

 GOBIERNO DE CHILE MINISTERIO DE AGRICULTURA GANADERÍA Y PESQUERÍA SAG	BIOSEGURIDAD INTERNA (BIOSEM/IT2)	octubre 2005
	Instructivo Técnico: Colecta y envío de muestras para diagnóstico de laboratorio de Encefalopatía Espongiforme Bovina (EEB)	Página 1 de 11

MANUAL DE CONTINGENCIA DE ENCEFALOPATIA ESPONGIFORME BOVINA (EEB)

BIOSEM/IT2

Instructivo Técnico

Colecta y envío de muestras para diagnóstico de laboratorio de Encefalopatía Espongiforme Bovina (EEB)

**DIVISION DE PROTECCIÓN PECUARIA
SUBDEPARTAMENTO VIGILANCIA EPIDEMIOLÓGICA
SERVICIO AGRÍCOLA Y GANADERO-SAG**

	BIOSEGURIDAD INTERNA (BIOSEM/IT2)	octubre 2005
	Instructivo Técnico: Colecta y envío de muestras para diagnóstico de laboratorio de Encefalopatía Espongiforme Bovina (EEB)	Página 2 de 11

INDICE

INTRODUCCIÓN	3
OBJETIVO	3
MARCO LEGAL Y REFERENCIAS NORMATIVAS	3
ÁMBITO DE APLICACIÓN	3
PROCEDIMIENTO PARA OBTENCION DE MUESTRAS BIOLÓGICAS	3
1.- EXTRACCION DE ENCEFALO	4
2.- EXTRACCION DEL TRONCO ENCEFALICO	6
ANEXOS	9

	BIOSEGURIDAD INTERNA (BIOSEM/IT2)	octubre 2005
	Instructivo Técnico: Colecta y envío de muestras para diagnóstico de laboratorio de Encefalopatía Espongiforme Bovina (EEB)	Página 3 de 11

INTRODUCCIÓN

En este instructivo se describen los procedimientos que deben ser aplicados, en la manipulación y obtención de muestras biológicas para el diagnóstico de EEB, así como de los debidos protocolos de bioseguridad personal, condiciones y requisitos necesarios para una apropiada muestra.

OBJETIVO

Aplicar protocolo de obtención y envío de muestras para diagnóstico de laboratorio, de animales sospechosos o enfermos de Encefalopatía Espongiforme Bovina (EEB).

MARCO LEGAL Y REFERENCIAS NORMATIVAS

- » DFL RRA N° 16, de 1963, que establece normas sobre Sanidad Animal.
- » Ley N°18.755 modificada por la Ley N°19.283 que establecen normas sobre el Servicio Agrícola y Ganadero.
- » Decreto N° 249 de 1996, que declara la Encefalopatía Espongiforme Bovina como enfermedad de declaración obligatoria y objeto de medidas sanitarias,

ÁMBITO DE APLICACIÓN

El presente instructivo se aplicará en el instante que se sospeche o confirme, uno o más casos de EEB en el territorio nacional, de acuerdo a los criterios que se detallan a continuación:

PROCEDIMIENTO PARA OBTENCION DE MUESTRAS BIOLÓGICAS

A continuación, se describirá los protocolos a seguir en la obtención y envío de muestras para diagnóstico de laboratorio, a través de dos procedimientos, a saber:

1. Procedimiento de extracción de encéfalo
2. Procedimiento para extracción de tronco encefálico

	BIOSEGURIDAD INTERNA (BIOSEM/IT2)	octubre 2005
	Instructivo Técnico: Colecta y envío de muestras para diagnóstico de laboratorio de Encefalopatía Espongiforme Bovina (EEB)	Página 4 de 11

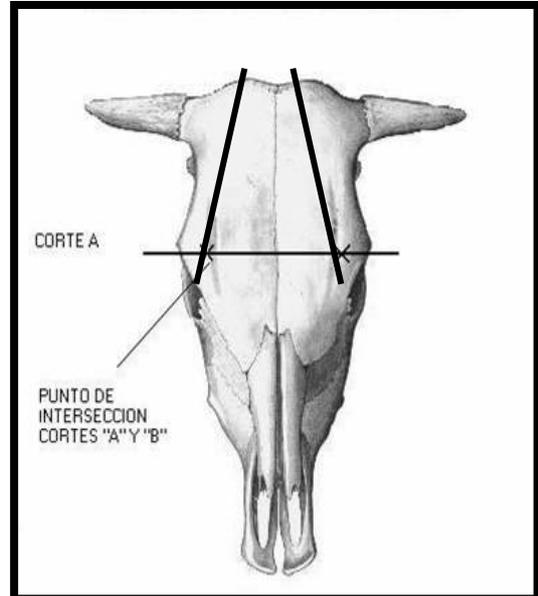
1.- EXTRACCION DE ENCEFALO

En todo momento utilizar guantes de goma y guantes de malla metálica como protección para el operador.

