



OPS



OMS

PANAFTOSA
Centro Panamericano de Fiebre Aftosa
Salud Pública Veterinaria

Procedimiento para colecta y remisión de muestras para el diagnóstico de enfermedades vesiculares y su diagnóstico diferencial



PROCEDIMIENTOS PARA COLECTA Y REMISION DE MUESTRAS PARA EL DIAGNOSTICO DE ENFERMEDADES VESICULARES Y SU DIAGNOSTICO DIFERENCIAL

INTRODUCCIÓN

La imposibilidad de hacer un diagnóstico diferencial de las enfermedades vesiculares, Fiebre Aftosa (FA), Estomatitis Vesicular (EV) y Enfermedad Vesicular del Cerdo (EVC) a partir de la sintomatología y examen clínico de los animales enfermos, exige que el diagnóstico de estas enfermedades se realice en el laboratorio.

La alta contagiosidad de estas enfermedades, principalmente la FA, unida a la elevada capacidad de variación del virus, a los diferentes ecosistemas de la enfermedad en los países afectados y la existencia de extensas áreas libres de las enfermedades vesiculares en el continente, imponen la necesidad de un diagnóstico rápido y seguro.

1 RECOLECCIÓN Y PREPARACIÓN DE MUESTRAS PARA EL DIAGNÓSTICO PRIMARIO DE FA Y EV

A los efectos del diagnóstico de las enfermedades vesiculares, tienen prioridad las muestras de tejido epitelial vesicular bucal, lingual, podal o de glándula mamaria de los animales enfermos. En su defecto se podrá coleccionar líquido esofágico-faríngeo (LEF). Se recomienda complementar las muestras indicadas anteriormente con muestras de suero pareadas de animales convalecientes y de animales que no hayan presentado sintomatología clínica y con las muestras necesarias para diagnóstico diferencial.

En casos de efectuar necropsias se podrá tomar muestras del miocardio y de vesículas encontradas en el aparato digestivo (pilares del rúmen en bovinos).

Cualquier duda con relación a la colecta de la muestra o su envío, llamar al Laboratorio de Referencia OIE/FAO de PANAFTOSA, a través de los teléfonos (+55 21) 3661-9064/9083 o (+55 31) 3660 9726/9728.

1.1 Muestras de tejidos

Los epitelios vesiculares bucal, lingual, podal o de glándula mamaria deberán ser extraídos preferentemente de lesiones vesiculares recientes y depositados en recipientes de boca ancha provistos de tapa a rosca, que contengan Tampón de Glicerina Fosfatada (Tabla 1) o Líquido Vallée (Tabla 2) en cantidad suficiente para que la muestra quede sumergida. Tratar que la muestra sea abundante, como mínimo de 1 gramo. Con muestras menores de 1 g difícilmente podrá realizarse aislamiento y tipificación viral.



Pequeños trozos de un mismo tejido y animal, se pueden colocar en un único recipiente. Muestras de linfa tomadas de vesículas intactas, utilizando jeringa, son apropiadas para el diagnóstico y deben ser colocadas en un tubo separado, volumen a volumen, con tampón de glicerina fosfatada o líquido Vallée.

Un rápido y preciso diagnóstico se facilita con muestras de buena calidad y cantidad.

Sellar la tapa de los recipientes y desinfectarlos externamente. Mantener y enviar las muestras refrigeradas utilizando sachets de gel refrigerante para mantener las muestras a temperatura de + 4°C o menor, de preferencia a -20 °C.

1.2 Muestras de líquido esofágico-faríngeo - LEF

El LEF se obtiene raspando la mucosa de la región faríngea y anterior del esófago, con un colector apropiado (PROBANG). Previo a la colecta, los animales deberán permanecer en ayuno por un período de 12 horas, para evitar regurgitaciones de contenido ruminal que contaminen la muestra.

Luego de efectuada la colecta, el contenido del PROBANG debe ser transferido a un recipiente de boca ancha con tapa a rosca, debidamente identificado.

