

RECOGIDA, PRESENTACIÓN Y ALMACENAMIENTO DE MUESTRAS PARA EL DIAGNÓSTICO

INTRODUCCIÓN

Las pruebas de laboratorio relativas a las enfermedades de los animales dependen básicamente de la calidad y de la idoneidad de las muestras que se obtienen para los análisis. Este primer capítulo introductorio trata algunos de los principios generales relativos a la obtención, presentación y almacenamiento de muestras. Cada uno de los capítulos de este Manual Terrestre proporciona información específica sobre las muestras concretas que se precisan para analizar agentes patógenos o toxinas determinados. Las muestras pueden tomarse de los animales o de su entorno con diferentes fines, tales como el diagnóstico de enfermedades, la vigilancia de enfermedades, el certificado sanitario o el seguimiento de la respuesta a un tratamiento o a una vacunación. Para proporcionar resultados que sean científica y estadísticamente válidos, las muestras obtenidas deberán ser idóneas para el fin que se persigue y adecuadas en cuanto a calidad, volumen y número para la finalidad en cuestión. Además, los animales y tejidos muestreados deberán representar adecuadamente la enfermedad que se esté estudiando.

Las muestras deberán obtenerse aplicando medidas de bioseguridad y bioprotección adecuadas con el fin de prevenir la contaminación del medio, de las personas que las manipulen y de las que lleven a cabo el muestreo, así como para prevenir la contaminación cruzada de las muestras en sí. Debe evitarse el estrés, las lesiones y el riesgo físico innecesario a los animales, así como a las personas que los manipulen. Los materiales biológicos deberán empaquetarse de tal forma que se evite por completo una posible fuga, y a continuación se etiquetarán cumpliendo estrictamente las regulaciones aplicables relativas a su transporte, indicadas en el Capítulo 1.1.3.

A. OBTENCIÓN DE LAS MUESTRAS

1. Consideraciones generales

Debe prestarse especial atención a la obtención, contención y almacenamiento de las muestras, incluidas las medidas de bioseguridad que deben aplicarse para impedir la contaminación del medio y la exposición de otros animales o seres humanos a sustancias que pueden resultar infecciosas (véase el capítulo 1.1.4 *Bioseguridad y bioprotección: norma para la gestión del riesgo biológico en el laboratorio veterinario y en las instalaciones de los animales*). Para conocer la información sobre el transporte de muestras, véase el Capítulo 1.1.3 *Transporte de material biológico*.

Para que las pruebas de diagnóstico resulten fiables, es fundamental que la/s muestra/s sea/n la/s apropiada/s, de calidad y representativas del proceso de enfermedad que se esté estudiando. Antes de obtener las muestras, debe pensarse en el tipo de muestra/s necesarias, así como en la finalidad del muestreo y las tecnologías de análisis que se utilizarán. El volumen o cantidad de muestra debe ser suficiente como para llevar a cabo un análisis inicial y las posibles pruebas confirmativas posteriores, y para que quede muestra residual suficiente como referencia o para guardarla en archivo.

Los objetivos del análisis deberán concordar con las finalidades para las cuales se hayan validado las pruebas, como se indica en el Capítulo 1.1.6 *Principios y métodos de validación de las pruebas de diagnóstico de las enfermedades infecciosas*, es decir:

- i) Poner de manifiesto la ausencia de infección en una población definida.
- ii) Certificar la ausencia de infección o la presencia de un agente patógeno en animales determinados o en sus productos destinados a fines de comercio/desplazamiento.

- iii) Erradicar la enfermedad o eliminar la infección de poblaciones definidas.
- iv) Confirmar el diagnóstico de casos sospechosos o confirmados.
- v) Estimar la prevalencia de la infección o exposición para facilitar el análisis del riesgo.
- vi) Determinar el estado inmunitario de animales o poblaciones determinados (post-vacunación).

Deben elaborarse planes de muestreo adecuados desde el punto de vista epidemiológico antes de obtener muestras, como se describe en el apartado B y en el Anexo 1.1.2.1. Estos planes especificarán el número de animales y de otras unidades a muestrear.

Las muestras deben obtenerse de acuerdo con un conocimiento exhaustivo de la epidemiología y la patogenia de la enfermedad que se esté estudiando, o del síndrome que se quiera diagnosticar. Ello implica muestrear los tejidos o líquidos que con mayor probabilidad contendrán el agente infeccioso o indicios de la infección. Es importante tener en cuenta si la infección afecta principalmente a unos u otros tejidos o si tiene unos órganos diana, la duración y el lugar de la infección en cada tipo de tejido y la duración y la vía de excreción, o el periodo de tiempo durante el cual puede detectarse, de forma fiable mediante las pruebas que se aplicarán, si ha habido infección en el pasado, como por ejemplo una respuesta de anticuerpos. Estas consideraciones también indicarán el/los método/s de obtención que deben emplearse. En muchos estudios de enfermedades de rebaños o basados en un rebaño resulta ventajoso obtener muestras de una cohorte sana para realizar pruebas epidemiológicas o para obtener los valores basales con fines comparativos (por ejemplo, en el caso de estudios de casos y controles y de cohorte para pruebas de diagnóstico), así como para fines de validación.

Cuando se requiere sacrificar o anestesiar a un animal para su contención, debe tenerse en cuenta cómo influirá la sustancia química utilizada en el resultado de la prueba (por ejemplo, pruebas de toxicología). Ciertas pruebas de laboratorio no son compatibles con determinados anticoagulantes o conservantes de tejidos, como la heparina, la formalina o el hielo seco (la exposición de la muestra problema a niveles altos de CO₂), o ni siquiera con la congelación. Aunque es fundamental obtener las muestras de la forma más aséptica posible, igual consideración merece el evitar la contaminación por detergentes o tratamientos antisépticos que se emplean para limpiar la zona del animal de la cual se obtendrá la muestra, puesto que estas sustancias pueden interferir con los procedimientos de las pruebas de laboratorio. Los procedimientos que requieren cultivos de agentes patógenos en tejido, así como muchas pruebas moleculares, pueden resultar afectados de forma negativa por sustancias químicas o detergentes que a menudo se utilizan en la fabricación o preparación de determinados utensilios que se emplean en la obtención de muestras (como las sustancias químicas que se emplean para fabricar ciertos hisopos y los detergentes que se utilizan para limpiar el material de vidrio).

En los capítulos del *Manual Terrestre* dedicados a cada enfermedad se proporciona información específica sobre las metodologías de las pruebas de diagnóstico y las muestras, los conservantes y los procedimientos de manipulación de las muestras recomendados; esta información también puede obtenerse preguntando directamente al laboratorio que llevará a cabo la prueba en cuestión. La mayoría de laboratorios de diagnóstico, incluidas las autoridades nacionales e internacionales, facilita los procedimientos para la obtención y la presentación de muestras, y dicha información a menudo está publicada en la página web del laboratorio en cuestión. En la página web de la OIE se facilita la información de contacto de todos los Laboratorios de Referencia de la OIE (<http://oie.int/our-scientific-expertise/reference-laboratories/list-of-laboratories/>).

