarjetas FTA (Tecnología Rápida para el Análisis de los ácidos nucleicos) para recolectar médula de las plumas, sangre o hisopados de cualquier tipo.

ENTREGA DE MUESTRAS

Cuando se envían muestras a un laboratorio de diagnóstico, es importante proporcionar la información completa y relevante del lote en el formulario de presentación al laboratorio. La información crítica que debe acompañar a todos los envíos de muestras para diagnóstico incluyen:

- Identificación y ubicación del lote
- Edad del lote
- Fecha en que se tomaron las muestras
- Programa de vacunación
- Historia del lote, incluyendo problemas de salud o de producción

Esta información es esencial para que el veterinario y la persona que hace el diagnóstico puedan hacer una interpretación significativa de los resultados serológicos o del diagnóstico y proporcionar recomendaciones que mejoren la salud y/o la producción del lote.

Resumen de las Normas Apropriadas para Recolectar Suero

- Seleccione aves representativas normales (10 a 20 muestras de suero), a menos que este trabajando en un diagnóstico.
- Tome de 2.0 a 3.0 ml de sangre de cada ave.
- Las muestras que se toman con una aguja son más limpias que con un bisturí.
- No dañe las muestras forzando el paso de la muestra de sangre de la aguja al tubo.
- Asegúrese que la sangre corra por un lado del tubo y coloque los tubos casi planos hasta que se forme el coágulo.
- Deje la sangre en el tubo de 10 a 12 horas a una temperatura aproximada de 80°F (27°C).
- La sangre no debe manipularse o agitarse bruscamente mientras se forma el coágulo o va a ocurrir la hemólisis.
- Remueva el coágulo cuidadosamente, o saque el suero.
- No envíe las muestras sin remover antes el coágulo.
- Mantenga las muestras de suero frías y envíelas inmediatamente al laboratorio en un paquete con hielo o en un paquete frío.

Edades para tomar muestras de sangre en lotes de reproductoras:

1. 10 a 12 semanas
2. A la hora de trasladar el lote (de crecimiento la granja de postura)
3. Cada 10 a 12 semanas durante la etapa producción

Edades para tomar muestras de sangre en lotes de ponedoras comerciales:

1. Una vez antes de traslado del lote (de crecimiento a la granja de postura)
2. Cada 10 a 12 semanas durante la etapa de producción

SEROLOGÍA

La serología es el estudio de los niveles de anticuerpos del suero, conocidos también como títulos. El sistema inmunológico desarrolla anticuerpos que circulan en la sangre después de que el ave ha sido expuesta a un antígeno, ya sea por una vacuna o por exposición al patógeno de una cepa de campo. Los anticuerpos se encuentran en la porción del suero de la sangre (la parte líquida después de que se forma el coágulo). El suero está libre de células sanguíneas y de factores coagulantes.

Los títulos de anticuerpos en el suero se utilizan para monitorear la eficacia de los programas de vacunación, evaluar los desafíos de campo, o diagnosticar enfermedades del lote. El valor de esta información depende de la calidad de las muestras de suero que recibe el laboratorio. Las muestras de mala calidad llevan a resultados erróneos y engañosos. La selección de las aves para tomar las muestras de sangre, las técnicas utilizadas para extraer la sangre, y la manipulación de las muestras de sangre y suero influyen en los resultados del laboratorio.

Selección de Aves

Para pruebas serológicas de rutina, las muestras de suero deben recolectarse de aves normales y sanas. No utilice las aves de descarte, enfermas o que aparentan estar estresadas, ya que sus títulos no representan típicamente el estado general de la salud del lote. Durante la investigación de una enfermedad potencial, las muestras de sangre deben tomarse de las aves que están exhibiendo los signos clínicos o lesiones del patógeno o síndrome sospechado.

En los alojamientos con sistemas de jaulas, es importante seleccionar aves de varias partes del galpón. Cuando un lote se inscribe en un programa de pruebas de rutina, se recomienda tomar las muestras de sangre de las mismas aves (o de las mismas jaulas). Esto reduce la variabilidad de los resultados cuando se comparan con las muestras de sangre de diferentes aves cada vez que se hacen pruebas. En los alojamientos en piso, es más difícil identificar a las mismas aves. Se pueden utilizar bandas en las alas o pintar las plumas lo cual puede ayudar a que la recolección de sangre sea consistente.

Número de Muestras

Deben tomarse veinte muestras de suero de buena calidad para el perfil de rutina del lote y para la investigación de enfermedades; sin embargo, un mínimo de 10 muestras puede ser suficiente para estimar los títulos de anticuerpos.

Edades para tomar las muestras

Para un monitoreo de rutina, la primera muestra de sangre debe tomarse de las 10 a las 12 semanas de edad. A esta edad, el lote de pollonas ha tenido la oportunidad de responder a las vacunaciones vivas tempranas y los anticuerpos maternos ya no están presentes. Los títulos de los anticuerpos de este grupo de edad pueden utilizarse para evaluar el estado inmune en general de un lote joven y el efecto de las vacunas vivas utilizadas en los programas de vacunación. Esta evaluación serológica temprana puede detectar el desafío potencial de una enfermedad en el galpón de crecimiento.

Otro momento importante para evaluar los títulos de los anticuerpos es inmediatamente después de trasladar las aves al galpón de postura. Este es un buen momento para verificar la respuesta inmune del lote contra *Mycoplasma gallisepticum* (MG), *Mycoplasma sinoviae* (MS), Enfermedad de Newcastle (NDV), Bronquitis infecciosa (IB), encefalomiелitis aviar (AE), e influenza aviar (AI). En reproductoras, el momento del traslado también es un tiempo ideal para evaluar la seroconversión adecuada para aves con el virus de anemia (CAV) y encefalomiелitis aviar (AE). La toma de suero antes del traslado establece un nivel básico de los títulos de un lote que se trasladó a un complejo de edades múltiples. La respuesta de los títulos de las vacunas inactivadas (muertas) llegará a su máximo de 3 a 5 semanas después de la vacunación. Supervisar los lotes durante el período de producción, con un intervalo de 10 a 12 semanas es suficiente para controlar los cambios en los niveles de los títulos de los anticuerpos.

Durante la investigación de un brote de enfermedad, se deben tomar muestras de sangre cuando se observan por primera vez los signos clínicos de la enfermedad, seguido de una muestra de sangre adicional de las mismas aves de 3 a 5 semanas después. Este período de tiempo permite la producción de anticuerpos específicos contra un agente patógeno potencial. La comparación de los títulos de estas muestras de suero puede demostrar cambios significativos en los títulos para un patógeno sospechoso.

