



TOMA Y ENVÍO DE MUESTRAS PARA EL LABORATORIO

Laboratorio de Diagnóstico Salud Animal LIFEX

MANUAL DE PROCEDIMIENTOS

⇒ NORMAS GENERALES:

Para la adecuada recolección, conservación y envío de las muestras, es indispensable tener presentes las siguientes normas:

1. Toda muestra debe ser remitida con su historia clínica completa y perfectamente identificada. LIFEX no procesará muestras que no cumplan con esta condición.
2. Las muestras ideales se obtienen de animales vivos en distintos estadios de la enfermedad. Si es necesaria la necropsia, ésta debe guardar un orden y metodología adecuadas; además, debe realizarse al menor tiempo posible después de la muerte del animal (1 hora).
3. Las muestras para estudios bacteriológicos deben tomarse antes de la administración de medicamentos y empleando siempre material estéril. Para evitar que la muestra se seque y lograr una adecuada conservación, en algunos casos es necesario utilizar medios de transporte.
4. Para la recolección de cualquier otro tipo de muestra, utilizar material limpio y seco.
5. Los envases utilizados para el envío de muestras deben ser, en lo posible, irrompibles, herméticos y de dimensiones adecuadas. Las precauciones a considerar varían con la clase de muestra, temperatura ambiente, transporte y duración del viaje; en líneas generales, el tiempo entre la obtención de la muestra y su llegada al laboratorio no debe extenderse más de 24 horas.

⇒ IDENTIFICACIÓN DE LAS MUESTRAS:

La identificación de las muestras es de primordial importancia para el laboratorio y debe estar acompañada de la siguiente información:

- Nombre, dirección, E-mail, teléfono y fax del médico veterinario.
- Nombre, dirección, E-mail, teléfono y fax del propietario.
- Nombre de la explotación pecuaria.
- Ubicación: provincia, cantón y parroquia.
- Especie, raza, sexo, edad e identificación o nombre del animal o animales.
- Número de animales de la explotación.
- Porcentaje de morbilidad (enfermos) y mortalidad (muertos).

- Sintomatología.
- Tiempo de evolución de la enfermedad.
- Tratamiento efectuado.
- Vacunas aplicadas (tipo y fechas).
- En caso de necropsia, descripción de hallazgos o lesiones macro.
- Tipo de muestra, fecha y hora de la toma.
- Sistema de conservación utilizado.
- Diagnóstico presuntivo.
- Observaciones

Nota: Para garantizar el flujo adecuado de la información, solicite los formularios de pedido de exámenes de nuestro laboratorio.

⇒ TÉCNICAS PARA RECOLECCIÓN DE LAS MUESTRAS:

Leche:

Para estudios bacteriológicos

1. Lavar, enjuagar y secar la ubre.
2. Con una solución de alcohol al 70% desinfectarse las manos.
3. Con la misma solución y utilizando algodón desinfectar los pezones. Dejar secar (2 minutos). Eliminar los dos primeros chorros de leche antes de tomar la muestra.
4. Ordeñar recogiendo en un recipiente estéril sin topar sus bordes 3 ml aproximadamente, tomando proporcionalmente de los cuartos afectados, preferiblemente en recipientes de vidrio estériles.
5. En caso de que la infección esté plenamente localizada en uno de los cuartos o se requiera localizar el cuarto afectado, siguiendo las mismas recomendaciones, tomar de 2 a 3 ml de leche del cuarto afectado o de cada cuarto por separado.
6. Identificar la muestra correctamente y mantenerla refrigerada hasta la llegada al laboratorio.

Para prueba de Ring-Test (Brucella en leche):

En un tubo de vidrio estéril con 0,5 ml de formalina al 10%, tomar un volumen de 1 a 3 ml de leche homogéneamente mezclada, de acuerdo con la siguiente indicación de # de animales ordeñados.

# de animales de 2 o más años	Volumen de leche
< 200	1 ml
201 - 500	2 ml
501 - 900	3 ml

Si hay más de 900 cabezas, se recomienda dividir el rebaño en grupos menores para recoger la muestra, la cual debe identificarse correctamente y mantenerla refrigerada hasta la llegada al laboratorio.

Nota: No tomar en un mismo tubo leche de más de un tanque.