Adicionar al LEF una cantidad igual de Medio EARLE (con antibiótico 2x) (Tabla 3). Sellar el recipiente, con cinta adhesiva y agitarlo cuidadosamente para homogeneizar el material con el medio. En seguida, y luego de la desinfección externa, colocar el recipiente con la muestra dentro de otro recipiente con hielo común adicionado con sal gruesa o sachets de gel refrigerante a -20°C. Asegurarse que la refrigeración sea adecuada y suficiente para al tiempo de transporte.

1.3 Muestras de sueros

Como ya se mencionó en el ítem 1 para “el diagnóstico de las enfermedades vesiculares, tienen prioridad las muestras de tejido epitelial vesicular bucal, lingual, podal o de glándula mamaria de los animales enfermos”. Puede ser de utilidad recolectar muestras de sueros para complementar los estudios. Estas muestras se colectarán de animales identificados en la fase aguda de la enfermedad y una segunda muestra de los mismos animales 2 a 5 semanas después de la primera muestra. Adicionalmente se recomienda tomar muestras representativas de animales del rebaño incluyendo animales de varias especies susceptibles con y sin sintomatología clínica.

El sangrado debe ser ejecutado preferentemente utilizando tubos tipo "vacutainer" o jeringas descartables con agujas estériles de tamaño y calibre apropiado para la especie. Mantener los tubos conteniendo la sangre en posición inclinada, mientras coagula. Una vez coagulado (centrifugar de ser



necesario), pasar el suero a microtubos plásticos descartables con tapa a rosca de 1.5 mL o tubos de tipo Eppendorf. Llenarlos a los 2/3 de su capacidad e identificar los tubos correctamente con etiqueta resistente a la humedad y letra legible usando tinta indeleble. Luego enfriar en cajas térmicas o refrigerador a +4 °C hasta el envío al laboratorio. Para su envío utilizar sachets de gel refrigerante de manera a mantener las muestras a temperatura de +4°C o menor, de preferencia a -20 °C.

1.4 Hisopados

Eventualmente se podrá remitir hisopado de mucosa bucal, nasal u ocular.

Para ello frotar enérgicamente el hisopo en la mucosa y depositarlo luego en un tubo apropiado con el medio de mantenimiento recomendado (medio EARLE con 2x antibiótico para aislamiento de virus vesiculares y medio EAGLE – MEM con 10% de suero fetal bovino para aislamiento de virus incluidos en el diagnóstico diferencial). El volumen de medio de mantenimiento debe ser suficiente para cubrir el hisopo.

2. PREPARACIÓN DE MUESTRAS DE FIEBRE AFTOSA PARA EL DIAGNÓSTICO POR PCR Y SECUENCIAMIENTO

Antecedentes

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es un importante complemento al conjunto de herramientas disponibles para el diagnóstico de fiebre aftosa. Esta técnica hace posible la rápida detección de pequeñas cantidades de ácido nucleico y el producto puede ser usado para secuenciamiento directo.

El ARN viral es extraído de la muestra y usado como molde para producir un ADN complementario (cADN) que a su vez es usado en la reacción de PCR.

El éxito de esta técnica depende básicamente de la integridad del ARN en las muestras que se usarán en el estudio. Se debe minimizar el contacto de la muestra con enzimas que puedan degradar el ARN (RNasas).

Se usa el TRIZOL-LS™ con el propósito de inactivar el virus y extraer ácidos nucleicos de muestras de tejido o líquidas para PCR.

Este compuesto contiene fenol e isotiocianato de guanidina los cuales desnaturalizan de manera irreversible las proteínas incluyendo RNasas manteniendo la integridad del ARN.



ADVERTENCIA

TRIZOL-LS™ es un producto químico a base de fenol, por lo tanto es un material potencialmente tóxico y corrosivo.

