



## PROTOCOLO DE MUESTREO DE LOS CRUSTÁCEOS<sup>1</sup>

Las enfermedades infecciosas de los crustáceos tienen un gran impacto económico sobre todo en el cultivo del camarón penaeoide muy extendido mundialmente. Para éstas enfermedades no existe tratamiento.

### 1. PROCEDIMIENTOS DE MUESTREO

El muestreo se puede realizar con al menos tres propósitos.

#### 1. Vigilancia epidemiológica

#### 2. Diagnóstico de enfermedades subclínicas

Certificación de explotación libre de la enfermedad (SPF)

Para poder obtener el estatus de explotación libre y sobre todo para el diagnóstico de enfermedades subclínicas. El muestreo debe realizarse de tal forma que permita la detección de la enfermedad en los animales infectados con un nivel de confianza del 95%. Para aquellos tests en los que la sensibilidad y especificidad es conocida, se pueden usar métodos como FreeCalc ([www.ausvet.com.au](http://www.ausvet.com.au)) o los que se relacionan en el capítulo 1. 1. 4 Requisitos de Vigilancia para el reconocimiento internacional de estatus *libre de infección* (Manual de Animales Acuáticos). Sin embargo, para aquellos tests de los que no se conozcan ni la sensibilidad ni la especificidad, el número de muestras que se han de tomar depende del tamaño de la población o lote (según la **tabla 1**).

**TABLA 1**

Tamaño de lote	Tamaño de muestra con un 2% de prevalencia	Tamaño de muestra con un 5% de prevalencia	Tamaño de muestra con un 10% de prevalencia
50	50	35	20
100	75	45	23
250	110	50	25
500	130	55	26
1000	140	55	27
2000	145	60	27
100000 o más	150	60	30

Se pueden realizar pools de 5 especímenes como máximo cuando las muestras que se toman están destinadas a realizar PCRs o tests de anticuerpos. Según el tipo de enfermedad son mejores unos estadios u otros de desarrollo de los crustáceos, por ejemplo, en el caso de los baculovirus es mejor muestrear larvas y postlarvas mientras que para el resto de enfermedades como cabeza amarilla, mancha blanca son mejores los jóvenes y subadultos.

#### 3 Diagnóstico de la enfermedad

Se deben seleccionar los especímenes con lesiones representativas dentro de los vivos y moribundos, el número representativo mínimo debe ser

- 100 larvas
- 50 postlarvas
- 10 para jóvenes y adultos

#### Pruebas para verificar y mantener el estatus de “libre de enfermedad”

Si en el plazo de 2 años de vigilancia epidemiológica no se diagnostica ninguna enfermedad como resultado de los análisis laboratoriales, ni se detecta en los animales síntomas clínicos, se puede pasar a realizar 2 inspecciones al año

<sup>1</sup> Tema realizado del Manual de Animales Acuáticos 2006 SECCIÓN 2.2 Capítulo 1.3



y el número de animales se puede reducir a 30. Haciendo la salvedad de que durante la inspección se deben recolectar todos los animales moribundos.

## 1. TIPOS DE MUESTRA Y SU CONSERVACION

### • **Muestras para microscopía directa**

Para la observación microscópica se usarán animales vivos frescos refrigerados o fijados con formalina tamponada al 10%.

### • **Muestras para histología**

Las muestras destinadas al estudio histológico se deben recolectar y enviar al laboratorio con el mínimo estrés posible, por ejemplo en agua bien oxigenada. Si los animales no pueden llegar vivos al laboratorio, como norma general se incluirá una unidad de peso en 10 volúmenes de agente fijador.

Las muestras se fijan durante 24 horas en una solución fijadora de Davidson <sup>2</sup>, con una relación máxima de 1:10 (volumen de muestra: solución fijadora) porque reduce la autólisis y decalcifica la cutícula. Transcurrido ese tiempo, las muestras se pasan a una solución conservante donde permanecerán hasta su posterior deshidratación e inclusión en parafina. También se pueden usar otros fijadores como Bouin, o Carson.

Si se va a usar la solución de Davidson no se debe fijar previamente con formalina al 10% y tampoco se pueden usar ácidos distintos al ácido acético como el CIH porque no es compatible con la prueba de la hematoxilina/eosina.

