
DIRECCIÓN GENERAL DE SALUD ANIMAL
Dirección de Epidemiología y Análisis de Riesgo
Centro Nacional de Servicios de Constatación en Salud Animal

MANUAL DE OBTENCIÓN Y ENVÍO DE MUESTRAS PARA EL DIAGNÓSTICO DE ENFERMEDADES EN ORGANISMOS ACUÁTICOS 2015



DIRECCIÓN GENERAL DE SALUD ANIMAL

Dirección de Epidemiología y Análisis de Riesgo
Centro Nacional de Servicios de Constatación en Salud Animal

La elaboración del presente obedece a la necesidad de contar con una muestra adecuada, en apoyo a la obtención de un diagnóstico preciso de los agentes biológicos que afectan la producción acuícola. Este manual está dirigido al personal del Servicio Nacional de Sanidad Inocuidad y Calidad Agroalimentaria (SENASICA) y a los técnicos de campo encargados de la vigilancia epidemiológica en los Organismos Auxiliares de Sanidad Acuícola (OASA).

Los procedimientos contenidos en este documento están aprobados por el SENASICA únicamente para los siguientes agentes bajo vigilancia epidemiológica:

CRUSTÁCEOS

- Virus de la mancha blanca (WSSV)
- Virus del Síndrome de Taura (ST)
- Virus de la cabeza amarilla (YHV)
- Virus de la mionecrosis infecciosa (INMV)
- *Vibrio spp.*

PECES

Trucha

- Virus de la necrosis hematopoyética infecciosa (IHN)
- Virus de la septicemia hemorrágica viral (VHS)
- Virus de la necrosis pancreática infecciosa (IPN)

Tilapia

- *Francisella spp.*

Carpa

- Virus causante de la viremia primaveral de la carpa (SVC)
- Herpesvirus de la carpa Koi (KHV)

MOLUSCOS

- *Perkinsus marinus* (Pm)

- *Perkinsus olseni* (Po)
- Herpesvirus del ostión (HVO)

TOMA DE MUESTRAS EN CRUSTÁCEOS

MATERIAL

Antes de comenzar con el muestreo, es importante que el técnico responsable verifique que cuenta con la cantidad suficiente de los materiales enlistados a continuación:

1. Guantes de látex
2. Pinzas de disección
3. Tubos Eppendorf de 1.5 a 2 ml
4. Pizeta de 250 ml
5. Mechero con alcohol
6. Bolsas de plástico de 10 x 10 cm (tipo Ziploc®)
7. Bolsas de plástico de 20 x 30 cm (tipo Ziploc®)
8. Dispositivos con agar Stuart
9. Etanol no desnaturalizado (alcohol etílico)
10. Plumón indeleble

PROCEDIMIENTO

Cuando se trate de diagnóstico de enfermedades virales, el tipo de muestras corresponderá a branquias; mientras que para el diagnóstico de *Vibrio spp.*, por medio de bacteriología, la muestra corresponderá a hepatopáncreas (**Figura 1**).

DIRECCIÓN GENERAL DE SALUD ANIMAL
Dirección de Epidemiología y Análisis de Riesgo
Centro Nacional de Servicios de Constatación en Salud Animal

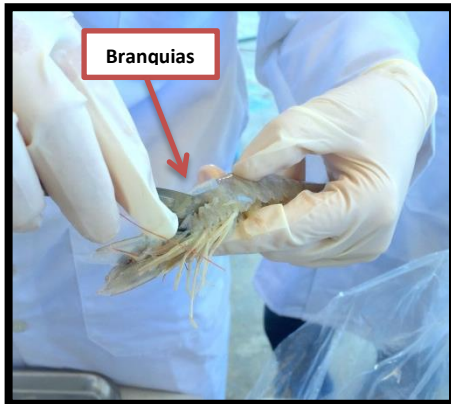


Figura 1. Corte de branquias

Para el caso del diagnóstico de *Vibrio parahaemolyticus*, el procedimiento de muestreo es el siguiente:

- a) Abra el empaque del dispositivo.



- a) Remueva la tapa del tubo de transporte.



