

Artículo de investigación

Toma y remisión de muestras para diagnóstico de fiebre aftosa en Venezuela.

Collection and referral of samples for the diagnosis of foot-and-mouth disease in Venezuela

Machín-Pire Christel C. 1*

Universidad Centroccidental "Lisandro Alvarado" (UCLA)

Área de Microbiología e Inmunología Veterinaria. Departamento de Salud Pública. Decanato de Ciencias Veterinarias.

Núcleo Dr. Héctor Ochoa Zuleta. Decanato de Ciencias Veterinarias. Tarabana- estado Lara. Venezuela.0058-0251-2592609. e-mail: *christel.machin@ucla.edu.ve.

RESUMEN

La Fiebre Aftosa (FA), una de las enfermedades virales más transmisibles de los animales, es de mucha importancia económica por su impacto en la producción y en el comercio internacional de animales y sus productos. En Venezuela la enfermedad aún persiste con circulación endémica en todo su territorio. Al ser indistinguible de otras enfermedades vesiculares y de otras enfermedades confundibles con FA, su diagnóstico definitivo se realiza por laboratorio, el cual a su vez es de suma importancia para las campañas de erradicación por dar inicio a la aplicación de medidas de control que evitarán mayor propagación de la enfermedad. En Venezuela, en el marco de la atención de los focos sospechosos a FA (casos muestreados), se presenta la situación en la que no se logra determinar el agente causal de la enfermedad bajo sospecha (casos no confirmados), siendo reportados como negativos a FA y a otras enfermedades vesiculares y/o confundibles con FA. Entre las causas de no confirmación por laboratorio se encuentra la remisión de muestras no satisfactorias. Como contribución al programa nacional de erradicación, el trabajo incluye una revisión de manuales para toma y remisión de muestras al laboratorio; y aborda algunos aspectos referidos al muestreo para diagnóstico de FA en Venezuela; de importancia en la mejora de desempeño en el muestreo y, consecuentemente, en el diagnóstico, atención y control de los focos, y estimación más precisa de la incidencia de la enfermedad en el país.

Palabras clave: Virus Fiebre Aftosa, toma de muestras.

ABSTRACT

Foot-and-mouth disease (FMD), one of the most transmissible viral diseases of animals, is of great economic importance due to its impact on the production and international trade of animals and their products. In Venezuela, the disease still persists with endemic circulation throughout its territory. As it is indistinguishable from other vesicular diseases and other diseases confusable with FMD, its definitive diagnosis is made by laboratory, which in turn is very important for eradication campaigns to initiate the application of control measures that will prevent further spread of the disease. In Venezuela, in the framework of the attention of the suspected outbreak to FMD (cases sampled), is presented the situation in which the causal agent of the suspected disease is not determined (unconfirmed cases), being reported as negative to FMD and other diseases vesicular and / or confusable with FMD. Among the causes of absence of confirmation by laboratory is the remission of unsatisfactory samples. As a contribution to the national eradication program, the work includes a review of manuals for collection and referral of samples and addresses some aspects related to sampling for the diagnosis of FMD in Venezuela, of importance in the improvement of performance in the sampling and, consequently, in the diagnosis, attention and control of the outbreaks, and more accurate estimation of the incidence of the disease in the country.

Key words: Foot-and-Mouth Disease Virus, sampling.

Recibido: 20-04-2018

Aceptado: 28-09-2018

INTRODUCCIÓN

Por su importancia económica, en Venezuela la erradicación de la Fiebre Aftosa (FA) es una política de Estado a cargo del Ministerio del Poder Popular para la Agricultura y Tierras (MPPAT), a través del Instituto Nacional de Salud Agrícola Integral (INSAI) (Servicio Veterinario oficial en Venezuela) [1, 2], y con el apoyo del Laboratorio Nacional de Referencia de Enfermedades Vesiculares del Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas (LNREV-INIA); (único laboratorio de diagnóstico de esta enfermedad, oficial y de referencia en el país). Debido a su elevada contagiosidad, el diagnóstico de FA amerita ser rápido [3], y es de suma importancia para las campañas de erradicación ya que da inicio a la aplicación de medidas de control. Al ser la FA indistinguible clínicamente de otras enfermedades vesiculares [Estomatitis Vesicular (EV) en el caso de Venezuela] y de las denominadas enfermedades confundibles con FA [4] (algunas presentes en Venezuela son: Rinotraqueitis Infecciosa Bovina, Diarrea Viral Bovina, Ectima Contagioso, y Pseudoviruela Bovina), el diagnóstico definitivo se realiza por laboratorio con el objetivo de confirmar o descartar, que el agente causal sea el Virus de la Fiebre Aftosa (VFA). Adicionalmente, como vigilancia epidemiológica se requiere identificar el serotipo y genotipo actuante y, a partir de las muestras obtenidas, se podrá también identificar la presencia del virus de la EV y de otros virus causantes de enfermedades confundibles con FA [5]. El diagnóstico se realiza mediante aislamiento del virus, demostración de antígenos, de ácidos nucleicos, y de anticuerpos específicos [4]. En LNREV-INIA se realiza diagnóstico de FA y EV, mediante el procesamiento de la misma muestra.

