

## CAPÍTULOS INTRODUCTORIOS

---

### CAPÍTULO 1.1.1.

## MÉTODOS DE MUESTREO

### INTRODUCCIÓN

*El punto de partida para la investigación de una enfermedad animal en el laboratorio es la toma de muestras. Este primer capítulo introductorio trata algunos de los principios generales relativos a la toma, envío y almacenamiento de muestras. Cada uno de los capítulos sobre enfermedades de este Manual proporciona información específica sobre la toma de muestras para esa enfermedad concreta. Las muestras pueden tomarse de los animales o de su entorno con diferentes fines, tales como el diagnóstico de enfermedades, vigilancia de enfermedades, certificado sanitario o seguimiento de la respuesta a un tratamiento o a la vacunación. Para proporcionar resultados estadísticos válidos, las muestras recogidas deberán ser idóneas para el fin que se persigue y adecuadas en cuanto al número y cantidad. Los laboratorios de diagnóstico solicitan la entrega de muestras adecuadas que lleguen al laboratorio en buenas condiciones. Para el diagnóstico de una enfermedad, los tejidos muestreados deberán ser representativos de la enfermedad investigada y de las lesiones observadas. Las muestras deben tomarse cuidadosamente con el fin de evitar cualquier lesión o estrés excesivo para el animal o cualquier peligro para el operador. Las muestras deben tomarse de forma aséptica y se debe tener cuidado para evitar la contaminación cruzada.*

*Las muestras deben embalarse, etiquetarse y enviarse al laboratorio por el procedimiento más rápido posible, controlando convenientemente la temperatura. Se deben seguir los requisitos específicos para el embalaje y expedición de especímenes para diagnóstico y sustancias infecciosas. También es necesario que el expedidor reciba instrucción sobre los procedimientos de expedición. Cuando se vaya a enviar material a un laboratorio de otro país, se consultará previamente con dicho laboratorio para asegurarse de que está dispuesto a recibir el material y a obtener la correspondiente licencia de importación. Todas las muestras deberán acompañarse de una carta o formulario de envío en el que se indique el nombre y la dirección del remitente, el origen del material, el historial pertinente, identificación del animal y espécimen correspondiente y las pruebas solicitadas.*

### A. RECOGIDA DE MUESTRAS

Antes de tomar las muestras, debe tenerse en cuenta el fin para el que se solicitan. Dicho fin determinará el tipo y número de muestras necesarias para obtener resultados válidos. Cuando las muestras se tomen de animales vivos, se llevará cuidado para evitar heridas o sufrimiento al animal o cualquier peligro para el operador y sus ayudantes. Puede ser necesario el uso de sujeción mecánica, de anestésicos o de tranquilizantes. Siempre que se maneje material biológico de animales vivos o muertos, debe tenerse en cuenta el riesgo de contraer una enfermedad zoonótica y, por lo tanto, deben tomarse precauciones para evitar la infección humana (véase también el Capítulo 1.1.6. *Bioprotección y bioseguridad en los laboratorios de microbiología veterinaria y en las instalaciones de los animales*). Los exámenes *post-mortem* deben realizarse bajo las más estrictas condiciones de asepsia posibles. Hay que procurar evitar la contaminación ambiental o el riesgo de propagar la enfermedad a través de insectos o fomites. Debe organizarse la forma apropiada y segura de deshacerse de animales y tejidos.

Se requieren bastante habilidad y cuidado para decidir qué muestras son apropiadas para enviar al laboratorio. Las muestras recogidas deben ser representativas de la enfermedad que se está investigando y de las lesiones observadas. Con frecuencia, se requiere un combinado de muestras de sangre para pruebas serológicas y de tejidos procedentes de animales muertos o sacrificados selectivamente para cultivos microbiológicos y examen patológico. Más adelante, dentro de este capítulo, se describen recomendaciones para el transporte.

Los capítulos sobre enfermedades contenidos en este *Manual* proporcionan una guía sobre las muestras que deben tomarse, y, por lo tanto, no repetiremos aquí esa información. Además, las autoridades nacionales e internacionales han elaborado los procedimientos para la recogida de muestras y su envío (2, 4, 7, 9, 10). Estas publicaciones ofrecen recomendaciones detalladas de muestras concretas que hay que tomar de diferentes especies, y sobre una amplia variedad de enfermedades de cuya existencia se sospecha. También proporcionan información sobre los procedimientos post-mortem, listados de medios apropiados e instrucciones sobre el envío de muestras. Se debería contactar con el laboratorio que vaya a realizar las pruebas para dilucidar cualquier cuestión relacionada con el tipo de muestreo a realizar.

