



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.

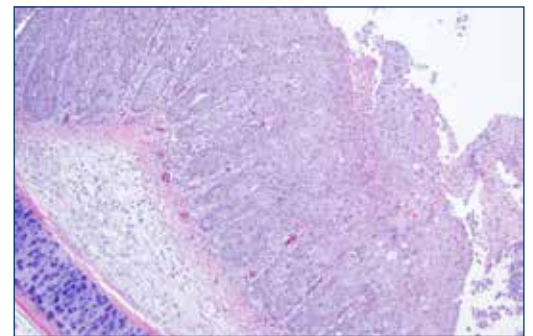


Figura 2. Vista microscópica del tejido de la tráquea.

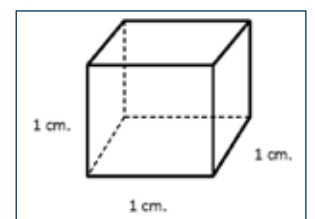


Figura 3. Centímetros cúbicos.



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.

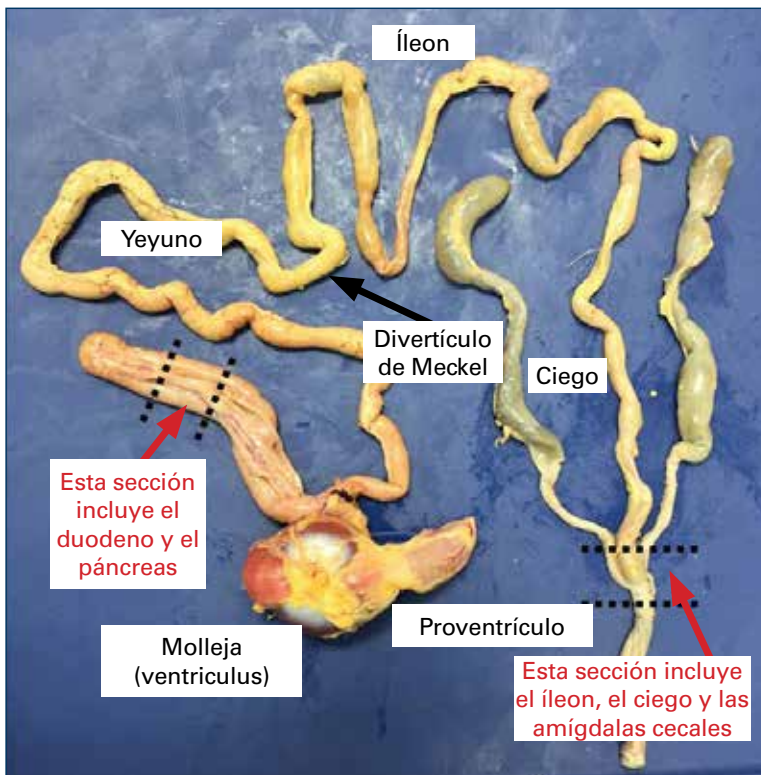


Figura 7. Sitios rutinarios para obtener muestras del tracto gastrointestinal. Corte secciones de 2-3 cm del intestino en el área con lesiones o de otras áreas de interés.



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

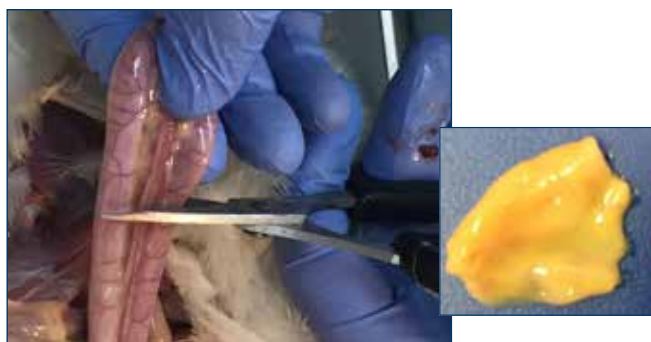


Figura 10. Corte secciones de 2-3 cm del intestino en el área de interés. Cuando tome muestras de las secciones del intestino, abra cuidadosamente el lumen del intestino (recuadro).

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.

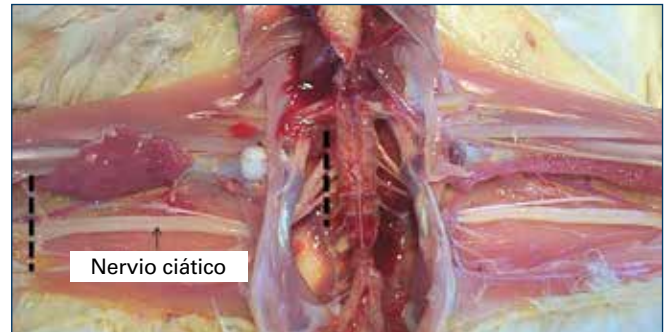


Figura 8. Para el diagnóstico de la enfermedad de Marek, frecuentemente se utiliza una muestra del nervio ciático de la pierna. Corte todo el largo del nervio ciático y colóquelo en formaldehído.



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



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

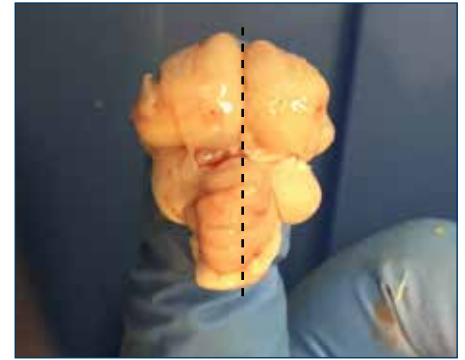


Figura 13. Remueva cuidadosamente el cerebro y divídalo a lo largo.

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.

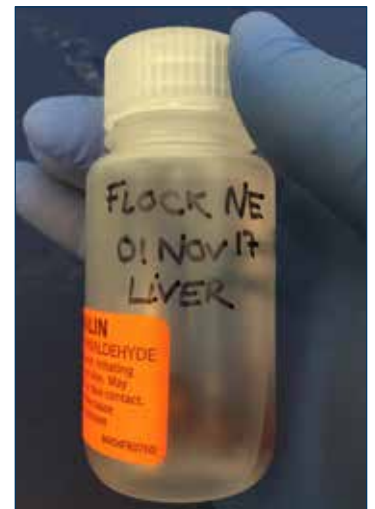


Figura 15. Después de 48 horas en formaldehído los tejidos han sido preservados adecuadamente.



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.

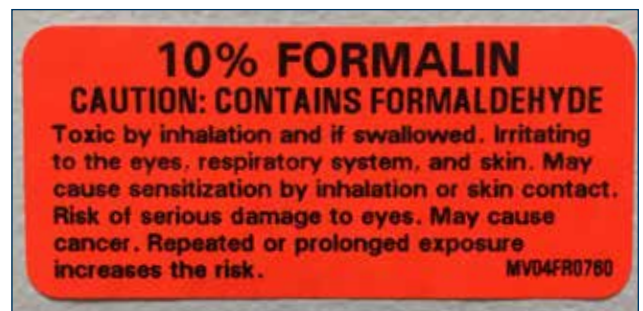


Figura 19. El formaldehído es dañino para la salud humana. Todos los recipientes deben tener etiquetas de advertencia de peligro biológico.

