

## PROTOCOLO DE COLECTA Y ENVÍO DE MUESTRAS PARA DIAGNÓSTICO DE ENFERMEDADES AVIARES

### Objetivos

El presente protocolo tiene como objetivo servir de guía a Médicos Veterinarios asesores de planteles avícolas, profesionales del Servicio Agrícola y Ganadero y personas vinculadas a la industria avícola, para realizar una adecuada colecta y envío de muestras al laboratorio, para el diagnóstico de enfermedades aviares.

El presente protocolo fue desarrollado por la Asociación de Productores Avícolas de Chile A.G., con el apoyo de Innova CORFO, través del Proyecto Mejoras Tecnológicas para la Sanidad Avícola.

### Responsabilidades

El responsable del muestreo, previo a desarrollar el procedimiento, deberá verificar que cuenta con los siguientes materiales de bioseguridad personal:

- Doble uso de guantes de látex y/o nitrilo y mascarilla desechables.
- Overol y cubrecalzado desechable o botas de goma
- Alcohol gel
- Jabón sanitizante
- Contenedor isotérmico
- Cinta de embalaje

Previo al muestreo, la persona encargada deberá leer y seguir los procedimientos de bioseguridad establecidos por el plantel de aves o la planta de incubación en la cual se desarrollará el muestreo, incluyendo el cambio de vestuario de calle por uno para uso exclusivo dentro del establecimiento y aplicación de una ducha en caso de ser parte de las normas internas. No deberán ingresar al interior de los pabellones accesorios como pulseras, anillos, relojes o celulares u otros los cuales puedan vehiculizar agentes infecciosos.

Previo a vestirse con el equipo de bioseguridad personal, deberá lavarse las manos con agua y desinfectarlas con jabón sanitizante, luego se colocará los guantes de látex desechables y los sanitizará con alcohol gel. Posteriormente, debe manipular el equipo de bioseguridad personal evitando su contaminación.

## 1. OBTENCIÓN DE MUESTRAS DE SANGRE

Previo a realizar la colecta de muestras deberá verificar que se cuenta con el siguiente material adicional:

- Jeringas desechables de 3 cc. y/o tubos venojet estériles para cada muestra.

Abra el envase que contiene los guantes desechables estériles, colóqueselos con cuidado y proceda a la toma de muestras. Las muestras de sangre deberán ser colectadas en forma estéril desde el corazón o desde las venas radial, cubital o yugular mediante punción con la aguja de la jeringa desechable estéril. La cantidad de sangre a extraer por ave será de a lo menos 3 ml.

Una vez colectada la muestra, los tubos con sangre deberán ser depositados en la caja isotérmica, previamente temperada entre 4-8°C mediante la utilización de gel refrigerante, en un ángulo de 45°, para facilitar la formación de suero y evitando que se derrame su contenido. Las jeringas deberán ser eliminadas en forma segura en un contenedor adecuado para evitar riesgos biológicos por el material corto punzante.

En caso de extracción con jeringa, la sangre debe ser vaciada inmediatamente después de obtenida a un tubo estéril, teniendo la precaución de retirar la aguja de la jeringa previamente. Se debe rotular el tubo con número correlativo y posteriormente la muestra deberá ser refrigerada dentro de una caja isotérmica.

## 2. OBTENCIÓN DE MUESTRAS A TRAVÉS DE TÓRULAS

Las muestras para cultivos virológicos obtenidas a partir de tómulas (cloacales y/o traqueales, dependiendo del tipo de ave), deberán ser humedecidas primero con el medio de transporte (3 ml) contenido en tubo de vidrio. Se debe tener la precaución de observar el medio para asegurar que no está contaminado (turbidez) debido a que no posee antibióticos. Para un correcto muestreo, la tórula debe rotarse sobre su eje en los dos sentidos dentro de la cloaca o tráquea, posteriormente ésta deberá sumergirse en el medio y agitarse vigorosamente, posteriormente se deberá eliminar la tórula del tubo en su contenedor a una bolsa de basura. Se puede usar un mismo tubo para un máximo de 5 tómulas. El tubo deberá ser correctamente rotulado con número correlativo, tipo de tórula (cloacal o traqueal) y tipo de ave muestreada. Finalmente el tubo con el medio deberá ser refrigerado inmediatamente. La acción de eliminar la tórula en el lugar de muestreo es para evitar posibles contaminaciones intralaboratoriales.