Técnica de campo para mastitis:

CMT LIFEX

La llamada prueba de California Mastitis Test (CMT), es un método de simple aplicación en el campo que permite cuantificar la situación sanitaria del hato con respecto a la mastitis subclínica.

Reactivos: California Mastitis Test (CMT LIFEX)

Procedimiento:

1. Lavar, enjuagar y secar la ubre.
2. Con una solución de alcohol al 70% desinfectarse las manos.
3. Con la misma solución y utilizando algodón desinfectar los pezones. Dejar secar 2 minutos. Eliminar los dos primeros chorros de leche antes de tomar la muestra.
4. Extraer de cada cuarto 3 ml de leche aproximadamente, depositándola en cada una de las copas de la paleta.
5. Añadir igual volumen de CMT LIFEX a cada una de las copas.
6. Mezclar durante 2 minutos mediante una ligera rotación circular de la paleta mantenida en posición horizontal.

Resultado: Los resultados de la prueba que son aplicables a muestras individuales o muestras a granel procedentes de distintas vacas, se interpretan de la siguiente manera:

Resultado Interpretación:

Trazas	Forma un ligero precipitado que se disuelve mezclándolo
+	Forma un gel mucoso
++	El gel es denso y floculento
+++	El gel se vuelve viscoso y pegajoso

Interpretación:

- En los primeros chorros de leche procedentes de una sola vaca, una reacción (+) se debe clasificar como sospechosa, mientras que (++) o más indican mastitis subclínica. Se recomienda tomar muestras de leche del cuarto o cuartos afectados, y enviar al laboratorio para que se les realice cultivo bacteriológico y antibiograma.
- Una reacción (+) con leche a granel procedente de un rebaño, sugiere que por lo menos el 20% de las vacas lactantes tiene mastitis subclínica, o que un gran porcentaje de ellas está cerca del final de su lactancia.
- Observaciones recientes sugieren que los resultados más seguros se obtienen cuando la prueba se lleva a cabo con leche extraída 3-5 horas después del ordeño normal.

Las reacciones que se observan con el CMT LIFEX en relación al número de células somáticas son como sigue:

+	400 000 - 1 500 000	células/ml
++	1 500 000 - 5 000 000	células/ml
+++	> 5 000 000	células/ml

Heridas abiertas y exudados:

En heridas abiertas, lo mismo que en exudados y raspados de garganta, los hisopos de algodón previamente esterilizados, son los que ofrecen las mayores ventajas:

1. En casos de heridas y exudados en contacto con las partes muy sucias del animal, se debe previamente lavar y secar la zona.
2. Con un hisopo estéril, raspar la zona afectada evitando el contacto con cualquier otra parte, introducir dentro de un tubo estéril con 3 ml de medio de transporte, o a su vez utilizar cultretes para transporte.
3. Mezclar adecuadamente la muestra con el medio de transporte y romper el mango del hisopo para eliminar la parte que ha estado en contacto con las manos.
4. Tapar el tubo evitando contaminar su interior. Identificarlo y enviarlo al laboratorio en refrigeración.

Nota: Los cultretes pueden ser suministrados en LIFEX.

Abscesos, edemas y líquido articular:

Para obtener éste tipo de muestras, está indicada la punción con aguja fina:

1. Depilar, lavar y desinfectar el sitio de la punción.
2. Introducir la aguja en forma perpendicular a la zona de punción y a la profundidad necesaria de acuerdo al caso. Recuerde utilizar material estéril.

3. Aspirar la muestra hasta obtener una cantidad suficiente (1-2 ml)*.
4. Pasar la muestra a un tubo estéril o bien sellar la punta de la aguja de la jeringuilla con su tapa.
5. Identificar y enviar al laboratorio en refrigeración.

* Cuando la muestra no puede ser aspirada por lo denso del material, se puede inyectar en el sitio solución salina estéril.

Órganos y tejidos:

La recolección se realiza con asepsia y máximo una hora después de la muerte del animal:

1. Evitando topar el lugar de la lesión a muestrear, cortar trozos de tejido u órgano afectado de un grosor no menor de 3x3 cm.
2. Para evitar contaminación y sangrado, sin topar el sitio de la lesión, sellar la muestra flameándola directamente o utilizando una espátula previamente flameada.
3. Depositar la muestra en un frasco estéril individual de boca ancha.
4. Para análisis histopatológico las muestras deben colocarse con formol al 10% y enviarse al laboratorio en envases bien sellados e identificados.
5. En caso de análisis bacteriológico las muestras deben enviarse refrigeradas al laboratorio. No utilizar formol.

