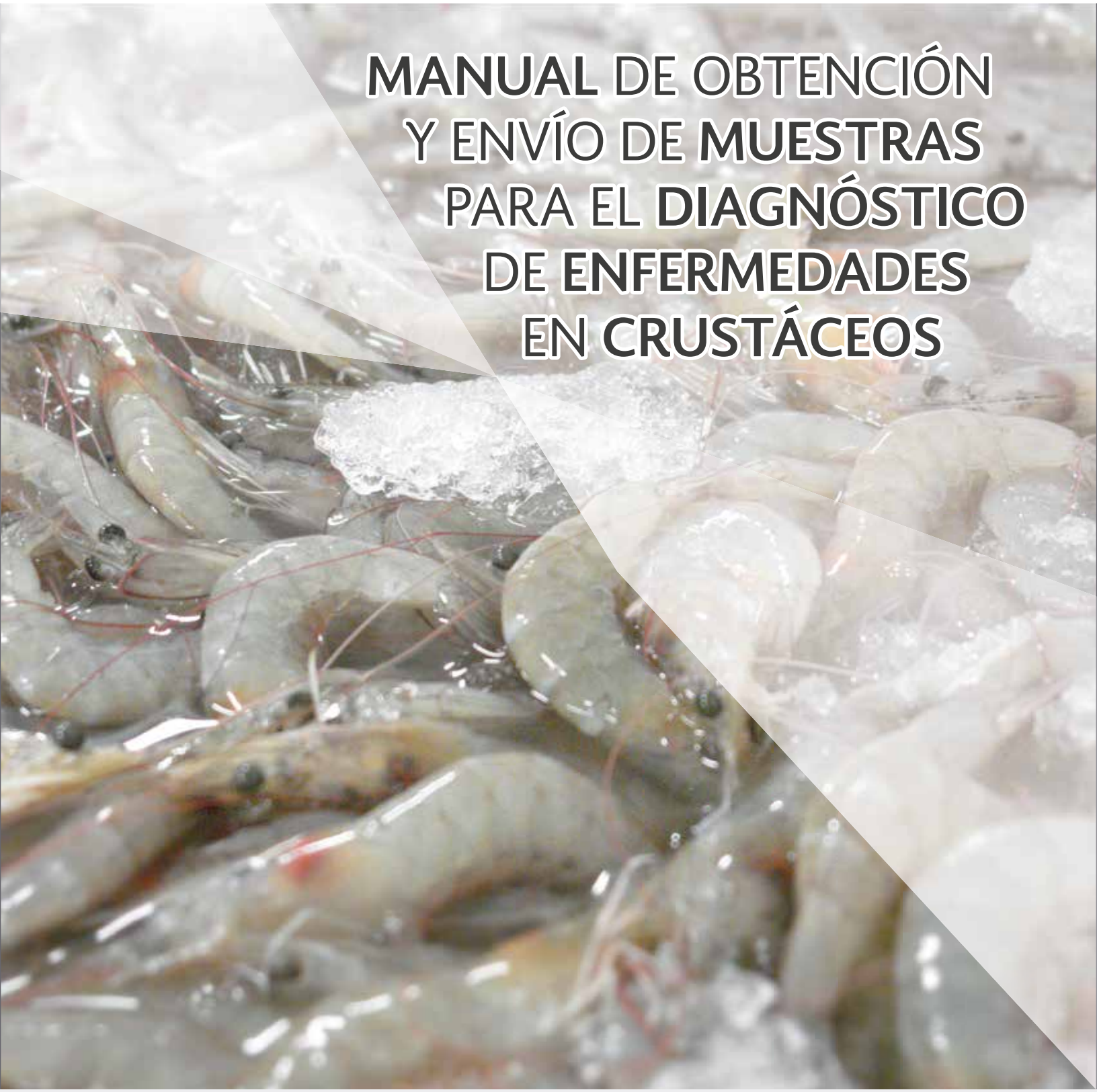
MOVER MÉXICO

MANUAL DE OBTENCIÓN Y ENVÍO DE MUESTRAS PARA EL DIAGNÓSTICO DE ENFERMEDADES EN CRUSTÁCEOS



SENASICA nos protege a todos

SAGARPA
SECRETARÍA DE AGRICULTURA, GANADERÍA, DESARROLLO RURAL, PESCA Y ALIMENTACIÓN

SENASICA
SERVICIO NACIONAL DE SANIDAD, INOCUIDAD Y CALIDAD AGROALIMENTARIA

www.gob.mx/sagarpa

www.gob.mx/senasica

MANUAL DE OBTENCIÓN Y ENVÍO DE **MUESTRAS** PARA EL **DIAGNÓSTICO** DE **ENFERMEDADES** EN **CRUSTÁCEOS**

INTRODUCCIÓN

Este manual está dirigido a personal técnico de campo encargado de la vigilancia epidemiológica activa de las enfermedades que afectan a los crustáceos.

Los procedimientos contenidos están aprobados por el SENASICA únicamente para la obtención de muestras dirigidas al diagnóstico de los siguientes agentes.

- Enfermedad de la mancha blanca (EMB)
- Síndrome de Taura (ST)
- Enfermedad de la cabeza amarilla (ECA)
- Mionecrosis infecciosa (MNI)
- Necrosis hipodérmica y hematopoyética infecciosa (IHHN)
- Vibriosis (*Vibrio* spp)

MATERIAL

Antes de comenzar con el muestreo, es importante que el técnico responsable verifique que cuenta con los materiales del siguiente listado en cantidades suficientes.

- Guantes (látex o nitrilo) libres de talco
- Atarraya, red o canasta limpia y desinfectada
- Pinzas de disección de acero inoxidable
- Microtubos de 1.5 a 2 ml (recomendado Eppendorf®)
- Pipeta de 250 ml
- Bolsas de plástico de 10 x 10 cm (tipo Ziploc®)
- Bolsas de plástico de 20 x 30 cm (tipo Ziploc®)
- Dispositivos con agar Stuart
- Etanol no desnaturalizado* (alcohol etílico absoluto)
- Plumón indeleble
- Papel parafilm
- Solución descontaminadora de ácidos nucleicos**
- Lápiz
- Bisturí y hojas de bisturí No. 14 o 15
- Pinzas metálicas
- GPS
- Hielera y/o bolsa térmica
- Gel refrigerante
- Etiquetas
- Cinta Canela