## 3. MUESTRAS DE ÓRGANOS

Para tomar muestras de órganos de aves muertas, estas deben haber muerto recientemente o si ambientalmente hace frío pueden tener 24 horas de muertas. Se

procederá a realizar una necropsia dirigida a la obtención de órganos como tráquea, pulmón, bazo u otro órgano de acuerdo a los hallazgos de necropsia, los cuales serán incluidos dentro de bolsas plásticas estériles y conservados en refrigeración o congelados. La cantidad mínima de órgano no deberá ser menos de 1 gramo y no más de 5 gramos. No se deben mezclar órganos de distintas aves en una misma bolsa. Se puede agregar el mismo medio cerebro corazón de los tubos para las tómulas a la bolsa, con el fin de proporcionar humedad y proteínas al virus. Las muestras se deberán mantener refrigeradas y deberán ser enviadas al laboratorio lo antes posible. No se congela la muestra a no ser que tengan un congelador a  $-70^{\circ}$  (los normales son  $-20^{\circ}$  lo que es fatal para el virus).

En el caso de muertes reciente se deberá enviar la cabeza de las aves en una bolsa aparte y congelada, esta muestra es exclusivamente para vigilancia de West Nile virus.

#### **4. MUESTRAS DE MECONIO**

##### **MATERIALES**

- Guantes estériles de látex
- Bolsas plásticas estériles con cierre hermético
- Alcohol al 70%
- Caja isotérmica con gel refrigerante
- Protocolo de Toma y Envío de Muestras para el laboratorio
- Lápiz indeleble
- Cinta de embalaje

Previo al muestreo, lávese muy bien las manos con agua y jabón sanitizante. Abra el envase que contiene los guantes estériles desechables y colóqueselos con cuidado. Colecte una muestra de 50 gr. aproximados de meconio, tomados desde diversas bandejas de la sala de nacedoras y deposítelos en la bolsa estéril correspondiente al sector de abuelas o reproductoras bajo estudio. Tome el extremo superior de la bolsa, doble y cierre con liga. De ser necesario, utilice una segunda bolsa como medida de protección. Deposite la bolsa dentro de la caja isotérmica, previamente temperada entre  $4-8^{\circ}\text{C}$ , mediante la utilización de gel refrigerante.

#### **5. MUESTRAS DE ÓRGANOS PARA DIAGNÓSTICO DE *SALMONELLA***

##### **MATERIALES**

- Tijeras y pinzas de acero inoxidable estériles
- Guantes estériles de látex
- Bolsas plásticas estériles con cierre hermético
- Alcohol al 70%

- Caja isotérmica con gel refrigerante
- Protocolo de Toma y Envío de Muestras para el laboratorio
- Lápiz indeleble
- Cinta de embalaje

Previo al muestreo, lávese muy bien las manos con agua y jabón sanitizante. Ubique las aves en piso plano cubierto con una bolsa de polipropileno en un lugar donde pueda proceder a realizar la necropsia en forma cómoda y lo más asépticamente posible. Proceda a desinfectar el plumaje con alcohol al 70% para evitar contaminación externa de la muestra.

Posteriormente abra el envase que contiene los guantes desechables estériles, colóqueselos con cuidado y comience a abrir el ave ubicando y extrayendo, con pinzas y tijeras esterilizadas, cada uno de los siguientes órganos: hígado, bazo, corazón, ciegos y ovarios. Deposite el hígado, bazo y corazón del ave en una bolsa estéril, los ciegos del ave en otra y los ovarios del ave en una última bolsa estéril. Tome el extremo superior de la bolsa, doble y cierre con liga u otro medio que evite la contaminación de las muestras. De ser necesario, utilice una segunda bolsa como medida de protección. Deposite la bolsa dentro de la caja térmica, previamente temperada entre 4-8°C, mediante la utilización de gel refrigerante.

Una vez colectadas todas las muestras, estas podrán ser analizadas como pools de órganos de una misma ave (Ejemplo pools de vísceras y aparte los ciegos y los ovarios).

En el caso de pesquisar *Salmonella Pullorum-Gallinarum* en portadores donde no hay lesiones aparentes, se pueden hacer varios pools de órganos, de 5 aves como máximo. Para el caso de *Salmonella pullorum* el órgano de elección son los ovarios y para *Salmonella gallinarum* el hígado y la vesícula biliar.

En el caso de aves adultas con problemas reproductivos se podrían observar algunas lesiones en ovario y anomalías en los órganos reproductivos (ovarios y tracto reproductivo): También son útiles las muestras de hígado y corazón.