Exudado prepucial:

La obtención de éste tipo de muestra es importante para el diagnóstico de las enfermedades infecciosas que afectan el sistema reproductor del macho:

1. Depilar, lavar con agua y jabón toda el área externa, verificando que el orificio externo del prepucio se mantenga seco.
2. Introducir una pipeta de plástico conectada a una jeringa (todo éste material estéril), en la parte más profunda de la cavidad. Se recomienda realizar un lavado de la cavidad prepucial, introduciendo aproximadamente 30 ml de solución salina estéril, con masajes de abajo hacia arriba por espacio de 5 a 20 minutos.
3. Atar el orificio externo del prepucio con una liga de caucho y aspirar el lavado al interior de la jeringa.
4. Pasar la muestra a un tubo estéril o bien sellar la jeringa con un corcho o tapón de caucho.
5. Identificar la muestra y transportar en refrigeración al laboratorio.

Semen:

Cuando se sospecha de problemas de infertilidad en el macho es importante realizar un análisis de semen.

Existen tres procedimientos para la obtención de semen: El uso de electroeyaculador, la estimulación de órganos sexuales y la vagina artificial.

La estimulación manual de los órganos genitales es la metodología recomendada para la obtención de semen.

1. Este procedimiento se realiza mediante palpación rectal estimulando la próstata, las vesículas seminales y la raíz del pene.
2. Los frascos o tubos utilizados para la recolección deben estar estériles y no contener ningún preservativo.
3. Las muestras se conservan en refrigeración y deben ser procesadas lo más pronto posible (máximo 2 horas después de tomadas).

⇒ FETO Y PLACENTA:

La recolección de éste tipo de muestras es importante en casos de aborto, para investigación de brucelosis, leptospirosis, listeriosis, vibriosis, etc.

Placenta: El procedimiento a seguir es similar al utilizado para recolección de órganos.

1. Utilizando guante protector, tomar porciones frescas que se encuentren dentro de la vagina.
2. Colocarlas en un frasco estéril de boca ancha.
3. Identificar y enviar refrigeradas al laboratorio.

Una muestra de sangre de la madre 2 semanas después del aborto es útil, sobre todo si se sospecha de brucelosis o leptospirosis, para las respectivas pruebas serológicas.

Feto:

1. Limpie el feto de suciedad, estiércol o paja con un guante protector.
2. Coloque el feto completo en un recipiente adecuado (bolsa de polietileno).
3. Envíe refrigerado al laboratorio. Si se sospecha de infección micótica es importante incluir una muestra de líquido abomasal (cuarto estómago), tomada de la misma forma como se recolectan abscesos o líquidos articulares pero enviando la muestra sin refrigerar. Se debe además recoger una muestra mediante raspado cutáneo del feto, como se describe a continuación:
 - a) Lavar la zona con agua y jabón.
 - b) Desinfectar con alcohol al 70% u otro antiséptico adecuado.
 - c) Dejar secar por 2 minutos.
 - d) Con una hoja de bisturí, o una placa portaobjetos, raspar la zona afectada.
 - e) Si hubiese pelos afectados, éstos deben arrancarse desde su raíz, con la ayuda de pinzas.
 - f) Enviar la muestra al laboratorio (en caja petri, sobre de papel o entre dos placas portaobjetos), sin refrigerar.

En caso tal que se sospeche de brucelosis se debe recolectar en forma aséptica el líquido abomasal (cuarto estómago del feto), utilizando material estéril y debe mantenerse en refrigeración hasta su envío al laboratorio.

Secreción vaginal:

Las infecciones uterinas (piometra, endometritis), así como las infecciones localizadas, se manifiestan con la presencia de secreción.

1. Introducir en el canal vaginal un espéculo estéril.
2. Con un hisopo estéril, realizar barrido del contenido o secreción vaginal.
3. Mezclar la muestra con el medio de transporte adecuado y romper el mango del hisopo para eliminar la parte que ha estado en contacto con la mano.
4. Identificar y enviar la muestra al laboratorio.