Conservando la primera muestra de suero (por medio de congelación) para analizarla al mismo tiempo que la segunda muestra se reduce la variación de la prueba de laboratorio debido a factores externos o cambios en los reactivos. Se puede utilizar una táctica similar para controlar la eficacia de las vacunas muertas dadas en un programa de pollonas.

Volumen de la Muestra de Sangre

Utilizando una técnica apropiada para la recolección y manipulación, 2,0 a 3,0 mililitros (ml o cc) de sangre producirán 1,0 a 1,5 ml de suero. Este volumen de suero es suficiente para hacer las pruebas de rutina de ELISA para la enfermedad de Newcastle, bronquitis infecciosa, enfermedad infecciosa de la Bursa (IBD Gumboro) AE y AI por medio de inmunodifusión en gel de agar (AGID), también para MG, MS y pullorum-tifoide (PT) por medio de la prueba en placa de aglutinación. Debe mantenerse suficiente suero congelado como reserva, en caso de que se requiera una prueba adicional en el futuro.

Equipo Utilizado para extraer Sangre

Se utilizan jeringas desechables estériles de 3 o 5 cc dependiendo del tamaño de la muestra que se va a obtener. El tamaño de la aguja depende del sitio anatómico utilizado para extraer la sangre.

Sito para extraer sangre	Largo de la aguja	Calibre de la aguja
Vena del Ala	0.5–1.0 inch (1.25–2.54 cm)	Calibre de 20 a 22
Punción cardíaca	1.5 inch (3.81 cm)	Calibre de 18 a 20

Utilice siempre agujas desechables y reemplácelas cada 5 a 10 aves. Las agujas sin filo causan trauma en el tejido y es más difícil entrar en la vena. Todo el equipo utilizado para recolectar sangre debe cambiarse entre lote y lote para eliminar el potencial de la transmisión de enfermedades. Enjuague la jeringa con agua destilada después de usarla entre ave y ave para prevenir que la aguja se tape con sangre. Los tubos estériles de plástico o vidrio de 3.0 ml con tapas herméticas son ideales para la recolección y almacenamiento de sangre, ya que permiten la coagulación adecuada de las muestras. Tubos similares son ideales para el almacenamiento de suero.



Figura 1. Las agujas desechables deben cambiarse cada 5 a 10 aves para prevenir trauma en el tejido y la contaminación cruzada.



Figura 2. Las jeringas desechables de 5 ml y las agujas calibre 22 son ideales para extraer sangre de la vena del ala de las aves adultas.



Figura 3. Tubo de plástico con tapa, ideal para separar el suero y transportar la muestra. Volumen apropiado (1.0 ml), el suero es de color ambar transparente.

MÉTODOS UTILIZADOS PARA EXTRAER SANGRE

1. Método utilizando una aguja en la vena (braquial) del ala

La vena braquial del ala es un sitio aceptable para extraer sangre en aves de 4 semanas de edad o más. En las aves más jóvenes, la vena es demasiado pequeña para poder extraer sangre eficientemente.

PASO 1



Figura 4. Tome el ave de las dos patas.

PASO 2



Figura 5. Coloque las patas debajo del codo de la mano que no domina.

PASO 3



Figura 6. Las manos deben quedar libres para tener acceso debajo del ala.

PASO 4



Figura 7. Quite las plumas para poder ver bien la vena braquial.

PASO 5



Figura 8. Visualice la vena braquial.

PASO 6



Figura 9. Oriente la aguja alineada con la vena, con el bisel apuntando hacia arriba, con la punta de la aguja apuntando hacia la punta del ala.

Método utilizando una aguja en la vena (braquial) del ala (continuación)

PASO 7

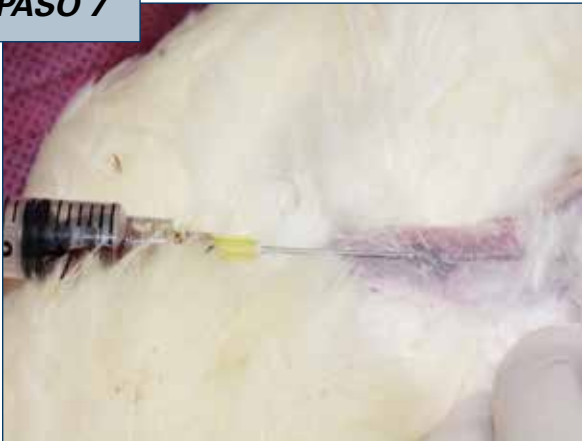


Figura 10. La aguja debe insertarse primero bajo la piel y luego dentro de la vena entre el codo y las articulaciones del hombro.

PASO 8



Figura 11. Si la aguja está en la vena braquial, la sangre fluirá en la jeringa con un mínimo jalón del émbolo. Si jala el émbolo con demasiada fuerza va a crear alta presión negativa, provocando que la vena se colapse y se detenga el flujo de sangre en la aguja.

PASO 9

Después de sacar la aguja de la vena, aplique presión con el dedo sobre el sitio de la inyección para promover un coágulo rápido. Es común que se forme un hematoma o coágulo de sangre en el área de la inyección.

Todas las agujas deben desecharse en un contenedor designado.

Las agujas nunca deben volver a cubrirse con las tapas.



Figura 12. Si se forma un hematoma antes de obtener suficiente sangre, puede ser necesario parar y tratar de recolectar la sangre de la otra vena braquial del ave. Una vez que se forma el hematoma es casi imposible ver la vena haciendo imposible sacar la sangre.

Si la sangre no fluye en la jeringa:

1. La aguja no está en la vena.
2. La aguja está tapada con un coágulo.
3. La vena ha sido picada y se está formando un hematoma.

2. Punción de la vena utilizando un bisturí

Aunque este método es más rápido para recolectar sangre, tiene el potencial de causar mayor trauma que si se utiliza una aguja y una jeringa.

- a. Se utiliza una navaja #11 insertada en el mango de un bisturí #3 o #4 para realizar la punción de la vena braquial justo arriba de la articulación del codo.
- b. Se utiliza un tubo para recolectar la sangre cuando la hemorragia sale de la cortada. Con este método es más probable que la muestra se contamine con bacteria, moho, etc. Si se limpia la piel con alcohol antes de cortar se puede limitar la contaminación.
- c. Dependiendo del tamaño del corte, este método puede causar un trauma significativo (perdida de sangre, estrés, etc.) al ave, además implica el riesgo de una ruptura de la arteria braquial y del nervio.