(*) El alcohol desnaturalizado o el alcohol de farmacia, contiene componentes que afectan los procesos de obtención de ácidos nucleicos, (cloruro de benzalconio, acetona, entre otros), por este motivo no deben ser utilizados.
(**) Los descontaminadores de ácidos nucleicos reducen riesgos de contaminación cruzada. Se recomienda utilizar:

A. Solución de cloro al 10% (obtenido a partir de alguna marca comercial por ejemplo Clorox®).

- Retire las partículas gruesas de tejido que se encuentren en el material (pinzas).
- Sumerja el material en la solución y espere 10 minutos.
- Realice un enjuague con agua destilada y seque perfectamente, ya que los residuos de cloro afectan la integridad de las muestras.

Importante: La solución de cloro al 10% no debe tener más de 24 horas de haber sido preparada, y el envase original, no más de 2 meses de haberse abierto.

B. Soluciones descontaminadoras comerciales como: Exitus Plus de la marca AppliChem®.

- Retire las partículas gruesas de tejido que se encuentren en el material
- Sumerja el material en la solución, espere 10 minutos y seque.
- Finalmente estará listo para su uso.

Nota: Una solución con alcohol no elimina los ácidos nucleicos.

TOMA Y ENVÍO DE MUESTRAS

La selección del tipo de muestra y el medio para su preservación dependerá del agente a diagnosticar, el tipo de análisis solicitado y los recursos de quien realice el muestreo. Los materiales elegidos deben asegurar el mantenimiento de la integridad de las muestras.

Las branquias de organismos adultos constituyen la muestra más comúnmente utilizada para diversas enfermedades en crustáceos. En caso de contar con postlarvas es posible macerar y extraer ácidos nucleicos de este macerado.

El diagnóstico de enfermedades bacterianas *(Vibrio spp.),* deberá incluir muestras correspondientes a hepatopáncreas (Figura 6).