En Venezuela, en el marco de la atención de los focos sospechosos a FA (casos muestreados), se presenta la situación en la que no se logra determinar el agente causal de la enfermedad bajo sospecha (casos no confirmados), siendo reportados como negativos a FA y a otras enfermedades vesiculares y/o confundibles con FA [6, 7, 8, 9]; lo que compromete la atención y contención de los focos de enfermedad. Entre las causas de no confirmación por laboratorio se encuentra la remisión de muestras no satisfactorias. Como contribución al programa nacional de erradicación, el trabajo incluye una revisión de manuales para toma y remisión de muestras al laboratorio; y aborda algunos aspectos referidos al muestreo para diagnóstico de FA en Venezuela; de importancia en la mejora de desempeño en el muestreo y, consecuentemente, en el diagnóstico, atención y control de los focos, y estimación más precisa de la incidencia de la enfermedad en el país.

Toma y remisión de muestras al Laboratorio Nacional de Referencia de Enfermedades Vesiculares del Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas (LNREV-INIA).

a) Notificación a INSAI.

Se notifica la presencia de animales con enfermedad vesicular. La notificación es de carácter obligatorio y puede ser realizada por cualquier persona natural o jurídica, que tenga conocimiento de dicha circunstancia, según lo dispuesto en la normativa vigente en materia de sanidad animal en Venezuela [1, 2]. Contactar con la Coordinación Nacional de Epidemiología (sede central) (datos de contacto en www.insai.gob.ve) o con la sede regional más cercana (oficina municipal).

b) Toma de muestras para diagnóstico de Fiebre Aftosa.

La recolección de muestras para diagnóstico de FA se encuentra a cargo del INSAI [2], sin embargo, por el reducido periodo de posibilidad de obtención de muestras para detección de virus (24-48 horas de haber iniciado la aparición de vesículas), es oportuno y recomendable que Médicos Veterinarios en ejercicio libre de la profesión, en virtud de la premura, y como apoyo al programa de control y erradicación, realicen la toma de muestras durante la atención médica a los animales [2], previa notificación a INSAI y con su respectiva autorización (inclusive verbalmente y por vía telefónica), y bajo sus instrucciones; lo cual está soportado en los artículos 6, numeral 6, y 14 de la Gaceta Oficial de Venezuela N° 40.330.09-01. 2014 (Normas para el Programa Nacional de Vigilancia, Prevención, Control y Erradicación de la Fiebre Aftosa).

Las muestras de elección: son líquido vesicular o linfa vesicular, tejido epitelial vesicular bucal, lingual, podal o de glándula mamaria; acompañados de sueros pareados de animales enfermos, convalecientes y de animales que no hayan presentado sintomatología clínica. En su defecto se podrá coleccionar líquido esofágico-faríngeo (LEF). Eventualmente se podrá remitir hisopados de mucosa bucal, nasal, y ocular [5, 10] y de secreciones nasales [5, 11]. Se recomienda complementar las muestras indicadas anteriormente, con muestras para diagnósticos diferenciales de ser posible [5, 10]. La rapidez requerida en el diagnóstico de laboratorio de FA, se logra con la obtención de una muestra satisfactoria (calidad y cantidad), remitida al laboratorio en condiciones óptimas (líquido de preservación adecuado y refrigeración desde la recolección hasta su arribo al laboratorio) [5, 10, 12];

Muestras para diagnóstico de fiebre aftosa en Venezuela

que garantizarán la integridad y viabilidad del agente causal, imprescindible para el aislamiento viral. La calidad se refiere a una alta cantidad de virus viable o vivo. Las muestras que contienen la mayor carga viral son la linfa o líquido vesicular (la mejor muestra), seguido del epitelio de vesículas intactas (aún con linfa en su interior) y de vesículas recientemente rotas (vesículas tempranas). En cuanto a cantidad, es necesario recolectar la mayor cantidad posible de tejido; al menos 2 gramos, equivalente a un cuadrado de epitelio de dos (02) centímetros de lado aproximadamente. No es indispensable que se trate de un fragmento único: el peso o tamaño pueden lograrse con varios trozos pequeños obtenidos de una o más lesiones, que pueden ser de más de una ubicación anatómica de un mismo animal [conjunto (pool) de epitelios muestreados] [5, 10, 12, 13].

Las posibilidades de obtener una muestra con estas características son relativamente reducidas debido a que las vesículas sólo se presentan en la fase aguda de la enfermedad, sólo perduran de 24-48 horas [13, 14], en adelante rompen, liberan el líquido vesicular e inician la cicatrización, con lo que paralelamente va disminuyendo la carga viral (menor calidad de muestra) y la cantidad de tejido disponible para mostrar (cantidad insuficiente). Como consecuencia, el diagnóstico de laboratorio demorará más tiempo ya que requerirá un mayor número de pruebas, a fin de amplificar la población viral mediante aislamiento. De aquí la importancia de acudir de inmediato al predio afectado ante una notificación de enfermedad vesicular (otorgando el carácter de urgencia) a fin de conseguir animales en etapa aguda, los cuales proporcionarán las muestras que garanticen el diagnóstico rápido. La rapidez en los diagnósticos es de importancia, desde el punto de vista del retraso en la aplicación de las medidas de control, como de las pérdidas económicas (indirectas) que aquejan a un productor, cuyo rebaño está siendo afectado por una enfermedad sospechosa a FA durante la espera de los resultados de laboratorio; considerando además que el predio afectado se encuentra en cuarentena (prohibición de venta de productos de origen animal y otras restricciones) desde la visita de atención al foco por parte de INSAI.