3. Métodos de punción cardiaca

Sacar sangre directamente del corazón puede ser una forma rápida de obtener sangre y permite recolectar grandes volúmenes de sangre (4 a 10 ml). Además, se pueden obtener muestras de sangre más limpias comparadas con el método de la vena del ala. El método de punción cardiaca solo debe llevarse a cabo por personal bien entrenado. Una mala técnica en la colocación de la aguja y los repetidos intentos para localizar el corazón pueden resultar en una hemorragia fatal; sin embargo, este riesgo se minimiza con la práctica. Si existe la sospecha de una hemorragia fatal, el ave debe ser humanamente sacrificada sin demora.

a. Vía cardiaca (torácica) anterior

Esta técnica es de una sola persona, se sostiene el ave de las dos patas con una mano mientras se maneja la jeringa con la otra mano. La posición correcta del ave es plana de espaldas con la cabeza del ave extendida hacia abajo sobre el borde de una mesa (o jaula, o sobre la rodilla del manipulador). Utilizando el dedo índice como una guía, la aguja se inserta en la entrada torácica en el punto más alto de la V invertida formada por la clavícula (espoleta). La aguja se mantiene en el mismo plano del hueso de la quilla y en ángulo hacia la cola. Generalmente se inserta toda la aguja (1.5 pulgadas o 3.81 cm, calibre 18) con poca resistencia en el corazón. Mientras se inserta la aguja, se aplica una ligera presión negativa. Cuando la aguja entra al corazón, la sangre fluye con facilidad en la jeringa. Cuando la posición de la aguja es incorrecta, generalmente cuando no está en el mismo plano del hueso de la quilla, puede entrar al tracto respiratorio y el aire entra a la jeringa. El ave puede morir como resultado de una hemorragia en el tracto respiratorio. Si la aguja se inserta incorrectamente, el ave debe ser humanamente sacrificada de una manera apropiada.

b. Vía cardiaca lateral

La vía lateral se practica mediante la inserción de la aguja a través de la pared torácica izquierda. Esto suele ser un procedimiento de dos personas, donde el manipulador coloca al ave plana en una mesa sobre costado derecho, sosteniendo las dos patas en una mano y las dos alas en la otra. El punto de referencia es el surco formado por el borde del músculo de la pechuga (pectoral), donde se pueden palpar las costillas. Se utiliza una aguja de 1.5 pulgadas (3,81 cm), calibre 18. El punto de inserción de la aguja es de aproximadamente 2 pulgadas (5,0 cm) verticales desde el punto del hueso de la quilla. La aguja se mantiene en un ángulo de 90° en el plano del hueso de la quilla. Cuando se utiliza este método, la posición adecuada del ave es muy importante para obtener resultados consistentes. De la misma manera que con el método por vía anterior, si la aguja entra incorrectamente, puede ser necesario sacrificar el ave humanamente antes de que ocurra una hemorragia fatal.

MANEJO APROPIADO DE LAS MUESTRAS DE SANGRE

Una vez obtenida la sangre en la jeringa, la muestra debe transferirse cuidadosamente a un tubo para que se forme el coágulo. La coagulación se produce cuando las células en la sangre se unen por medio del proceso de coagulación y se separa de la porción líquida de la sangre (suero).

- Debe remover la aguja de la jeringa antes de ponerla en el tubo de coagulación. (Figura 13). El forzar la sangre de nuevo a través de la aguja puede romper los glóbulos rojos (hemólisis), lo que resulta en una muestra de mala calidad.
- Inyecte lentamente la sangre en el tubo de coagulación, permitiendo que corra sobre uno de los lados del tubo, lo cual ayuda a la formación del coágulo. La sangre debe colocarse dentro del tubo antes de que inicie el proceso de coagulación.
- No mueva los tubos mientras ocurre el proceso de coagulación. Los tubos deben colocarse en forma casi plana (horizontalmente) para tener una mayor superficie mientras se forma el coágulo (Figura 14). La cantidad de suero que sale de la sangre coagulada depende del área de la superficie para la formación del coágulo. Si mantiene los tubos verticalmente hay una superficie muy pequeña y se produce muy poca cantidad de suero. Utilice un soporte para los tubos de ensayo para mantener los tubos en posición casi plana. Si no tiene un soporte para los tubos de ensayo, entonces use un pedazo de madera perforado con agujeros de un tamaño apropiado o también puede usarse una rejilla de alambre.
- El tiempo para la formación del coágulo depende de la temperatura ambiental a la que se mantengan las muestras. La temperatura ideal para la formación del coágulo es de 80 a 100°F (27 a 38°C). A esta temperatura, la separación del suero toma aproximadamente de 12 a 18 horas. A temperaturas más bajas, el proceso de coagulación es más lento y se reduce el rendimiento de suero.

Las muestras de sangre pueden dañarse y están sujetas a la contaminación de bacterias si se exponen a temperaturas altas por largos periodos de tiempo. Esto puede ocurrir cuando las muestras de sangre se dejan en un automóvil

caliente o cuando están expuestas directamente a la luz del sol.

La contaminación de bacteria y moho pueden causar que el suero tenga una apariencia viscosa con partículas sólidas parecidas al queso. Los microorganismos oportunistas se alimentan de los anticuerpos en el suero y bajan la cantidad de anticuerpos medidos por el laboratorio.

Si las aves están deshidratadas (especialmente en climas cálidos o debido al estrés), producen muestras pobres de suero gelificado. Además, el suero de las aves que han comido recientemente tiene una apariencia turbia debido al exceso de grasa en el suero. Las muestras lipémicas (grasosas) no son ideales para ser analizadas en el laboratorio, ya que la grasa va a interferir con cualquier prueba basada ópticamente o en las pruebas de anticuerpos de fijación tal como la prueba de ELISA.

Cuando la sangre está en el proceso de la formación del coágulo, no debe congelarse. Las muestras no deben agitarse o permitir que rueden. La manipulación brusca de las muestras hace que el suero tenga una apariencia de color rojo o rosado. La hemólisis interfiere con las pruebas de laboratorio que miden los niveles de los anticuerpos. Las muestras que contienen coágulos de sangre no deben enviarse, ya que puede ocurrir una hemólisis en el camino al laboratorio.



Figura 13.



Figura 14.

RECOLECCIÓN Y MANEJO DEL SUERO

Después de que el suero se haya separado del coágulo de sangre, saque el suero del tubo de coagulación y colóquelo en otro tubo, o saque el coágulo del tubo con un palito de madera, (como un palillo de dientes), dejando únicamente el suero en el tubo. El coágulo debe manejarse cuidadosamente durante el proceso de la separación del suero. Las muestras turbias, viscosas o con hemólisis no deben enviarse al laboratorio.

Cuando el suero ha sido separado del coágulo exitosamente, debe mantenerse a una temperatura fría (45°F o 7°C) y enviarse inmediatamente al laboratorio. No congele el suero si va a utilizarlo dentro de 3 a 5 días. Los tubos que contienen las muestras de suero de aves individuales deben permanecer cerrados herméticamente, organizados por lote, en bolsas de plástico selladas y claramente identificadas con etiquetas o con tinta permanente. Las muestras deben enviarse en contenedores aislados de espuma de polietileno con al menos un paquete frío. Es mejor evitar enviar las muestras de suero por correo al laboratorio los jueves o viernes, ya que llegarán al laboratorio durante el fin de semana. El suero que va a almacenarse por largos períodos de tiempo debe congelarse a una temperatura de +14°F a -40°F (-10°C a -40°C).