Siga las recomendaciones de seguridad indicadas por el fabricante

Cuidado: Puede causar quemaduras, intoxicación, paro respiratorio, convulsiones, muerte, por lo tanto, al manipular se debe de usar:

GUANTES, PROTECTOR DE OJOS, NARIZ y BOCA, PIPETA AUTOMÁTICA O PROPIPETA, CABINA DE SEGURIDAD PARA MANIPULAR PRODUCTOS QUÍMICOS.

La piel es la principal puerta de contaminación. Con cantidades mínimas se alcanzan altos niveles de toxicidad, pudiendo causar pérdida de sensibilidad localizada. En caso de accidente, lavar con abundante agua corriente, cualquier parte del cuerpo que tome contacto con TRIZOL.

Su inhalación es peligrosa. Puede causar daños al aparato respiratorio hasta provocar paro respiratorio.

De ser ingerido, no se debe inducir vomito.

Puede causar intoxicación sistémica, convulsiones y hasta la muerte. Por esas razones en cualquier accidente buscar urgente ayuda y orientación médica.

2.1 Precauciones especiales

Las RNAsas pueden ser introducidas accidentalmente dentro de la preparación de ARN en cualquier momento durante la colección y el envío de la muestra. Debido a que la actividad de las RNAsas es difícil de inhibir, es muy importante evitar su introducción. Para tal fin se recomienda:

- En todo momento usar guantes de látex, sin talco, estériles y descartables.
- Usar material plástico descartable y estéril (incluyendo punteras y microtubos). En general, el material plástico estéril que esté certificado para uso en cultivo celular puede ser usado.
- Usar micropipetas dedicadas exclusivamente para la manipulación de este tipo de muestras.
- Todo material que no sea descartable debe ser esterilizado. Usar horno durante 2 horas a +180 °C.
- En el caso de material plástico que no sea descartable (soporte para tubos, etc.) debe ser sumergido por aproximadamente 60 minutos en 0.5 M NaOH, luego lavar copiosamente con agua destilada y finalmente esterilizar por autoclave.



Las muestras en TRIZOL deben ser enviadas en microtubos estériles descartables de polipropileno de 1.5 mL con tapa a rosca o tubos tipo Eppendorf. Antes de enviar el material, asegurarse que esté debidamente sellado para evitar pérdidas durante el transporte. Al seleccionar el material de plástico, evite usar plásticos sensibles al fenol.

Las muestras tratadas con TRIZOL se pueden almacenar a -20°C o -70°C . Cuando sean acondicionadas para su envío al laboratorio asegurar una temperatura de $+4^{\circ}\text{C}$ o menor durante el transporte.

Si es posible, enviar diferentes muestras del mismo caso, por ejemplo: material original (epitelio, fluido vesicular, secreción nasal, etc.) y suspensiones de pasajes de las muestras replicadas en cultivo celular (diferentes pasajes, etc.).

2.2 Muestras para PCR

Tejidos: Colocar aproximadamente 50-100 mg de tejido en 1 mL de TRIZOL. Homogeneizar (el volumen de la muestra no debe exceder 10% del volumen de TRIZOL adicionado). Alternativamente, puede ser preparada una suspensión de 250 μL de tejido al 10% (p/v) en Medio EARLE (con antibiótico 2x) o PBS (solución salina fosfatada), con posterior adición de 750 μL de TRIZOL, y vigorosa homogeneización. Refrigerar inmediatamente y congelar a -20°C o -70°C hasta su procesamiento.

Líquido esofágico-faríngeo (LEF): Diluir la muestra de raspado esofágico-faríngeo con igual volumen de Medio EARLE (con antibiótico 2x). Homogeneizar y centrifugar para descartar restos de tejido. Recoger el sobrenadante en tubo estéril. Por cada 100 μL de muestra adicionar 900 μL de TRIZOL y congelar a -20°C o -70°C hasta su uso.