c) Examen Clínico:

Se recomienda comenzar por los animales aparentemente sanos y por último aquellos que se muestren decaídos, con claudicaciones, salivación, o cuya producción de leche ha disminuido bruscamente. Además de conseguir vesículas tempranas, también se encontrarán lesiones en fase de cicatrización, las cuales darán indicaciones para una estimación más precisa del inicio del episodio [5] y proporcionarán otras muestras de utilidad para el diagnóstico. Siempre que

sea posible, proceder al examen clínico en el mismo lugar en que están los animales enfermos con la ayuda del personal mínimo necesario. La medición de la

temperatura a animales aparentemente sanos es de utilidad en la búsqueda de animales febriles (indicio de etapa aguda de enfermedad), los cuales deben ser examinados a fin de obtener de muestras [5] en el momento o en los días siguientes, de especial interés en caso de conseguir muestras insuficientes al momento de la primera visita al predio. Examinar cavidad oral, patas y ubres. En presencia de lesiones vesiculares, tomar muestras de linfa o líquido vesicular, epitelio y suero sanguíneo. Cuando las lesiones se encuentran cicatrizando (animales convalecientes), tomar muestras de LEF y suero sanguíneo. La inspección de la cavidad oral se realiza con el uso de material de sujeción (narigón, abreboca, bozal), en una manga o brete de ser posible. Se procede inicialmente sujetando firmemente la lengua con ayuda de una tela de paño, introduciendo la mano entre los maxilares desde un lateral del animal. La lengua se mantiene siempre sujeta, fuera de la cavidad oral, girada hacia un lado. Se requiere trabajo de 3 personas como mínimo. Buscar lesiones en los labios, encías, lengua y paladar. Al tomar las muestras, es obligatorio el uso de guantes, pinzas y tijeras estériles o asépticas, realizando cambio o desinfección del material para cada animal. A la salida del lugar del foco sospechoso a FA, antes de salir del predio, se debe lavar y desinfectar el equipo y materiales utilizados en los exámenes clínicos y toma de las muestras, así como también los vehículos de transporte (ruedas) (en la Tabla I se muestran algunas soluciones desinfectantes empleadas y su preparación), cambiar la ropa de trabajo, colocarla en sacos, que sólo serán abiertos en el lugar donde serán lavados y por último, lavar y desinfectar las manos. Las personas que participaron en la toma de muestras, no podrán visitar otros predios o lugares donde se encuentren especies susceptibles a FA durante un periodo de 8 días [5, 12, 13].

d) Muestras de elección y procedimientos

1) Muestras de líquido de vesículas.

Materiales:

Jeringa y tubo con tapa de caucho (tubo sin anticoagulante). Si se logra detectar animales con vesículas intactas, se debe recolectar muestras de linfa o líquido vesicular, tanto como sea posible. Se extrae con jeringa y aguja estéril. Se recomienda doblar la aguja de la jeringa para sellarla o bien transferir su contenido a un tubo de ensayo con tapa. Refrigerar y enviar de inmediato (máximo 24 horas) a temperatura de 2-4°C durante el transporte [5, 10, 12]

ACIDO ACÉTICO AL 2%	ACIDO ACÉTICO AL 0,5%
2 ml de ácido acético glacial en 98ml de agua.	0,5 ml de ácido acético glacial en 100ml de agua.
400ml de ácido acético en 20 litros de agua.	100ml de ácido acético en 20 litros de agua.
Indicaciones: Objetos de laboratorio o cabinas de vehículo Obs.: Es poco corrosivo para objetos de metal, pero tiene poca penetración cuando el virus está contenido en material orgánico.	Indicaciones: Objetos de laboratorio o cabinas de vehículos.
VINAGRE AL 0,5%	SOLUCIÓN DE CREOLINA AL 10%
2 litros de Vinagre de uso doméstico (ácido acético al 5%) 20 litros de agua.	a) Preparación: Mezclar 9 litros de agua con un litro de creolina comercial al 10%. 2,2 litros de creolina en litros de agua.
Indicaciones: Objetos de laboratorio o cabinas de vehículos.	b) Tiempo de contacto: 2 horas.
SOLUCIÓN DE FORMOL AL 10%	c) Método de aplicación: Pulverización, aspersion.
Disolver 0,5 litros de formalina (solución de formol comercial 40%) en 5 litros de agua.	d) Indicaciones: Instalaciones, vehículos estercoleras.
Tiempo de contacto: 30 minutos a 3 horas.	
Método de aplicación: Pulverización, aspersion e inmersión.	
Precauciones: Uso de máscara.	
Indicaciones: Vestuarios, utensilios, cueros, pieles, huesos y pajas.	

Tabla I. Soluciones desinfectantes de uso en instalaciones bajo sospecha de fiebre aftosa.

2) Muestras de tejido epitelial vesicular bucal, lingual, podal o de ubre.

Materiales:

a) Tijeras y pinzas estériles. b) Frascos colectores estériles o en su defecto asépticos (Ej. envase colector de orina) c) Líquido de preservación recomendado (en la Tabla II se muestran las soluciones empleadas y su preparación).