- b) Retire el hisopo del empaque



- c) Inserte el tejido dentro del tubo y colóquelo en el fondo con ayuda del hisopo, procurando que el medio Stuart cubra todo el tejido (**Figura 2**).

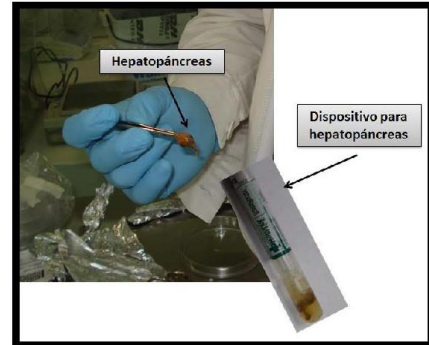


Figura 2. Muestra de hepatopáncreas inmersa en medio Stuart.

- d) Cierre el dispositivo e identifique la muestra



Una vez concluido el muestreo, deposite las muestras en una hielera con refrigerantes, con la finalidad de conservar las muestras en condiciones óptimas para el envío, este debe realizarse lo antes posible ya que la sustancia que contiene el dispositivo permite conservar la muestra hasta por 24hrs (**Figura 3**).

El empaque debe ir acompañado con la solicitud de servicios que contenga toda la información solicitada (antecedentes, lote, caso, tipo de muestra, especie, unidad de producción, procedencia, fecha de toma de muestra).

Se recomienda que las muestras sean enviadas al laboratorio el día lunes para que se estén recibiendo en el laboratorio el día martes y puedan ser procesadas.



Figura 3. Muestra de hepatopáncreas inmersa en medio Stuart

DIRECCIÓN GENERAL DE SALUD ANIMAL
Dirección de Epidemiología y Análisis de Riesgo
Centro Nacional de Servicios de Constatación en Salud Animal

TOMA DE MUESTRAS EN MOLUSCOS

MATERIAL

Antes de iniciar con el muestreo, es importante que el técnico responsable verifique que cuenta con la cantidad suficiente de los materiales enlistados a continuación:

1. Guantes de látex
2. Pinzas de disección
3. Tubos Eppendorf® de 1.5 a 2 ml
4. Pizeta de 250 ml.
5. Mechero con alcohol
6. Bolsas de plástico de 10 x 10 cm (tipo Ziploc®)
7. Bolsas de plástico de 20 x 30 cm (tipo Ziploc®)
8. Bisturí y hojas de bisturí No. 14 o 15
9. Pinzas metálicas
10. Etanol no desnaturalizado (alcohol etílico)
11. Plumón indeleble

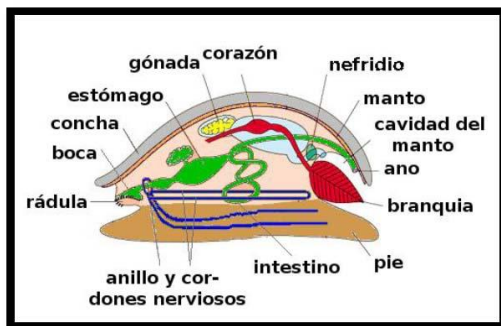


Figura 4. Anatomía general de los moluscos

PROCEDIMIENTO

1. Siguiendo los protocolos en medidas de bioseguridad, ingrese a la unidad de producción y obtenga un total de 30 organismos, los cuales debe seleccionar de forma aleatoria.
2. En condiciones asépticas, corte la concha en la región donde se localiza el músculo aductor, en la parte más próxima a la valva izquierda, utilizando una pinza para no dañar el organismo (Figura 4 y 5).
3. Abra la concha utilizando un bisturí para no desgarrar el organismo y corte firmemente el músculo para separar ambas valvas.
4. Con cuidado corte el manto y la branquia que está adherida al músculo aductor, principalmente en la porción más próxima a la valva.
5. Una vez descubierto el manto, se inserta la pinza sujetando el tejido y se corta una pequeña porción de branquia y manto (Figura 6).
6. Destape el tubo Eppendorf® y coloque en su interior una porción de branquia y manto, agregue etanol no desnaturalizado hasta cubrir totalmente el tejido. Distribuya las muestras obtenidas en 6 tubos Eppendorf®, cada uno almacenará muestras de manto y tejido branquial de 5 organismos distintos.
7. Coloque los tubos en una gradilla o dentro de una bolsa tipo Ziploc®, e identifique con una etiqueta y/o con marcador indeleble.