Hisopado nasal: Frotar un hisopo hasta su impregnación con la secreción nasal. Agitar el hisopo en 250 μL de Medio EARLE (con antibiótico 2x) o PBS, dentro de un tubo de 2 mL. Adicionar 750 μL de TRIZOL, refrigerar inmediatamente y congelar a -20°C - -70°C .

Cultivo celular:

Sobrenadante: por cada 250 μL de sobrenadante adicionar 750 μL de TRIZOL, homogeneizar y congelar a -20°C - -70°C hasta su uso. (En este caso el título viral debe ser por lo menos de 10^5 CCID₅₀/mL).

Monocapa infectada: Descartar el sobrenadante de la infección y posteriormente lisar la monocapa de células directamente en el frasco de cultivo celular, agregando TRIZOL (0,3-0,4 mL/ cm^2 de monocapa). Agitar vigorosamente hasta desprender la monocapa, homogeneizar bien y congelar a -70°C hasta su uso.

Células en suspensión: Sedimentar las células por centrifugación. Adicionar 1 mL de TRIZOL por cada $5-10 \times 10^6$ células, homogeneizar y congelar a -20°C - -70°C .



3. PROCEDIMIENTO PARA LA COLECTA Y ENVÍO DE MUESTRAS PARA EL DIAGNOSTICO DIFERENCIAL

Cuando se requiera realizar el diagnóstico de otras enfermedades confundibles clínicamente con fiebre aftosa se deberán remitir:

3.1 Para el aislamiento del virus de la Rinotraqueitis Infecciosa Bovina (IBR)

Hisopados de secreciones y lesiones: Deberá contener células epiteliales, para lo cual se recomienda frotar el hisopo con cierta intensidad. Las muestras se colectan de ojo, nariz, boca, ano, vagina, prepucio. El hisopo debe acondicionarse en un tubo, conteniendo medio de transporte en cantidad suficiente para mantener el hisopo húmedo durante el transporte. Para transporte se recomienda EAGLE MEM con 10% de suero fetal bovino irradiado y antibiótico 2x (Tabla 5).

Organos: Durante la necropsia se pueden obtener membranas mucosas del aparato respiratorio, amígdala, pulmón y ganglios linfáticos. En caso de abortos tomar muestras de hígado, pulmón, bazo y riñón del feto y cotiledones placentarios. De haber sintomatología nerviosa remitir líquido cefalorraquídeo.

Todas las muestras, se deberán enviar en EAGLE MEM con 10% de suero fetal bovino irradiado y antibiótico 2x (Tabla 5), refrigeradas a +4 °C.

3.2 Para el aislamiento del virus de la Diarrea Viral Bovina (BVD)

Hisopados de secreciones y lesiones: Se deben remitir hisopados nasal y ocular. El momento ideal para la toma de la muestra es cuando el animal presenta secreciones serosas (no mucopurulentas). Debe contener células epiteliales y/o células blancas (monocitos). Frotar el hisopo con intensidad.

Para el transporte utilizar EAGLE MEM con 10% de suero fetal bovino irradiado y antibiótico 2x (Tabla 5). Todas las muestras, se deberán enviar refrigeradas a +4 °C.

Sangre entera con EDTA (1mg/mL): Colectar sangre a razón de 3-5 mL por muestra. Homogeneizar el contenido invirtiendo suavemente el tubo 6-8 veces. Mantener refrigeradas hasta su llegada al laboratorio. **(No congelar).**

Organos: Remitir muestras de intestino delgado, placas de Peyer, esófago, pulmón, adrenal, ganglios linfáticos mesentéricos y tejidos fetales.

Para el transporte utilizar EAGLE MEM con 10% de suero fetal bovino irradiado y antibiótico 2x (Tabla 5). Todas las muestras, se deberán enviar refrigeradas a 4 °C.



