



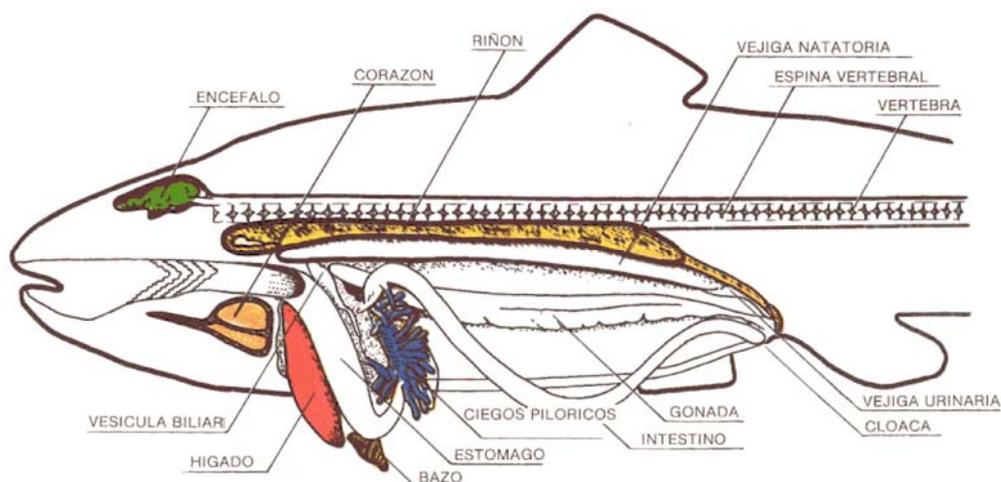
## PROTOCOLO DE TOMA DE MUESTRAS Y ENVÍO AL LABORATORIO EN PECES.

### 1. PARA LA DETECCIÓN Y CONFIRMACIÓN DE SHV Y NHI

Se tendrán preparados tubos de plástico estériles que contengan 4 ml de medio de transporte, es decir, medio de cultivo celular con 10% de suero de ternera y antibióticos. Se recomienda la combinación de 200 UI de penicilina, 200 µg de estreptomicina y 200 µg de kanamicina por ml, aunque podrán utilizarse asimismo otros antibióticos de eficacia probada.

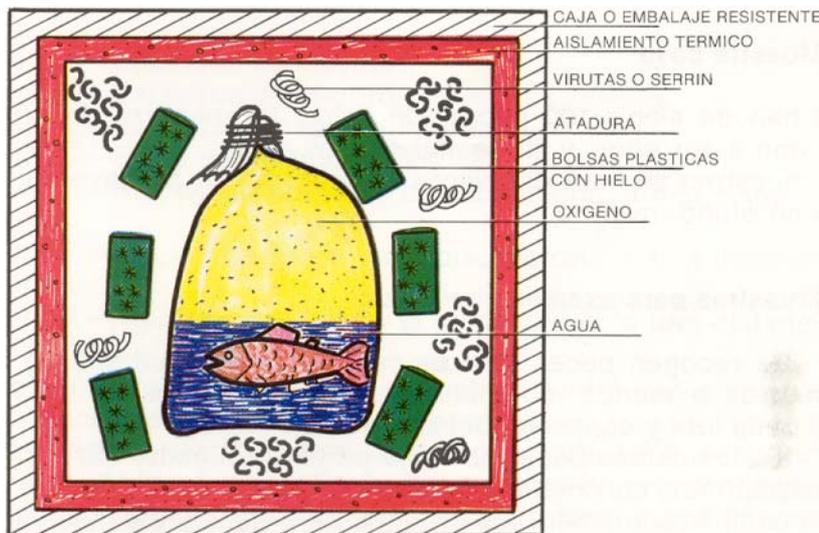
Si los peces muestreados son inferiores a 6 cm. de longitud se pueden enviar enteros. Si los peces son mayores de 6 cm. de longitud se extraerán con material estéril partes de los órganos, abriendo el pez ventralmente desde un poco antes del ano hasta la parte anterior. Los tejidos que deben recogerse son bazo, la parte anterior del riñón y, además, bien el corazón o bien el encéfalo. En algunas ocasiones, deberá examinarse el fluido ovárico.

Los peces enteros, el fluido ovárico o las partes de órgano de un máximo de 10 peces podrán recogerse en un solo tubo estéril que contenga al menos 4 ml de medio de



transporte, ésto constituirá una muestra conjunta. El peso del tejido de cada muestra deberá ser de 0,5 gramos como mínimo.

## 1.1. Envío



Los tubos con las muestras se colocarán en recipientes aislados (por ejemplo caja de poliestireno de paredes gruesas) con una cantidad suficiente de hielo o de bloques de enfriamiento para garantizar la refrigeración de las muestras durante su traslado al laboratorio. Se evitará la congelación. La temperatura de las muestras durante el transporte nunca deberá exceder de 10°C y

en el momento de la recepción todavía deberá haber hielo en el recipiente de transporte, o, alternativamente, uno o más bloques de enfriamiento deberán estar aún helados parcial o totalmente.

Las muestras deberán estar en el laboratorio lo antes posible y nunca después de que hayan transcurrido 48 horas desde la recogida de las muestras. Solo en casos excepcionales (cuando las muestras se recojan en zonas muy remotas) se podrá iniciar el examen virológico en un plazo de 72 horas desde la recogida del material, siempre que éste quede protegido con medio de transporte y se cumplan los requisitos de temperatura durante el transporte.