## 1. Toma de muestras de animales vivos

### a) Sangre

Las muestras de sangre pueden tomarse para análisis hematológico, para cultivos y/o para el examen directo de bacterias, virus o protozoos, en cuyo caso es normal el uso de anticoagulantes, como el etilén diamino tetra-acético (EDTA) o heparina. También se pueden tomar para pruebas serológicas, en cuyo caso se necesita una muestra coagulada. El plasma sanguíneo también se usa para algunos procedimientos. Las muestras de sangre se toman mediante venepuntura, de la forma más limpia posible. En la mayoría de los grandes mamíferos, se utiliza la vena yugular o una vena caudal, pero también se pueden utilizar venas braquiales y mamarias. En los cerdos también se utilizan derivaciones de la vena cava. En las aves, generalmente se utiliza una vena del ala (vena braquial). En los animales pequeños de laboratorio, las venas auricular o retroorbital pueden ser útiles para obtener muestras de sangre, pudiéndose obtener ésta también por punzamiento del corazón. La sangre se puede extraer con una jeringa y aguja o con una aguja y un tubo de vacío (no es fácil con venas delicadas, pero es cómodo con venas gruesas). Se pueden obtener cómodamente pequeñas cantidades de sangre mediante punción con una aguja triangular de punta sólida. Lo ideal sería rasurar (o desplumar) la piel del lugar de la punción, frotarla con alcohol etílico al 70% y dejarla secar.

Cuando las muestras se recogen con anticoagulante, es preciso mezclarlas por completo mediante agitación suave inmediatamente después de su recogida. Es preciso mezclar bien las muestras tomadas con anticoagulantes y/o antibióticos tan pronto como se tomen éstas. También puede ser necesario hacer un frotis sanguíneo en un portaobjetos; se pueden preparar semiextensiones y extensiones de sangre. Para las muestras de suero, la sangre debe dejarse a temperatura ambiente, pero protegida del calor o frío excesivos, durante 1-2 horas, hasta que el coágulo empiece a retraerse. Entonces, se recoge el coágulo con una varilla estéril, girándola, y se colocan los frascos en el frigorífico a 4° C. La muestra se puede centrifugar a 1000 g durante 10-15 minutos después de unas horas o al día siguiente, y el suero se puede decantar o quitar con una pipeta. Con los sueros que van a utilizarse para pruebas de neutralización de virus, deben evitarse los conservantes químicos, tales como el ácido bórico o el tiomersal (mertiolato). A menudo, será necesario tomar muestras de suero pareadas para determinar los títulos de los anticuerpos con intervalos de 7-14 días. Un método alternativo para el transporte de sangre, que se va a usar en pruebas de sensibilidad a anticuerpos, es la colocación de una gota de sangre sobre papel de filtro; la sangre se seca a temperatura ambiente y la muestra puede entonces remitirse sin necesidad de refrigeración. Hay que ponerse en contacto con el laboratorio para preguntar si este método de colección está validado para las pruebas requeridas.

### b) Heces

Se deben utilizar al menos 10 g de heces recién evacuadas, enviándolas con o sin medio de transporte. Las heces para análisis parasitológico deben llenar por completo el recipiente y enviarse con refrigeración para impedir la eclosión de los huevos de los parásitos, y deben llegar al laboratorio antes de transcurridas 24 horas. Si el transporte va a durar más de 24 horas, las muestras deben enviarse en hielo o refrigerarse para evitar la eclosión de los huevos de parásitos. Deben utilizarse botellas con tapón de rosca o bolsas de plástico para el transporte. Debe evitarse el uso de tubos con tapón de goma, pues el gas que se genera puede expulsar el tapón del tubo destruyendo así la integridad de la muestra y contaminando otras muestras del mismo paquete. Un método alternativo y a menudo preferible consiste en tomar muestras del recto (o cloaca), procurando arrastrar la superficie mucosa. Los hisopos deben estar visiblemente cubiertos de materia fecal; sin embargo las muestras recogidas con hisopos no suelen ser adecuadas para el análisis parasitológico. Se debe tener cuidado al tomar muestras de animales pequeños y delicados o de aves, para no herirlos; se deberían utilizar los hisopos pequeños que se encuentran en el mercado. Los hisopos deben colocarse en un medio de transporte. Las heces se deben almacenar y transportar a 4°C.