⇒ **GENERALIDADES SOBRE EL MANEJO DE MUESTRAS PARA MICROBIOLOGÍA:**

Selección y recolección de muestras:

El éxito y valor final de analizar una muestra clínica en el laboratorio de bacteriología, depende inicialmente del cuidado ejercido en la selección, recolección y envío de la muestra. La muestra seleccionada debe ser aquella que es más probable que contenga el agente causal y se debe hacer un esfuerzo para evitar su contaminación con organismos del medio ambiente.

⇒ **CULTIVOS BACTERIOLÓGICOS:**

Tejidos y órganos: En lo posible, el tamaño de las muestras debe ser mínimo de 3 x 3 cm colocadas en fundas individuales de polietileno u otros recipientes estériles. En caso de no tener dichos envases, es posible esterilizar los frascos o tubos de ensayo y las respectivas tapas, poniéndolos a hervir por espacio de 30 minutos. Enviarlas refrigeradas al laboratorio en un lapso no mayor de 4 horas.

Porciones de intestino deben enviarse con sus extremos amarrados y empacados individualmente.

Hisopos: Los hisopos son la forma preferida para enviar muestras de secreciones (nasal, faríngea, ocular, cutánea, cervical, vaginal, etc.), exudados, contenido de abscesos, etc. introducidos en un medio de transporte adecuado y enviados en refrigeración.

Heces: Las muestras fecales deben ser recolectadas directamente del recto para evitar contaminación, puestas en un envase hermético y enviadas en refrigeración al laboratorio. Debido a la alta probabilidad de contaminación se debe evitar el envío de excretas expuestas al medio ambiente.

En caso de animales grandes, la muestra puede ser recolectada introduciendo la mano y el brazo en el recto del animal, colocándose previamente un guante plástico que cubra inclusive el brazo. La manga de la funda puede ser invertida y ésta enviada al laboratorio.

Leche: Las muestras de leche deben ser tomadas de animales que no hayan recibido tratamiento con antibióticos durante los últimos 10 días. Estas deben ser recolectadas en envases estériles bien cerrados y luego enviadas en refrigeración al laboratorio en el menor tiempo posible.

Orina: Se debe utilizar un recipiente estéril. El sondeo vesical es la forma ideal para evitar contaminación, en su defecto, la micción espontánea es la técnica aconsejable. La muestra debe enviarse al laboratorio en refrigeración.

⇒ **CULTIVOS MICÓTICOS (HONGOS):**

Micosis superficiales:

Raspados cutáneos del borde de una lesión activa y pelo son las muestras preferidas para aislamiento de dermatofitos. Deben ser enviados al laboratorio en un tubo estéril tapado con un algodón o sobre de celofán. No enviar la muestra en medio de cultivo porque proliferan los hongos contaminantes.

Micosis profundas:

Las muestras (tejidos y órganos) deben ser enviadas en condiciones semejantes a las de bacteriología.

Hemocultivos:

Sangre con anticoagulante EDTA (Vacutainer tapa lila), refrigerada, enviar lo más pronto posible al laboratorio (máximo 4 horas).

Análisis de alimentos:

Granos forrajeros, balanceados o cama deben ser enviados, mínimo 50 g, en fundas de papel al laboratorio. Si existe demora para su envío debe refrigerarse.

Análisis de agua:

Una muestra de agua (50 ml aproximadamente) sin preservativos debe ser enviada al laboratorio en un frasco estéril en condiciones de refrigeración.

⇒ **PARASITOLOGÍA (PARÁSITOS GASTROINTESTINALES, HEPÁTICOS Y PULMONARES):**

Coproparasitarios:

1. Con guante o funda plástica introducir la mano en el recto del animal y estimular mediante masaje el esfínter anal.
2. Cuando se haya obtenido la cantidad suficiente (20 a 40 g) revertir el guante hacia dentro y cerrarlo. Enviar la muestra refrigerada al laboratorio en menos de 4 horas.

Si la muestra tardara más de 4 horas en llegar al laboratorio, pasar una parte a un recipiente con 3 gotas de formalina al 10%. En caso de requerir investigación

de parásitos pulmonares (identificación de larvas) enviar otra muestra sin formalina, en refrigeración.