### Identificación

Las muestras irán convenientemente identificadas y acompañadas de un informe en el que se registrarán:

- Nombre de la instalación
- Dirección de la instalación
- Propietario o Persona responsable
- Tipo de explotación: de agua continental, marina,
- Especie(s): Trucha arcoiris, trucha común, etc.
- Naturaleza de la muestra: vísceras, fluido ovárico, alevines, etc.
- Causa de la investigación: programa de vigilancia, diagnóstico, etc.
- Síntomas clínicos
- Análisis solicitados



## 2. PARA LA DETECCIÓN Y CONFIRMACIÓN DE AIS

### 2.1. Toma de muestras

Si los signos clínicos se corresponden con la ISA o un inspector veterinario tiene cualquier otra razón para sospechar que el pez puede estar infectado, un mínimo de 10 peces tendrán que ser muestreados. Las muestras serán sobre las mortalidades recientes, ejemplares débiles o de conducta anormal, siempre que sea posible. Si no hay número suficiente de ejemplares clínicamente afectados, entonces el número de muestras se complementará con peces sanos de las jaulas, tanques o estanques que muestren el mayor índice de mortandad o con más signos clínicos de enfermedad.

#### 2.1.1. Muestras para examen histológico

Se tomarán de los peces recién muertos que presenten signos clínicos o hallazgos postmortem consecuentes con la presencia de la enfermedad. Se muestreará cualquier lesión interna o externa, y en cualquier caso, de cada pez se recogerán muestras de hígado, riñón medio, corazón y bazo usando un bisturí y transfiriéndolo a una solución salina tampón con formol al 8-10% (vol/vol). Para asegurar la satisfactoria conservación de los tejidos, la relación entre el líquido fijador y el tejido debe ser de al menos 20:1.

#### 2.1.2. Muestras para examen virológico

Se tomarán tejidos de todos los peces muestreados. Se recogerán de cada pez trozos de hígado, riñón anterior, corazón y bazo usando bisturí estéril y se transferirán a tubos de plástico conteniendo 9 ml de medio de transporte, por ejemplo medio de cultivo celular con antibióticos. Es apropiada una combinación de 12,5 µg de fungizona, 200 UI de polymixina B y 200 µg de kanamicina por ml, pero pueden utilizarse otras combinaciones de eficacia probada. Se pueden recoger tejidos de hasta 5 peces en un tubo conteniendo solución de transporte y representará un muestra conjunta. El peso de tejido en una muestra será de 1,0±0,5 gramos.

#### 2.1.3. Muestras para exámenes de IFAT

Se tomarán improntas de riñón de los peces 2 horas después de muertos. Se extraerá del pez un trozo de riñón medio usando pinzas y bisturí estériles. El tejido será desangrado en papel absorbente para eliminar el exceso de sangre, luego se presionará de manera repetida contra un porta de cristal cubierto de poli-L-lisina. Las impresiones individuales deben de estar colocadas adyacentes, pero nunca superpuestas, para conseguir una monocapa de células continua. La sangre y el tejido fluido son irrelevantes en esta prueba. Pero se debe evitar dejar la muestra de riñón drenar en el papel absorbente ya que esto puede producir una coagulación de sangre originando grandes cantidades de proteínas séricas depositadas en el porta. Las improntas deben dejarse secar al aire y luego conservarlas en lugar fresco y seco si no se van a fijar inmediatamente. La fijación de las improntas ha de realizarse dentro de las 72 horas de la toma de muestra. Alternativamente, las improntas pueden ser congeladas después del secado y almacenadas a -20° C hasta un mes antes de la fijación.



#### 2.1.4. Muestras para análisis hematológico

Los peces que muestran síntomas de anemia pueden ser anestesiados y se toman inmediatamente muestras de sangre con heparina para exámenes hematológicos como la medida del hematocrito.

#### 2.1.5. Muestras para análisis de RT-PCR

Se deben tomar tejidos de todos los peces muestreados. Se recogerá del pez un trozo de riñón anterior o medio utilizando un bisturí estéril e introducirlo en un microtubo de centrifuga conteniendo 1 ml de solución conservante de RNA. El RNAlater (Ambion Inc.) es apropiado pero pueden utilizarse otras soluciones de eficacia probada. En un tubo con solución conservante se pueden recoger muestras de hasta 5 peces constituyendo una muestra conjunta. El peso del tejido en una muestra será aproximadamente de 0,5 g. Cuando los peces sean demasiado pequeños para obtener una muestra con el peso requerido se podrán recoger trozos de riñón, corazón, bazo, hígado o ciegos pilóricos, en este orden de preferencia, hasta alcanzar los 0,5 g.

### 2.2. Envío

2.2.1. Las muestras de sangre y tubos conteniendo tejidos para examen virológico o para análisis de RT-PCR serán colocadas juntas en contenedores aislantes (por ejemplo cajas de poliestireno de paredes gruesas) con suficiente hielo o bloques refrigerantes para asegurar la refrigeración de las muestras durante el transporte al laboratorio. Se debe evitar la congelación y en el momento de la recepción todavía deberá haber hielo en el recipiente de transporte, o, alternativamente, uno o más bloques de enfriamiento deberán estar aún helados parcial o totalmente. En circunstancias excepcionales las muestras para RT-PCR y las de examen virológico pueden ser congeladas instantáneamente y transportadas al laboratorio a  $-20^{\circ}\text{C}$  o por debajo.

2.2.2. Los portas para IFAT serán enviados en contenedores de portas con suficiente desecante para mantener las improntas secas y refrigeradas como arriba se describe.

2.2.3. Si los tejidos del pez se transportan en líquido fijador para examen histológico, deberán enviarse en tubos a prueba de goteo y esos tubos dentro de contenedores a prueba de golpes como cajas de poliestireno de paredes gruesas.

### 2.3. Identificación

La misma que en el epígrafe de identificación para muestras de SHV y NHI