Es fundamental no solo obtener las muestras más adecuadas para el diagnóstico, sino también informar al laboratorio de la epidemiología de la enfermedad, con el fin de que el personal del laboratorio pueda asignar las pruebas o conjuntos de pruebas más adecuados. La información epidemiológica a presentar con las muestras se indica en el Apartado C de este capítulo.

Cuando se investiguen enfermedades de causa desconocida, deben obtenerse varias muestras de distintos tipos que sean representativas de las diferentes fases del avance de la enfermedad en un animal o en la población de animales (por ejemplo, la fase pre-clínica, inicio de la fase clínica, fase clínica activa, fase de afectación crónica y fase convaleciente). Para el diagnóstico de enfermedades relacionadas con la población, es especialmente importante tener en cuenta los aspectos epidemiológicos, como sería el caso de las colmenas, los rebaños y las parvadas. Los principios de epidemiología que se emplean para el muestreo se introducen con mayor detalle en el Apartado B de este capítulo.

Pueden obtenerse muestras ante-mortem o post-mortem. A continuación se detallan las consideraciones específicas relativas a los distintos tipos de muestras.

2. Sangre

Pueden obtenerse muestras de sangre para hematología, bioquímica clínica, toxicología, examen directo para descartar bacterias o parásitos, PCR, inmunología o cultivos de bacterias o virus. En función de las pruebas

necesarias, a partir de la sangre total obtenida con los anticoagulantes apropiados, se trabajará con la propia sangre total, células hemáticas y/o plasma. Para escoger el anticoagulante, será necesario saber qué pruebas de laboratorio van a realizarse, como diagnósticos basados en la PCR, bioquímica clínica o toxicología, que pueden resultar afectados negativamente por la presencia de determinados anticoagulantes o conservantes. En cada capítulo de este *Manual Terrestre* dedicado a una enfermedad concreta se indican los requisitos relativos a las pruebas y a las muestras. Para que los anticoagulantes sean eficaces, la sangre extraída deberá mezclarse bien con el anticoagulante elegido, durante o inmediatamente después de extraerla del animal.

Para obtener suero, la sangre total se introduce en un tubo sin anticoagulantes y se deja que se forme el coágulo a temperatura ambiente, protegido de temperaturas extremas durante periodos que pueden oscilar entre unas pocas horas y toda una noche. El suero, transparente, puede decantarse o recogerse mediante pipeteado tras la retirada física del coágulo, teóricamente tras una centrifugación suave para separar los componentes celulares del suero. Si no se dispone de centrífuga, la separación del coágulo puede facilitarse inclinando unos 45 grados el tubo de sangre acabada de recoger, hasta que el coágulo se haya retraído, “rodeando” el coágulo con un bastón o pipeta estériles para separarlo de la superficie del tupo, y extrayéndolo a continuación con unas pinzas. La calidad de la muestra puede comprometer los resultados de la serología. La contaminación bacteriana y los detritos de los eritrocitos en las muestras de suero pueden producir falsos positivos en las pruebas de tipo aglutinación. La hemólisis en la muestra de suero puede afectar negativamente a las pruebas serológicas. La contaminación microbiana y la hemólisis son problemas considerables, sobre todo cuando se obtienen muestras de sangre y de suero post-mortem. Son causas frecuentes de hemólisis del suero y del plasma la exposición a temperaturas excesivas o retrasos en la separación del suero respecto de los eritrocitos, así como la obtención de sangre mediante aguja de diámetro demasiado pequeño o el no quitar la aguja cuando se expulsa la muestra de sangre de la jeringa con la que se ha extraído.

La sangre total debe obtenerse de forma aséptica, habitualmente mediante venopunción del animal vivo. En función del animal y del lugar de muestreo, pueden utilizarse las venas yugular, caudal, braquial, cefálica, mamaria o cava. Se han revisado técnicas específicas para el muestreo en animales pequeños de laboratorio (Anon, 1993; Hem *et al.*, 1998). Debe tenerse cuidado de obtener y dispensar las muestras de sangre de la forma más cuidadosa posible para impedir dañar las células hemáticas, lo cual causaría hemólisis. La sangre y los sueros suelen enviarse y almacenarse refrigerados (o congelados en el caso de los sueros) en viales, tubos o frascos irrompibles; no obstante, en el caso de algunas pruebas de laboratorio que requieren células mononucleares de sangre periférica viables, la sangre debe empaquetarse, transportarse y almacenarse de tal modo que se evite la exposición a extremos de temperatura. Para determinadas pruebas, pueden deshidratarse alícuotas de muestras sobre un trozo de papel de filtro no tratado o tratado de forma específica y diseñado para el transporte y el almacenamiento de muestras estabilizadas.

3. Heces

Pueden obtenerse heces recientes o de preferencia directamente del recto/cloaca en el caso de pruebas como el cultivo de microorganismos, el examen parasitológico o la determinación de sangre fecal oculta; también pueden obtenerse para el diagnóstico por cultivo y molecular a partir del recto/cloaca empleando hisopos con punta de algodón, Dacrón o gasa, en función del volumen de muestra que exija la metodología de la prueba en cuestión. Las muestras tomadas con hisopo deben conservarse húmedas introduciendo el hisopo en los medios de transporte recomendados para la prueba en cuestión, que pueden oscilar entre la solución salina estéril y medios de cultivo que contengan antibióticos o estabilizantes. Las muestras fecales deben guardarse refrigeradas (por ejemplo, a 4 °C o sobre hielo) y analizarse cuanto antes tras la obtención, para minimizar el efecto negativo que la muerte del microorganismo buscado, el sobrecrecimiento bacteriano o la eclosión de huevos de parásitos pueden ocasionar en los resultados de las pruebas. El doble empaquetado de las muestras fecales en recipientes con tapón de rosca o herméticos que a su vez puedan introducirse en bolsas de plástico herméticas ayudará a prevenir la contaminación cruzada de las muestras y materiales de envoltura relacionados. Las muestras fecales que solamente se envuelven en guantes de exploración, bolsas de plástico o tubos con tapón de goma no sirven, porque muy a menudo contienen crecimiento bacteriano con producción de gas que puede romper las bolsas de plástico, desplazar los tapones y comportar la fuga de muestra.

4. Epitelio

Para el examen directo o pruebas de laboratorio destinados a detectar parásitos de superficie, como ácaros, piojos, infecciones fúngicas, bacterianas o víricas, reacciones alérgicas o neoplasias puede utilizarse tejido epitelial en forma de biopsia o raspado de piel, hisopos de las superficies oral, faríngea y gastrointestinal, así como el pelo o lana arrancados. Estas muestras deben obtenerse de forma aséptica y conservarse como se haya especificado para la/s prueba/s en cuestión. Los raspados profundos de piel obtenidos mediante el borde de una hoja de bisturí son útiles para detectar ácaros excavadores. Las puntas de plumas se han validado para su uso en la detección del antígeno vírico de la enfermedad de Marek, y se utilizan como muestra para la detección molecular de otras enfermedades de las aves. Ciertos tejidos epiteliales, en concreto los relacionados con lesiones vesiculares e introducidos en medios de transporte para virus, pueden resultar fundamentales en el diagnóstico de laboratorio de infecciones víricas específicas, como la fiebre aftosa.