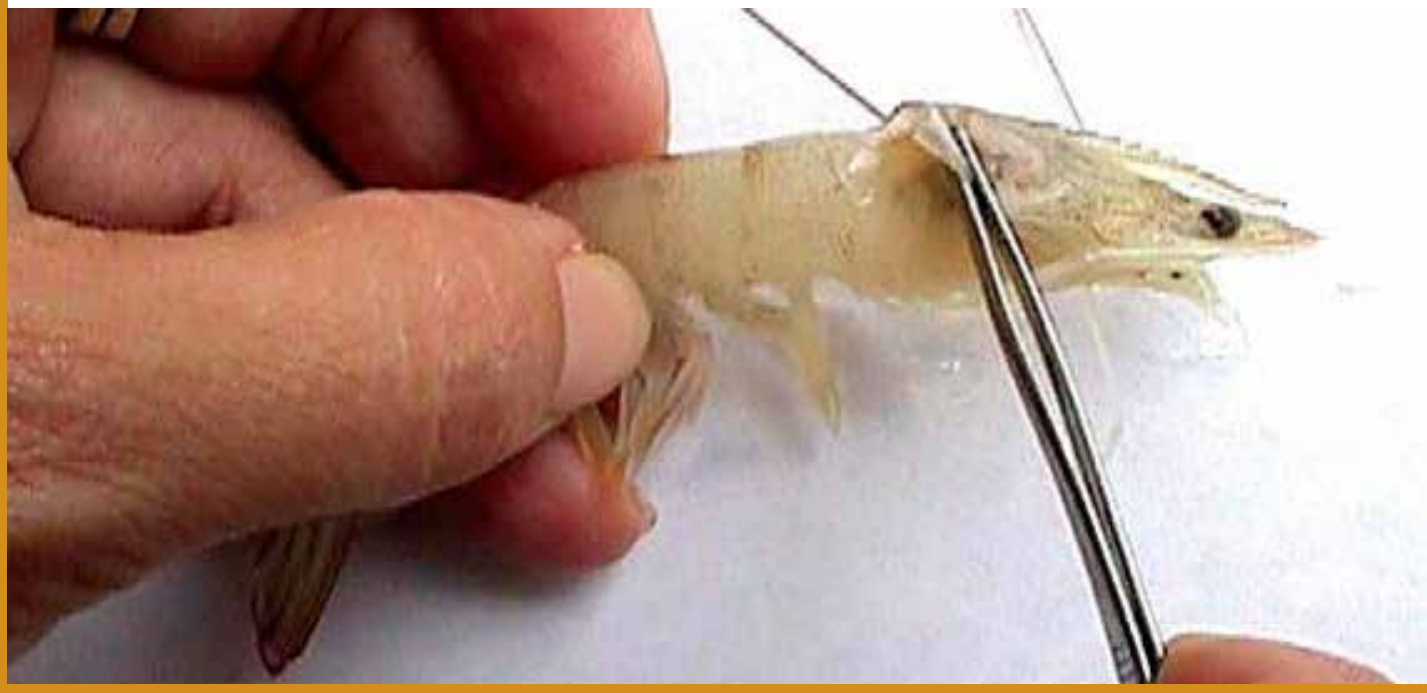


Figura 6. Levantamiento de la cutícula posterior del cefalotórax para la extracción de muestras de hepatopáncreas y branquias.

1. Preséntese ante el responsable de la unidad de producción y explique el motivo de la visita.

2. Obtenga el punto de geoposición a la entrada de la unidad de producción.

3. Solicite se designe a una persona que tenga conocimiento de las actividades que se llevan a cabo en la unidad de producción, para que lo acompañe y en caso necesario, apoye durante la obtención de la muestra.

4. Seleccione los estanques a muestrear considerando la signología clínica de enfermedad. En caso de no presentar signología clínica evidente, realice la selección de los organismos a estudiar con base en factores de riesgo para la presentación de enfermedades. Considere que se debe obtener un mínimo de cinco organismos por estanque. Cuando el número de estanques sea reducido, distribuya la muestra siempre usando múltiplos de cinco (para elaborar pools de cinco organismos para el diagnóstico).

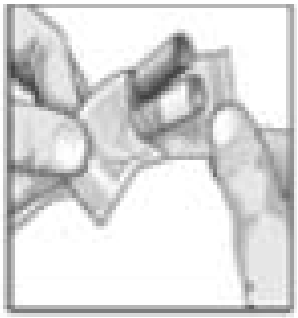
5. La técnica de obtención de muestras debe ser la misma que la utilizada por la unidad de producción para sus actividades de evaluación.