**c) Piel**

Las muestras se tomarán de las lesiones mismas, en el caso de enfermedades que producen erupciones vesiculares: se tomarán 2 g del tejido epitelial afectado de la forma más aséptica posible, y se depositarán en 5 ml de medio de transporte de virus con glicerina tamponada con fosfato o caldo de triptosa tamponada con Tris, a pH 7,6. Además, las muestras de fluido vesicular deben tomarse por aspiración con una jeringa, en donde haya vesículas intactas, y depositarse en un tubo estéril independiente. Las muestras de pelo o lana son útiles en los caso de infección por ácaros de superficie, piojos y hongos. Para la detección del antígeno vírico, cuando se sospecha la presencia de la enfermedad de Marek, pueden obtenerse piojos “excavadores” mediante raspado profundo con el borde de un escalpelo, y, en el caso de las aves, pueden tomarse las puntas de las alas.

**d) Tracto genital y semen**

Las muestras pueden tomarse mediante lavado vaginal y prepucial o utilizando hisopos adecuados. El cérvix y la uretra se muestrean por raspado. Las mejores muestras de semen se obtienen mediante una vagina artificial o por extrusión y estimulación artificial del pene. La muestra debe contener una fracción rica en esperma y debe evitarse la contaminación, mediante el lavado con una solución antiséptica. A menudo se requieren medios y condiciones de transporte.

**e) Ojos**

La muestra de la conjuntiva puede tomarse separando el párpado y arrastrando suavemente por la superficie. A continuación, el hisopo debe colocarse en un medio de transporte. Los raspados también se pueden depositar sobre portaobjetos. En este caso, las asas de los hisopos de mango de metal son útiles para asegurarse de que se retiran suficientes células para el estudio microscópico. Sólo en raras ocasiones son útiles las secreciones mucopurulentas nasales y lacrimales.

**f) Exudados nasales (saliva, lágrimas)**

Las muestras también se pueden tomar con hisopos de dracón, algodón o gasa, preferiblemente con mangos de alambre, ya que la madera no es flexible y se puede partir. Puede resultar útil humedecer el hisopo con medio de cultivo antes de tomar la muestra. Es conveniente dejar el hisopo en contacto con las secreciones durante 1 minuto, colocarlo después en un medio de transporte, y enviarlo al laboratorio sin demora, a 4°C. Se deberían utilizar hisopos nasofaríngeos con protección duradera para recoger muestras en algunos casos sospechosos de infección vírica.

**g) Leche**

Las muestras de leche deben tomarse después de limpiar y secar el pezón, evitando el uso de antisépticos. Debe desecharse el primer chorro de leche y llenar un tubo con el chorro o chorros siguientes. Para algunas pruebas, puede tomarse la muestra de leche de un tanque de almacenamiento. La leche para pruebas serológicas no se debe congelar, calentar o agitar de forma energética. Puede añadirse conservante a las muestras de leche recogidas para pruebas serológicas si se va a tardar en enviarlas al laboratorio. Si es preciso se puede congelar la leche destinada a análisis bacteriológico.

## **2. Toma de muestras en los exámenes post-mortem**

Al realizar el examen *post-mortem*, se pueden tomar muestras de tejidos de diferentes órganos. En la mayoría de los libros de texto de patología, se detallan los procedimientos para la realización de exámenes *post-mortem* y para la toma de muestras. Se ha publicado una guía sobre los procedimientos de necropsia (8). Las técnicas *post-mortem* se recogen también en algunas de las directrices nacionales (2, 4, 7). En este apartado se ofrece un resumen de estos procedimientos.

Se debe instruir al personal veterinario sobre los procedimientos que deben seguirse en un examen *post-mortem* de los animales con los que trabajan. El equipo necesario para realizar este trabajo dependerá del tamaño y de la especie del animal y se requerirán un cuchillo, una sierra, un hacha y también bisturí, fórceps y tijeras, incluidas unas con punta curva en una de sus hojas para abrir los intestinos. Debe disponerse de un abundante número de recipientes adecuados a la naturaleza de la muestra, así como de etiquetas y formularios de informe. Los recipientes deben etiquetarse perfectamente con la fecha y la identificación del tejido y del animal antes de comenzar la necropsia. Pueden necesitarse medios especiales para el transporte de las muestras desde el lugar en el que se toma la muestra. El operador debería llevar vestimenta protectora (traje de protección lavable y guantes y botas de goma). Además, si se están investigando posibles enfermedades zoonóticas, el examen *post-mortem* debería realizarse en una cabina de seguridad biológica; si esto no es posible, se debería llevar una mascarilla y protección para los ojos. Es normal separar la cabeza del animal, si se sospecha de la rabia o de encefalopatías espongiiformes transmisibles (EETs).

