

# Presentación

*Queridos compañeros:*

En esta edición de Casos Clínicos queremos haceros llegar una información que creemos puede ser muy útil en vuestro trabajo diario, sobre todo cuando queréis tomar muestras para hacer algún diagnóstico de laboratorio y no sabéis exactamente cómo tomar esas muestras o qué muestras enviar. En algunas ocasiones nos habéis comentado, cuando hemos coincidido con alguno de vosotros, que hay casos muy interesantes en los que no se ha podido llegar a ningún diagnóstico definitivo porque a la hora de tomar las muestras no se han tomado adecuadamente o por ejemplo, para hacer muestreos serológicos, no sabéis cuantas muestras se deben recoger.

Aquí os mostramos unas normas muy básicas de toma y envío de muestras para los análisis de laboratorio más utilizados en el diagnóstico de patologías en porcino: muestras de sangre y muestras de tejidos para histopatología, microbiología y PCR. Esperamos que esta información os sea de utilidad y sirva para que no se os escape ningún diagnóstico, al menos por no tomar las muestras necesarias y adecuadas.

Un saludo y esperamos vuestros casos para publicarlos en esta sección.

Guillermo Ramis Vidal

*guiramis@um.es*

*Departamento de Producción Animal  
Facultad de Veterinaria de Murcia*

Francisco José Pallarés Martínez

*pallares@um.es*

*Departamento de Anatomía y Anatomía  
Patológica Comparadas.  
Facultad de Veterinaria de Murcia*



**Salud Animal**

4607/07

# Toma de muestras para diagnóstico

**A** continuación, se describe por una parte la toma de muestras de sangre, y por otra, la de tejidos para histopatología, microbiología y PCR.

## Toma de muestras de sangre

La extracción de sangre en los cerdos se ve dificultada por la propia conformación corporal del animal: la cobertura grasa hace que el acceso a los vasos sea complicada, agravado en algunos casos por la capa oscura del animal.

Los puntos de extracción más accesibles son:

- Vena lateral de la oreja. No se suele utilizar debido al calibre fino de este vaso que dificulta la extracción.
- Grandes vasos del cuello y porción craneal del tórax. Se accede de forma laterocaudal a la punta del esternón, manteniendo al animal en estación, o sujeto en diversas posturas (**Figura 1**).
- Vena caudal de la cola. Se utiliza en animales de gran tamaño, normalmente mediante incisión del vaso, aunque es un método poco higiénico.
- Seno retroftálmico. Se accede a través de la comisura medial del ojo, y es muy útil en animales de gran tamaño o con cobertura grasa muy gruesa como los ibéricos (**Figura 2**).

Usualmente, la extracción se realiza con tubos de vacío tipo Vacutainer, usando distintos tamaños de aguja (siempre estériles) dependiendo del tipo de animal a muestrear.

### Envío de muestras

Se puede enviar al laboratorio tanto sangre entera como suero, dependiendo del tipo de análisis solicitado. Los tubos de extracción utilizados variarán según queramos una u otra cosa: para suero emplearemos los tubos de extracción de tapón rojo, mientras que para sangre entera utilizaremos tubos que contienen algún anticoagulante como EDTA (tapa morada) o heparina (tapa verde).

Para la obtención de suero se suele utilizar una centrifugadora, aunque la sangre de cerdo

comienza a desuerar espontáneamente muy poco tiempo después de ser extraída.

El envío se debe hacer lo más rápido posible, por lo que se suelen emplear servicios de mensajería, que en cuestión de horas transportan la muestra a cualquier punto del país. Sin embargo se debe hacer con unas condiciones mínimas:

- Para evitar que los tubos se vuelquen podemos usar las mismas gradillas de porexpan en las que normalmente vienen los tubos de toma de muestras, usando cinta adhesiva para fijar los tubos a la misma (**Figura 3**). Si enviamos sueros, debemos introducirlos en tubos tipo Eppendorf (**Figura 4**) que también se pueden introducir en una gradilla de porexpan, siendo fijados con cinta adhesiva igualmente. La ventaja de estas gradillas es que además por su naturaleza son isotermas y ayudarán a conservar la temperatura baja de la muestra durante el transporte.
- Identificación. Las muestras deben ir identificadas individualmente usando las etiquetas que van adheridas a los tubos. Si sólo ponemos la identificación en la gradilla corremos el riesgo de que al volcarse accidentalmente los tubos se mezclen y no sepamos cuál es cuál. Además, debemos acompañar las muestras de una pequeña anamnesis y un cuadro de identificación escrito en papel, al objeto de facilitar la labor del laboratorio. Muchos laboratorios disponen de sus propios formularios de identificación y anamnesis.
- Conservación. La sangre no se puede congelar ya que se produce hemólisis y el suero posteriormente es muy sucio y a veces no apto para el análisis. Los sueros en cambio si se pueden congelar, aunque debemos saber que si lo que queremos es identificar la presencia de antígeno o genoma de virus, los virus ARN son más lábiles y por tanto una parte se perderá a lo largo del tiempo. Si el análisis a realizar es serológico o el virus es ADN, la conservación en congelación será adecuada. Si vamos a guardar las muestras, siempre debería hacerse a  $-80^{\circ}\text{C}$  que condu-





Figura 1. Extracción de sangre de la cava craneal de un cerdo.



Figura 3. Gradillas de porexpan donde se suministran los tubos y que son muy útiles para el envío de muestras al laboratorio.

ce a una mejor conservación. Para el transporte podemos usar neveras isotermas de porexpan (incluso las mismas que usan los laboratorios para enviarnos las vacunas) que ayudarán a conservar la temperatura de la muestra y no debemos olvidar incluir algunos bloques refrigerantes que aseguren el mantenimiento de dicha temperatura. Finalmente las sellaremos con cinta adhesiva o precinto para evitar que se abran durante el transporte.

- Sistema de envío. Como dijimos anteriormente los más adecuados son los servicios de mensajería urgente, que en cuestión de pocas horas trasladan nuestras muestras a cualquier punto de España. Unas muestras que hayan estado mucho tiempo en transporte y en condiciones no conocidas (y más aún si no hemos puesto medios de conserva-



Figura 2. Extracción de sangre del seno retroftálmico de un cerdo.



Figura 4. Muestra de suero en un tubo Eppendorf.

ción adecuados), producirán unos resultados cuando menos dudosos. Incluso algunos de éstos servicios hacen transporte refrigerado. Otro punto a tener en cuenta es el día que enviamos las muestras. Debemos hacerlo a principios de semana, puesto que si las muestras llegan, por ejemplo, un viernes por la tarde al laboratorio es posible que no se conserven bien hasta el lunes. Por tanto, los primeros días de la semana son los que elegiremos para nuestro envío.

- Bioseguridad. No olvidemos que estamos trabajando con material potencialmente infeccioso, por lo tanto debemos imponernos un mínimo de bioseguridad en nuestros envíos. Una idea es colocar los tubos que contengan la muestra (bien sean los propios tubos Vacutainer, bien los Eppendorf con las muestras) en contenedores intermedios, por ejemplo frascos para toma de muestras de