5. Muestreo ocular

Pueden tomarse muestras de la superficie ocular mediante hisopado o raspado ocular, garantizando que para la prueba se obtienen células y no secreción mucopurulenta ni líquido lagrimal. Las muestras conjuntivales suelen obtenerse sosteniendo los párpados separados y aplicando con cuidado sobre la superficie ocular un hisopo de algodón, dacron o gasa, que previamente se habrá humedecido con solución salina estéril o medios equivalentes. Este tipo de hisopos deben mantenerse húmedos en solución salina o medios de transporte recomendados para la prueba en cuestión. Las biopsias del tercer párpado de ovejas se han utilizado como tejido rico en células linfoides para la detección de priones.

6. Muestreo del tracto reproductor

Pueden utilizarse lavados e hisopos prepuciales y vaginales del cuello del útero y la uretra como muestras para investigar enfermedades reproductivas. Los hisopos deben mantenerse húmedos tras la obtención de la muestra introduciéndolos en el volumen recomendado de medio de transporte que exija la prueba de laboratorio, normalmente en solución salina estéril o medios de cultivo específicos. Las muestras de semen suelen obtenerse empleando una vagina artificial o por extrusión del pene y estimulación artificial. Es necesario evitar la contaminación de la muestra por soluciones antisépticas o detergentes que se utilicen para preparar el muestreo del animal/zona.

7. Secreción nasal, saliva y líquidos vesiculares

Pueden obtenerse secreciones directamente a un vial o tubo, o bien utilizando hisopos. Los líquidos vesiculares constituyen una fuente muy concentrada de agente patógeno para las pruebas de diagnóstico, y pueden obtenerse de vesículas no reventadas empleando una aguja y jeringa estériles, transfiriéndolas de inmediato a un vial o tubo que cierre herméticamente. Para la obtención de material celular y mucus de la faringe del ganado vivo pueden emplearse utensilios de muestreo específicos para este fin, como las sondas esofágicas. Las cuerdas de algodón que los animales pueden mordisquear y masticar se han validado para su uso en la obtención de muestras de saliva de ganado porcino.

8. Leche

Puede obtenerse leche de animales determinados o del tanque de leche combinada de varios animales del rebaño. El/los pezón/es que se utilice/n para el muestreo deberá/n limpiarse, y deberá enjuagarse todo el detergente antes de obtener la muestra. Al extraer leche de pezones determinados, el chorro inicial debe desecharse y solo deben aprovecharse los siguientes. El método de conservación previo al análisis depende de los requisitos de cada prueba; en algunos casos, será fundamental evitar la congelación o adición de conservantes químicos. Deberán consultarse los capítulos de este *Manual Terrestre* sobre cada enfermedad concreta y/o el consejo del laboratorio de análisis para saber cuáles son las recomendaciones relativas a la manipulación y conservación adecuadas de las muestras.

9. Muestras obtenidas durante la necropsia

Las necropsias solo deben llevarlas a cabo veterinarios y especialistas en anatomía patológica calificados. Los veterinarios pueden formar a personal paraveterinario para que lleve a cabo exámenes post-mortem para fines determinados. Es importante destacar que el propósito de la necropsia no solo es obtener muestras sino también realizar observaciones fundadas relativas a la anatomía patológica de la enfermedad. Este tipo de observaciones son un complemento importante de las observaciones epidemiológicas y clínicas en la investigación veterinaria global del caso o del brote. A las autoridades veterinarias les resulta útil contar con veterinarios especialistas en anatomía patológica para que lleven a cabo investigaciones post-mortem en casos importantes. Cuando esta capacidad se gestiona desde un laboratorio veterinario, los métodos empleados deben describirse formalmente en el Manual de Garantía de Calidad del laboratorio y dicha capacidad debe reconocerse en el ámbito de acreditación del laboratorio. En la mayoría de libros de texto sobre anatomía patológica se describen en detalle los procedimientos necesarios para llevar a cabo exámenes post-mortem y obtención de tejidos, y también pueden hallarse en muchas de las directrices sobre los análisis que publican los laboratorios de ámbito nacional en sus páginas web. Las muestras que resultan cruciales para la investigación en el laboratorio de enfermedades de la lista de la OIE se indican en los capítulos del *Manual Terrestre* correspondientes a cada enfermedad.

Tanto si la necropsia se realiza en un laboratorio designado como sobre el terreno, deben seguirse los procedimientos de bioseguridad y biocontención pertinentes, con el fin de garantizar la seguridad y para conseguir muestras no contaminadas y útiles para el análisis, así como para proteger el medio ambiente y a otros animales de la posible exposición a agentes patógenos. Como requisito mínimo, la/s persona/s que obtengan las muestras deberán usar equipo de protección personal que proteja la piel y las mucosas y que sea desechable o que pueda descontaminarse. Los restos de tejidos, canales y líquidos deberán introducirse en recipientes y tratarse con un método desinfectante o de destrucción adecuado, y el medio ambiente inmediato deberá desinfectarse a fondo.

En función de la enfermedad de la que se sospeche, del estado de la canal y de las instalaciones de las que se disponga para realizar las necropsias, pueden obtenerse muestras post-mortem de uno o varios órganos y presentarse al laboratorio como muestras frescas (sin conservantes) o conservadas para posterior análisis en el laboratorio. El proceso de autólisis de la canal puede destruir tejidos y agentes infecciosos relevantes desde el punto de vista del diagnóstico, y por lo tanto debe tenerse en cuenta antes de obtener y presentar muestras post-mortem.

En el caso de muestras frescas, debe prestarse especial atención a su manipulación y almacenamiento para evitar la autólisis y el sobrecrecimiento de contaminantes bacterianos y fúngicos. Lo ideal es mantener las muestras obtenidas en refrigeración constante desde el momento de la obtención hasta su procesado para el análisis. Cuando esta cadena de frío no puede asegurarse, pueden obtenerse muestras frescas para ciertos procedimientos analíticos en líquidos como etilenglicol, que inhiben el crecimiento de microorganismos secundarios. Cuando estas estrategias son compatibles con los métodos analíticos posteriores, la opción se menciona en el capítulo correspondiente del *Manual Terrestre* para cada enfermedad.

La conservación de muestras post-mortem se suele llevar a cabo introduciéndolas en una solución de formalina. Cuando el laboratorio o las autoridades competentes proporcionan este fijador químico al personal de anatomía patológica, este debe asegurar una formación suficiente en los aspectos de seguridad y salud relacionados con el uso de este tipo de sustancias químicas, así como la formación suficiente en cumplimiento de las regulaciones relativas al transporte de estas sustancias químicas.