Los tejidos se recogen para realizar cultivos microbiológicos, diagnósticos de parásitos, análisis bioquímicos, estudios histopatológicos y/o inmunopatológicos, y para la detección de proteínas o ácidos nucleicos del genoma. La persona que realice el examen post-mortem debe poseer conocimientos de anatomía y patología suficientes para seleccionar los órganos correctos y las lesiones más favorables para el muestreo. Cada trozo de tejido se debe colocar en una bolsa de plástico independiente perfectamente rotulada o en un bote con tapa de rosca. Se debe utilizar instrumental esterilizado para la recogida de especímenes destinados a cultivo microbiológico, y hay que tener un cuidado especial de no contaminar los tejidos con contenido intestinal. No deben utilizarse desinfectantes sobre o cerca de los tejidos que vayan a servir de muestra para cultivo bacteriológico o para aislamientos víricos.

Los tejidos se pueden enviar secos al laboratorio o en medio de transporte de bacterias o de virus, dependiendo de las pruebas que se soliciten. Tras la recogida, las muestras para examen microbiológico deben refrigerarse hasta su envío. Las muestras se deben congelar si aquél no se hace en 48 horas; sin embargo el almacenamiento prolongado a  $-20^{\circ}\text{C}$  puede resultar perjudicial para el aislamiento de virus. Para los estudios histopatológicos, se cortarán bloques de tejido que no excedan de 0,5 cm de grosor y 1–2 cm<sup>2</sup> y se colocarán en formalina al 4–10 % en tampón neutro, que debería ser, al menos, diez veces el volumen de la muestra de tejido. Cuando se sospeche de ciertas enfermedades, se necesitan trozos más grandes de cerebro; el cerebro se secciona haciendo un corte sagital: la mitad se envía fresco, en hielo, y la otra en formalina al 10% tamponada. En el caso de la “tembladera” (scrapie), de la encefalopatía esponjiforme bovina y otras EETs, los detalles sobre recolección de muestras se ofrecen en los capítulos correspondientes del presente Manual. Almacene y embale los tejidos fijados con formalina separados de los tejidos frescos, la sangre y los frotis. Hay que asegurarse de que los tejidos fijados con formalina no estén congelados. Una vez fijados, se les puede quitar la formalina y enviarlos al laboratorio, siempre que se mantengan húmedos y estén protegidos (por ejemplo, envolviendo los tejidos en toallas de papel empapadas con formalina y en botes con tapón a rosca herméticamente cerrados).

### 3. Toma de muestras medioambientales y de alimentos

Las muestras se pueden tomar para controlar la higiene o como parte de la investigación de enfermedades. Las muestras del medio ambiente se pueden tomar del estiércol o de la cama de los animales y de heces excretadas u orina. Las muestras pueden tomarse de la superficie de los conductos de ventilación, de comederos y de desagües. Este tipo de muestreo es particularmente importante en criaderos, centros de inseminación artificial y mataderos, en los que hay equipamiento especializado. Las muestras también se pueden tomar del forraje de los comederos o de los contenedores de almacenamiento. La toma de muestras de agua se puede hacer de comederos, de bebederos, de tanques de alimentación o de alimentos naturales o manufacturados.

### 4. Abejas

Las abejas adultas, estén muertas o moribundas, se pueden recoger en las cercanías de las colonias. A las vivas se las mata por congelación. Las muestras de crías se toman quitando un trozo de panal de cría que presente anomalías. Se envuelve en papel y se coloca en una caja para transportarla al laboratorio.

## B. TAMAÑO DE LA MUESTRA

Cuando se investiga un caso de una enfermedad clínica, los ejemplares recogidos deben ser representativos de la enfermedad que se está investigando y de las lesiones observadas. Cuando se desarrolla un programa de vigilancia y seguimiento de la salud animal, se deben utilizar algunos métodos estadísticos de muestreo generales. Estos métodos de muestreo son necesarios para realizar los estudios científicos especificados en el *Código Sanitario para los Animales Terrestres* de la OIE (12). Es posible calcular el número de animales de una manada de un tamaño determinado que se deben muestrear, para que la detección de la infección, que se asume que está presente en un determinado porcentaje de animales, alcance una probabilidad del 95% (10). Las formulas siguientes pueden proporcionar datos numéricos aproximados, pero un programa de muestreo específico para el programa de vigilancia planificada debería basarse en formulas completas que están disponibles en las referencias (1, 3) o utilizando un programa (FreeCalc) disponible en Internet [http://www.ausvet.com.au/content.php?page=res\\_software#freecalc](http://www.ausvet.com.au/content.php?page=res_software#freecalc) En todos los ejemplos de cálculo proporcionados en los párrafos siguientes puede utilizarse FreeCalc.