Algunos de los métodos para **fijar en Davidson** y enviar los especímenes son:

- a. **Larvas y postlarvas pequeñas** si los especímenes son muy pequeños como para ser sangrados con una jeringa de tuberculina, se introducirán directamente en el agente fijador durante 12-24 hr y se transferirán luego a alcohol etílico al 50%-70% para su almacenamiento.
- b. **Postlarvas más grandes y juveniles** se realizará una incisión en la cutícula con una aguja de punta fina y se procederá igual que en *a*
- c. **Postlarvas grandes, juveniles y adultos** se inyecta el agente fijador en el camarón vivo de la siguiente manera. Se inyecta en el hepatopancreas un volumen (5-10% del peso) de agente fijador en varios puntos hasta que pase de color naranja a pálido, también alrededor del encefalotorax y en la parte anterior y posterior de la región abdominal. Si la fijación ha sido adecuada, entonces todo signo de vida debe cesar inmediatamente y los tejidos deben cambiar de color visiblemente. Inmediatamente después de la inoculación se pasa a cortar la cutícula desde el sexto segmento abdominal hacia el rostro. También se realizará una incisión en el área cefalo torácica medio-lateral.
- d. **Camarones u otros crustáceos mayores de 12 g**  
Después de inyectar el agente fijador se debe biseccionar el cuerpo transversalmente justo detrás del cefalotórax y también puede seccionarse a mitad del abdomen.
- e. **Crustáceos muy grandes** los órganos pueden diseccionarse después de realizar la inyección del agente fijador.

---

<sup>2</sup> Se puede realizar con diferentes fórmulas y fases, se propone a modo de ejemplo realizarla en dos etapas.

La primera es la de fijador que incluye glicerina (mejora la flexibilidad y la morfología tisular). Esta se prepara a partir de la solución stock.

Las muestras se pueden mantener cubiertas ligeramente por solución stock durante 6 meses.

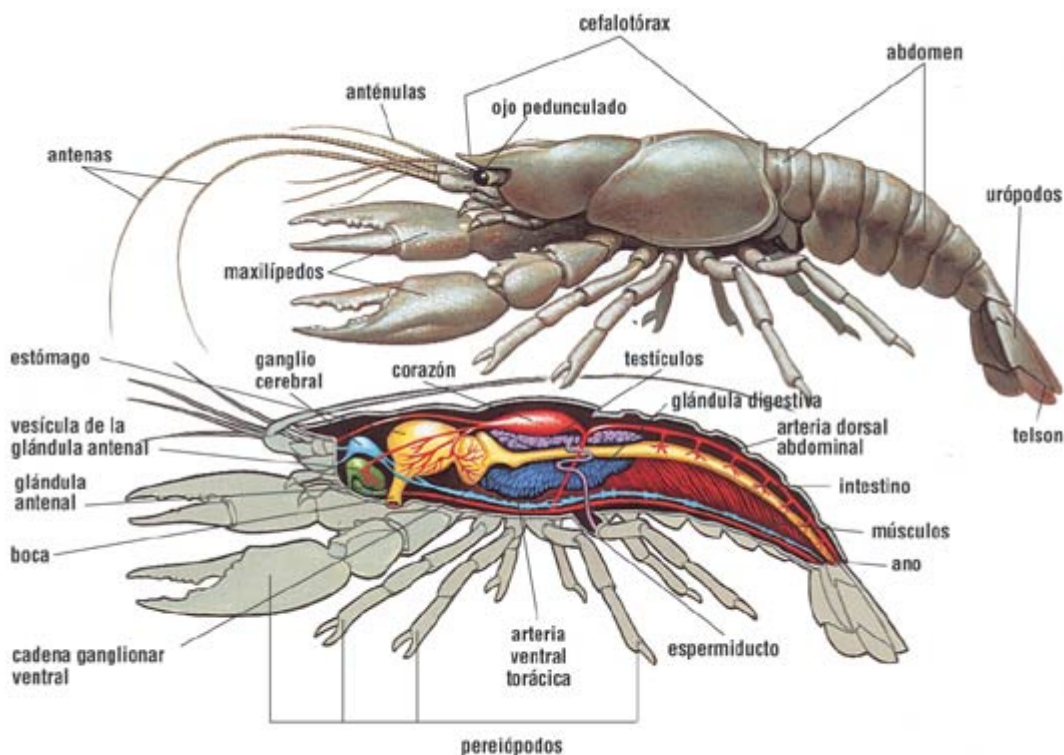
#### **Solución stock:**

Glicerina ..... 400 ml  
Formol.....800 ml  
95% Alcohol.....1200 ml  
Agua de mar filtrada ..... 1200 ml  
Mezclar bien

**Solución fijadora:** Mezclar 9 partes de solución stock con una parte de ácido acético.

El consenso es que es mejor eliminar el ácido acético después de unas 24 horas. El ácido elimina los detalles del núcleo que en algunos casos pueden resultar interesante.