Si la vesícula está aún intacta, luego de extraer el líquido, romperla con tijera para recolectar todo el tejido epitelial. Si las aftas ya están desgarradas, puede extraerse todo tejido epitelial que aun esté presente en estas lesiones. Cuando el epitelio se ha desprendido, se recurre al epitelio de los bordes de las erosiones. Extraer el epitelio de las vesículas con tijera y pinza estériles, e inmediatamente colocarlo en un frasco de boca ancha/tapa a rosca, debidamente rotulado y con el líquido de preservación, en cantidad suficiente para que la muestra quede sumergida. Cuando el medio conservante contiene indicador de pH (medio de color rosado) (Tabla II), es preciso observar su color en los frascos, ya que el indicador de pH, que da al medio un color rosado en la condición adecuada de pH, vira a anaranjado o amarillo si está acidificado (condición no adecuada), en cuyo último caso, el medio no debe ser utilizado [5, 10, 12]. A nivel de campo, cuando no se dispone de alguno de los líquidos de preservación recomendados, y ante la premura por sospecha a FA, se puede utilizar una solución hipersaturada de azúcar

común (Tabla II) [13] o coleccionarla sin líquido conservador; en este caso, el mantenimiento bajo refrigeración es mucho más estricto [12, 13], y posteriormente, de ser posible conseguir un frasco con líquido de preservación y transferirle la muestra [12]. Se puede utilizar un envase colector de orina asegurando el cierre de la tapa con esparadrapo o tela adhesiva [13]. Si se utilizan frascos de vidrio, se recomienda esterilizarlos mediante ebullición de agua durante 10 minutos y tomar medidas para evitar su ruptura durante el envío (uso de algodón, periódico u otros) [12]. Recolectar la mayor cantidad posible de epitelio; puede ser de varias lesiones de diferentes ubicaciones anatómicas. Si las muestras se toman de diferentes partes de un mismo animal, colocarlas en frascos separados indicando en cada uno la ubicación anatómica de donde fue obtenida la muestra y que provienen de un mismo animal (identificación del animal en todos los frascos). En caso de resultar insuficiente la cantidad de tejido (menos de 2 gramos), colocar todos los fragmentos epiteliales obtenidos de un mismo animal en un solo frasco (pool de epitelios), indicando las zonas anatómicas de donde fueron obtenidas. Ej. Pool epitelio bucal y de ubre. En el caso de las lesiones podales y de ubre, es necesario lavarlas previamente con abundante agua limpia, sin usar jabón ni antisépticos antes de tomar las respectivas muestras. Las muestras de vesículas podales se encuentran generalmente más contaminadas que las bucales y de ubre, por lo que se recomienda no hacer pool con éstas. Recolectar muestras de varios

Muestras para diagnóstico de fiebre aftosa en Venezuela

animales, en frascos separados por cada muestra y cada animal. Nunca hacer en un sólo frasco pool de epitelios de animales diferentes [5, 12, 13]. Sellar la tapa de los frascos con cinta adhesiva de uso médico (esparadrapo), desinfectarlos externamente evitando el ingreso del desinfectante a su interior y luego lavarlos con agua (Tabla I). La etiqueta de los frascos, debe contener la siguiente información: a) Datos del predio o lugar donde se obtuvo la muestra (Nombre, Parroquia/Municipio/Estado); b) Identificación del animal, especie y grupo etario; c) Material que

por contiene (Ej. Epitelio de lengua, pool de epitelio bucal y mamario, pool de epitelios podales); d) Fecha de recolección. Indicar si de un mismo animal se remiten también muestras de sueros pareados. El mismo esparadrapo proporciona una buena etiqueta. La escritura debe hacerse con lápiz o marcador indeleble, ya que las escrituras con tinta suelen humedecerse y se tornan ilegibles [5, 12, 13]. Refrigerar y enviar de inmediato (máximo 24 horas) a temperatura de 2-4°C durante el transporte [5, 10, 12].