Separar la cabeza de la carcasa, mediante un corte a través de la articulación atlanto-occipital. Realizar incisión en la piel a nivel de la línea media de la cabeza, desde la nuca, pasando por la frente y hasta la nariz.

Traccionar lateralmente la piel, para exponer el cráneo, órbitas y parte posterior de la nariz. Remover cualquier músculo y grasa de toda el área, para facilitar cortes posteriores.

Con sierra de carnicero, cortar transversalmente la cabeza (huesos frontales), a nivel de la parte posterior de cada órbita y con una profundidad de 1 a 2 cm.



Efectuar dos cortes: uno a cada lado del cráneo y desde el foramen mágnam a un punto que está 2 – 3 cm. medial al corte A. Cada corte debe ser efectuado con la sierra en un ángulo de aproximadamente 45 ° respecto al eje vertical.

Insertar un cuchillo firme o cincel de hueso en el corte transversal (Corte A). Hacer palanca y extraer lentamente tapa del cráneo hacia arriba. Al traccionar, se debe tener precaución de evitar desgarrar en los anexos o fijaciones (meninges). Las meninges se cortan cuando se remueve la tapa del cráneo.

Para cortar membranas se debe utilizar tijeras. Al retirar la fracción de los huesos seccionados, se visualizará la duramadre (meninge externa que se caracteriza por ser una membrana densa y resistente de tejido fibroso). Cortar la duramadre longitudinalmente en su línea media y apartar lateralmente para visualizar la masa encefálica.

Cortar las meninges entre los hemisferios cerebrales y sobre el cerebelo. Removerlas cuidadosamente. Desprender suavemente el cerebro de la cavidad craneana, mientras se cortan las adherencias.

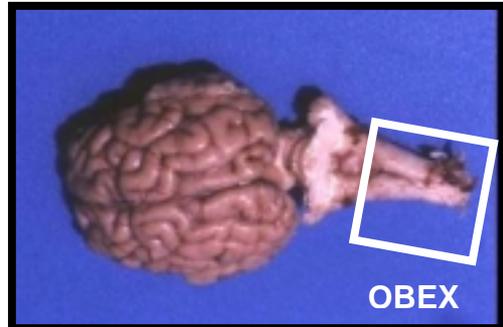
Depositar cuidadosamente el cerebro sobre una superficie limpia y seca. Remover el cerebelo efectuando un corte postero anterior a nivel de su base para exponer el área a muestrear (obélix – médula).

	BIOSEGURIDAD INTERNA (BIOSEM/IT2)	octubre 2005
	Instructivo Técnico: Colecta y envío de muestras para diagnóstico de laboratorio de Encefalopatía Espongiforme Bovina (EEB)	Página 5 de 11

Se tomarán dos tipos de muestras:

1^{era} muestra:

Tejido fresco para test rápido, método de inmunodiagnóstico (Inmunobloting). Esta corresponderá a una sección del óbex en forma rectangular (zona del tronco del encéfalo adyacente a óbex) incluyendo médula espinal. El peso de la muestra debe ser igual o mayor a un gramo.

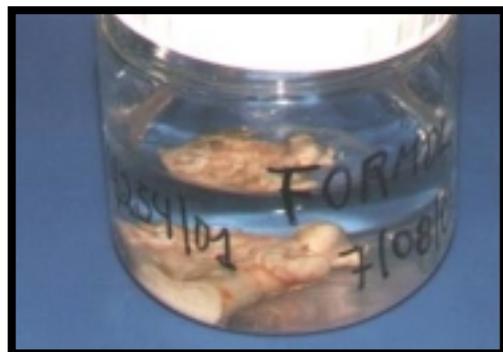


Debe colocarse inmediatamente en un tubo cónico tapa rosca de 50 ml. de capacidad, y preservarse exclusivamente en frío. Enviar a la brevedad al laboratorio en caja isotérmica con refrigerante, comunicando por fax, teléfono o correo electrónico, el medio de transporte y número de guía respectiva.