3.3 Para el aislamiento del virus de la Lengua Azul (LA)

Sangre entera con EDTA (1mg/mL): Colectar sangre a razón de 3-5 mL por muestra. Homogeneizar el contenido invirtiendo suavemente el tubo 6-8 veces. Mantener refrigeradas hasta su llegada al laboratorio. (**No congelar**).

Organos: Remitir muestras de bazo, hígado, médula ósea, sangre del corazón, nódulos linfáticos y epitelio ulcerado de la boca.

Para el transporte utilizar EAGLE MEM con 10% de suero fetal bovino irradiado y antibiótico 2x (Tabla 5). Todas las muestras, se deberán enviar refrigeradas a +4 °C.

3.4 Sueros pareados para serología

En todos los casos (IBR, BVD o LA), remitir sueros pareados de los animales afectados y sanos en contacto.

Identificar los animales a sangrar para facilitar la toma de la segunda muestra de suero. Entre la primera y segunda muestra dejar pasar 2 a 4 semanas.

Todas las muestras, se deberán enviar refrigeradas a +4 °C.

4. ENVÍO DE LAS MUESTRAS A PANAFTOSA

Todas las cajas y los envases conteniendo material biológico deberán estar correctamente etiquetadas con el código de UN correspondiente a la categoría y naturaleza del material y acompañadas de la documentación en la que se especifique el tipo de material que se remite, su riesgo biológico y que el mismo se acondicionó cumpliendo Normas Internacionales para transporte de muestras biológicas. Los documentos deben acompañar la caja. Las muestras para diagnóstico serán identificadas como UN 3373 Biological substance, Category B – muestras para diagnóstico. El envase y las cajas para transporte deberán atender las normas internacionales para transporte de este tipo de material.

Deberá estar acompañado de los protocolos que contengan la información epidemiológica relevante del caso y conformados de manera tal que permitan asociar e identificar las muestras enviadas. (Tabla 6).

4.1 Las muestras para diagnóstico son consideradas “Substancias Biológicas, Categoría B” y deben ser acondicionadas en envase triple para su transporte, conforme al Manual IATA Dangerous Goods Regulations, Packing Instructions 650.



Usar envases de plástico de buena calidad con tapas de rosca y una cinta selladora sobrepuesta en la tapa. Los sueros deben ser remitidos, preferentemente, en microtubos plásticos descartables de 1.5 mL con tapa a rosca o tubos tipo Eppendorf. Recordar llenarlos solo hasta los 2/3 de su capacidad. Para prevenir daños o posibles roturas con dispersión del contenido, deben ser envueltos en algodón u otro material absorbente impregnado con ácido cítrico 1%, colocados dentro de una bolsa plástica y acomodados adecuadamente en un recipiente de paredes resistentes con tapa de rosca que se cierre herméticamente (envase de protección secundario). De quedar espacio libre, completar con algodón el envase secundario. Este, deberá colocarse dentro de un envase resistente y de tapas herméticas (envase terciario).

Tanto el envase primario, el secundario como el terciario deberán estar correctamente identificados y desinfectados externamente con solución desinfectante (Tabla 4).

Estos requisitos de “acondicionamiento de muestras para el transporte” dan cumplimiento a Normas Internacionales y a la Instrucción Normativa n° 05, de 28 de marzo de 2012 de la Secretaría de Defensa Agropecuaria del Ministerio de Agricultura, Pecuaria y Abastecimiento de Brasil, que aprueba las normas sobre Seguridad Biológica para la Manipulación del Virus de la Fiebre Aftosa en su territorio.

Acondicionarlos luego en una caja térmica (nueva, no reutilizada) para transporte de material biológico introduciendo sachets congelados a -20 °C en cantidad suficiente para una durabilidad compatible con el tiempo previsto para su llegada al destino. Colocar la caja térmica en una de cartón homologada para transporte de material biológico, que será el envase exterior donde se colocarán las marcas y etiquetas correspondientes. En un sobre resistente a la humedad **colocar copia de toda la documentación (certificados y protocolos)**. Esta información se colocará entre la caja térmica y la caja de cartón exterior.