10. Medio ambiente y alimento

El muestreo del medio ambiente puede hacerse de material de cama, agua de bebederos o pienso que haya estado expuesto a orina, heces y/o saliva de animales afectados, o bien pueden tomarse hisopos de superficies o instalaciones, conductos de ventilación, sistemas de drenaje o tanques de alimento. Si se dispone de equipo especializado, puede muestrearse el aire circulante.

11. Abejas melíferas

Pueden obtenerse abejas adultas moribundas o que acaben de morir de las proximidades de las colonias. También pueden sacrificarse abejas vivas mediante congelación. Las muestras de panal suelen obtenerse tomando un pedazo de panal de cría que presente anomalías e incluyendo panal muerto o decolorado, envolviéndolo en papel de cocina o de periódico y no en papel de aluminio ni encerado, para contribuir a la prevención del sobrecrecimiento microbiano. Como alternativa, las celdillas enfermas de un panal puede muestrearse empleando un palillo o utensilio equivalente. Puede utilizarse una tabla pegajosa para obtener detritos de la colmena, lo cual también sirve para atrapar parásitos móviles. Si se precisa más información sobre las muestras que deben obtenerse, puede hallarse en los capítulos de este *Manual Terrestre* sobre cada enfermedad relacionada con las abejas.

B. ENFOQUES EPIDEMIOLÓGICOS DEL MUESTREO

Para conseguir resultados que sean científica y estadísticamente válidos, las muestras deben ser las adecuadas para cada propósito de estudio, y deben presentar la calidad, volumen y cantidad suficientes. En el Apartado A se indican los propósitos con los que se llevan a cabo investigaciones respaldadas por pruebas de laboratorio.

Cuando las pruebas de laboratorio tienen como finalidad el establecer un diagnóstico, es importante muestrear animales que estén afectados clínicamente o en los que se sospeche claramente de infección, y en el caso de la serología, que hayan estado infectados. Deben obtenerse las muestras que con mayor probabilidad den la máxima sensibilidad y especificidad a la investigación. En general, la fase de la infección, así como la vía y la duración de la excreción determinarán cuál/es es/son el/los animal/es adecuado/s, así como la fase de la enfermedad clínica, el plazo máximo para el muestreo y el tejido o punto anatómico a escoger. Estos criterios se evaluarán desde el conocimiento de la patogenia de la enfermedad, en el caso de enfermedades conocidas, y estableciendo una hipótesis de la patogenia en el caso de las enfermedades que se manifiestan con trastornos de etiología desconocida.

Para detectar signos de infección que concuerden con las otras cinco finalidades del análisis, según la lista del apartado A anterior, el muestreo debe realizarse en el contexto de un programa de vigilancia. Los criterios de diseño e implementación de una vigilancia eficaz se describen en el Capítulo 1.4 *Vigilancia de la sanidad animal del Código Sanitario para los Animales Terrestres (Código Terrestre)*. La identificación de los animales que deben muestrearse en los programas de vigilancia puede ser dirigida (basada en el riesgo) o aleatoria. El muestreo basado en el riesgo, que se basa en el conocimiento epidemiológico de la infección en estudio o en observaciones epidemiológicas de la población en estudio, tiene por finalidad el detectar con la máxima probabilidad los individuos infectados.

Las deducciones sobre el estado de una población, como la estimación de la prevalencia, el estado inmunitario o la ausencia de enfermedad deben basarse en un muestreo aleatorio. El muestreo aleatorio asegura que los animales muestreados sean representativos de la población, dentro de las limitaciones impuestas por los distintos ambientes y sistemas de producción. Además, el muestreo aleatorio permite la extrapolación de los hallazgos del estudio a la población general (con un intervalo de confianza aproximado). Los principios epidemiológicos para la estimación del tamaño muestral se indican en el Anexo 1.1.2.1.

Los requisitos específicos para que la vigilancia ponga de manifiesto la ausencia de enfermedad/infección, y los requisitos de muestreo relacionados, se indican en detalle en el Artículo 1.4.6 del Capítulo 1.4 del *Código Terrestre*.

El muestreo y las pruebas de laboratorio también pueden utilizarse para respaldar diagnósticos y estudios basados en la epidemiología, como los estudios de casos y controles, los longitudinales y los de cohorte (Fosgate & Cohen, 2008; Mann, 2003; Pfeiffer, 2010). El número y selección de los animales a muestrear y el tipo de muestras contribuirán a determinar el diseño del estudio.

C. INFORMACIÓN QUE DEBE ENVIARSE CON LAS MUESTRAS

Cada muestra debe identificarse claramente empleando métodos apropiados. Los utensilios de marcaje deben poder resistir el uso, es decir, la humedad y la congelación. Se requiere el uso de un rotulador indeleble. El lápiz puede borrarse. Las etiquetas pegadas al plástico pueden desprenderse cuando el recipiente se almacene a -70°C .

Las muestras que se envíen al laboratorio siempre deberán ir acompañadas de información sobre el lugar de procedencia y los datos de contacto, así como de las instalaciones muestreadas, la información sobre el caso y la información epidemiológica relacionada, como se detalla abajo. Este tipo de documentación debe introducirse en un sobre de plástico que irá pegado a la parte externa del recipiente que se envíe, entre el material de envoltorio secundario y el externo (véase también el Capítulo 1.1.3 *Transporte de material biológico*). Sería aconsejable contactar con el laboratorio receptor para que enviara un formulario con los requisitos relativos a las muestras y demás información relevante sobre el envío y la manipulación de las muestras.

La información necesaria es la siguiente:

1. Información sobre el lugar de procedencia y datos de contacto

- i) Nombre y dirección del propietario o responsable y de las instalaciones muestreadas y su ubicación geográfica (latitud y longitud, si se dispone de estos datos), y del momento en el que tuvo lugar la enfermedad, con información de contacto adecuada (teléfono y fax, y dirección de correo electrónico).
- ii) Nombre, dirección postal y correo electrónico, teléfono y fax del remitente.

2. Información sobre el caso

- i) Los agentes patógenos sospechosos y pruebas solicitadas.
- ii) La especie, raza, sexo, edad e identidad de los animales muestreados, y el número de trazabilidad cuando se disponga del mismo.
- iii) La fecha en que se obtuvieron y enviaron las muestras.
- iv) Listado del tipo de muestras enviadas, y de los medios de transporte utilizados.
- v) Historial del caso:
 - a) Los signos clínicos y su duración, incluida la temperatura de los animales enfermos, el estado de la boca, los ojos y las patas, y los datos de producción de leche o huevos, según corresponda.
 - b) Un listado y descripción de los animales explorados y de los hallazgos de los exámenes ante y post-mortem.
 - c) El tiempo durante el cual ha habido animales enfermos en las instalaciones; si son llegadas recientes, de dónde provienen.
 - d) La fecha de los primeros casos y casos o pérdidas posteriores, y, a efectos de la trazabilidad, los números de referencia del envío previo correspondiente.