Cuando se requiera evaluar el estado de infestación de un grupo de animales, debe tomarse un "pool" de muestras por edad. En éste caso, se colectarán pequeñas muestras de heces tomadas al azar. Cada pool debe corresponder a un solo grupo de edad.

⇒ MUESTRA DE SANGRE:

Para la colección de sangre debe tenerse en cuenta el sitio de punción y el calibre de aguja a utilizar para cada especie (Ver Anexo No. 1).

Consideraciones generales para la toma de muestras de sangre:

- a) No colocar el bisel de la aguja hacia abajo pues imposibilita el paso de sangre.
- b) No usar agujas húmedas ya que se hemolizan los glóbulos rojos.
- c) Retirar la aguja de la jeringa antes de llenar el tubo donde se depositará la sangre para evitar la ruptura de los glóbulos rojos (hemólisis).
- d) En caso de que se requiera anticoagulante es aconsejable utilizarlo en polvo y no en forma líquida, pues se diluye la sangre.
- e) Homogeneizar la sangre con el anticoagulante para evitar la formación de coágulos.

Para la extracción de sangre utilizar preferentemente el sistema de tubos al vacío (tipo Vacutainer), que por ser un sistema cerrado presta mayor garantía en cuanto a asepsia y preservación de las muestras, o tubos limpios estériles y secos.

Los tubos Vacutainer con y sin anticoagulante están disponibles en LIFEX. Este sistema manejado en forma adecuada representa un menor riesgo de hemólisis de las muestras, con respecto al sistema de extracción con jeringuilla.

Para exámenes hematológicos (conteo celular, hemoglobina, hematocrito, etc.):

1. Extraer 5 ml de sangre con un tubo que contenga una solución anticoagulante de EDTA (Vacutainer tapa lila).
2. Mezclar el tubo por inversión de 5 a 7 veces hasta homogeneizar la sangre.
3. Realizar frotis por duplicado para estudio diferencial de células (Ver procedimiento para frotis).
4. Identificar y enviar la muestra refrigerada.

Las muestras enviadas sin anticoagulante no podrán ser procesadas.

Frotis sanguíneo:

1. Mezclar invirtiendo el tubo de 5 a 7 veces.

2. Colocar una pequeña gota de sangre (0,02 ml aproximadamente), en un extremo de la placa portaobjetos.
3. Con otra placa portaobjetos de bordes lisos (esmerilada) y formando un ángulo de 35 grados extender la gota en su borde y con un movimiento continuo hacia adelante realizar la extensión (frotis). Las esquinas de esta placa deben estar cortadas, de modo que el borde que obra en la extensión sea algo menor que el ancho del portaobjetos en que se extiende la sangre (*).

4. Dejar secar al medio ambiente (2 minutos) y guardar evitando que la superficie del frotis se deteriore.
5. Identificar las placas portaobjetos, con el número de la muestra utilizando lápiz.

Un buen frotis se reconoce por la formación de una lengüeta y por ser lo suficientemente fino como para dejar pasar la luz.

Para estudios químicos o serológicos:

1. Extraer 7 ml de sangre con un tubo sin anticoagulante (Vacutainer tapa roja).
2. Evitar mover el tubo, dejarlo a temperatura ambiente en un ángulo de 30 grados hasta formarse el coágulo (30 minutos).
3. Identificar y llevar al laboratorio en un tiempo no mayor de 2 horas.
4. Si el tiempo de llegada al laboratorio fuese mayor a 2 horas, mantener la muestra refrigerada en forma vertical y preferentemente separar el suero.
5. No congelar.

⇒ MUESTRAS DE TEJIDOS PARA HISTOPATOLOGÍA:

1. Al cortar, las muestras deben contener una parte del tejido afectado junto a otra de aspecto normal.
2. El grosor de la muestra depende del tejido, pero por lo general no debe ser mayor de 0,5 cm.
3. Colocar la muestra en un frasco que contenga formol al 10% en una cantidad que cubra al órgano completamente.
4. Los recipientes para las muestras deben ser de boca ancha para que puedan salir íntegras y fácilmente. Las muestras para estudios histopatológicos no necesitan refrigeración y nunca deben congelarse.