2^{da} muestra:

Resto del encéfalo que queda después de haber obtenido la primera más el cerebelo removido con anterioridad. Estas serán colocadas inmediatamente y con suavidad en un contenedor de plástico de boca ancha, que contenga formalina neutra al 10%, considerando una relación volumen muestra/volumen fijador = 1 : 10. Es decir el tamaño de la muestra debe ser colocado en un contenedor (envase) que contenga por lo menos 10 veces su volumen de fijador.



RECOMENDACIONES

Colectar inmediatamente las muestras de encéfalo, después del sacrificio del animal y fijarlas a la brevedad, a objeto de minimizar los efectos de autólisis.

Asegurar que la muestra fijada en formalina incluya: el puente, la médula oblongada y el cerebelo.

La extracción del cerebro debe ser cuidadosa, a fin de no dañar sitios importantes del órgano, ya que puede alterar seriamente los resultados del examen histopatológico.

Extremar las precauciones a fin de evitar contacto con los ojos del fijador o preservador utilizado, el cual es formalina neutra al 10%, por lo tanto, se deben tomar las precauciones necesarias puesto que es un producto irritante para la piel y mucosas.

	BIOSEGURIDAD INTERNA (BIOSEM/IT2)	octubre 2005
	Instructivo Técnico: Colecta y envío de muestras para diagnóstico de laboratorio de Encefalopatía Espongiforme Bovina (EEB)	Página 6 de 11

En caso de accidente se debe lavar con abundante agua.

Por ningún motivo congelar los tejidos fijados en formalina.

Rotular e identificar los frascos con tinta indeleble.

Enviar las muestras fijadas al laboratorio antes del 5º día post extracción, ya que el preservador debe ser cambiado al 7º día.

2.- EXTRACCION DEL TRONCO ENCEFALICO

La zona del encéfalo más importante para el diagnóstico de EEB, es el tronco encefálico y específicamente la médula oblongada a nivel del óbex, de modo que esta zona debe estar intacta. Por tal razón, en el sacrificio o eutanasia del animal, por ningún motivo se debe dañar esta región.

El cerebro medio puede ser extraído segura y rápidamente vía foramen mágnum. El uso de esta técnica requiere una menor cantidad de muestra de tejido, facilita el proceso de fijación y reduce el volumen de fijador requerido.

Proceso

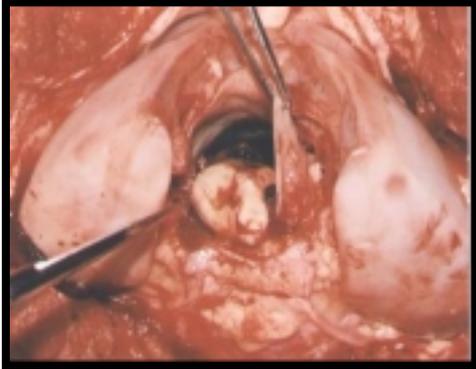
Separar la cabeza por la unión atlanto occipital, tan pronto como sea posible tras la muerte del animal.

Colocar la cabeza dorsalmente hacia abajo en una mesa de necropsia u otra adecuada para tal efecto.



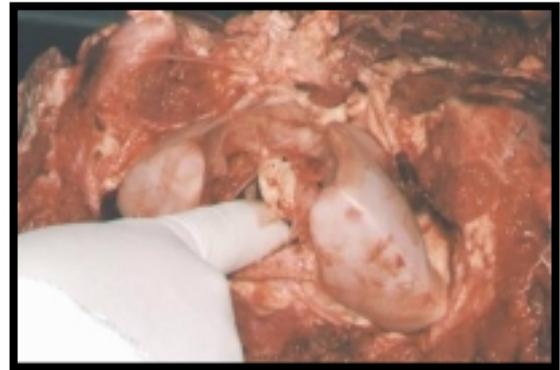
Diseccionar cuidadosamente separando la médula de la duramadre y nervios espinales.

	BIOSEGURIDAD INTERNA (BIOSEM/IT2)	octubre 2005
	Instructivo Técnico: Colecta y envío de muestras para diagnóstico de laboratorio de Encefalopatía Espongiforme Bovina (EEB)	Página 7 de 11



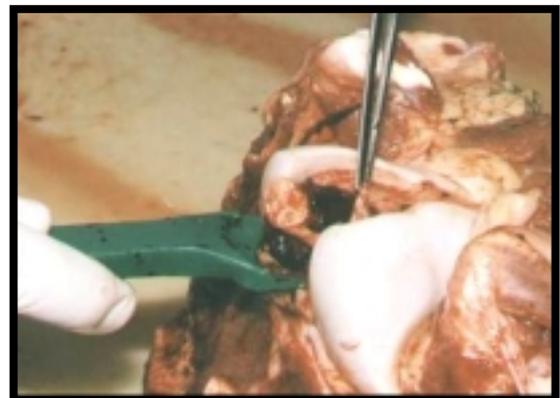
Retirar cuidadosamente la cuchara al mismo tiempo efectuando suave presión hacia arriba, con el objeto de sacar completamente el tronco encefálico

Para tal efecto se puede utilizar tijeras y pinzas o realizarlo con un dedo suavemente.