La siguiente fórmula podría utilizarse para calcular el tamaño de la muestra  $n$  para detectar al menos un caso de infección, con una prueba que tiene una sensibilidad y especificidad del 100%, donde  $\alpha$  es el nivel de significación y  $1-\alpha$  es el nivel de confianza, y  $p$  es la prevalencia en la población. Si una enfermedad se presentara en el 5% de una manada de 500 animales, sería necesario recoger ejemplares de 59 animales, para que la confianza de encontrar al menos un caso positivo sea del 95%, suponiendo que la sensibilidad y la especificidad de la prueba fueran del 100%. Para hacer una predicción de la prevalencia de una muestra, es de suma importancia que la muestra se tome de la población por el procedimiento de muestreo al azar. Puesto que la mayoría de las pruebas diagnósticas no tienen la especificidad y la sensibilidad del 100%, el número de

ejemplares recogidos debe ajustarse a la sensibilidad y especificidad de la prueba que se utilice (véase también Capítulo 1.1.3. *Principios de validación para las pruebas de diagnóstico de enfermedades infecciosas*).

$$n = \frac{\ln(\alpha)}{\ln(1-p)}$$

En el ejemplo anterior  $\alpha = 0,5$ ,  $1-\alpha = 95\%$ ,  $p = 0,05$  y  $n = 59$

Si la sensibilidad (Se) es menor del 100%, la fórmula anterior se debería modificar de la siguiente forma:

$$n = \frac{\ln(\alpha)}{\ln(1-p \cdot Se)}$$

En el ejemplo anterior con  $\alpha = 0,05$ ,  $p = 0,05$ , especificidad (Sp) = 1 y Se = 0,95, sería necesario muestrear un mínimo de  $n = 62$  animales en vez de 59 para tener una probabilidad de 0,95 de encontrar al menos un animal positivo. El aumento en el tamaño de la muestra desde 59 a 62 se debe a la disminución de la sensibilidad de la prueba desde 1 a 0,95. La gráfica de abajo indica el tamaño de muestra mínimo que se requiere para encontrar al menos un positivo para varias combinaciones de sensibilidad y prevalencia para  $\alpha = 0,05$  y Sp = 1.

Si se sabe que la prueba tiene una especificidad menor de 1, los resultados positivos se deberán confirmar mediante una prueba con una especificidad más alta. Si la prevalencia es muy baja y la prueba utilizada tiene una especificidad menor de 1, es muy posible que un resultado positivo de la prueba sea un falso positivo.

### Cálculo del tamaño de la muestra Especificidad = 1 alfa = 0,05

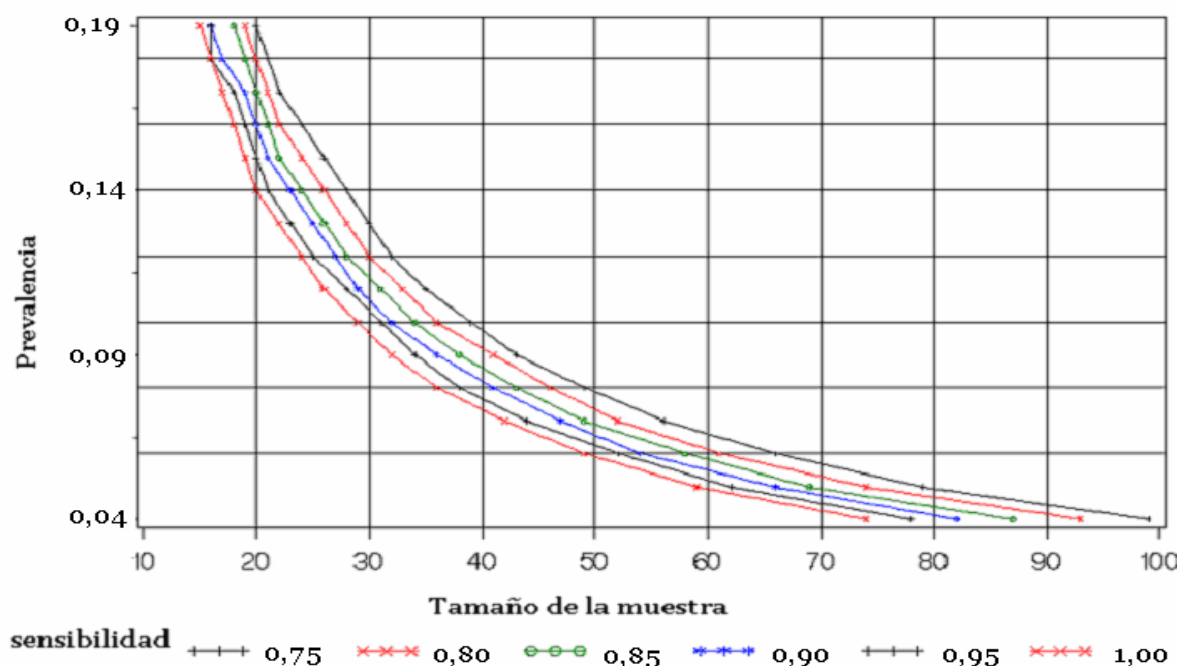


Figura 1. Tamaño de muestra mínimo requerido para la confianza del 95% de encontrar la infección para distintas combinaciones de sensibilidad y prevalencia.