MEDIO VALLE 50%		TAMPON DE GLICERINAFOSFATADA (TGF)	
KH ₂ PO ₄ Fosfato monopotásico	1,35g	KH ₂ PO ₄ Fosfato monopotásico	1,80g
K ₂ HPO ₄ Fosfato dipotásico	7,80g	K ₂ HPO ₄ Fosfato dipotásico	2,30g
H ₂ O desmineralizada c.s.p	1000ml	H ₂ O desmineralizada	1000ml
Glicerol o Glicerina neutra pH 7,6	1000ml	Glicerina neutra	1000ml
SOLUCION HIPERSATURADA DE AZUCAR		Rojo fenol a 1%	2ml
Se prepara con agua limpia (hervida) a temperatura ambiente. Se adiciona azúcar. La solución se considera hipersaturada en el momento en que el azúcar deja de disolverse. Utilizada únicamente cuando no se dispone de las soluciones anteriores.		pH final entre 7,4 y 7,8	
Este medio conservante contiene indicador de pH (medio de color rosado). Es preciso observar el color del medio conservante, ya que el mismo contiene un indicador de pH, que dá al medio un color rosado en la condición adecuada de pH, y vira al anaranjado o amarillo si está acidificado (condición no adecuada), en cuyo último caso, el medio no debe ser utilizado. Preservar bajo refrigeración.		SOLUCION DE GLICERINA AL 50%	
SOLUCIÓN SALINA FOSFATADA O PHOSPHATE BUFFER SALINE (PBS) PH 7,4		Solución Isotónica al 0,9% (fisiológica) estéril	
Cloruro de Sodio	8,00 g	Glicerina neutra farmacéutica	Partes iguales
Cloruro de Potasio	0,20 g	Ej. 4 ml de glicerina y 4 ml de solución fisiológica. Preservar bajo refrigeración.	
Fosfato de Sodio	1,21 g		
Fosfato de Potasio	0,20 g		
Agua destilada	1000 ml		
MEDIO EARLE 2X CON HIDROLIZADO DE LACTOALBUMINA, EXTRACTO DE LEVADURA, PARA COLECTA DE MATERIAL ESOFAGICO-FARINGEO			
NaCl ₆ .	8,00g	NaHCO ₃	2,20 g
KCl	0,40 g	CaCl ₂	0,20 g (Disolver por separado y adicionar al final)
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,20 g	Sulfato de Neomicina (*)	0,22 g
NaH ₂ PO ₄ .H ₂ O	0,14 g	Penicilina G. Potásica (*)	100.000 UI
Glucosa Anhidra	1,00 g	Fungizona (*)	
Hidrolizado de Lactoalbúmina	5,00 g (disolver por separado)	Solución Rojo Fenol al 1%	
Extracto de Levadura	1,00 g	H ₂ O desmineralizada	c.s.p. 1.000 ml
Ajustar a pH 7,4 / 7,6 con solución NaOH o HCl a 1N. Filtrar por membrana 0,22 µm (*) Agregar el doble en el momento de uso.			

Tabla 2. Medios de preservación para muestras para diagnóstico de fiebre aftosa y estomatitis vesicular

3) Muestra de Líquido Esofágico-Faríngeo (LEF).

Es una muestra complementaria que se utiliza con la finalidad de aislar el VFA y confirmar la infección con

muestras de suero sanguíneo. Están indicadas en los siguientes casos [5]:

Machín C.

a) En los casos de notificación tardía o de retrasos en la visita de atención del foco, donde sólo se encuentran animales con lesiones ya cicatrizadas [5, 12].

b) Cuando las muestras tomadas a partir del caso índice (primer animal que manifestó los signos clínicos) arrojan resultados de laboratorio no concluyentes, o bien las muestras son insuficientes (lesiones escasas o mínimas). En estos casos se recomienda realizar un estudio complementario. Regresar al predio a los 15 días y tomar muestras de suero a un grupo significativo de animales que incluye aquellos que presentaron la sospecha clínica. Si alguno de los animales sale reactor a las pruebas serológicas, se regresa al predio con el fin de coleccionar muestras de LEF que permitirán confirmar la infección [5].

Adicionalmente, estas muestras son de utilidad para la búsqueda de animales portadores, debido al potencial de transmisión que presentan estos animales a través del contacto estrecho con otros animales susceptibles [5]. En zonas de baja prevalencia la detección de infección persistente o estado de portador, es crítica para garantizar la eliminación del virus de la población, de importancia en cuanto a las exigencias de la Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE) para el reconocimiento de país libre de FA, basada no únicamente en ausencia de enfermedad sino también de infección [15]. Se denominan portadores a aquellos animales (rumiantes) en los que el virus persiste en la región faríngea (parte dorsal y caudal de la faringe y esófago) durante más de 28 días después de la infección. Su diagnóstico se realiza sólo mediante aislamiento viral a partir de muestras LEF (no pueden ser diagnosticados por detección de anticuerpos). En ellos la presencia del virus es escasa e intermitente [16, 17] dificultando el aislamiento viral y requiriendo condiciones de toma y remisión de muestras más rigurosas que en las muestras epiteliales, como por ejemplo, congelación inmediata a la recolección [5]. En no portadores, después de la recuperación del estado agudo de infección, el virus desaparece de todas las secreciones y excreciones [16, 17]. Para la obtención de estas muestras se requiere insumos y adiestramiento adicionales. Actualmente estas muestras no se emplean en el diagnóstico de FA Venezuela.

Materiales

- Colector (copa PROBANG) esterilizado (No disponible comercialmente en Venezuela). Uno por animal (contenedor primario).
- Frasco de boca ancha y tapa de rosca, esterilizado o aséptico (contenedor secundario). Se puede utilizar un envase colector de orina asegurando el cierre de la tapa con esparadrapo o tela adhesiva.
- Medio EARLE 2x o PBS (Solución Salina Fosfatada) pH 7,4-7,6 (provisto por el laboratorio) (Tabla 2).

CO₂, perjudicando el aislamiento del virus. Mantener bajo congelación si no fuese posible el envío inmediato.

- Termo de plástico o polietileno (contenedor terciario).
- Hielo seco o hielo de agua con sal común (en caso de no disponer de hielo seco).