6. Se necesita obtener un mínimo de 30 branquias provenientes de 30 ejemplares por unidad de producción, divididas en 6 pools (bolsas, frascos, contenedores) con muestras de 5 crustáceos cada uno, con esto se podrá obtener el diagnóstico de EMB, ST, ECA, MNI, IHHN.

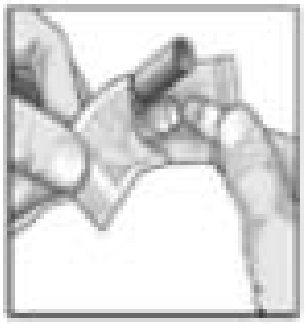
Las muestras dirigidas a diagnóstico molecular se enviarán sumergidas en etanol no desnaturalizado, dentro de un empaque que asegure la integridad de la muestra y evite derrames; todas las muestras deberán ir perfectamente identificadas.

7. Para el muestreo de Vibrio spp, se requieren en total 30 muestras de hepatopáncreas por cada unidad de producción, divididos en 6 pools con 5 muestras cada uno, las cuales se deben colectar en medio Stuart (Figura 7).

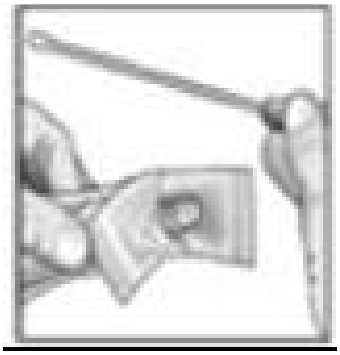
a) Abra el empaque del dispositivo.



b) Remueva la tapa del tubo de transporte.



c) Retire el hisopo del empaque.



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 7. Muestra de hepatopáncreas inmersa en medio Stuart

e) Cierre el dispositivo e identifique la muestra

Una vez concluido el muestreo, deposite las muestras en una hielera con refrigerantes, con la finalidad de conservarlas en condiciones óptimas para su envío, mismo que deberá ser realizado lo antes posible ya que la sustancia que contiene el dispositivo permite conservar la muestra hasta por 24hrs.

PROBLEMAS Y ERRORES RECURRENTES EN LA TOMA Y ENVÍO DE MUESTRAS

La estandarización del proceso de toma y envío de muestras, es una práctica que influye directamente en el resultado de los análisis, por lo tanto, se debe considerar que distintas personas pueden realizar diferentes practicas durante la toma de muestras, y una misma persona puede tomar muestras de distinta manera cuando las circunstancias cambian en cada situación (muestreo de juveniles, reproductores, embarques congelados, etc.), por ello se debe mantener una supervisión constante del personal encargado de la operación.

1) Viales saturados de tejido

Las muestras para diagnóstico pueden ser enviadas al laboratorio en pools de muestras, conformados por un total de 5 organismos, tomando una sola porción de tejido por cada camarón.

La Figura 8, muestra la excesiva cantidad de branquias enviadas en un mismo vial, donde se dificulta la selección de la muestra a procesar, en la que se incluyan únicamente los 5 organismos a evaluar.

La saturación de tejido (Figura 8) puede provocar varias complicaciones durante el análisis de las muestras, entre ellas que el tejido no se fije de manera correcta; el etanol debe estar en una proporción de 3 volúmenes de alcohol con respecto al tejido como mínimo para garantizar una conservación adecuada de la muestra, lo cual afectará la calidad del ácido nucleico que se desea purificar.