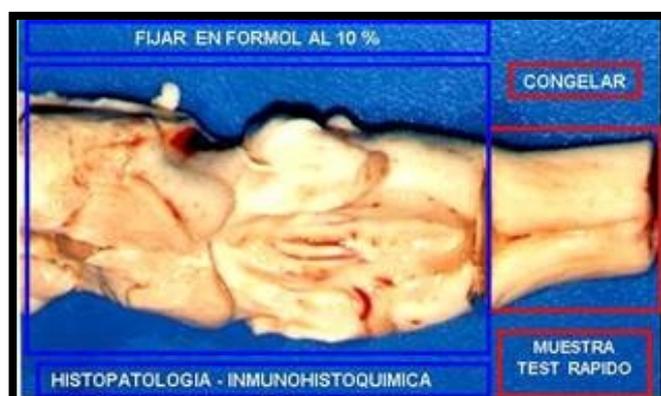
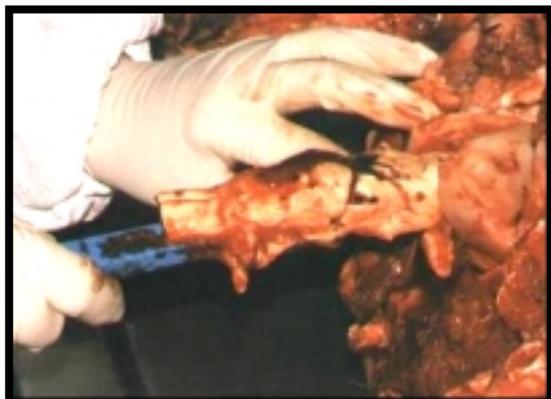


Insertar la “cuchara” a través del foramen mágnam, por el espacio subdural hasta el nivel del puente.

Enseguida rotar la cuchara en 180 grados a la derecha e izquierda, a objeto de completar un giro completo para separar el tronco encefálico.



	BIOSEGURIDAD INTERNA (BIOSEM/IT2)	octubre 2005
	Instructivo Técnico: Colecta y envío de muestras para diagnóstico de laboratorio de Encefalopatía Espongiforme Bovina (EEB)	Página 8 de 11



Se obtendrán dos tipos de muestras: una sección de óbex, la cual se colocará en el frasco cónico de tapa rosca, y colocado en la caja isotérmica con refrigerante; y el resto se introducirá inmediatamente en el frasco con formol tamponado al 10%. No deberá transcurrir más de dos horas entre la muerte del animal y la inmersión de la muestra en el formol.

Consultas:

Laboratorio de Patología y Virología – Subdepartamento de Laboratorios y Estación Cuarentenaria Pecuaria – fax: (2) 345 1903; fono: (2) 345 1951 – 345 1900; correo electrónico: virologia.pecuaria@sag.gob.cl; patologia.pecuaria@sag.gob.cl

Bibliografía:

European Comission Agriculture (ECA) 1994. Transmissible Spongiform Encephalopathies. Protocols for the Laboratory Diagnosis and Confirmation of Bovine Spongiform Encephalopathy and Scrapie.

Protocol I Confirmation of BSE by microscopic examination of the brain, pag 1 – 17.

	BIOSEGURIDAD INTERNA (BIOSEM/IT2)	octubre 2005
	Instructivo Técnico: Colecta y envío de muestras para diagnóstico de laboratorio de Encefalopatía Espongiforme Bovina (EEB)	Página 9 de 11

OIE 1992. Rev.Sci. Tech. Off. Int. Epiz; Vol 11 N° 2, Jun 1992.

Popesko, Peter 1984 Atlas de Anatomía Topográfica de los animales domésticos. Tomo 1 Salvat Editores.

ANEXOS

MATERIALES PARA EXTRACCION DE ENCEFALO.