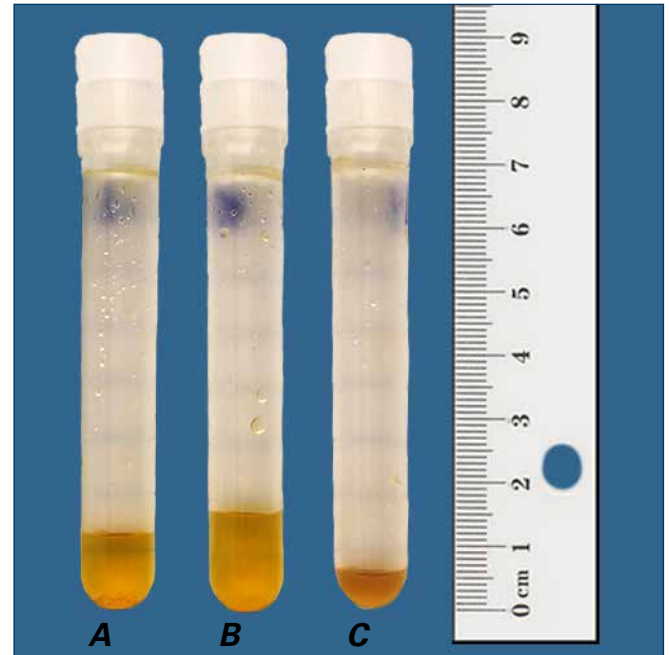


Figura 15. Ejemplos de muestras de suero buenas. Note el color ámbar transparente y el volumen adecuado (>0.25 ml).

No envíe al laboratorio muestras de suero que:

- Contengan menos de 0.25 ml de suero
- Con hemólisis excesiva (rojas)
- Con lipemia excesiva (grasa)
- Con coágulos
- Gelificado viscoso o con partículas parecidas al queso

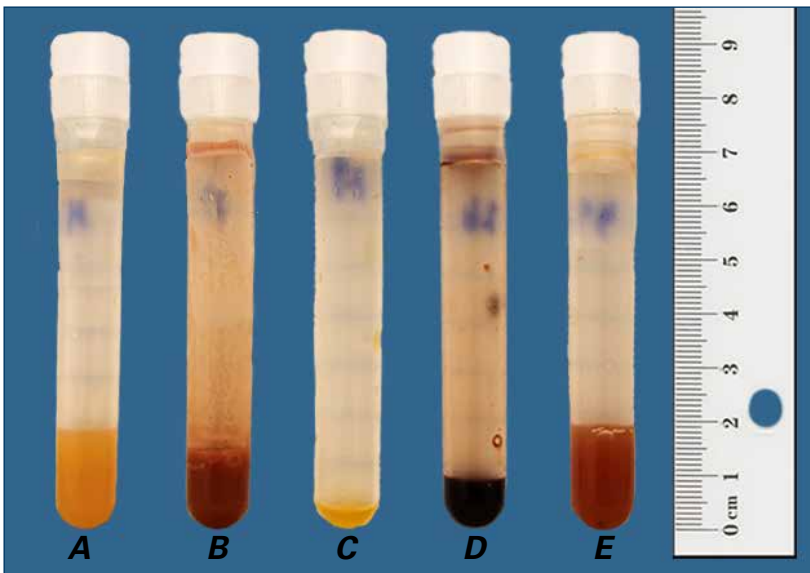


Figura 16. Ejemplos de muestras de suero pobres. A: muestra nebulosa, turbia; B: muestra con lipemia; C: muy poco volumen (>0.25 ml) D: coágulo sin suero; E: muestra con hemólisis.



Hy-Line International | www.hyline.com





MANERA APROPIADA PARA RECOLECTAR Y MANEJAR LAS MUESTRAS PARA DIAGNÓSTICOS

PARTE 2: TARJETAS FTA

Tarjetas FTA

Las tarjetas (FTA) son tarjetas de tecnología rápida para el análisis de ácidos nucleicos que están hechas de un papel especial con químicos que protegen a los ácidos nucleicos (ARN o ADN) de la degradación, mientras eliminan la capacidad infecciosa de los patógenos. Las muestras en las tarjetas FTA se pueden utilizar en la genética molecular para identificar y analizar segmentos específicos del ADN de las aves, y para fines de diagnóstico para detectar el ADN o ARN a partir de bacterias o de virus patógenos. El tamaño compacto de una tarjeta FTA proporciona un medio ideal para transportar muestras tanto nacional como internacionalmente con una aprobación apropiada para su importación. Las tarjetas FTA también proporcionan un medio estable permitiendo almacenar a la temperatura del cuarto las muestras para diagnósticos por largos períodos de tiempo.

Hay dos tipos de tarjetas FTA, cada una con un propósito específico las cuales se pueden obtener a través de la compañía GE Healthcare:

Las tarjetas FTA (WB120205) "clásicas", unen el ADN/ARN y liberan las proteínas cuando son tratadas con los tapones apropiados.

Las tarjetas FTA (WB120410) "Elute" unen las proteínas y liberan el ADN/ARN siguiendo el tratamiento.

Consulte con el laboratorio que va a recibir la muestra antes de tomarla para asegurarse de utilizar la tarjeta FTA del tipo correcto.

Muestras apropiadas para colocarse en una tarjeta FTA y su propósito de diagnóstico:

- Sangre completa – diagnóstico de enfermedades, análisis genético
- Pulpa de la pluma – identificación de patógenos
- Hisopos Cloacales muestras anales de articulaciones y órganos – identificación de patógenos.
- Impresión de tejidos – identificación de patógenos

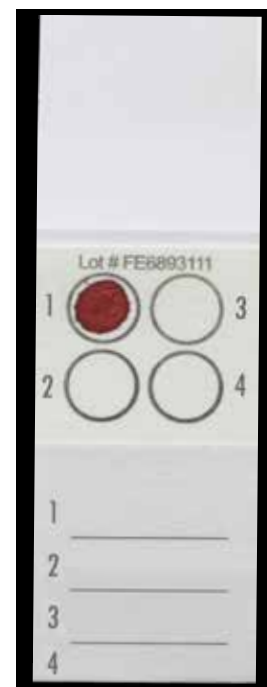


Figura 1.
Tarjeta FTA.