## C. INFORMACIÓN QUE HA DE ENVIARSE CON LAS MUESTRAS

Es fundamental que las muestras individuales se identifiquen perfectamente mediante métodos adecuados. Los instrumentos de marcado deben poder resistir las condiciones de uso; por ejemplo, mojarse o congelarse (utilícese un marcador de tinta indeleble). El lápiz tiene tendencia a borrarse de los contenedores, y las etiquetas, pegadas al plástico, se desprenden cuando se almacenan a  $-70^{\circ}\text{C}$ . La información y el historial del caso siempre deberían acompañar a las muestras al laboratorio y deberían colocarse en un sobre de plástico, por fuera del embalaje de transporte. Tal como se resume en la sección siguiente sobre el transporte de muestras, esa información debe incluirse también dentro del embalaje de transporte. Se sugiere que se sigan los siguientes puntos. Es aconsejable contactar con el laboratorio receptor para determinar si tiene un formulario de envío que quisiera que le remitieran con las muestras o si necesita otra información.

- i) Nombre y dirección del propietario/titular y geoubicación (latitud y longitud, si se dispone de ambas) donde se dio la enfermedad, con los números de teléfono y fax.
- ii) Nombre, dirección postal, correo electrónico, números de teléfono y fax del remitente..
- iii) Enfermedades de cuya existencia se sospecha y pruebas solicitadas.
- iv) Fecha de toma de las muestras y envío.
- v) Lista de las muestras remitidas y medios de transporte utilizados.
- vi) Debería incluirse un historial completo para el laboratorio, que contemplara los siguientes elementos:
  - a) Una lista y descripción de los animales examinados y de los hallazgos del examen *post-mortem*.
  - b) El tiempo que han permanecido los animales enfermos en la granja; si son recién llegados y de dónde procedían.
  - c) La fecha de los primeros casos y de los posteriores, o de los animales muertos, con los números de referencia de los envíos anteriores.
  - d) Una descripción de la extensión de la infección en la manada o rebaño.
  - e) El número de animales muertos y de los que presenten signos clínicos, y edad, sexo y raza.
  - f) Los signos clínicos y su duración, incluidos la temperatura de los animales enfermos, el estado de la boca, ojos y patas, y los datos de producción de leche y huevos.
  - g) Tipo y normas para la cría, incluidos el tipo de alimento disponible, y posible contacto con venenos o plantas venenosas.
  - h) Historial de viajes al extranjero por parte del propietario o de introducción de animales de otros países o regiones.
  - i) Cualquier medicación administrada a los animales y cuándo se les administró.
  - j) Cualquier vacuna administrada y cuándo se administró.
  - k) Otras observaciones sobre la enfermedad y manejo de los animales.

## D. EMBALAJE Y TRANSPORTE DE MUESTRAS

### 1. Autorización de envío de especímenes

Se debe contactar con el laboratorio que va a recibir las muestras, para asegurarse de que está capacitado para realizar las pruebas solicitadas y para consultar si hay requisitos especiales de embalaje o expedición. Cuando el material se envíe a otro país es imprescindible ponerse en contacto con el laboratorio receptor. Normalmente se necesitará una licencia de importación especial para el transporte de cualquier material biológico a otros países y debe obtenerse con anticipación. La licencia debe colocarse en un sobre en el exterior del paquete.

Los envíos deben realizarse de acuerdo con las regulaciones sobre sustancias peligrosas para cada modo concreto de envío. Para el transporte aéreo existen las directrices técnicas de la Organización de Aviación Civil Internacional (OACI) para el transporte aéreo seguro de sustancias peligrosas. Esas directrices están reflejadas en el Reglamento sobre Mercancías Peligrosas de la Asociación Internacional de Transporte Aéreo (IATA), que constituyen la plasmación de las instrucciones de la OACI aplicadas al transporte aéreo (5). Ese Reglamento se ha descrito en una publicación (11) de la Organización Mundial de la Salud, de las Naciones Unidas. El remitente es responsable de comprobar los cambios en las directrices para asegurarse del cumplimiento de las restricciones.

## 2. Transporte de especímenes

Los especímenes deben enviarse al laboratorio por el procedimiento más rápido disponible. Si las muestras pueden llegar al laboratorio antes de 48 horas, se deben enviar refrigeradas. Si se utiliza hielo seco, se deben seguir normas adicionales de empaquetado. Las sustancias infecciosas, que pueden incluir especímenes de diagnóstico, no se pueden enviar como equipaje facturado ni como equipaje de mano, y se deben enviar como cargamento.

