



## 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).

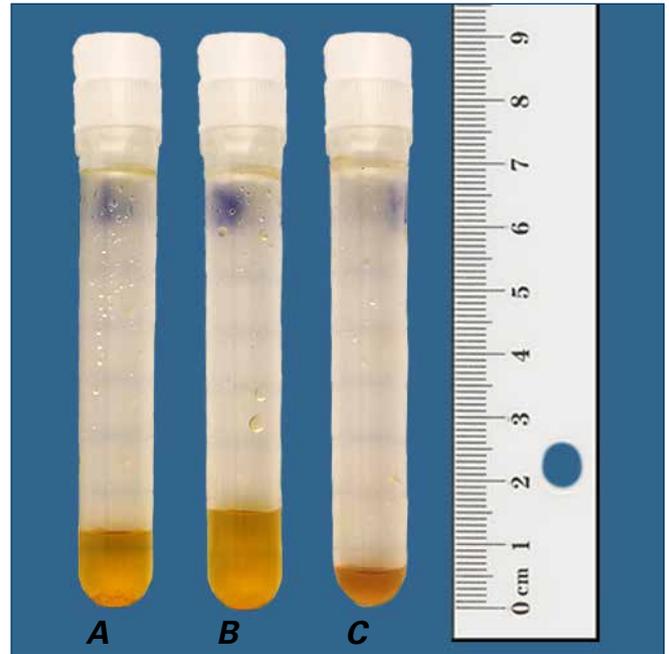


Figura 15. Ejemplos de muestras de suero buenas. Note el color ámbar transparente y el volumen adecuado (>0.25 ml).

### 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

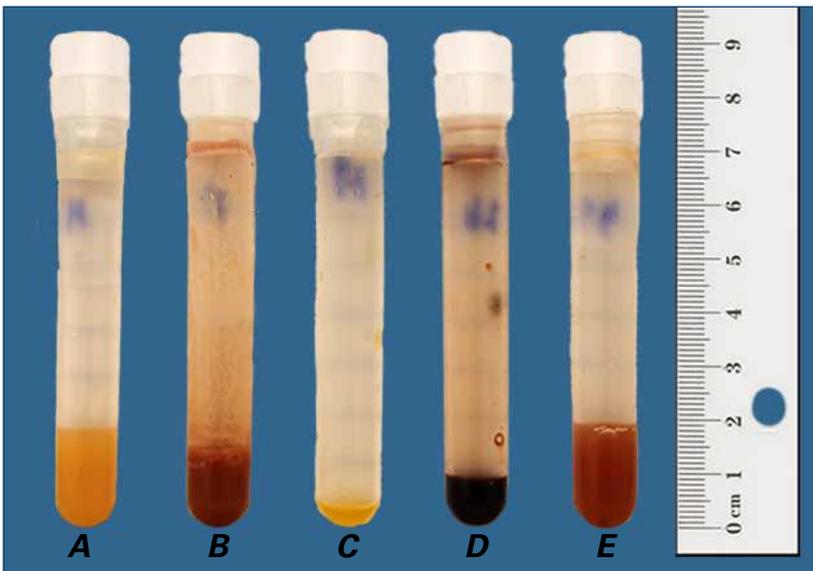


Figura 16. Ejemplos de muestras de suero pobres. A: muestra nebulosa, turbia; B: muestra con lipemia; C: muy poco volumen (>0.25 ml) D: coágulo sin suero; E: muestra con hemólisis.



Hy-Line International | [www.hyline.com](http://www.hyline.com)