3. Información epidemiológica

- i) Una descripción de la diseminación de la infección en el rebaño o parvada.
- ii) El número de animales de las instalaciones por especie, el número de animales muertos, el número que presenta signos clínicos, y su edad, sexo y raza.
- iii) El tipo y las normas de cría, incluidas las medidas de bioseguridad y otros factores relevantes potencialmente relacionados con la aparición de casos.
- iv) El historial de viajes del propietario al extranjero o de introducción de animales procedentes de otros países o regiones.
- v) Toda medicación administrada a los animales, y el momento en el que se ha administrado.
- vi) Historial de vacunación describiendo el tipo de vacunas que se han empleado y las fechas de aplicación.
- vii) Otras observaciones sobre la enfermedad, prácticas de manejo y otros trastornos patológicos observados.

D. RECEPCIÓN, ALMACENAMIENTO Y ARCHIVOS DE ENVÍOS AL LABORATORIO

1. Recepción de muestras

La recepción, desembalado y preparación de alícuotas de las muestras deben realizarse de tal forma que se evite la contaminación cruzada, con el fin de garantizar la fiabilidad de las pruebas y para prevenir la exposición del personal.

Debe llevarse a cabo una evaluación del riesgo (ER) como se describe en el capítulo 1.1.4 antes de establecer los sistemas de manipulación de agentes biológicos y toxinas, con el fin de definir las medidas adecuadas de bioseguridad y de bioprotección en el laboratorio. La ER debe conducir al desarrollo de políticas y procedimientos para la ejecución de todo el proceso de recepción de todos los envíos que lleguen al laboratorio.

Los envíos entregados al laboratorio deben recibirse de acuerdo con los procedimientos operativos estandarizados especificados por el personal, que deberá haber recibido una formación adecuada al respecto, y cuando sea posible, deberá ser avisado de las posibles llegadas, para que se trate correctamente a los paquetes en el momento de recibirlos. Para que la muestra pueda ser rastreada adecuadamente, deberá contener la siguiente información: a) el momento de la llegada, b) el remitente, c) la persona que recibe las muestras y d) la empresa transportista con el número de rastreo. Cuando, a los efectos de una acción o investigación legal, se requiere una cadena de custodia determinada, el envío debe mantenerse cerrado y seguro en un lugar fresco y seco protegido de la luz solar directa hasta que el personal de laboratorio autorizado sea notificado y esté disponible para recibir el paquete y para continuar la cadena de custodia. Los laboratorios deben disponer de procedimientos operativos escritos en los que se detallen los requisitos para cumplir con las exigencias legales de ámbito nacional relativas a este tipo de envíos.

1.1. Zona de recepción de las muestras

Las zonas de recepción de muestras deben estar equipadas para facilitar la manipulación y procesado seguros de los envíos destinados a diagnóstico, para evitar la contaminación de la zona de trabajo y del personal y la contaminación cruzada entre muestras, y para que la desinfección sea sencilla en situaciones en que el recipiente que contiene la muestra presenta fugas. La sala de recepción de muestras debe estar limpia, y disponer de una repisa con espacio suficiente para organizar los paquetes recibidos y el papeleo. En función del número de envíos esperados y dependiendo de la ER, la zona de recepción de muestras puede ser, o bien una zona del laboratorio de diagnóstico, o bien un espacio independiente fuera del laboratorio de diagnóstico.

La sala de recepción debe contar con una zona dedicada al desembalado de las muestras, con superficies fáciles de limpiar y bandejas y/o cabinas de bioseguridad, en función de la ER. Debe haber espacio suficiente y adecuado para almacenar las muestras, neveras o congeladores, en función del tiempo que las muestras deban quedar almacenadas. También es necesario que cuenten con equipo de registro de las muestras, como ordenadores, impresoras o cuadernos de registro. Para identificar y rastrear las muestras puede utilizarse un sistema de código de barras.

1.2. Desembalaje, registro y preparación de las muestras para el procesado posterior

Los paquetes deben permanecer cerrados hasta que se transfieren a la zona de recepción de muestras para su procesado posterior. El envío debe desembalarse y abrirse según los procedimientos operativos estandarizados establecidos. Debe plantearse la descontaminación de la superficie de trabajo para evitar la contaminación cruzada, lo cual deberá formar parte de los procedimientos que se establezcan en función de la ER.

La información que debe registrarse cuando llega la muestra es la procedencia, la fecha en la que se envió, el estado del embalaje externo y el estado de los embalajes internos (indicando la presencia de fugas o roturas), el estado de la muestra en sí, la temperatura del envoltorio interno y las posibles peticiones del remitente.

Otras actividades pueden ser el etiquetado de los recipientes de la muestra, la transferencia de muestras al laboratorio y el almacenamiento de las muestras.

El material de envoltorio debe desecharse de forma adecuada con arreglo a las regulaciones nacionales, lo cual podría implicar la destrucción de todo el material de envoltorio en autoclave, en función de la ER.

Debe suministrarse equipo de protección personal (PPE) para proteger al personal. El PPE mínimo es una bata de laboratorio y guantes. En función de la ER, también puede ser necesaria una protección respiratoria o protección eficaz contra salpicaduras (como gafas protectoras).

Una vez se haya determinado que el envío contiene el papeleo adecuado y correspondiente a las muestras, y que las muestras están en buen estado, personal de laboratorio adecuadamente formado pasará a ser el responsable de transferir el material a la zona del laboratorio apropiada, y de mantener la cadena de custodia de las muestras según sea necesario. Solo podrán transferirse al laboratorio de diagnóstico las muestras que se hayan que vengan en un recipiente adecuado y que se hayan registrado (identificado). Introducir los recipientes de las muestras enviadas en un segundo recipiente para transferirlas de forma segura al laboratorio se considera una buena práctica, y a veces es un paso exigido por las normas de bioseguridad y de bioprotección del laboratorio, en función de la ER.

1.3. Emergencias

Si la ER es exhaustiva, servirá para identificar escenarios de emergencia creíbles y previsibles, y constituirá la base para preparar un plan de respuesta. En concreto, las muestras que presentan fugas suponen un riesgo biológico para el personal del laboratorio y podrían contaminar el entorno y a otras muestras. En la zona de recepción de muestras debe contarse con instrucciones escritas sobre cómo actuar ante tubos rotos o que presenten fugas. El personal debe recibir formación, y deben realizarse ejercicios y simulaciones de emergencias de forma periódica.

Las muestras que estén deterioradas o en un estado inaceptable para el análisis deberán descontaminarse y desecharse adecuadamente con arreglo al plan de respuesta del laboratorio, como se indica en el párrafo anterior. Las superficies del laboratorio contaminadas deberán descontaminarse con el desinfectante adecuado. El rechazo de muestras y las discrepancias entre la muestra y el papeleo acompañante deberán resolverse contactando inmediatamente con el remitente para que envíe un duplicado de la muestra o para aclarar el papeleo.