## 3. Embalaje

El remitente debe asegurarse de que los especímenes se embalan de tal forma que lleguen al laboratorio en buenas condiciones y que no hay fugas durante el transporte. El Reglamento sobre Mercancías Peligrosas (DGR) tiene requisitos explícitos sobre el embalaje y expedición de especímenes para diagnóstico en todos los medios comerciales de transporte aéreo (5,11). En algunos países se exigen requisitos similares para los envíos terrestres y por servicio postal, y deberían consultarse dichos requisitos antes del envío. Los requisitos para el transporte aéreo se especifican de forma detallada en las publicaciones de la IATA, que son actualizadas cada año. Se espera que el remitente conozca y siga los procedimientos esbozados en el Reglamento para Mercancías Peligrosas (DGR). A continuación se ofrece un resumen del Reglamento vigente en el momento en que este Manual de los animales terrestres se publicó, y que deberían seguirse para cualquier envío. Los remitentes deberán consultar siempre la última versión de las DGR de la IATA antes de proceder al envío de especímenes de diagnóstico. Además, tres de las directrices nacionales ofrecen instrucciones explícitas para el embalaje y envío de especímenes de diagnóstico, estando tales directrices basadas en los requisitos de la IATA (2, 4, 7).

Las DGR esboza los procedimientos para el envío de sustancias infecciosas, incluidos los especímenes de diagnóstico. Las DGR define las sustancias sospechosas como sustancias de las que se sabe o se sospecha que contienen patógenos. Los patógenos se definen como microorganismos (incluidas bacterias, virus, rickettsias, parásitos y hongos) o microorganismos recombinantes (híbridos o mutantes) de los que se sabe o se tiene una sospecha razonable de que causan enfermedades en los humanos o los animales.

La IATA (5, 11) menciona como exento del Reglamento sobre Mercancías Peligrosas el siguiente supuesto:

- *3.6.2.2.3.1 Las sustancias que no contienen sustancias infecciosas o las sustancias que no es probable que causen enfermedades en humanos o animales no están sujetas a estas Regulaciones salvo que se ajusten a criterios por los que se las pueda incluir en otra clase.*
- *3.6.2.2.3.2 Las sustancias que contengan microorganismos no infeccioso para el hombre o los los animales no están sujetas a estas regulaciones salvo que se ajusten a criterios por los que se las pueda incluir en otra clase.*
- *3.6.2.2.3.3 Las sustancias en las que cualquier agente patógeno ha sido neutralizado o inactivado de modo que no representen un riesgo no están sujetas a estas regulaciones salvo que se ajusten a criterios por los que se las pueda incluir en otra clase.*
- *3.6.2.2.3.4 Las muestras ambientales (incluidas las muestras de alimento o agua), que se considere que no representan peligro alguno de infección, no están sujetas a estas regulaciones salvo que se ajusten a criterios por los que se las pueda incluir en otra clase.*
- *3.6.2.2.3.5 Las manchas de sangre seca, recogida mediante la aplicación de una gota de sangre a material absorbente, o mediante pruebas de examen de sangre oculta fecal y la sangre o componentes sanguíneos que se hayan recogido para transfusiones o para preparar productos sanguíneos que han de usarse en transfusiones o trasplantes o cualquier tejido u órgano que se vaya a usar en un trasplante.*
- *3.6.2.2.3.6 Los ejemplares de pacientes, con muy pocas posibilidades de albergar patógenos no están sujetos a estas Regulaciones si el ejemplar se transporta con un embalaje a prueba de fugas y está*

marcado con las palabras “Especimen humano exento” o “Especimen animal exento”, según sea el caso. El embalaje debe cumplir los siguientes requisitos.

- (a) El embalaje debe tener tres componentes
  - (1) un recipiente primario a prueba de fugas;
  - (2) un envoltorio secundario a prueba de fugas; y
  - (3) un envoltorio exterior con fuerza adecuada a su volumen, masa y uso, y con al menos una superficie plana de una dimensión mínima de 100 mm x 100 mm;
- (b) Para los líquidos, debe colocarse una cantidad suficiente de material absorbente para eliminar todo el contenido entre el recipientes primario y el envoltorio secundario de forma que, durante el transporte, cualquier fuga o escape de una sustancia líquida no alcance al envoltorio exterior y no comprometa la integridad del material de amortiguación;
- (c) Cuando se coloquen múltiples recipientes frágiles dentro de un único envoltorio, deberá envolverse cada uno de ellos por separado para evitar el contacto entre ellos.