**Cuadro I. Número de muestras dependiendo del tamaño de la granja y de la prevalencia esperada.**

| Prevalencia<br>Tamaño | 50 | 40 | 30 | 25 | 20 | 15 | 10 | 5  | 2   | 1   | 0,5 | 0,1   |
|-----------------------|----|----|----|----|----|----|----|----|-----|-----|-----|-------|
| 20                    | 4  | 6  | 7  | 9  | 10 | 12 | 16 | 19 | 20  | 20  | 20  | 20    |
| 20                    | 4  | 6  | 8  | 9  | 11 | 14 | 19 | 26 | 30  | 30  | 30  | 30    |
| 40                    | 5  | 6  | 8  | 10 | 12 | 15 | 21 | 31 | 40  | 40  | 40  | 40    |
| 50                    | 5  | 6  | 8  | 10 | 12 | 16 | 22 | 35 | 46  | 50  | 50  | 50    |
| 60                    | 5  | 6  | 8  | 10 | 12 | 16 | 23 | 38 | 55  | 60  | 60  | 60    |
| 70                    | 5  | 6  | 8  | 10 | 13 | 17 | 24 | 40 | 62  | 70  | 70  | 70    |
| 80                    | 5  | 6  | 8  | 10 | 13 | 17 | 24 | 42 | 68  | 79  | 80  | 80    |
| 90                    | 5  | 6  | 8  | 10 | 13 | 17 | 25 | 43 | 73  | 87  | 90  | 90    |
| 100                   | 5  | 6  | 9  | 10 | 13 | 18 | 25 | 45 | 78  | 96  | 100 | 100   |
| 150                   | 5  | 6  | 9  | 11 | 13 | 18 | 27 | 49 | 95  | 130 | 148 | 150   |
| 200                   | 5  | 6  | 9  | 11 | 13 | 19 | 27 | 51 | 105 | 155 | 190 | 200   |
| 500                   | 5  | 6  | 9  | 11 | 14 | 19 | 28 | 56 | 129 | 225 | 349 | 500   |
| 1.000                 | 5  | 6  | 9  | 11 | 14 | 19 | 29 | 57 | 138 | 258 | 450 | 950   |
| 5.000                 | 5  | 6  | 9  | 11 | 14 | 19 | 29 | 59 | 247 | 290 | 564 | 2.253 |
| 10.000                | 5  | 6  | 9  | 11 | 14 | 19 | 29 | 59 | 248 | 294 | 581 | 2.588 |
| >3.000                | 5  | 6  | 9  | 11 | 14 | 19 | 29 | 59 | 249 | 299 | 596 | 2.995 |

**Cuadro II. Confianza esperable al reducir el número de muestras según el tamaño de la población.**

| Tamaño de población | Número de muestras para una confianza del 95% | Confianza obtenida con 10 animales |
|---------------------|-----------------------------------------------|------------------------------------|
| 20                  | 19                                            | 50%                                |
| 40                  | 31                                            | 44%                                |
| 60                  | 38                                            | 43%                                |
| 80                  | 42                                            | 42%                                |
| 100                 | 45                                            | 41%                                |
| 120                 | 46                                            | 41%                                |
| 160                 | 49                                            | 41%                                |
| 200                 | 51                                            | 40%                                |
| 300                 | 54                                            | 40%                                |
| 400                 | 55                                            | 40%                                |
| 500                 | 56                                            | 40%                                |
| 1.000               | 57                                            | 40%                                |
| 2.000               | 58                                            | 40%                                |
| > 3.000             | 59                                            | 40%                                |

orina, de modo que vayan más protegidos frente a golpes durante el transporte. Los

contenedores intermedios se pueden rellenar de papel de modo que si escapara el contenido de alguno de los tubos, empape el papel y se reduzca la posibilidad de pérdidas. En cualquier caso, el uso de las neveras de porexpan que son bastante gruesas, ayuda a que las muestras no se dañen durante el transporte y reducen la posibilidad de escapes del material biológico.

#### *Tamaño de la muestra*

Es imposible tomar muestras de todo el colectivo de una granja, sobre todo cuando son de gran tamaño, por lo que tenemos que tomar muestras que sean representativas para poder hacer una extrapolación del resultado analítico a toda la población.