Estas muestras son tomadas de bovinos, ovejas o cabras convalecientes [5]. Del rebaño se seleccionan 5 ó 6 animales que comprobadamente sufrieron la enfermedad, lo que se verifica por la presencia de cicatrices o formación de epitelio nuevo en las zonas de presentación de lesiones (animales convalecientes). A falta del número de animales deseados se puede recolectar de animales que estuvieron en contacto con los enfermos. Para evitar contaminación con regurgitaciones, se recomienda que los animales a muestrear tengan un ayuno al menos de 12 horas, o bien dar de beber agua a los animales previo al muestreo. En animales temperamentales puede ser necesaria una sedación previa. Llevar a cabo la sujeción del animal colocándolo en un brete preferentemente, haciendo uso de narigón y sogas. Puede ser necesario el uso de un abreboca. Una vez maniatado el animal se debe mantener firmemente su cabeza hacia delante y ligeramente elevada. Introducir el colector PROBANG y hacer presión suave para que la copa sea tragada por el animal. Una vez se tenga la certeza que la copa está en cavidad esófago faríngea, se debe raspar las mucosas de faringe y zona anterior al esófago, moviendo el colector hacia arriba y abajo por tres veces aproximadamente y luego retirar la copa asegurando no derramar el contenido. Se debe utilizar un colector esterilizado por animal y en caso de no contar con el número suficiente, se deben lavar con abundante agua limpia, para luego ser utilizado en otro animal y así sucesivamente [5, 10, 12]. Verter la muestra en un frasco de boca ancha ya identificado (contenedor secundario), adicionar una cantidad igual (1:1) de medio EARLE 2x o de PBS, cerrar el frasco, sellarlo con cinta adhesiva, agitarlo vigorosamente para homogeneizar el material con el medio, y desinfectarlo externamente. Inmediatamente colocarlo en un recipiente con hielo seco (en su defecto hielo común y sal gruesa o sal común). Enviar al laboratorio bajo congelación, para ello, introducir el contenedor secundario (frasco de boca ancha con tapa de rosca) en el termo de plástico o polietileno (contenedor terciario) con suficiente hielo seco o hielo de agua y sal para mantener una temperatura de -20°C. En caso de realizar el envío al laboratorio a través de mensajería nacional utilizar obligatoriamente hielo seco. Se recomienda fijar el contenedor secundario al terciario para evitar daño en el contenedor secundario al ir desapareciendo el hielo. Asegurar que la refrigeración sea adecuada al tiempo de transporte [5]. En caso de usar hielo seco, garantizar el cierre adecuado del frasco ya que si éste no estuviera bien cerrado, hay riesgo de acidificación del material por penetración de

4) Muestras obtenidas por Hisopados.

Muestras para diagnóstico de fiebre aftosa en Venezuela.

Eventualmente se podrá remitir hisopado de mucosa bucal, nasal u ocular. Si es posible, enviar acompañada de diferentes muestras del mismo caso, por ejemplo: material original (epitelio, fluido vesicular, secreción nasal) [5, 10, 12]. Materiales (provistos por el laboratorio):

- Tubos de ensayo estériles con tapa de caucho o Tubos estériles de centrifuga de 1,6 ml. Si la muestra está destinada a RT-PCR (Reverso Transcripción - Reacción en Cadena de la Polimerasa), estos deben estar estériles y libres de nucleasas.
- Medio EARLE 2X o PBS pH 7,4-7,6.
- TRIZOLLS^{MR}. Para hisopados de secreción nasal destinados a RT-PCR y secuenciación (Producto potencialmente tóxico y corrosivo; seguir las recomendaciones de seguridad del fabricante).
- Hisopos estériles.

Frotar enérgicamente el hisopo en la mucosa (para obtener células epiteliales y partículas virales) y depositarlo luego en el tubo con el medio de mantenimiento recomendado (Medio EARLE 2X o PBS pH 7,4-7,6), cuyo volumen debe ser suficiente para cubrir el hisopo [10]. Partir el hisopo dejando dentro del tubo el extremo que contiene la muestra, o bien, retirar el hisopo, sumergirlo en ácido acético al 2% y posteriormente descartarlo [12]. Refrigerar y enviar de inmediato (máximo 24 horas) a temperatura de 2-4°C durante el transporte [5, 10, 12].

4.1) Muestras de secreción nasal obtenidas por Hisopados. Destinadas a la técnica RT-PCR y secuenciación. Aunque en LNREV-INIA esta técnica ha sido utilizada con fines de investigación [18], actualmente se requiere su implementación rutinaria en el diagnóstico de FA y EV. Se seleccionan animales con descarga nasal. Frotar un hisopo hasta su impregnación con la secreción nasal, agitarlo dentro de un tubo de 2 ml con 250 µl de Medio EARLE 2X o PBS pH 7,4-7,6. Adicionar 750 µl de TRIZOL LS^{MR}, refrigerar inmediatamente y luego congelar a -70°C [10, 11]. El éxito de esta técnica depende de la integridad del ácido nucleico viral (ARN) presente en la muestra. Se debe minimizar el contacto de la muestra con enzimas que puedan degradarlo (RNAsas), las cuales pueden ser introducidas accidentalmente dentro de la preparación en cualquier momento durante la recolección y envío de la muestra. Debido a que la actividad de las RNAsas es difícil de inhibir, es muy importante evitar su introducción, para lo cual se recomienda: Uso de guantes de látex, preferentemente sin talco, estériles y desechables. Estricta refrigeración o congelación de la muestra. Uso de material plástico descartable y estéril

(incluyendo puntas y microtubos). Puede ser usado material plástico estéril certificado para cultivo celular. En lo posible, usar micropipetas de uso exclusivo para manipulación de este tipo de muestras. En el caso de material plástico no descartable (soporte para tubos, etc.) debe ser sumergido por aproximadamente 60 minutos en 0,5 M NaOH, luego lavar copiosamente con agua destilada y 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, y se pueden almacenar a -20°C o -70 °C. Asegurar una temperatura de 2 a 4 °C durante el envío al laboratorio. Si es posible, enviar diferentes muestras del mismo caso (Ej. epitelio, fluido vesicular, entre otros) [10, 11].