Pasos para la recolección de muestras en una tarjeta FTA:

1. Coloque una muestra en la tarjeta FTA en el lugar designado utilizando una aguja o una jeringa (Figura 2) o con una varita de plástico (Figura 3) y permita que se seque al aire. No es necesario llenar todo el círculo.
2. Pueden colocarse hasta cuatro muestras en una tarjeta FTA. Las muestras colocadas en la misma tarjeta no deben mezclarse (Figura 4), ya que esto ocasiona una contaminación-cruzada de las muestras individuales.
3. Coloque la tarjeta seca en una bolsa de plástico sellada para transportarla.
4. Una esté totalmente la muestra en la tarjeta no presenta ningún riesgo de transportar material infeccioso. Verifique los reglamentos locales para los requisitos de importación de las tarjetas FTA.
5. El laboratorio que recibe la tarjeta FTA procesará las muestras individuales y extraerá el ADN o ARN para realizar el ensayo apropiado que se ha solicitado.
6. Todas las muestras enviadas a Hy-Line International requieren una aprobación previa y los permisos apropiados.

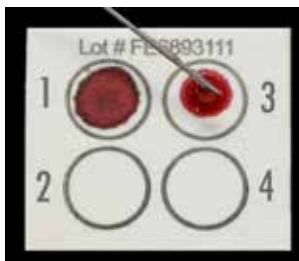


Figura 2. Aplicación con aguja y jeringa.

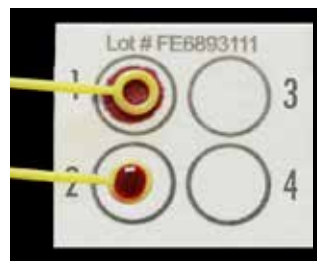


Figura 3. Aplicación con una varita de plástico.



Figura 4. Contaminación-cruzada.

Pasos a Seguir para marcar una impresión de tejido en una tarjeta FTA:

1. Corte una pequeña parte del tejido (5 mm³) para marcar una impresión (Figura 5).
2. Aplique el tejido en el lugar designado presionando con el dedo el tejido contra la tarjeta FTD (Figura 6).
3. Remueva el exceso de tejido para facilitar el secado.
4. Coloque la tarjeta FTD sobre el costado para permitir que la tarjeta se seque al aire (Figura 7). Después de que la muestra esté totalmente seca, colóquela en una bolsa plástica sellada para transportarla.
5. Se pueden aplicar hasta cuatro muestras en una tarjeta FTD. Las muestras colocadas en la misma tarjeta no deben mezclarse para prevenir la contaminación cruzada de las muestras individuales. (Figura 8).



Figura 5. utilice una pequeña muestra del tejido de interés. Las muestras grandes se salen del área designada.

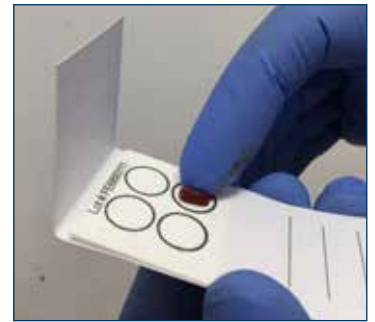


Figura 6. presione suavemente el tejido sobre la tarjeta FTD y remueva el exceso de tejido.



Figura 7. La muestra debe secarse totalmente colocando la tarjeta FTD sobre el costado.

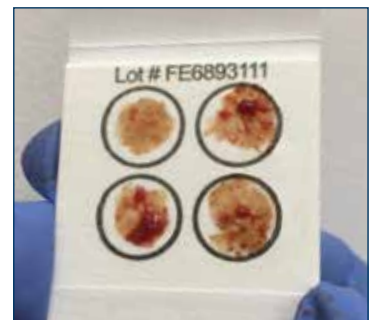


Figura 8. Se pueden aplicar hasta cuatro muestras en una tarjeta FTD.

Cuando se envían muestras a un laboratorio de diagnósticos, es importante proporcionar la información completa y relevante del lote en el formulario de presentación al laboratorio.

Información importante que debe acompañar los envíos de todas las muestras para diagnósticos:

- Identificación del lote y ubicación
- Edad del lote
- Fecha en que se tomó la muestra
- Programa de vacunación
- Historial del lote, incluyendo los problemas pertinentes de salud o producción
- Esta información es muy importante para el veterinario y para la persona que realiza el diagnóstico del lote para poder obtener una interpretación significativa de los resultados serológicos o diagnósticos y proporcionar las recomendaciones para mejorar la salud/ producción del lote.

Beneficios de las Tarjetas FTA:

- Recolección de la Muestra – fácil de realizar
- Seguridad – la muestra está estable y no está infectada
- Transporte – tamaño pequeño, aunque es necesario obtener un permiso internacional
- Almacenamiento – a la temperatura del cuarto



Hy-Line International | www.hyline.com



Las muestras para diagnósticos se utilizan para determinar el estado de salud o para identificar patógenos específicos en los lotes de pollonas, ponedoras y reproductoras. Las pruebas de rutina incluyen muestras de sangre, suero, y tejidos en muestras de gasas o hisopos traqueales, del paladar, orofaríngeos, cloacales, de órganos y articulaciones en formalina. Para investigaciones específicas, se pueden utilizar las tarjetas FTA (Tecnología Rápida para el Análisis de Ácidos Nucléicos) para recolectar médula de las plumas, sangre o hisopados de cualquier tipo.

DIAGNÓSTICO MOLECULAR

La llegada de los diagnósticos moleculares tales como PCR y rt-PCR proporcionan nuevas herramientas para el diagnóstico rápido y preciso de las enfermedades avícolas. Ahora es posible secuenciar el genoma de muchos patógenos. La secuencia nos permite comparar los aislamientos para entender mejor la epidemiología de la enfermedad. Los tejidos, gasas y tarjetas FTA pueden enviarse para realizar diagnósticos moleculares.

ENVIO DE MUESTRAS

Cuando se envían muestras a un laboratorio de diagnósticos, es importante proporcionar la información completa y relevante del lote en el formulario de presentación al laboratorio. Envíe las gasas o hisopos inmediatamente al laboratorio de diagnósticos para su análisis. No congele las muestras.

Recolección en hisopos

El uso de hisopos de algodón o de gasas son métodos efectivos, no invasivos para tomar muestras de Micoplasmas, bacterias, y muchos otros virus. (por ejemplo, bronquitis infecciosa, influenza aviar, laringotraqueitis infecciosa, Newcastle). Las muestras para PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa), aislamiento de virus, aislamiento bacterias o de otras pruebas se pueden obtener por medio de hisopos orales/anales, traqueales, cloacales y de órganos y articulaciones afectados.



Figura 2. Técnica apropiada para restringir un ave mientras se toman muestras orofaríngeas con un hisopo.