2. Almacenamiento y archivos

Para la futura investigación y desarrollo, para llevar a cabo estudios retrospectivos e investigaciones epidemiológicas y para contar con material de referencia esencial para fines de estandarización y validación de pruebas y para programas de comprobación de la aptitud de los análisis, es fundamental obtener muestras bien caracterizadas que incluyan agentes infecciosos, tejidos y líquidos infectados, así como tejidos y líquidos control negativos.

Los materiales que suelen ser necesarios como estándares de referencia y para la validación de las pruebas se describen en el Capítulo 1.1.5 *Gestión de la calidad en los laboratorios de pruebas veterinarias*. Los materiales que se guardan en los archivos de los laboratorios deben ser representativos de los agentes manipulados y de los tipos de muestras que se utilizan en cada método analítico realizado, lo cual incluiría, de forma variable, tejidos y líquidos frescos y fijados, tejidos incluidos en parafina, y cultivos estabilizados o bien conservados. La *World Federation for Culture Collections* (WFCC: www.wfcc.info/collections) es una fuente útil de información y de documentación de referencia para desarrollar, mantener y compartir colecciones de cultivos, y ha publicado una guía exhaustiva sobre el establecimiento y funcionamiento de las colecciones de cultivos microbianos

(WFCC, 2010). Forma parte de las tareas de los Laboratorios de Referencia de la OIE el suministrar materiales de referencia.

Los componentes principales de cualquier archivo de laboratorio son los medios apropiados de estabilización y almacenamiento, un sistema completo de documentación e inventario del material guardado, y la implementación de medidas de bioseguridad y de bioprotección del laboratorio necesarias para gestionar la colección.

2.1. Estabilización y almacenamiento

El método de conservación de tejidos, líquidos y cultivos dependerá de su/s uso/s previsto/s. En el caso de las muestras guardadas a las que deba accederse periódicamente, como los materiales de referencia para pruebas, deberán prepararse alícuotas para evitar los posibles problemas relacionados con la extracción y reintroducción reiteradas en el lugar de almacenamiento. Pueden almacenarse en un lugar distinto del destinado a las muestras o materiales que se guardan con fines históricos y que se conservan a largo plazo. Las condiciones de almacenamiento deberán gestionarse para mantener la viabilidad y las propiedades bioquímicas e inmunológicas de las muestras al máximo. Para conservar la integridad de las muestras, deberán protegerse de la desecación (por ejemplo, la que puede tener lugar en ciertos congeladores), de las fluctuaciones de temperatura frecuentes o extremas, de la degradación por UV, de la humedad, de la contaminación y de la posible pérdida de la identificación o de la documentación del archivo relacionada con la muestra. Las cepas y materiales únicos o de gran valor deberán estabilizarse y almacenarse al menos mediante dos procedimientos y en dos lugares distintos.

El almacenamiento a temperaturas ultrabajas (por ejemplo, en nitrógeno líquido o la crioconservación en congeladores a -140°C o menos) se considera el método óptimo para el almacenamiento a largo plazo de materiales biológicos. El almacenamiento a temperaturas de congelador bajas, de -80°C y 20°C , es frecuente para periodos de entre 5 y 10 años. La ultracongelación podría no ser una buena opción porque es cara de mantener, pero el coste debe valorarse teniendo en cuenta que la degradación biológica de la muestra a lo largo del tiempo es cada vez más probable a medida que sube la temperatura de congelación. Los materiales de referencia que deban evaluarse de forma periódica deberán guardarse en alícuotas del tamaño adecuado para que resulten accesibles y al mismo tiempo se minimice el número de veces que se manipula la "reserva primaria". Debe evitarse la congelación y descongelación reiteradas de las muestras, puesto que puede desnaturalizar los antígenos, dar lugar a una pérdida de la viabilidad de los agentes exigentes y precipitar el sobrecrecimiento de microorganismos contaminantes o indeseados en la muestra.

Los métodos de estabilización y almacenamiento de muestras a temperatura ambiente abarcan desde las tecnologías comerciales, que en gran medida van dirigidas a estabilizar el ácido nucleico, a los procesos de liofilización y las versiones relativamente poco tecnológicas de desecación de líquidos sobre papel de filtro, y de almacenamiento de muestras biológicas en presencia de agentes desecantes, como silicagel o granos de arroz para absorber humedad.

Las consideraciones relativas a la rapidez con la que se congela una muestra o se conserva químicamente, el tamaño y la densidad del material que se desee conservar, el recipiente y los medios de almacenamiento, y también los protocolos de reconstitución, descongelación y agentes de revivificación pueden variar en función del tejido y del agente. Tanto si se pretende almacenar muestras congeladas como a temperatura ambiente, para la mayoría de tejidos y grupos de agentes infecciosos existen conservantes, protocolos de estabilización y condiciones de almacenamiento específicos y considerados óptimos; debe consultarse la bibliografía actual publicada.

2.2. Documentación e inventario

Los agentes y tejidos que se mantienen en un archivo deben estar identificados correctamente, y deben registrarse suficientes datos de respaldo que caractericen a la muestra o agente. En el caso de los materiales de referencia, se exige, además, documentación que autentique al agente o tejido. La identidad única del tejido, líquido o agente y la ubicación del almacenamiento se conservan mejor en un registro de inventario electrónico o en papel, en el que también se documentará la fecha en que se obtuvo el material, la fecha y método de conservación, el volumen de material almacenado, la procedencia del material, incluida la especie relacionada, la ubicación geográfica y el historial clínico del animal donante y la situación sanitaria del rebaño o parvada. Resulta extremadamente útil añadir información, normalmente el método inicial de aislamiento/recuperación, la caracterización (por ejemplo, datos disponibles sobre las propiedades bioquímicas, el título de anticuerpos o antigénico, y la secuencia genética) y datos adicionales sobre la manipulación del material (como el número de pases por agentes infecciosos y líneas celulares, las fechas en que el material archivado se congeló-descongeló o rehidrató y las fechas en que se transfirió a condiciones o recipientes de almacenamiento distintos). Lo habitual es que los inventarios se organicen asignando un número de

identificación o código alfanumérico único para cada muestra (el recipiente que la contiene), que remite al identificador correspondiente de una base de datos o registro de inventario. Los registros de inventario pueden ser registros de datos manuales, hojas de cálculo informatizadas, o programas informáticos especializados. Sea cual sea la forma de gestionar los registros, deben mantenerse actualizados y la información entrada debe ser rastreable hasta su origen. Deberán registrarse los datos de la persona que realice una entrada o modificación en el inventario de muestras.