5) Muestras de suero sanguíneo pareadas para diagnóstico serológico de Fiebre Aftosa.

Las pruebas serológicas tienen diversos objetivos en los programas de erradicación, pero ante una sospecha a FA, su objetivo es también confirmar o descartar que el agente causal sea el VFA. Los anticuerpos aparecen en sangre a partir de los 6 días post-infección. Estas muestras se remiten pareadas, complementando a las muestras de lesiones vesiculares y también a las muestras de LEF [5, 10, 12, 13]. El muestreo pareado consiste en tomar una primera muestra el día de la primera visita de atención de foco al predio (SP₁) y una segunda muestra (SP₂) a las 3 a 5 semanas después de la primera muestra (mismos animales a los que se recolectó muestra SP₁). Todos los animales a muestrear deben contar con identificación. Se colectarán de animales en la fase aguda de la enfermedad. Adicionalmente se recomienda tomar muestras representativas del rebaño: de animales sin sintomatología clínica y de animales de otras especies susceptibles a FA con y sin sintomatología clínica, si en la unidad de producción afectada los hubiere. El número de muestras a enviar debe ser representativo del rebaño [5, 10, 12] en cuanto a número total de animales y en cuanto a grupos etarios (incluir animales de todos los grupos etarios).

La identificación de los tubos debe incluir: a) Identificación del animal o número del tubo (en este último caso indicar la identificación del animal correspondiente en una planilla para muestras de sueros pareados). b) Muestreo al que pertenece. Ej., SP₁ o SP₂. La planilla para muestras de sueros pareados debe incluir: vacunación (fecha última vacunación, fabricante, lote y fecha de vencimiento de la vacuna), especie, fechas de ambos muestreos, datos de la unidad de producción (nombre, ubicación), y datos de contacto del propietario. Al lado de la identificación de cada tubo, especificar la edad (o grupo etario), sexo, muestreo al que pertenece (SP₁ o SP₂) y si corresponde a un animal enfermo, convaleciente, o aparentemente sano. Realizar un único envío al

laboratorio, una vez que se tienen los dos muestreos. Las muestras S₁ se mantienen congeladas (suero sin coágulo) hasta su envío al laboratorio junto con las S₂. Enviar bajo refrigeración.

6) Muestras de obtención post-mortem.

En animales muertos recientemente con signos clínicos compatibles a FA, colectar muestras de miocardio y vesículas del aparato digestivo (pilares del rumen en bovino) y colocarlas en frascos con la solución de preservación recomendada. Refrigerar y enviar de inmediato (máximo 24 horas) a temperatura de 2-4°C durante el transporte [5, 10, 12].

e) Envío y remisión de las muestras.

De no ser posible el envío inmediato, podrán preservarse a temperatura de 2-4°C (exceptuando las muestras LEF), hasta su remisión al laboratorio o la llegada del personal INSAI, teniendo en consideración que el periodo de envío debe ser no mayor a 24 horas. Siempre que sea posible, las muestras serán transportadas directamente al laboratorio por personal competente de forma rápida y fiable (contactar con www.insai.gob.ve o www.inia.gob.ve). De no ser posible, enviarlas a través de servicios de mensajería nacional (LNREV-INIA ubicado en la ciudad de Maracay-estado Aragua), asegurando que el tiempo de transporte de la muestra no trascorra durante un fin de semana (no enviar los días jueves o viernes). Las cavas de anime contentivas de las muestras y sachets de geles refrigerantes, deberán estar correctamente etiquetadas con la dirección de LNREV-INIA; acompañadas de la documentación con la información clínico-epidemiológica relevante sobre el caso y las muestras remitidas (formulario de envío de muestras de INSAI o uno elaborado por el Médico Veterinario quien tomó las muestras, y Planilla para Muestras de Sueros Pareados), debidamente protegida en un sobre y en funda plástica transparente, fijada en el exterior de la caja. El formulario de envío de muestras al laboratorio del Médico Veterinario que tomó las muestras, además de la información clínica y epidemiológica, debe incluir lo siguiente: nombre y ubicación del predio, datos de contacto del propietario; clase de muestras, fechas de recolección y de envío; nombre y datos de contacto del remitente [12]. En caso de que las muestras hayan sido recolectadas por Médicos Veterinarios de libre ejercicio en acuerdo con el personal INSAI, también podrán ser enviadas directamente al LNREV-INIA.

AGRADECIMIENTO

Al Profesor Carlos Medina Rivas, M.V. Esp., MSc., Departamento de Salud Pública del DCV, Universidad Centroccidental "Lisandro Alvarado" (UCLA), por la

(PANAFTOSA-OPS). 2012. Disponible en:

lectura crítica del manuscrito y por sus valiosos comentarios y aportes.