⇒ URIANÁLISIS:

Utilizar un recipiente estéril y mantener la muestra refrigerada. El tiempo máximo entre la toma de muestra y la llegada al laboratorio debe ser de 2 horas. Preferentemente la muestra debe ser tomada por sondeo vesical.

⇒ MUESTRA DE ECTOPARÁSITOS:

Garrapatas:

1. Se toma el cuerpo de la garrapata con los dedos índice y pulgar procurando llevar la uña del pulgar hasta el órgano de fijación de la garrapata (hipostoma).
2. Ejercer ligeras presiones y pequeños movimientos en todos los sentidos hasta que la garrapata se desprenda (en lugar de los dedos puede utilizarse una pinza de disección).
3. Colocar las garrapatas recolectadas en un frasco con alcohol al 70%.
4. Rotular y enviar al laboratorio para su identificación.

Acaros:

1. Utilizando una gasa embebida en glicerina y sostenida por una pinza, limpiar la zona, separando las costras poco adheridas y las escamas que se encuentran sobre o alrededor de la lesión que se va a investigar.
2. Hacer un doblez en la piel del animal a nivel del área sospechosa y colocar una gota de glicerina o aceite mineral.
3. Con la hoja de bisturí raspar la parte superior del doblez varias veces hasta lograr algo de sangrado en la zona.
4. Transferir el raspado a un recipiente estéril y enviar al laboratorio.

Nota: Al enviar material para diagnóstico, tomar en cuenta que los raspados deben hacerse cerca de los bordes de las lesiones activas, evitando incluir costras secas, pelos o lana.

⇒ MUESTRAS PARA VIROLOGÍA

El diagnóstico de enfermedades virales en términos generales puede requerir de suero (sangre sin anticoagulante), exudados (enfermedades vesiculares) y de tejidos con el fin de llevar a cabo pruebas serológicas, aislamientos de virus y estudios estructurales. En caso de que lo requiera comuníquese con LIFEX para mayor información.

⇒ EMPAQUE Y SISTEMAS DE ENVÍO DE MUESTRAS:

Considerando que las muestras biológicas son potencialmente infecciosas, se recomienda el transporte personal o la participación directa de los médicos ve-

terinarios de LIFE. Sin embargo, cuando esto no es posible, se deben enviar las muestras con las siguientes instrucciones:

1. Como medio ideal de conservación, se utiliza la refrigeración, con hielo natural, hielo seco o gel refrigerante en fundas herméticas (existen excepciones descritas en los procedimientos de recolección de muestras).
2. La totalidad de las muestras recolectadas debe enviarse utilizando un sistema de empaque en doble caja:
 - La caja interna, preferentemente debe ser de un material aislante de temperatura externa, siendo las más recomendadas las cajas de espumaflex (icopor) por su bajo peso y fácil manipulación.
 - Las muestras deberán ser enviadas en recipientes individuales y bien identificadas. Entre cada funda, frasco o recipiente que contenga la muestra, se coloca un material que amortigüe los golpes, mantenga fijas las muestras y absorba la humedad (especialmente cuando se usa hielo natural o hielo seco como refrigerante). Puede usarse también espumaflex para éste fin.
 - La información básica que acompaña las muestras se envía debidamente protegida, dentro de un sobre y en funda plástica, entre la caja interna y la caja externa.
 - La caja externa se cierra de tal manera que todas las esquinas y/o tapas queden selladas con cinta adhesiva (aumenta la resistencia del recipiente y garantiza el aislamiento de las muestras).
 - Si las condiciones lo permiten, envolver la caja externa con papel empaque, sellar con cinta adhesiva y colocar con letra grande y clara:

MANÉJESE CON CUIDADO MATERIAL BIOLÓGICO REFRIGERADO.

4. Igualmente, pero de manera menos relevante, anotar la dirección a donde se envía el paquete: DESTINO: LABORATORIO DE DIAGNOSTICO LIFEX Calle Juan Galarza y Av. de La Prensa. Teléfono: 468013. Laboratorios Life - Quito
5. El paquete en estas condiciones es transportado dependiendo del lugar de recolección, al sitio más cercano donde se encuentre uno de los servicios de transporte, que nuestro Laboratorio de Diagnóstico LIFEX recomienda o al punto de recepción de muestras más cercano.