2.3. Bioseguridad y bioprotección en el laboratorio

Como primer paso del establecimiento de un archivo, debe llevarse a cabo una evaluación del riesgo biológico del laboratorio que aborde aspectos de bioseguridad y de bioprotección, incluidas todas las medidas de control o mitigación que deban implementarse. Como se ha definido en el capítulo 1.1.4, para que la evaluación del riesgo relativo a las muestras archivadas sea adecuada, deberá abordar la necesidad de que el personal que manipule los tejidos, líquidos y agentes disponga de competencia técnica, especialmente los materiales que pueden resultar infecciosos o tóxicos para los trabajadores, los animales y el medio interno y externo del laboratorio. El laboratorio debe tener en cuenta todas las medidas de gestión del riesgo biológico necesarias para proteger la integridad de la muestra, así como la salud de los trabajadores y del medio ambiente, desde el momento en que se recibe la muestra original, a lo largo de todo el almacenamiento y durante el uso o destrucción del/los material/es.

Es importante que los laboratorios que mantienen inventarios y archivos biológicos tengan en cuenta cuál es el nivel adecuado de bioprotección del laboratorio, incluido el acceso controlado a las muestras archivadas y a los registros de inventarios. El laboratorio también debe tener un plan de copias de seguridad para transferir o destruir materiales archivados que puedan resultar peligrosos en caso de cortes del suministro eléctrico u otros problemas en el lugar de almacenamiento. Todos los laboratorios que tengan archivos de laboratorio deberán cumplir con las regulaciones y la legislación nacional e internacional, incluidos los requisitos para la obtención de permisos y licencias para recibir, mantener y trabajar con agentes y tejidos específicos, así como para distribuirlos. Puede encontrarse la información relativa a la reglamentación actual respecto a la recepción y almacenamiento de materiales biológicos en la página web de la *European Biological Resource Centre Network* (www.ebrcn.net/), en las directrices de la WFCC (2010) y en las correspondientes agencias gubernamentales nacionales.

BIBLIOGRAFÍA

ANON (1993) Removal of blood from laboratory mammals and birds. First Report of the BVA/FRAME/RSPCA/UFAW/Joint Working Group on Refinement. *Laboratory Animals*, **27**, 1–22.

FOSGATE G.T. & COHEN N.D. (2008) Epidemiological study design and the advancement of equine health. *Eq. Vet. J.*, **40**, 693–700.

HEM A., SMITH A.J. & SOLBERG P. (1998). Saphenous vein puncture for blood sampling of the mouse, rat, hamster, gerbil, guinea pig, ferret and mink. *Laboratory Animals*, **32**, 364–368.

MANN C.J. (2003). Observational research methods. Research design II: cohort, cross sectional, and case-control studies. *Emerg. Med. J.*, **20**, 54–60.

PFEIFFER D. (2010). *Veterinary Epidemiology: An Introduction*. Wiley-Blackwell; pp; 37–41.

WORLD FEDERATION FOR CULTURE COLLECTIONS (2010). Guidelines for the establishment and operation of collections of cultures of microorganisms, Third Edition, Revised by the WFCC Executive Board. ISBN 92 9109 043 3.

*

* *

NB: ADOPTADO POR PRIMERA VEZ EN 2008 COMO RECOGIDA Y ENVÍO DE MUESTRAS PARA EL DIAGNÓSTICO;
ÚLTIMAS ACTUALIZACIONES ADOPTADAS EN 2013.

ENFOQUES EPIDEMIOLÓGICOS DEL MUESTREO: CÁLCULOS DEL TAMAÑO DE LA MUESTRA

El tipo y el número de muestras necesarios dependen del propósito deseado. El cálculo del tamaño muestral para cada uno de los principales propósitos de análisis, cuando se ha utilizado un muestreo aleatorio, puede enfocarse del siguiente modo:

1. Para poner de manifiesto la ausencia de infección en una población definida (país/zona/compartimiento/rebaño donde la prevalencia es aparentemente cero)

A menudo, el objetivo del muestreo es determinar si una enfermedad está presente o ausente, a un umbral determinado (prevalencia prevista), en una población. Estos métodos de muestreo son necesarios para llevar a cabo estudios con base científica especificados en el *Código Sanitario para los Animales Terrestres* de la OIE, con el fin de determinar la ausencia con y sin vacunación, así como para volver a establecer la ausencia tras un brote.

Es posible calcular cuántos animales deberán muestrearse de un brote/parvada de cierto tamaño, para lograr una probabilidad del 95% de detectar infección o considerar que ha habido exposición previa en un cierto porcentaje de los animales. Puede aplicarse la siguiente fórmula:

$$n \cong \frac{(1 - (1 - CL)^{1/D})(N - 1/2)(SeD - 1)}{Se}$$

Donde:

- n*: es el tamaño de muestra requerido
- CL*: es el nivel de confianza (generalmente 0,95)
- N*: es el tamaño de la población
- D*: es el número de animales enfermos esperado en la población
- Se*: es la sensibilidad diagnóstica de la prueba utilizada

Por ejemplo, para determinar el tamaño de la muestra necesario para detectar, con una confianza del 95%, al menos un animal infectado en un rebaño de 500 animales, con una prevalencia prevista del 10%, la fórmula anterior se utilizaría del siguiente modo (suponiendo una sensibilidad diagnóstica perfecta):

$$n \cong (1 - (1 - 0.95)^{1/50})(500 - 1/2(50 - 1)) \cong 28$$

Si todas las muestras dan negativo en las pruebas de laboratorio, el epidemiólogo puede llegar a la conclusión de que, con una confianza del 95%, la prevalencia es inferior al 10%. Si la enfermedad en cuestión es muy infecciosa y es improbable que solo esté infectado un 10% de los animales, el rebaño podría considerarse libre de la enfermedad. No obstante, si una o más muestras dan positivo, el epidemiólogo puede llegar a la conclusión de que, con una confianza del 95%, la prevalencia de la enfermedad es de al menos un 10%.

2. Para certificar la ausencia de infección o la presencia del agente en animales determinados o en productos destinados al comercio/desplazamientos

El *Código Terrestre* aporta recomendaciones específicas para el comercio. Algunas se basan en el hecho de poner de manifiesto la ausencia de enfermedad a nivel de rebaño o de parvada, y otras, en pruebas realizadas en animales determinados destinados a la exportación. Cuando se recomienda que un rebaño o parvada obtenga la certificación de ausencia de enfermedad, puede seguirse el enfoque descrito en el punto 1 para calcular el número de muestras necesario.