En el caso de realizarse un muestreo en pollitos de un día se deberán tomar las siguientes muestras:

- a) Pool de órganos: Hígado, bazo, corazón.
- b) Meconio.
- c) Vitelo.
- d) Ciegos (no mezclar con otros órganos)

## 6. MUESTRA AMBIENTAL

### MATERIALES

- Torulas estériles 10x10 cm.
- Guantes estériles de látex
- Bolsas plásticas estériles con cierre hermético
- Alcohol al 70%
- Caja isotérmica con gel refrigerante
- Protocolo de Toma y Envío de Muestras para el laboratorio
- Lápiz indeleble
- Cinta de embalaje

Previo al muestreo, lávese muy bien las manos con agua y jabón sanitizante. Abra el envase que contiene los guantes estériles y colóqueselos con cuidado. Tome las bolsas que contienen las tómulas de arrastre en su interior, previamente humedecidas en 10 a 20 ml. de suero fisiológico y utilizando una pinza esterilizada tome las tómulas estériles por un extremo sacándolas cuidadosamente del envoltorio evitando su contaminación. Inicie el arrastre de la tómula a unos 3 metros post entrada del pabellón. Camine a lo largo de éste, haciendo contacto con la cama, cubriendo la mayor superficie del pabellón. De una vuelta completa. Abra la bolsa estéril, evitando contaminar el interior e introduzca la tómula al interior de la bolsa, evitando tocarlas con sus manos. Tome el extremo superior de la bolsa, doble y cierre. De ser necesario, utilice una segunda bolsa como medida de protección. Deposite la bolsa dentro de la caja de isotérmica, previamente temperada entre 4-8°C, mediante la utilización de gel refrigerante.

## 7. MUESTRA DE ÓRGANOS PARA DIAGNÓSTICO DE *MYCOPLASMA*

Previo al muestreo, lávese muy bien las manos con agua y jabón sanitizante. Ubique las aves en piso plano cubierto con una bolsa de polipropileno en un lugar donde pueda proceder a realizar la necropsia en forma cómoda y lo más asépticamente posible. Proceda a abrir el ave, previa desinfección, con alcohol al 70 % del plumaje para evitar contaminación externa de la muestra.

Posteriormente abra el envase que contiene los guantes desechables estériles, colóqueselos con cuidado y comience a abrir el ave ubicando y extrayendo, con pinzas y tijeras estériles, muestras de cada uno de los siguientes órganos: tráquea, pulmones y sacos aéreos. En el caso la tráquea y pulmones utilice pinzas y tijeras estériles mientras que en el caso de los sacos aéreos se recomienda tomar la muestra con tómulas, envolviendo el saco aéreo en ésta, incluyéndolo en medio de enriquecimiento. Haga pools de 5, de cada grupo de órganos, y deposítelos en una última bolsa estéril. Tome el extremo superior de la bolsa, doble y cierre con liga. De ser necesario, utilice una segunda bolsa como medida de protección. Deposite la

bolsa dentro de la caja isotérmica previamente temperada entre 4-8°C, mediante la utilización de gel refrigerante.

## **8. ROTULADO DE MUESTRAS Y ALMACENAJE**

Identifique, usando un lápiz indeleble y letra clara, la muestra con el nombre de la granja, sector, pabellón, estrato productivo, edad, fecha muestreo y tipo de muestra. Una vez finalizado el procedimiento, verifique que la rotulación ha sido realizada en forma correcta.

Deposite cada bolsa con las muestra en una caja isotérmica con el gel refrigerante necesario para mantener las muestras refrigeradas entre 4 y 8°C.

El gel pack debe asegurar que se mantiene la cadena de frío en forma adecuada hasta la llegada de la muestra a un refrigerador o el laboratorio.

Las muestras no deben congelarse.

## **9. ENVÍO DE LAS MUESTRAS AL LABORATORIO**

Complete con letra clara el protocolo de toma de muestras. Verifique la correcta relación entre la bolsa que contiene cada muestra y su identificación en el protocolo. Verifique que la cadena de frío se mantenga adecuada durante el tiempo del traslado considerando el día de la semana, horas de mayor tráfico vehicular y otros factores que puedan retrasar este proceso (Ej. Caminos en reparación).

Una vez en el laboratorio, complete el registro de ingreso de muestras y guarde el comprobante de recepción que se le entregue.