Figura 5. Corte de la concha de un molusco

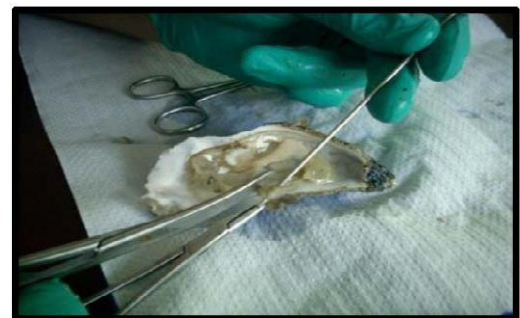


Figura 6. Corte de branquia y manto

DIRECCIÓN GENERAL DE SALUD ANIMAL

Dirección de Epidemiología y Análisis de Riesgo

Centro Nacional de Servicios de Constatación en Salud Animal

- El envío de muestras debe realizarse en recipientes que resguarden la integridad de ellas, como por ejemplo: hieleras de unicel o hieleras de plástico con cierre hermético.
- El empaque debe ir acompañado por la solicitud de servicios que contengan toda la información requerida (antecedentes, lote, caso, tipo de muestra, especie, unidad de producción, procedencia, fecha de toma de muestra), esta documentación debe protegerse colocándola dentro de una bolsa plástica sellada herméticamente para evitar pérdida de datos.
- Elabore un registro de los pool enviados.

TOMA DE MUESTRAS EN PECES

MATERIAL

Antes de iniciar con el muestreo, es importante que el técnico responsable verifique que cuenta con la cantidad suficiente de los materiales enlistados a continuación:

- Guantes de látex
- Pinzas metálicas de disección
- Tubos Eppendorf® de 1.5 a 2 ml
- Pizeta de 250 ml
- Mechero de alcohol
- Bolsas de plástico de 10 x 10 cm (tipo Ziploc®)
- Bolsas de plástico de 20 x 30 cm (tipo Ziploc®)
- Etanol no desnaturalizado (alcohol etílico)

PROCEDIMIENTO

El tipo de muestra para el diagnóstico de SVC y KHV corresponderá a branquias; mientras que para el diagnóstico de IHN, VHS, IPN se requiere el envío de bazo, riñón, hígado y branquia, y para *Francisella spp.* se requiere el envío de bazo.

- Siguiendo los protocolos en medidas de bioseguridad, ingrese a la unidad de producción y obtenga un total de 15 organismos, los cuales se deben obtener de forma aleatoria a partir del total de estanques presentes.

- Las muestras se distribuirán en 3 tubos, cada uno de ellos contendrá una porción de tejido de los 5 organismos, de acuerdo a la enfermedad a diagnosticar.

Para el caso de branquia:

- En condiciones asépticas, tome una porción de tejido branquial (**Figura 7**)
- Destape el tubo Eppendorf® y coloque en su interior una porción de tejido branquial de cada uno de los peces, agregue etanol no desnaturalizado hasta cubrir totalmente el tejido.

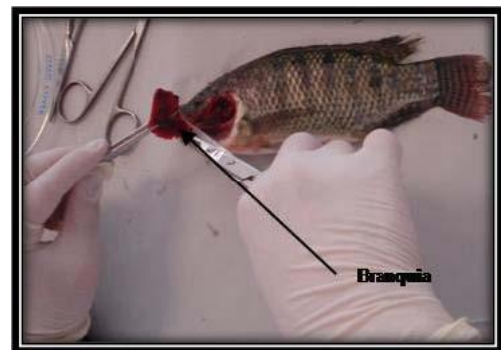


Figura 7. Obtención de branquia

Para el caso de bazo, riñón o hígado:

- Realice un corte en la región abdominal desde el ano hasta la región de las branquias, corte el abdomen de manera que le permita exponer los órganos internos (**Figura 8**).