4.2 Siempre que posible, colocar en cajas separadas el material destinado a pruebas de aislamiento viral (epitelio, LEF, fluido vesicular), de otros destinados a diagnóstico molecular o serológico (sueros o materiales en TRIZOL).

La cantidad máxima que puede ser acondicionada en el envase primario es 1 L y el envase terciario no debe contener más de 4 L o 4 Kg.

http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/149288/1/WHO_HSE_GCR_2015.2_eng.pdf?ua=1&ua=1



4.3 Etiquetar la caja

a) Nombre y dirección del destinatario:

CENTRO PAN-AMERICANO DE FIEBRE AFTOSA
PANAFTOSA - OPS/OMS
Avenida Rômulo Joviano, s/n LANAGRO, Pedro Leopoldo, MG
Brasil CEP: 33600-000
Tel.: +(55 31) 3660 9726/9728; +(55 21) 3661 9083/9064
Fax.:+(55 21) 3661-9001

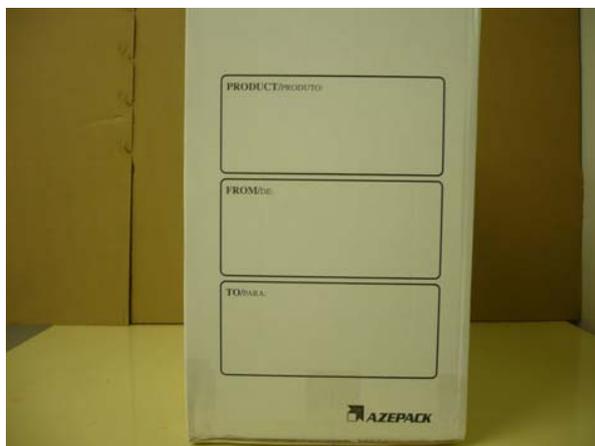
- b) Nombre y dirección del remitente
- c) La categoría del envío, BIOLOGICAL SUBSTANCE, CATEGORY B
- d) La etiqueta con el número de las Naciones Unidas, UN 3373
- e) Nombre de expedición y cantidad líquida incluida
- f) Nombre y teléfono de contacto de emergencia
- g) Etiqueta “Este lado para arriba ↑↑ ” en dos lados opuestos de la caja)
- h) Cubrir las etiquetas con cinta adhesiva transparente para evitar que se torne ilegible ante eventuales mojaduras.



Procedimientos para colecta y remisión de muestras para el diagnóstico de enfermedades vesiculares y su diagnóstico diferencial

En el enlace abajo se puede encontrar información sobre empaque de muestras para transporte aéreo

<http://www.iata.org/whatwedo/cargo/dgr/Documents/packing-instruction-650-DGR56-en.pdf>

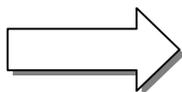




4.4. En el caso de sustancias infecciosas, categoría A, por ejemplo, volúmenes superiores a 50 mL de sobrenadante de cultivo celular infectado con virus de fiebre aftosa, utilizar embalaje P620 y verificar instrucciones de envío en

http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/149288/1/WHO_HSE_GCR_2015.2_eng.pdf?ua=1&ua=1

4.5 Antes de despachar el material contactar por **fax, teléfono y correo electrónico** al Laboratorio de Referencia OIE/FAO de PANAFTOSA solicitando la autorización de importación del material biológico. PANAFTOSA tramitará frente a las autoridades sanitarias de Brasil el permiso correspondiente y se lo hará llegar por vía electrónica. Esta autorización debe acompañar la documentación al momento del despacho del material.