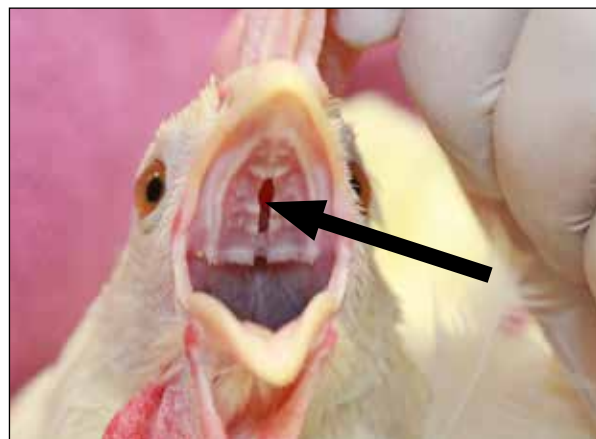


Figura 1. La hendidura del paladar (flecha) está presente en el pico superior.

Información importante que debe acompañar los envíos de todas las muestras para diagnósticos:

- Identificación del lote y ubicación
- Edad del lote
- Fecha en que se tomó la muestra
- Programa de vacunación
- Historial del lote, incluyendo los problemas pertinentes de salud o producción



Figura 3. Asegúrese de meter el hisopo en la hendidura del paladar cuando tome muestras orofaríngeas.

Patógeno(s)	Muestra para PCR	Medio Utilizado	Localización
Influenza Aviar	medio por grupo de 11 hisopos en 5.5 mL medio medio por grupo de 5 hisopos o gasas en 3mL media	BHI (infusión de cerebro corazón)	Traqueal, orofaríngeal
Enfermedad de Newcastle	medio por grupo de 11 hisopos en 5.5 mL medio	BHI	Traqueal, orofaríngeal
Mycoplasma gallisepticum/sinoviae	grupo de 5 hisopos o gasas por reacción de PCR	Seco o BHI medio	Traqueal, orofaríngeal
Bacteria y/o Virus	Únicamente grupo de tejidos de un ave individual, grupo por sistema de órganos (respiratorio, entérico, reproductor)	Medio proporcionado en un tubo de ensayo	Órganos afectados

Para las recomendaciones de como recolectar especímenes de aves para pruebas de diagnósticos virales, vea <http://poultryimprovement.org/documents/WIAV0020.pdf>.

Se recomienda confirmar el hisopo del tipo apropiado y la necesidad del medio de enriquecimiento para la recolección de la muestra y el transporte. La comunicación previa con el laboratorio es importante para asegurar la manipulación correcta y acelerar el proceso. Cuando envíe muestras de hisopos en un medio líquido, tales como infusión de cerebro-corazón (BHI), muchos laboratorios requieren que el hisopo actual no este incluido en el tubo. El procedimiento apropiado en este caso es mover cuidadosamente el hisopo en el medio para que se desprenda el material y después presione el hisopo contra el vidrio del tubo antes de sacarlo para exprimir el exceso de líquido del hisopo que puede contener material patógeno. Dependiendo de la prueba, se pueden poner juntos de 5 a 11 hisopos con muestras individuales sin reducir la sensibilidad del PCR.

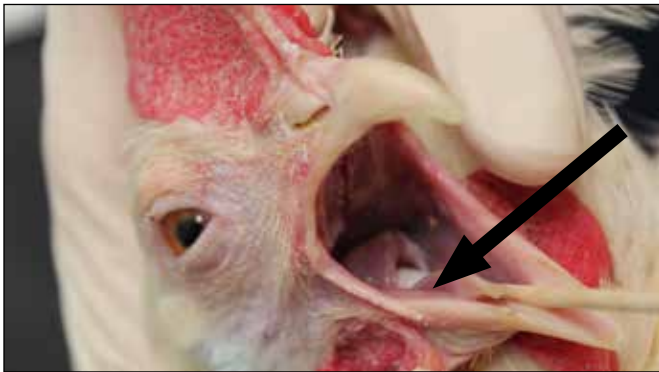


Figura 4. El hisopo se inserta cuidadosamente a través del glotis en la tráquea.



Figura 5. Remueva las plumas y limpie la piel con un algodón con alcohol antes de cortar en la articulación de un ave sacrificada.



Figura 6. Pase el hisopo sobre la superficie sinovial de la articulación afectada.



Figura 7. Exponga la cloaca e inserte el hisopo cuidadosamente en la cloaca y gire el hisopo sobre la superficie de la mucosa.



Hy-Line International | www.hyline.com





MANERA APROPIADA PARA RECOLECTAR Y MANEJAR LAS MUESTRAS PARA DIAGNÓSTICOS

PARTE 4: RECOLECCIÓN Y ENVÍO DE TEJIDOS PARA HISTOPATOLOGÍA

HISTOPATOLOGÍA

La histología se refiere a la evaluación de células y tejidos utilizando un microscopio. La histología proporciona información importante para el diagnóstico de las enfermedades. Como un seguimiento después del examen post-mortem, la histología es una valiosa herramienta para evaluar la salud del lote. Algunas enfermedades avícolas pueden ser diagnosticadas únicamente a través de la histopatología. Por ejemplo, la presentación clínica del virus de la laringotraqueitis infecciosa o de la viruela húmeda en un lote pueden ser virtualmente idénticas, pero las enfermedades causan cambios histopatológicos característicos distintivamente diferentes que permiten un diagnóstico definitivo.

Para poder utilizar exitosamente la histopatología como una práctica de diagnóstico se requiere la disponibilidad de muestras seleccionadas y conservadas apropiadamente.

Recolección de Muestras

Las muestras para histopatología deben ser recolectadas tan pronto como sea posible después de la muerte del ave, para evitar la deterioración de los tejidos. Las muestras de tejidos frescos de aves sacrificadas de una manera humanitaria inmediatamente antes del examen post-mortem proporcionan láminas de la mejor calidad. Si tiene que utilizar la mortalidad para la recolección de tejidos, se debe determinar que los tejidos sean tan frescos como sea posible y que no estén descompuestos.

No tome muestras de aves que han sido previamente congeladas. El proceso de congelación y descongelación puede alterar las características celulares, lo cual conduce a láminas de mala calidad.

Las muestras deben recolectarse utilizando un bisturí o una navaja filosa y esterilizada (Figura 5). Evite utilizar tijeras, ya que pueden aplastar el tejido y destruir los detalles microscópicos.

Una muestra individual no debe ser mayor de 1 cm³ (1x1x1 cm) para permitir que el fijador penetre en el tejido adecuadamente. Las muestras de tejidos más grandes se descomponen en el centro antes de que el fijador (formaldehído) penetre en el tejido adecuadamente.



Figura 4. Equipo utilizado para la recolección de muestras para histopatología.



Figura 5. Utilizando un bisturí para cortar la muestra del tejido.