Equipo del operador

- | | |
|---|---|
| <ul style="list-style-type: none"> <input type="checkbox"/> Botas <input type="checkbox"/> Overall <input type="checkbox"/> Pechera <input type="checkbox"/> Guantes de látex desechables resistentes | <ul style="list-style-type: none"> <input type="checkbox"/> Guantes anti-corte (Nitrilo) <input type="checkbox"/> Guantes metálicos de malla <input type="checkbox"/> Máscara barbijo <input type="checkbox"/> Gorro desechable |
|---|---|

Instrumental para extracción de encéfalo

- | | |
|--|---|
| <ul style="list-style-type: none"> <input type="checkbox"/> Cuchillo curvo mango antideslizante (hoja 18 cm) <input type="checkbox"/> Cuchillo recto mango antideslizante (hoja 18 cm) <input type="checkbox"/> Sierra para huesos <input type="checkbox"/> Cincel para huesos <input type="checkbox"/> Martillo peña | <ul style="list-style-type: none"> <input type="checkbox"/> Tijeras (punta aguda/roma) 14 cm. <input type="checkbox"/> Tijeras (punta aguda/aguda) 14 cm. <input type="checkbox"/> Pinzas anatómicas de 25 cm. <input type="checkbox"/> Pinzas diente de ratón de 25 cm. <input type="checkbox"/> Astil o Chaira <input type="checkbox"/> Hoja de bisturí N° 24 <input type="checkbox"/> Mango de bisturí para hoja N° 24. |
|--|---|

Material para colecta de muestras

- | | |
|--|--|
| <ul style="list-style-type: none"> <input type="checkbox"/> Contenedores o frascos de 4 a 6 litros, de boca ancha y tapa hermética. <input type="checkbox"/> Formalina al 10 % <input type="checkbox"/> Frascos plásticos estériles de 50 ml con tapa rosca. <input type="checkbox"/> Lápiz rotulador indeleble <input type="checkbox"/> Cinta de sellado de un ancho 5 cm. | <ul style="list-style-type: none"> <input type="checkbox"/> Bolsas plásticas resistentes de 50 por 70 cm. <input type="checkbox"/> Cajas isotérmicas <input type="checkbox"/> Refrigerantes |
|--|--|

	BIOSEGURIDAD INTERNA (BIOSEM/IT2)	octubre 2005
	Instructivo Técnico: Colecta y envío de muestras para diagnóstico de laboratorio de Encefalopatía Espongiforme Bovina (EEB)	Página 10 de 11

Otros

- Desinfectante de superficies y equipos (Hipoclorito de sodio dilución igual o mayor al 2%). Aplicar por una hora a 20° C. Equipos durante toda la noche.
- Desinfectante de superficies y equipos (Hidróxido de sodio 2 N). Aplicar por una hora a 20° C. Equipos durante toda la noche.
- Desinfectante de cortes accidental de piel (Hidróxido de sodio 1N). Aplicar con tórula en área afectada durante 5 minutos y lavar con abundante agua.
- Jabón desinfectante
- Toalla de papel y paño esponja desechable

MATERIALES PARA EXTRACCIÓN DEL TRONCO ENCEFÁLICO

Equipo del operador

- Botas
- Overall
- Pechera
- Guantes de Nitrilo (anticorte)
- Guantes metálicos de malla
- Máscara barbijo
- Gorro desechable
- Anteojos protectores de policarbonato

Instrumental para extracción de tronco encefálico

- “cuchara” especialmente diseñada, bordes laterales y frontal rebajados, con filo en sus bordes laterales y dentados en su parte frontal. La parte dorsal de la “cuchara” presenta un sobre-relieve o protuberancias para facilitar la adherencia del tejido y su extracción.
- Tijeras rectas punta aguda/roma de 14 cm.
- Bisturí con hoja N°24
- Mango de bisturí para hoja N° 24
- Pinza anatómica de 18 cm.

Material para colecta y envío de muestras

- Frascos de boca ancha capacidad 500 ml.
- Formol tamponado al 10%
- Tubos cónicos tapa rosca capacidad 50 ml.
- Cajas isotérmicas / plumavit

	BIOSEGURIDAD INTERNA (BIOSEM/IT2)	octubre 2005
	Instructivo Técnico: Colecta y envío de muestras para diagnóstico de laboratorio de Encefalopatía Espongiforme Bovina (EEB)	Página 11 de 11

- Refrigerantes
- Lápiz rotulador indeleble
- Cinta de sellado de 5 cm. de ancho
- Bolsas polietileno (plástico) 50 por 70 cm. resistentes
- Formularios protocolos toma y envío de muestras al laboratorio