Figura 8. Corte en región abdominal

- Identifique el bazo, hígado o riñón (**Figura 9**) y coloque una porción del órgano de cada uno de

DIRECCIÓN GENERAL DE SALUD ANIMAL
Dirección de Epidemiología y Análisis de Riesgo
Centro Nacional de Servicios de Constatación en Salud Animal

los peces en un tubo Eppendorf®, adicione etanol no desnaturalizado hasta cubrir el tejido.

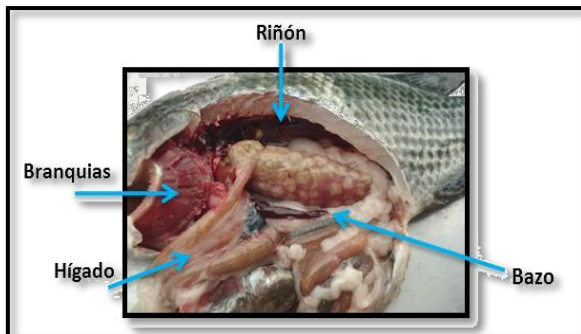


Figura 9. Órganos del pez

3. Coloque los tubos Eppendorf® en una gradilla o dentro de una bolsa tipo Ziploc®, e identifique con una etiqueta y/o con marcador indeleble.
4. El envío de muestras debe realizarse en recipientes que resguarden la integridad de ellas, como por ejemplo: hieleras de unicel o hieleras de plástico con cierre hermético.
5. El empaque debe ir acompañado por la solicitud de servicios que contengan toda la información solicitada (antecedentes, lote, caso, tipo de muestra, especie, unidad de producción, procedencia, fecha de toma de muestra), esta documentación debe protegerse colocándola dentro de una bolsa plástica sellada herméticamente para evitar pérdida de datos.
6. Elabore un registro de los pool enviados.

ACONDICIONAMIENTO Y ENVÍO DE MUESTRAS

El envío de muestras es de gran importancia en la obtención de un diagnóstico confiable.

PROCEDIMIENTO

1. Coloque los tubos en un cuadro de unicel previamente etiquetados en forma consecutiva sin duplicar el número asignado, asegurándose de que los tubos queden bien cerrados e inmóviles sobre el unicel (**Figura 10**).



Figura 10. Tubos en el cuadro de unicel

2. Al finalizar el acomodo de los tubos sobre el cuadro de unicel, envuelva en plástico adherente o coloque otro cuadro de unicel para que las muestras queden aseguradas para evitar el desprendimiento de los tubos o el derrame de las muestras.
3. Introduzca el cuadro de unicel en el interior de la hielera de plástico, o bien, en un sobre que pueda contenerlos e incluya el formato con la relación de las muestras enviadas, el cual debe protegerse dentro de una bolsa tipo Ziploc®.

CONSIDERACIONES GENERALES

Las muestras que se entreguen personalmente o enviadas por paquetería se reciben en el área de recepción de muestras, únicamente en el horario de 8:00 a 15:00 horas los lunes y martes.

Para las muestras que sean enviadas en hieleras, se sugiere aislar la documentación que las acompañe, utilizando bolsas de plástico bien cerradas para evitar que los documentos se mojen.

Las muestras que no cumplan con las especificaciones contenidas en el presente manual, se declaran como no aptas y no serán procesadas para su diagnóstico.

BIBLIOGRAFÍA

<http://www.oie.int/es/para-los-periodistas/editoriales/detalle/article/prevention-and-control-of-aquatic-animal-diseases-what-is-the-oie-doing/>

DIRECCIÓN GENERAL DE SALUD ANIMAL

Dirección de Epidemiología y Análisis de Riesgo

Centro Nacional de Servicios de Constatación en Salud Animal

<http://www.oie.int/es/manual-de-pruebas-de-diagnostico-para-los-animales-acuaticos/>

<http://www.oie.int/es/codigo-sanitario-para-los-animales-acuaticos/>

<http://www.telefonica.net/web2/paleontologiaernesto/Invertebrados/crustaceos/Crustacea.html>

<http://herramientas.educa.madrid.org/animalandia/taxon.php?nombre=Mollusca>

http://www.infovisual.info/02/033_es.html

Morales-Covarrubias M. S. 2013. Camarón análisis en fresco, herramienta de diagnóstico. 1 era. Edición. CIAD-OIRSA, p.p. 86.