Figura 1. Después de haber procesado las muestras de tejido y las secciones histológicas se colocan en una lámina de vidrio, y luego un patólogo avícola capacitado examina las secciones del tejido para ver si hay evidencia de la enfermedad.

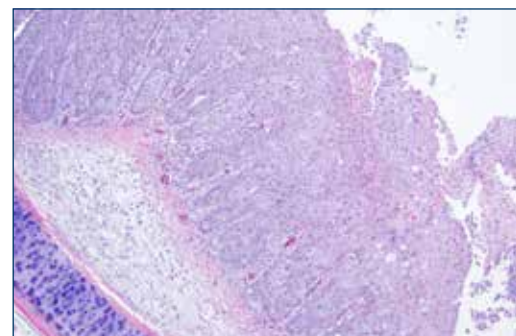


Figura 2. Vista microscópica del tejido de la tráquea.

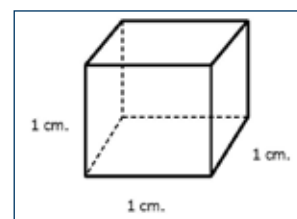


Figura 3. Centímetros cúbicos.



Figura 6. Para preservar el tejido rápido y totalmente, la muestra no debe ser mayor de 1 cm³.

Selección de Muestras

Las muestras para histopatología deben recolectarse en el momento del análisis post-mortem. La selección de las muestras depende de las observaciones hechas durante el examen. Se deben tomar muestras de los tumores y otras masas, decoloraciones, y de órganos agrandados, atrofiados o anormales. Cuando hay sospecha de alguna enfermedad en particular basándose en el historial del lote, los tejidos asociados con esa enfermedad deben ser recolectados, aún cuando tengan apariencia normal. (vea la Tabla 1). Cuando sea posible, deben recolectarse muestras de una sección transversal de todas las partes del órgano afectado.

Se prefiere cortar el tejido desde el margen de la lesión, recolectando tanto los tejidos afectados como los normales. Cuando sea posible, recolecte parte del mismo tejido con apariencia sana para comparar.

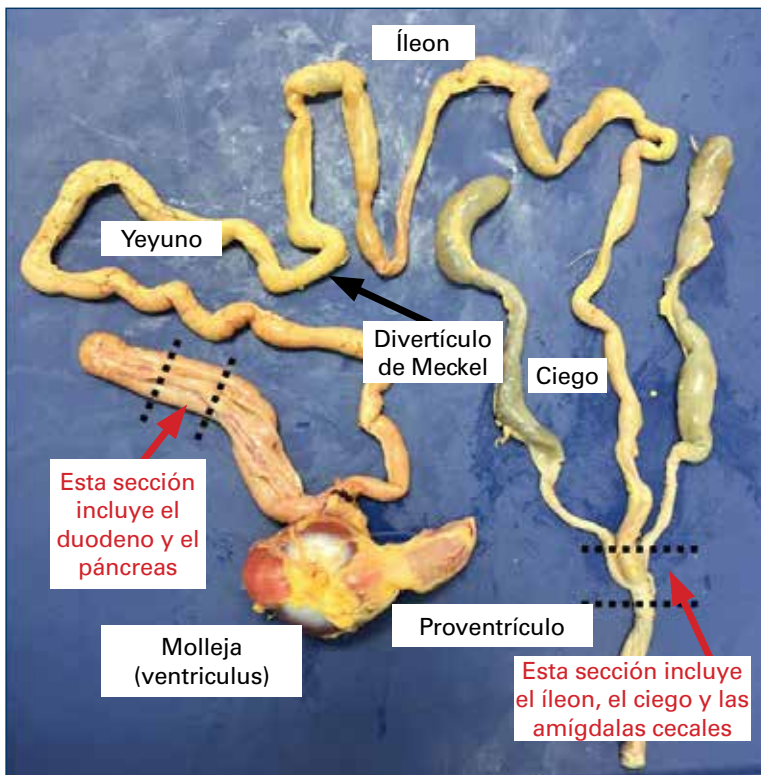


Figura 7. Sitios rutinarios para obtener muestras del tracto gastrointestinal. Corte secciones de 2-3 cm del intestino en el área con lesiones o de otras áreas de interés.

Tomando Muestras para Enfermedades Específicas

Cuando se sospecha de alguna enfermedad en particular basándose en el riesgo regional, o por un resultado sospechoso en las pruebas de vigilancia, o signos clínicos en el lote, deben tomarse muestras de tejidos específicos. La Tabla 1 proporciona ejemplos de algunas enfermedades de preocupación y de las muestras especiales que deben tomarse.

Enfermedad de Preocupación	Muestras Necesitadas
Gumboro (IBD)	<ul style="list-style-type: none"> Bolsa de Fabricio, Timo
Laringotraqueitis Infecciosa	<ul style="list-style-type: none"> Tráquea Laringe Conjuntiva
Enfermedad de Marek	<ul style="list-style-type: none"> Nervio ciático Cerebro Ojo Tumores
Viruela Húmeda	<ul style="list-style-type: none"> Tráquea Laringe
Enteritis (coccidia, necrosis duodenal)	<ul style="list-style-type: none"> Porciones de tracto gastrointestinal afectado

Tabla 1.

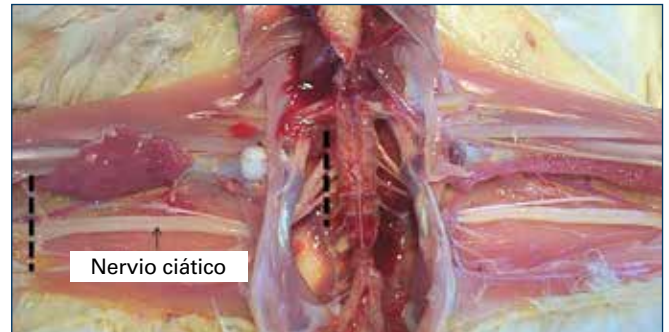


Figura 8. Para el diagnóstico de la enfermedad de Marek, frecuentemente se utiliza una muestra del nervio ciático de la pierna. Corte todo el largo del nervio ciático y colóquelo en formaldehído.



Figura 9. El divertículo de Meckel es el punto de referencia físico que divide el yeyuno y el íleon.