Después de realizar la inyección del agente fijador, las bi o tri secciones, se deben sumergir todos los órganos a razón de 1/10 en agente fijador (24-71 hr). Se pueden conservar indefinidamente una vez que se pasan al alcohol de 70%.



### Transporte y envío de muestras conservadas

Cuando se trate de larvas, post-larvas y formas juveniles de pequeño tamaño, se utilizarán viales herméticos de plástico y con tapón de rosca. Para enviar ejemplares grandes, se envuelven bien las muestras con toallas de papel blanco (no se debe usar algodón crudo). Se colocan los ejemplares envueltos con toallas en una bolsa hermética de plástico y se satura con alcohol etílico al 70%. Se inserta la etiqueta y se sella la bolsa. Se coloca ésta dentro de una segunda bolsa hermética. Se pueden poner muchas bolsas hermética en un recipiente de envío adecuadamente etiquetado, que sea resistente, y a prueba de aplastamiento (véase el capítulo 1.5.6 del *Código de animales acuáticos*).

### • Muestras para Métodos Moleculares y pruebas con anticuerpos

Los métodos moleculares como PCR, RT-PCR, que ya están disponibles incluso en forma de kits comerciales, necesitan que el ácido nucleico se preserve adecuadamente. Lo mismo ocurre con el uso de las sondas ADN y la inmunohistoquímica que para detectar agentes patógenos en tejido fresco o muestras fijadas, éstas necesitan sitios reactivos antigénicamente. Hay que considerar que el conseguir una carga de agente patógeno suficiente se ve dificultada por el hecho de que no existen líneas celulares donde se puedan multiplicar estos virus.

Para que sean fiables los resultados de éstos análisis las fases previas de “preparación de las muestras” son de extraordinaria importancia, por ello las señalamos a continuación.

Se deben usar contenedores nuevos (botellas o bolsas de plástico) y marcar con rotuladores indelebles o lápices del nº 2 los datos más relevantes de la muestra en las etiquetas. Es conveniente recoger datos como especie, edad, peso, origen (silvestre o cultivado) etc.

### Métodos de Conservación y Transporte según tipo de muestra



- **Especímenes vivos** éstos pueden procesarse en el campo o enviarse al laboratorio para ser analizados.
- **Hemolinfa** este tejido constituye la muestra preferida para ciertas pruebas de diagnóstico moleculares o basadas en anticuerpos. Las muestras se pueden recoger con jeringuilla y aguja mediante punción cardíaca, a partir del hemocoel (i.e. el seno ventral de los peneidos), o de un apéndice cortado.
- **Especímenes en hielo vivos o refrigerados** si pueden llegar en 24 hr se meten en bolsas rodeadas de hielo húmedo, todo ello se enviará en nevera al laboratorio.
- **Ejemplares enteros congelados:** se seleccionan ejemplares vivos, según los criterios expuestos en la sección 3, se congelan rápidamente in situ a  $-20^{\circ}\text{C}$  o menos utilizando hielo seco molido, o se congelan en los laboratorios de campo utilizando un congelador mecánico. Se prepara una etiqueta y se inserta en los recipientes con las muestras, se empaquetan las muestras con una cantidad adecuada de hielo seco en una caja aislada con espuma de estireno, y se envía al laboratorio.
- **Muestras conservadas en alcohol:** se puede utilizar etanol al 90–95% para conservar, guardar y transportar ciertos tipos de muestras. Con crustáceos enteros (en cualquier fase de su vida, siempre que no sean mayores de 2–3- g) pueden conservarse en etanol al 90-95% los tejidos extirpados (i.e. los pleópodos) de crustáceos grandes, o la hemolinfa; después se empaquetan para su envío de acuerdo con los procedimientos descritos en la sección 4.2.v (para más detalles, véase el capítulo 1.5.6 del *Código de animales acuáticos*).
- **Conservación de ARN y ADN tisulares utilizando RNAlater:** se corta una porción de tejido de menos de 0.5 cm y se sumerge en 5 volúmenes de RNAlater (por ejemplo, una muestra de 0.5 gramos de peso requiere unos 2.5 ml de RNAlater). Los órganos pequeños, como el riñón, el hígado y el bazo pueden guardarse enteros en RNAlater. Esas muestras pueden almacenarse a  $4^{\circ}\text{C}$  durante un mes, a  $25^{\circ}\text{C}$  durante una semana o a  $-20^{\circ}\text{C}$  por tiempo indefinido. Los tejidos tratados con RNAlater se guardan a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