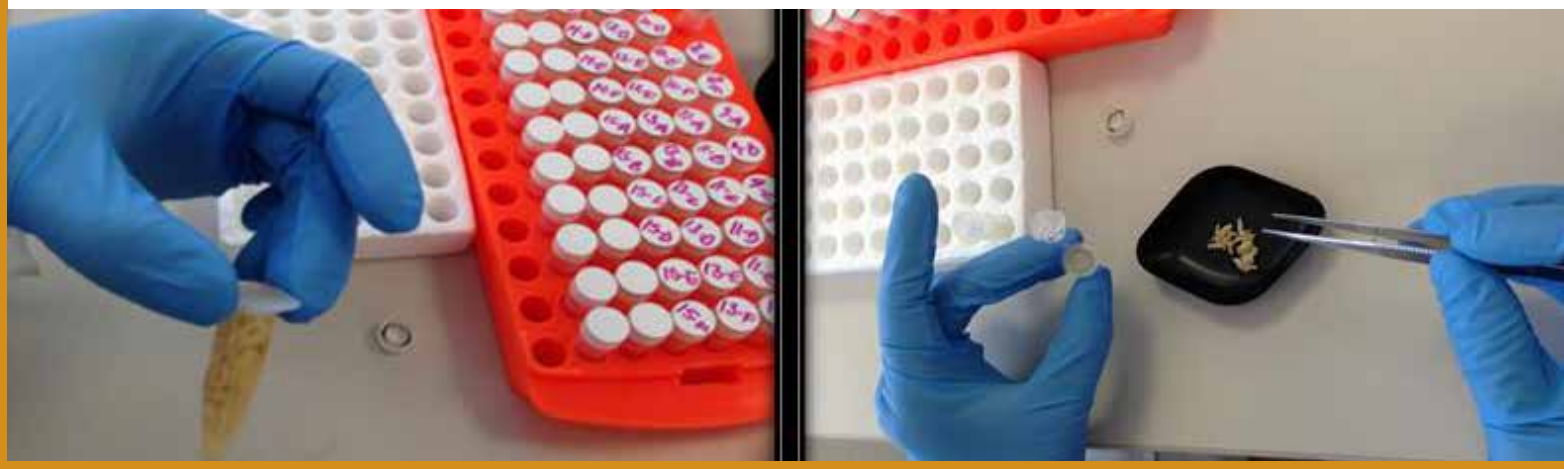


Figura 8. Viales saturados de tejido dificultan el procesamiento de muestras

En estos casos no es posible analizar 5 organismos por cada pool; las muestras sobresaturadas impiden la identificación de los 5 organismos que se desean analizar al llegar a encontrar hasta 40 branquias en un mismo tubo.

Otra posible complicación es que el etanol no entre en contacto con todo el tejido; la presencia de tejidos en mayor cantidad a la que soporta un vial, puede ocasionar aglomeración en un punto, lo que genera un tapón que impide que el etanol entre en contacto con todo el tejido (Figura 9).

Figura 9. Viales saturados de tejido impiden su correcta fijación

2) Viales saturados de etanol

El llenado excesivo del vial con etanol puede provocar que la integridad de las muestras se vea afectada.

La Figura 10 muestra el nivel de etanol correspondiente a 1.5ml y 2.0ml (viales del lado izquierdo en la imagen). Los viales del lado derecho de la imagen muestran un llenado con volúmenes mayores al que pueden contener.

Figura 10. Viales saturados de etanol

Los viales que se envían al laboratorio con cantidades de alcohol que sobrepasan el volumen máximo que puede contener un vial (Figura 10), pueden provocar que estos se abran durante el envío y que el alcohol se derrame, lo cual afecta la integridad de la muestra (Figura 11, Izquierda), además puede provocar que la identificación del vial sea borrada, (Figura 11, Derecha). A pesar del uso de parafilm al momento del sellado de los tubos, si las tapas de los viales no se encuentran bien cerradas, el sellado no impedirá que el etanol se derrame.

Figura 11. Viales con derrame de etanol

Los problemas de derrames se pueden reducir incrementando el número de precauciones durante el envío al laboratorio: utilizar las cantidades de tejido sugerido en viales o contenedores adecuados (existen tubos de 1.5ml, 2.0ml, 5.0ml, 15ml y 50ml), colocar la cantidad adecuada de etanol como conservador, utilizar un buen sellado de los tubos para evitar el derrame del etanol durante el traslado de las muestras al laboratorio (el manejo de la paquetería es un factor que no podemos controlar).

Se sugiere el envío de las muestras en soportes rígidos (como gradillas comerciales o bases de unicel), que eviten que los tubos se muevan, volteen y choquen entre sí, lo que puede evitar que se abran (Figura 12).