Existen varios métodos de cálculo del tamaño de muestra representativa, aunque todos ellos se basan en la fiabilidad que deseamos que tenga el análisis (el grado de confianza) que normalmente está entre el 90 y el 99% (es decir, que haya entre un 90 y un 99% de probabilidades de que el resultado obtenido no sea producto del azar o esté sesgado), la prevalencia esperada de la enfermedad (cuanto mayor sea la prevalencia esperada menor será el número de muestras necesarias para obte-



**Cuadro III. Número de muestras según la edad de los animales y el tamaño de la explotación para realizar un seroperfil.**

|        |            | Tamaño de explotación (cerdas) |           |             |             |             |              |
|--------|------------|--------------------------------|-----------|-------------|-------------|-------------|--------------|
|        |            | < 500                          | 500-1.000 | 1.000-3.000 | 3.000-5.000 | 5.000-7.000 | 7.000-10.000 |
| Cerdas | Nulíparas  | 6 - 8                          | 8 - 10    | 10 - 13     | 13 - 16     | 16 - 20     | 20 - 24      |
|        | 1-2 partos | 6 - 8                          | 8 - 10    | 10 - 13     | 13 - 16     | 16 - 20     | 20 - 24      |
|        | 3-4 partos | 6 - 8                          | 8 - 10    | 10 - 13     | 13 - 16     | 16 - 20     | 20 - 24      |
|        | 5-6 partos | 6 - 8                          | 8 - 10    | 10 - 13     | 13 - 16     | 16 - 20     | 20 - 24      |
|        | > 6 partos | 6 - 8                          | 8 - 10    | 10 - 13     | 13 - 16     | 16 - 20     | 20 - 24      |
| Cerdos | 3 semanas  | 6 - 7                          | 7 - 9     | 9 - 11      | 11 - 14     | 14 - 18     | 18 - 20      |
|        | 6 semanas  | 6 - 7                          | 7 - 9     | 9 - 11      | 11 - 14     | 14 - 18     | 18 - 20      |
|        | 9 semanas  | 6 - 7                          | 7 - 9     | 9 - 11      | 11 - 14     | 14 - 18     | 18 - 20      |
|        | 12 semanas | 6 - 7                          | 7 - 9     | 9 - 11      | 11 - 14     | 14 - 18     | 18 - 20      |
|        | 18 semanas | 6 - 7                          | 7 - 9     | 9 - 11      | 11 - 14     | 14 - 18     | 18 - 20      |
|        | 24 semanas | 6 - 7                          | 7 - 9     | 9 - 11      | 11 - 14     | 14 - 18     | 18 - 20      |

Fuente: David Llopart (Laboratorios Hipra).

ner un resultado fiable) y el tamaño de la población.

En base a estos tres parámetros existen numerosas tablas probabilistas que nos indican el tamaño de muestras con respecto al tamaño de población que debemos tomar. Una fórmula muy básica para la determinación del tamaño muestral en base a la prevalencia y el nivel de confianza (para poblaciones grandes) sería:

$$N = \log(\text{error}) / \log(1 - \text{prevalencia de la enfermedad})$$

Así, por ejemplo, en una población de más de 3.000 cerdos, con una prevalencia del 20% y para un nivel de confianza del 90%, el tamaño muestral sería:

$$N = \log(0,10) / \log(1-0,20) = 10,31$$

Es decir, con un tamaño de muestra de 10 animales seríamos capaces de detectar uno o más animales positivos.

Un ejemplo aparece en el **Cuadro I** con una confianza del 95% de detectar uno o más positivos en una población infectada.

Cuando no sepamos cuál puede ser la prevalencia esperada, siempre debemos tomar como mínimo el 50%.

Algo que suele suceder en el campo es intentar minimizar el número de muestras a tomar, y una muestra muy utilizada es de 10 animales. En el

**Cuadro II** se muestra cómo se reduce el nivel de confianza en poblaciones de distinto tamaño con una prevalencia del 5%, al reducir el tamaño de la muestra a 10 animales, en comparación con el tamaño de muestra que se debería tomar para un nivel de confianza del 95%.

Lógicamente observamos cómo se produce una reducción muy importante del nivel de confianza que podemos esperar de esos análisis. La disminución en la confianza será menos importante cuanto mayor sea la prevalencia esperada del patógeno.