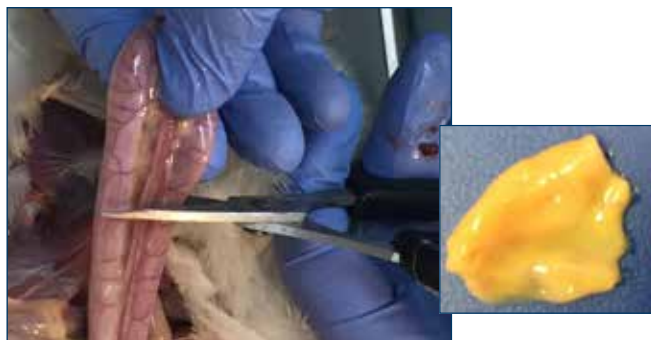


Figura 10. Corte secciones de 2-3 cm del intestino en el área de interés. Cuando tome muestras de las secciones del intestino, abra cuidadosamente el lumen del intestino (recuadro).



Figura 11. Envío la tráquea completa; abra cuidadosamente la tráquea a todo lo largo.



Figura 12. Remueva cuidadosamente el cráneo sobre el cerebro con unas tijeras.

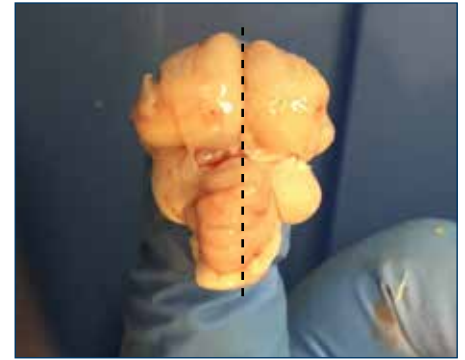


Figura 13. Remueva cuidadosamente el cerebro y divídalo a lo largo.

Preservación de las Muestras

Las muestras deben sumergirse rápidamente en una solución con 10% de formaldehído en búfer neutro para su preservación. El volumen de la solución de formaldehído en un recipiente debe ser por lo menos 10 veces el volumen de los tejidos. Las muestras deben sumergirse completamente en la solución para saturarse en el fijador adecuadamente para prevenir la deterioración. Los tejidos de los pulmones y otros tejidos que contienen aire pueden envolverse cuidadosamente en algodón absorbente para ayudar a la inmersión. Abra cuidadosamente las muestras del lumen de la tráquea y del intestino para liberar el aire atrapado.

Después de 48 horas en formaldehído, los tejidos se han fijado adecuadamente. Si es necesario para el envío en ese momento se puede vaciar el formaldehído. Después de vaciar el formaldehído, las muestras deben enviarse inmediatamente para minimizar el riesgo de que las muestras se sequen y se dañen.

Si las muestras están sujetas a temperaturas bajo cero durante el envío, las muestras que ya han sido fijadas pueden vaciarse y volver a sumergirse en "formaldehído alcohólico." Esto puede proteger a los tejidos contra el daño por congelamiento y descongelamiento. Para una mezcla simple de formaldehído alcohólico, combine y pre-mezcle 6.5 partes de alcohol etílico puro, 2.5 partes de agua destilada y 1 parte de 37% de formaldehído.



Figura 16. Después de 48 horas, se puede vaciar el formaldehído y colocar las muestras en bolsas de plástico selladas a prueba de fugas.

Las muestras que se han fijado en formaldehído pueden mantenerse en bolsas de plástico selladas (por ejemplo en bolsas Whirl-Pak®), o mantenerse en un frasco sellado con formaldehído.

Si las muestras van a enviarse al laboratorio por correo, coloque las muestras en bolsas dobles para prevenir fugas o derrames. Recuerde que el formaldehído es un veneno y la exposición al líquido o vapor es dañino para los humanos.



Figura 14. Coloque el tejido inmediatamente en una solución con 10% de formaldehído en búfer neutro para su preservación.



Figura 15. Después de 48 horas en formaldehído los tejidos han sido preservados adecuadamente.



Figura 17. Las bolsas tipo Whirl-Pak® pueden sellarse, son resistentes a las fugas, y pueden utilizarse para almacenar y transportar muestras.

Entrega de Muestras

Cuando envíe las muestras al laboratorio de diagnósticos, es importante proporcionar toda la información del lote en el formulario del laboratorio. La información importante que debe acompañar a todas las muestras que se envían al laboratorio incluyen lo siguiente:

- Identificación y ubicación del lote
- Edad del lote
- Fecha de la recolección de muestras
- Tejido(s) recolectados
- Programa de vacunación
- El historial del lote debe incluir la descripción de los signos clínicos, problemas de producción, y el nivel de mortalidad presente
- Puede haber reglamentos especiales para el envío de contenedores con formaldehído
- Todos los contenedores para transportar las muestras deben tener etiquetas apropiadas con una advertencia de peligro biológico
- Permisos apropiados para transporte internacional (por ejemplo permisos de la USDA-APHIS) si es apropiado

Esta información es vital para que el veterinario del lote y el patólogo puedan realizar una interpretación significativa de los resultados de diagnóstico y puedan proporcionar recomendaciones para mejorar la salud y/o la producción del lote.

Procesamiento de Muestras

Cuando las muestras llegan al laboratorio de diagnósticos, los tejidos conservados en formaldehído se colocan en un bloque de parafina, luego se cortan con un micrótopo en rebanadas muy finas conocidas como secciones. Las rebanadas de tejidos de 4 micrones de grueso son lo suficientemente delgadas para ser examinadas por un patólogo bajo la luz de un microscopio. Estas rebanadas finas se fijan en una diapositiva de vidrio y se tiñen. Se pueden utilizar varios tintes para resaltar los diferentes tipos de células u otros aspectos del tejido. El tinte utilizado con más frecuencia para el diagnóstico de enfermedades es el tinte con hematoxilina y eosina (H&E).

REFERENCIAS

1. Bermudez, Alex J. and Bruce Stewart-Brown. Chapter 1: Principles of Disease Prevention: Diagnosis and Control, "Disease Prevention and Diagnosis": Diseases of Poultry. 13th edition. Ames: Wiley-Blackwell, 2013.
2. USDA-APHIS. United States Veterinary Permit for Importation and Transportation of Controlled Materials and Organisms and Vectors. U.S. Department of Agriculture. 2016.



Figura 18. Coloque las muestras en bolsas dobles para prevenir fugas o derrames de formaldehído durante el transporte.

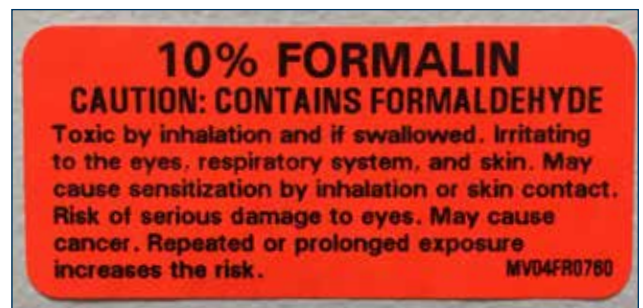


Figura 19. El formaldehído es dañino para la salud humana. Todos los recipientes deben tener etiquetas de advertencia de peligro biológico.