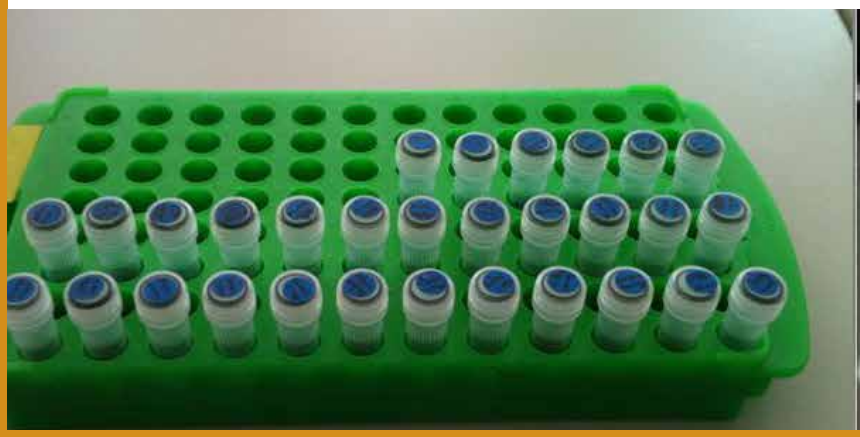


Figura 12. Muestras acomodadas en base rígida para su envío al laboratorio

CONSIDERACIONES GENERALES

1) Identificación de muestras

Se asignará un número de identificación a cada tubo de muestra enviado, que consistirá en las siglas del estado, el número de la granja muestreada y el número de la muestra (del 1 al 30), como se observa en el siguiente ejemplo:

SIN-01-21-25 = Sinaloa, granja 1, muestra 21 a 25.

El número de identificación será anotado con lápiz en un trozo de papel, y posteriormente será introducido dentro del tubo que contenga la muestra correspondiente.

Adicionalmente, acompañando a las muestras enviadas, se deberán incluir un formato con la relación de las muestras enviadas, que incluya los siguientes datos:

- Nombre de la unidad de producción;
- Nombre del propietario;
- Ubicación de la unidad de producción (Estado, municipio, localidad);
- Fecha de obtención de la muestra;
- Especie: Nombre común y/o científico;
- Análisis solicitado.

2) Acondicionamiento y envío de muestras

- Los tubos deberán ser preferentemente colocados en una base de unicel o base comercial, previamente identificados y sin duplicar el número asignado a cada una, asegurándose de que estos queden bien cerrados e inmóviles sobre el unicel (Figura 13).