Fax (+ 55 21) 3661-9001

Teléfonos (+ 55 21) 3661-9083/9064; (+55 31) 3660 9726/9728

Correo electrónico: rallende@paho.org; adrumond@paho.org y mssilva@paho.org (laboratorio de referencia), con copia a fortescl@paho.org (administrador)

4.6 Se recomienda **no utilizar servicios de "courier"**. **Caso decida hacerlo recomendamos verificar con anticipación que la compañía está aprobada para transporte de material biológico y que garantiza la entrega en el destino final en un plazo no mayor a 72 h.**

4.7 Asegurarse en el momento del envío que no haya cambio de la compañía aérea elegida para el transporte. Esto es importante porque el número de la guía también será cambiado, aumentando la posibilidad de extravíos.

4.8 Es preferible que el material biológico llegue al Aeropuerto Internacional de Confins (CNF), Belo Horizonte – Minas Gerais, Brasil (caso no sea posible, enviar para Aeropuerto Internacional Galeão (GIG), Rio de Janeiro, Brasil), entre Lunes y Jueves, para facilitar su liberación.



TABLA 1

TAMPON DE GLICERINA FOSFATADA (TGF) *	
Volumen total	2 litros
Fosfato de Potasio monobásico (KH_2PO_4) PM 136,09 g/mol	1.8 g
Fosfato de Potasio dibásico (K_2HPO_4) PM 174,2 g/mol	2.3 g
H ₂ O deionizada/destilada c.s.p.	1.000 mL
Solución Rojo Fenol al 1%	2 mL
Glicerol ($\text{C}_3\text{H}_8\text{O}_3$) PM 92,1 g/mol	1.000 mL

* Autoclavar durante 20 minutos a +121 °C por separado el glicerol y el tampón fosfato. Posteriormente esperar que la temperatura disminuya hasta aproximadamente +25 °C. En ambiente estéril juntar los dos volúmenes, homogeneizar cuidadosamente y distribuir en recipientes estériles adecuados para rutina de uso.

pH final entre 7.4 y 7.8 – Conservar en temperatura entre +4 °C – +8 °C

TABLA 2

LIQUIDO VALLÉE 50% *	
Volumen total	2 litros
Fosfato de Potasio monobásico (KH_2PO_4) PM 136,09 g/mol	1.35 g
Fosfato de Potasio dibásico (K_2HPO_4) PM 174,2 g/mol	7.8 g
H ₂ O deionizada/destilada c.s.p.	1.000 mL
Solución Rojo Fenol al 1%	0.10 mL
Glicerol ($\text{C}_3\text{H}_8\text{O}_3$) PM 92,1 g/mol	1.000 mL

* Autoclavar durante 20 minutos a +121 °C por separado el glicerol y el tampón fosfato. Posteriormente esperar que la temperatura disminuya hasta aproximadamente +25 °C. En ambiente estéril juntar los dos volúmenes, homogeneizar cuidadosamente y distribuir en recipientes estériles adecuados para rutina de uso.

pH final 7.6 – Conservar en temperatura entre +4 °C – +8 °C



TABLA 3

MEDIO EARLE con HIDROLIZADO de LACTOALBUMINA y EXTRACTO LEVADURA para COLECTA DE LIQUIDO ESOFAGICO-FARINGEO (antibiótico 2x)	
Volumen total	1 litro
Cloruro de Sodio (NaCl) - PM 58,44 g/mol	6.8 g
Cloruro de potasio (KCl) - PM 74,55 g/mol	0.4 g
Sulfato de magnesio (Mg SO ₄ 7 H ₂ O) - PM 246,48 g/mol	0.2 g
Fosfato de sodio (NaH ₂ PO ₄ H ₂ O) - PM 137,99 g/mol	0.14 g
Glucosa anhidra - PM 180,16 g/mol	1.0 g
Hidrolizado de Lactalbumina-Sigma Cat.20940 (Disolver separado)	5.0 g
Extrato de Levadura BD Difco Cat.288620	1.0 g
Bicarbonato de sodio (NaHCO ₃) - PM 84,01 g/mol	2.2 g
Cloruro de calcio (CaCl ₂) - PM 110,98 (disolver por separado y adicionar al final)	0.2 g
Sulfato de Neomicina - PM 908,9 g/mol	0.44 g
Penicilina G Potásica - PM 356,0 g/mol	200.000 UI
Fungizona - PM 924,09 g/mol	5.0 g
Solución Rojo Fenol al 1%	1.0 mL
H ₂ O desionizada c.s.p.	1.000 mL