BIBLIOGRAFÍA

[1] Ley de Salud Agrícola Integral. Gaceta Oficial de la República Bolivariana de Venezuela N° 5.890 Extraordinario, de fecha 31 de Julio de 2008. Disponible en: <http://www.fao.org/pgafa-gpa-archive/ven/ley-salud-int.pdf>.

[2] Gaceta Oficial de la República Bolivariana de Venezuela. Número 40.330.09-01. 9 de enero de 2014. Normas para el Programa Nacional de Vigilancia, Prevención, Control, y Erradicación de la Fiebre Aftosa. Disponible en: <http://www.fedeagro.org/fotos/file/leyesagricolas/PlanAftosa.pdf>

[3] Longjamn., Deb R., Sarmah A., Tayo T., Awachat V., Saxena V.. Brief Review on Diagnosis of Foot-and-Mouth Disease of Livestock: Conventional to Molecular Tools. Veterinary Medicine International, Volume 2011, Article ID 905768, 17 pages.

[4] Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE). Foot and Mouth Disease (Infection with Foot and Mouth Disease Virus). Chapter 2.1.8., 2017. Disponible en: http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standard/tahm/2.01.08_FMD.pdf

[5] Díaz T., Barrero D., Del Barrio L. Guía para la Atención de Focos de Fiebre Aftosa. Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO). 2013. Disponible en: <http://www.fao.org/3/a-i3168s.pdf>

[6] Informe de Situación de los Programas de Erradicación de la Fiebre Aftosa Sudamérica y Panamá año 2013. PANAFTOSA. 2013. Disponible en: <http://bvs1.panaftosa.org.br/local/File/textoc/Sit2013.pdf>

[7] Informe de Situación de los Programas de Erradicación de la Fiebre Aftosa en Sudamérica y Panamá en 2014. PANAFTOSA. 2014. Disponible en: <http://www.fao.org/3/a-i3168s.pdf>

[8] Informe de Situación de los Programas de Erradicación de la Fiebre Aftosa en Sudamérica y Panamá en 2015. PANAFTOSA. 2015. Disponible en: <http://bvs1.panaftosa.org.br/local/File/textoc/Sit2015esp.pdf>

[9] Informe de situación de los Programas de Erradicación de la Fiebre Aftosa en Sudamérica y Panamá en 2016. PANAFTOSA. 2016. Disponible en [http://panaftosa.org/cosalfa44/dmdocuments/Informe-Situacion-Paises-2016-\[300317\].pdf](http://panaftosa.org/cosalfa44/dmdocuments/Informe-Situacion-Paises-2016-[300317].pdf)

[10] Darsieg C., Dos Reis J. L., Allende R. Procedimiento para colecta y remisión de muestras para el diagnóstico de enfermedades vesiculares y su diagnóstico diferencial. Centro Panamericano de Fiebre Aftosa- Organización Panamericana de la Salud

<http://www.paho.org/panaftosa/index.php?option=com...gid...>

[11] Malirat V., y Bergmann I.. Instrumentos moleculares para caracterización viral MANUAL RT-PCR y secuenciamiento cíclico para estudios de epidemiología molecular del virus de la Fiebre Aftosa. Serie de manuales didácticos „ nº 17. PANAFTOSA. 2003. Disponible en: <http://bvs1.panaftosa.org.br/local/File/textoc/SerManDid17.pdf>

[12] Genovese M. A., Saraiva V., Bergmann I., Naranjo J., Pompei J., Darsie G., et al. Manual de Procedimientos para la Atención de Ocurrencias de Fiebre Aftosa y otras Enfermedades Vesiculares. Serie de Manuales Técnicos No. 9.PANAFTOSA–OPS/OMS. 2007. Disponible en: http://www.panaftosa.org.br/salsit_cad/docs/Doc2007248e.pdf

[13] Manual de Procedimientos para la Atención de un Predio donde ocurre Fiebre Aftosa. Serie de manuales técnicos nº 1. Rev. 1. 1994. Disponible en: <http://bvs1.panaftosa.org.br/local/File/textoc/Ser%20Man%20Tec%201%20rev1%20CPFA.pdf>.

[14] Díaz L.E. Diagnóstico Diferencial en Fiebre Aftosa.. 1ed. Editorial Capital Intelectual S.A. Argentina. 2008.

[15] Bergmann I., Instrumentos diagnósticos para la vigilancia de la Fiebre Aftosa.PANAFTOSA. 2003. Disponible en: <http://bvs1.panaftosa.org.br/local/file/textoc/Seminario2003-p11-16Bergmann.pdf>

[16]. Moonen, P. and Schrijver, R. (2000). Carriers of foot-and-mouth disease virus: A review. *Veterinary Quarterly*. 22(4), 193-197.

[17] Alexandersen S, Zhang Z, Donalson A. Aspect of the persistence of foot-and-mouth disease virus in animals. The carriers problem. 2002. *Microbes Infect*. Aug 4 (10): 1099-1110.

[18] Machín C, Medina G, Perez C, López J. Genetic diversity of foot-and-mouth disease virus serotype A in Venezuela, (2001-2013). *Zootecnia Trop.*, 34 (3): 191-200. 2016.