Otro factor a tener en cuenta es qué animales muestrear. Obviamente cuando estemos hablando, por ejemplo, de seroperfiles transversales debemos tomar muestras de animales de las edades que nos permitan hacer una curva de dinámica serológica. Cuando testemos al colectivo reproductor debemos procurar tomar muestras de cerdas en distintas paridades, para poder observar si es un problema que afecta a animales nulíparas, primíparas o multíparas y así poder hacernos una idea de cómo se está moviendo el patógeno entre la población. Por eso también existen tablas de tamaño de muestra dependiendo del tipo de animal a sangrar, en muchas ocasiones basadas en la experiencia que nos termina marcando un número mínimo de muestras a testar. Un ejemplo aparece en el **Cuadro III**, que comprendería todos los grupos de edad necesarios para realizar un seroperfil.





Figura 5. Bote con un volumen inadecuado de fijador con respecto al tamaño de la muestra.

## Toma de muestras de tejidos para histopatología

Las muestras deben ser extraídas lo antes posible. Deben incluir un fragmento de la lesión y zonas adyacentes de apariencia macroscópica normal. Si existen dudas acerca de los cambios observados, es aconsejable el envío de muestras de los órganos principales, aunque presenten apariencia normal, ya que podrían aportar información complementaria. Se adjuntará un historial clínico con los datos relevantes, referidos tanto al animal como al colectivo de procedencia, así como una descripción detallada y objetiva de las lesiones macroscópicas.

El fijador habitual utilizado para histopatología es el formol al 10%, que consiste en una solución formada por una parte de formol comercial o formalina (formaldehído al 40%) y nueve partes de agua corriente (del grifo), aunque también se puede utilizar para la dilución solución salina o tampón. Tiene la ventaja de ser un fijador donde las muestras pueden permanecer sin ninguna atención hasta el momento de ser procesadas. El volumen del fijador será, como mínimo, diez veces superior al de la pieza (Figura 5). Para evitar que se adhieran al fondo del recipiente, se pondrá primero el fijador y luego los fragmentos seleccionados. El grosor de la muestra no deberá exceder de un centímetro, ya que debido a la velocidad de penetración del formol en los tejidos, si la muestra excede ese grosor puede quedar sin fijar en la porción central, por lo que entrará en un proceso de autólisis y no

servirá para el estudio histopatológico. En el caso del intestino es aconsejable seleccionar varios segmentos de unos tres centímetros, abiertos longitudinalmente. Muy importante, el material congelado no es apto para el estudio histopatológico ya que los cristales que se forman durante la congelación suelen desgarrar el tejido por lo que a veces resulta imposible llegar a un diagnóstico definitivo.

## Toma de muestras de tejidos para microbiología

Para el estudio microbiológico se deben tomar las muestras con las mayores condiciones higiénicas posibles, evitando que haya contacto entre unas muestras y otras para evitar contaminaciones cruzadas. Por ello, se deben tomar las piezas con unos guantes limpios, depositarlas dentro de contenedores aislados (pueden utilizarse bolsas de plástico con autocierre o botes estériles de muestras) e identificarse correctamente. Cuando tomamos muestras de intestino es recomendable tomar el asa intestinal, atarla con una cuerda o hilo formando un bucle y luego cortar por detrás de la ligadura, para evitar que el contenido se desparrame por el contenedor de la muestra.

Las muestras deben mantenerse en refrigeración hasta el momento del envío, que debe realizarse en unas condiciones similares a las expuestas anteriormente para las muestras de sangre.

## Toma de muestras de tejidos para PCR

Para los estudios de PCR pueden enviarse muestras congeladas, por lo que la toma de muestras puede realizarse en las mismas condiciones de higiene que las muestras para bacteriología, pero una vez tomadas e identificadas pueden mantenerse en congelación hasta el momento de ser enviadas al laboratorio. Para mantener el estado de congelación durante el envío es recomendable utilizar nieve carbónica y contenedores de porexpan.

Si se toman muestras de sangre entera para PCR se deben congelar en tubos de plástico tipo Falcon o similar puesto que los tubos de vidrio en numerosas ocasiones al congelarse se rompen, y sobre todo, no deben llenarse nunca en exceso.