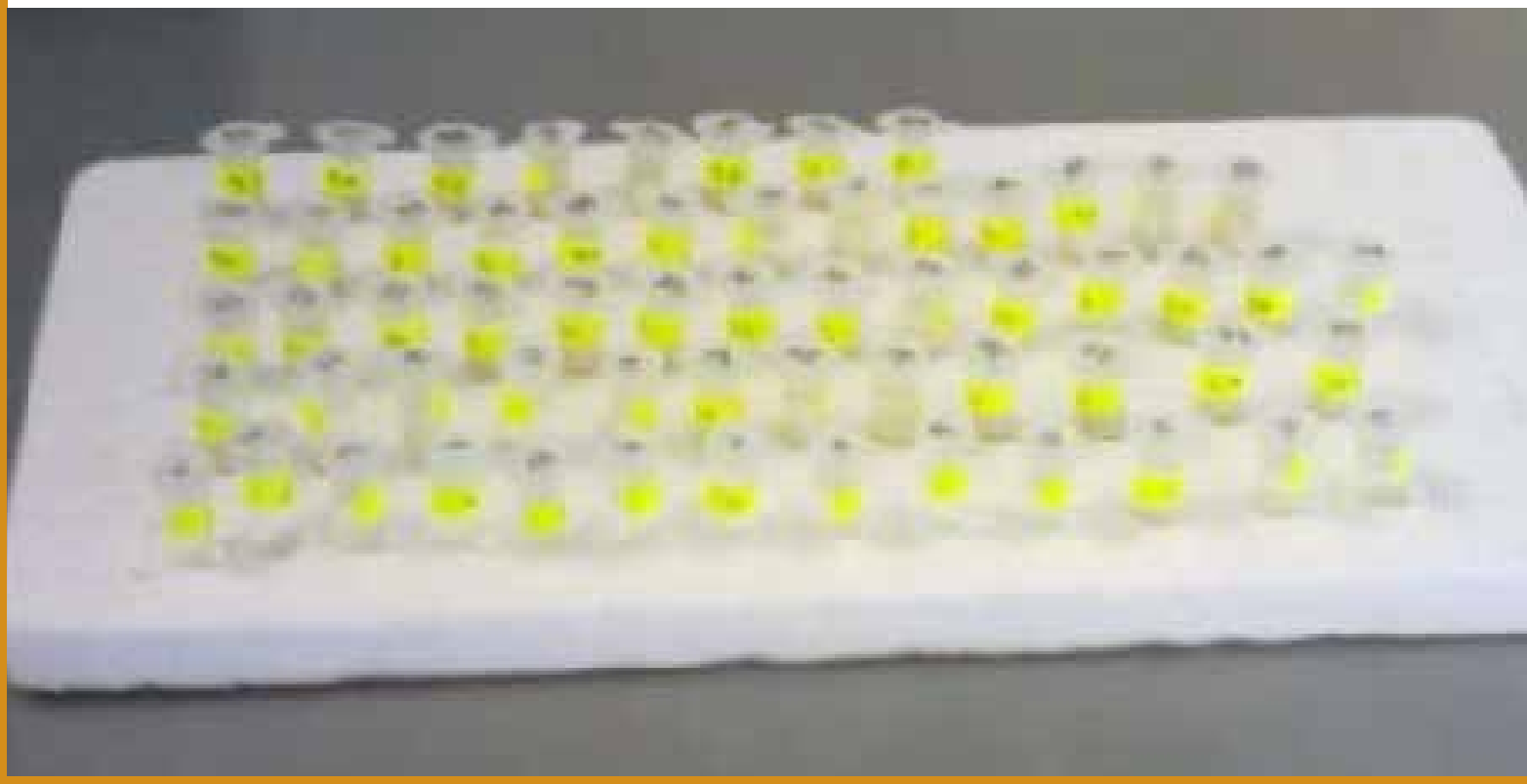


Figura 13. Acomodo de los tubos en la base de unicel

- Todos los empaques de muestras (bolsas, tubos, bases de unicel) deben ir acompañados por la solicitud de servicios y la identificación correspondiente.

- Introduzca las muestras al interior de la hielera de plástico o unicel e incluya el formato con la relación de las muestras enviadas dentro de una bolsa de plástico para evitar que entre en contacto con líquidos (Figura 14).

- La caja se debe ser cerrada herméticamente con cinta adhesiva alrededor. En la parte superior de esta debe de colocarse una etiqueta que indique el destinatario y los datos del remitente.

Figura 14. Cierre y etiquetado de caja de unicel

3) Recepción de muestras

Las muestras que se entreguen personalmente o por medio de servicios de paquetería, se recibirán en el área de recepción de muestras del laboratorio de diagnóstico, únicamente en el horario de 8:00 a 15:00 horas los días lunes, martes y miércoles.

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, así como las muestras que se encuentren entre los siguientes supuestos:

- Cuando el empaque que contenga las muestras presente rupturas.
- Cuando las muestras presenten otro producto diferente al solicitado.
- Cuando los tubos presenten derrames en su contenido.
- Cuando las muestras se encuentren en estado de descomposición o con contaminación evidente de microorganismos.
- Cuando las muestras carezcan de alguno de los sistemas de identificación solicitados.

Las muestras serán enviadas al Centro Nacional de Servicios de Constatación en Salud Animal -(CENAPA), ubicado en la carretera Federal Cuernavaca – Cuautla No. 8534 (Km 11.5), Colonia Progreso, C.P. 62550, Jiutepec, Morelos, Tel.: 01 (55) 59051000 Ext: 53139 o 53140.

Dudas sobre:
• Campañas Fito o Zoosanitarias
• Movilización de Productos Agroalimentarios y Mascotas

01 800 987 9879

Quejas • Denuncias
Órgano Interno de Control en el SENASICA

+52(55) 5905 1000, ext. 51648
+52(55) 3871 8300, ext. 20385

www.gob.mx/sagarpa www.gob.mx/senasica

SENASICA SAGARPA @SENASICA YouTube SENASICA SAGARPA

"Este programa es público, ajeno a cualquier partido político.
Queda prohibido el uso para fines distintos a los establecidos en el programa".