Ajustar el pH a 7.4 – 7.6 con solución NaOH 1 mol/L o HCl 1mol/L

Filtrar por membrana 0.22 µm y distribuir en recipientes estériles adecuados para rutina de uso.



TABLA 4

SOLUCIONES DESINFECTANTES	
a) Solución Ácido cítrico + ácido acético	
Ácido cítrico al 1%	
Ácido acético al 0,5%	
b) Solución alcalina	
Carbonato de sodio al 4%	
c) Solución de Hipoclorito	
Hipoclorito de sodio al 20%	

TABLA 5

EAGLE MEM - PARA TRANSPORTE DE MUESTRAS PARA AISLAMIENTO VIRAL (antibiótico 2x)	
Volumen total	1 litro
Medio MEM en polvo (GIBCO-61 100-103)	9.5 g
Piruvato de Sodio (C ₃ H ₃ NaO ₃) PM 110,04 g/mol	0.11 g
Bicarbonato de Sodio (NaHCO ₃) PM 84,01 g/mol	1.50 g
Solución de Aminoácidos no esenciales	10 mL
Sulfato de Neomicina PM 908,9 g/mol	0.44 g
Penicilina G Potásica PM356,0 g/mol	200.000 U.I.
Fungizona PM 924,09 g/mol	5.0 mg
Suero Fetal Bovino irradiado	100 mL
H ₂ O desionizada c.s.p.	1.000 mL

pH final 7.5

Confirmar la osmolaridad de 270/340 mOsm/Kg H₂O

Filtrar por membrana 0,22 µm y distribuir en recipientes estériles adecuados a rutina de uso.



Procedimientos para colecta y remisión de muestras para el diagnóstico de enfermedades vesiculares y su diagnóstico diferencial

TABLA 6
PROTOCOLO DE REMISION DE MUESTRAS

Información mínima requerida:

País: _____ Institución: _____
 Autoridad responsable del envío: _____
 Teléfono: _____ Fax: _____
 Correo electrónico: _____

Muestra remitida	Identificación	Cantidad	Especie	Edad Categoría	Sexo	Fecha de toma	Observaciones
Epitelio lingual							
Epitelio podal							
Epit. Mamario							
LEF							
Suero							
Sangre							
Hisopados							
Organos							
Tejidos							

Provincia: _____
 Estado: _____
 Municipio: _____
 Nombre del Establecimiento: _____
 Cuadrante Epidemiológico Afectado: _____
 Especie Afectada: _____
 Categorías Afectadas: _____
 Fecha, marca y serie de las tres últimas vacunaciones antiaftosa:
 1 - _____
 2 - _____
 3 - _____
 Fecha de vacunación contra otras enfermedades virales o bacterianas:

 Tratamientos sanitarios realizados en los últimos 3 meses:

 Descripción de la sintomatología clínica:

 Estudios solicitados:
 Estudios que ya fueron hechos en su laboratorio (resultados):

 Información complementaria:



PANAFTOSA
Centro Panamericano de Fiebre Aftosa
Salud Pública Veterinaria

Procedimientos para colecta y remisión de muestras para el diagnóstico de enfermedades vesiculares y su diagnóstico diferencial

Versión N° 3

Actualizado en Julio de 2015 por:

Arianna Drumond Lage

Vanderly Campos

Augusto V. Arruda de Carvalho

Versión revisada por:

Rossana Allende

Jefa Laboratorio de Referencia OIE/FAO PANAFTOSA

Aprobado por:

Ottorino Cosivi, Director