En caso de analizar animales uno por uno, en general es esperable que se analicen todos los animales. La cuestión fundamental en este caso es la relacionada con el valor predictivo negativo (NPV) de la prueba y la probabilidad de obtener al menos un falso negativo en un grupo. El valor predictivo negativo de una prueba se define como la probabilidad de que un animal no esté infectado cuando ha dado un resultado negativo. El NPV es función de la sensibilidad y la especificidad diagnóstica de la/s prueba/s utilizada/s y de la prevalencia de la infección en la población de la que proceden los animales. En general, la probabilidad de tener al menos un falso negativo en un grupo se calcula del siguiente modo:

$$P(x \geq 1) = 1 - (1 - NPV)^n$$

El valor predictivo negativo se calcula del siguiente modo:

$$NPV = \frac{TN}{TN + FN} = \frac{(1 - p)Sp}{(1 - p)Sp + p(1 - Se)}$$

Donde:

- TN: es el verdadero negativo
- FN: es el falso negativo
- Se: es la sensibilidad diagnóstica
- Sp: es la especificidad diagnóstica
- p: es la prevalencia
- n: es el número de animales del grupo

En el *Handbook on Import Risk Analysis for Animals and Animal Products, Quantitative Risk Analysis* de la OIE puede hallarse más información sobre la cuantificación de estos tipos de probabilidades.

3. Para erradicar la enfermedad o eliminar la infección de poblaciones definidas

El objetivo de la vigilancia en caso de brote es intentar encontrar algún resto de infección. El muestreo debe ir dirigido a poblaciones que tengan mayor riesgo de exposición y en las que sea más probable encontrar el agente, como animales que presenten signos clínicos o que sean sospechosos de haber estado en contacto con animales infectados. Si los animales de un rebaño o parvada determinados no están presentando signos clínicos, para determinar la presencia o ausencia de enfermedad deberá obtenerse una muestra representativa, basada en la fórmula del punto 1 anterior.

4. Para confirmar el diagnóstico de casos sospechosos o clínicos (incluye la confirmación de un resultado positivo en una prueba de detección)

Los casos sospechosos o clínicos con un resultado positivo en una prueba de detección sistemática pueden volver a analizarse con una prueba confirmativa. Normalmente, se utiliza una prueba con una sensibilidad diagnóstica alta para la detección y una con una especificidad diagnóstica alta con fines para la confirmación. Si se desea determinar si el rebaño o parvada presentan la enfermedad, deberán muestrearse animales que presenten signos clínicos compatibles con la enfermedad en cuestión. Ello aumentará la probabilidad de confirmar la infección. Si se desea calcular el número de muestras necesarias, puede utilizarse la fórmula del punto 1, que sirve para determinar la presencia o ausencia. Dado que solo se obtendrán muestras de animales que presenten signos clínicos, la prevalencia prevista utilizada puede ser relativamente alta, y por lo tanto dará un tamaño de muestra menor.

5. Para estimar la prevalencia de la infección

Es posible que ciertos programas de control de enfermedades precisen evaluar periódicamente cómo influyen las medidas de control. Uno de los indicadores clave de éxito es una reducción en la prevalencia de la enfermedad. Puede emplearse la siguiente fórmula para determinar el número de muestras necesarias para determinar la prevalencia de la enfermedad dentro de un grupo de animales.

$$n = \frac{Z^2 pq}{L^2}$$

Donde

- n: es el tamaño muestral necesario
- Z: es el valor de la distribución de Z para el nivel de confianza deseado (normalmente, del 95%)
- p: es la prevalencia esperada en la población
- q: es 1-p
- L: es el nivel de precisión (o error aceptable)

No existen normas fijas para determinar el nivel de precisión (a veces, también denominado margen de error), cuya elección se deja en manos del epidemiólogo que lleva a cabo el estudio. No obstante, cuanto más fino es el nivel de precisión, mayores tamaños muestrales se requieren. El valor correspondiente de la distribución Z para una confianza del 95% es 1,96. Para determinar la prevalencia de una enfermedad con una confianza del 95% en un rebaño de 500 animales con una prevalencia de enfermedad esperada del 20%, y a un nivel de precisión de $\pm 3\%$, el tamaño muestral requerido puede calcularse del siguiente modo:

$$n = \frac{1.96^2 \times 0.2 \times 0.8}{0.03^2} = \frac{0.6146}{0.0009} \cong 683$$

Obsérvese que en este caso el tamaño muestral requerido es mayor que la población, de tal modo que el tamaño muestral deberá ajustarse teniendo en cuenta el tamaño de la población (N),:

$$n_{adj} = \frac{1}{1/n + 1/N} = \frac{1}{1/683 + 1/500} \cong 289$$

Por lo tanto, deberían muestrearse de forma aleatoria 289 animales.

6. Para determinar el estado inmunitario de animales o poblaciones (post-vacunación).

Los programas de control de enfermedades a menudo se basan en la vacunación como herramienta; en estos casos, es importante evaluar la cobertura de la inmunidad y no contar meramente el número de animales o rebaños que se han vacunado. La proporción de animales que tiene que inmunizarse para detener la diseminación de la enfermedad en una población es una función del número de infecciones secundarias que surjan a partir de un único caso infectado (el número reproductivo, R_0). En muchas enfermedades infecciosas, la proporción que precisa inmunidad para controlar la transmisión de la enfermedad es de alrededor de un 80%. Pueden aplicarse dos enfoques. Si el objetivo es hallar la proporción de animales inmunes, puede aplicarse la fórmula para determinar la prevalencia explicada en el punto 5 anterior. No obstante, si los responsables del programa quieren determinar si los rebaños tienen un nivel de inmunidad situado en cierto umbral o por encima del mismo, deberá utilizarse la fórmula que permite determinar presencia o ausencia, indicada en el punto 1 anterior. La diferencia en el tamaño muestral varía en gran medida en función del objetivo.

Si se desea estimar el estado inmunitario de un rebaño de 500 animales en el cual todos han sido vacunados, pueden seguirse los siguientes enfoques.

6.1. Estimar la proporción de animales inmunes de un grupo

- Prevalencia esperada (de animales inmunes) del 80%
- Precisión, para este ejemplo se considera un 3%
- Nivel de confianza del 95%

$$n = \frac{1.96^2 \times 0.8 \times 0.2}{0.03^2} = \frac{0.6146}{0.0009} \cong 683$$

$$n_{adj} = \frac{1}{1/n + 1/N} = \frac{1}{1/683 + 1/500} \cong 289$$

6.2. Estimar la inmunidad a un umbral definido

- Prevalencia esperada (de animales inmunes) del 80%, es decir, 400 de un total de 500 animales
- Nivel de confianza del 95%
- Sensibilidad diagnóstica perfecta

$$n \cong (1 - (1 - 0.95)^{1/400})(500 - 1/2(400 - 1)) \cong 3$$

Si al menos una de las tres muestras da positivo en la prueba, la interpretación es que, con una confianza del 95%, la proporción de animales inmunes en el rebaño es de al menos el 80%. Si ninguna de las muestras da positivo, el rebaño no puede considerarse suficientemente inmunizado. Este enfoque puede utilizarse para determinar localizaciones geográficas o tipos de sistemas de producción en los que la cobertura inmunitaria sea baja y que podrían precisar una revacunación.

Recursos on-line

Open Epi: <http://www.openepi.com/OE2.3/Menu/OpenEpiMenu.htm>

Free Calc: <http://epitools.ausvet.com.au/content.php?page=FreeCalc2>

Win Episcopy: <http://www.winepi.net/>

*
* *