**“Nota:** Para determinar si un espécimen de paciente tiene una posibilidad mínima de contener patógenos, se requiere un componente de evaluación profesional para determinar si una sustancia está exenta según los criterios del párrafo anterior. Dicha evaluación debe basarse en el historial médico conocido, los síntomas y las circunstancias individuales del humano o animal y las condiciones endémicas locales. Los ejemplos de especímenes que se pueden transportar según el mencionado apartado incluyen las pruebas de sangre u orina para comprobar los niveles de colesterol, glucosa en sangre, hormonas, anticuerpos específicos de la próstata (PSA); las pruebas requeridas para comprobar el funcionamiento de órganos como el corazón, hígado o riñón de humanos o animales sin enfermedades infecciosas, o comprobación de la medicación terapéutica; pruebas realizadas para fines de seguro o empleo cuya finalidad es determinar la presencia de drogas o alcohol; pruebas de gestación; biopsias para detectar cáncer; y detección de anticuerpos en humanos o animales”

También hay excepciones para algunos productos biológicos, y el remitente debe consultar el Reglamento de la IATA ya que algunos de esos productos no están exentos. A continuación ofrecemos la definición de productos biológicos que aparece en las DGR (5,11):

*Los productos biológicos provienen de organismos vivos y se fabrican y distribuyen de acuerdo con los requisitos exigidos por las correspondientes autoridades de ámbito nacional; estos productos están sometidos a requisitos para obtener licencias y se utilizan para la prevención, tratamiento o diagnóstico de enfermedades humanas o animales, o para el desarrollo, experimentación e investigación relacionados con los propósitos antes mencionados. Entre esos productos se incluyen productos acabados o no acabados como las vacunas.*

Las DGR especifica que las sustancias infecciosas (incluidos los especímenes que puedan contener patógenos que afectan a los humanos o los animales) se designan como Categoría A y B y asignadas a N2814, NU2900 o UN3373.

La categoría A se define como una: “sustancia infecciosa que se transporta de tal forma que cuando se produce una exposición a la misma, es capaz de causar invalidez permanente, la muerte o una enfermedad fatal en el hombre o en animales sanos; En los Cuadros 1 y 2 se ofrecen ejemplos indicativos de sustancias que se ajustan a esos criterios”. Las sustancias infecciosas que se ajustan a esa definición y afectan a los humanos, entre ellas los agentes zoonóticos, se designan como UN 2814 y se les asigna la etiqueta de embarque **“sustancia infecciosa, que afecta a los humanos”**; las que sólo afectan a los animales se designan como UN 2900 y se les marca con la etiqueta **“sustancia infecciosa, que afecta a los animales”**.

Las sustancias infecciosas enviadas con fines diagnósticos, y que no se ajustan a los criterios por los que se las designaría como UN2814, o, UN 2009, se asignan a la Categoría B y a la clase UN 3373 y se designan como **“ESPECÍMENES DE DIAGNÓSTICO o ESPECÍMENES CLÍNICOS o SUSTANCIAS BIOLÓGICAS DE LA CATEGORÍA B”**.

Las DGR de la IATA contiene una lista indicativa de los patógenos que se deben asignar a UN 2814, o, UN 2900 (Cuadros 1 y 2). Los patógenos incluidos en estas listas no se pueden asignar a UN 3373 (5, 11).



**Cuadro 1.** Sustancias infecciosas que afectan a los humanos y que deben denominarse UN 2814.

<i>Bacilo del ántrax</i> (sólo cultivos)	Virus de la Encefalitis japonesa (sólo cultivos)
<i>Brucella abortus</i> (sólo cultivos)	Virus de Junin
<i>Brucella melitensis</i> (sólo cultivos)	Virus de la Enfermedad de la Selva de Kyasanur
<i>Brucella suis</i> (sólo cultivos)	Virus de Lassa
<i>Burkholderia mallei</i> – <i>Pseudomonas mallei</i> – Muermo (sólo cultivos)	Virus Machupo
<i>Burkholderia pseudomallei</i> – <i>Pseudomonas pseudomallei</i> (sólo cultivos)	Virus de Marburg
<i>Chlamydia psittaci</i> – cepas aviarias (sólo cultivos)	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> (sólo cultivos)
<i>Clostridium botulinum</i> (sólo cultivos)	Virus de la Viruela del mono
<i>Coccidioides immitis</i> (sólo cultivos)	Virus de Nipah
<i>Coxiella burnetii</i> (sólo cultivos)	Virus de la Fiebre hemorrágica de Omsk
Virus de la Fiebre hemorrágica de Crimea-Congo	Virus de la Polio (sólo cultivos)
Virus del Dengue (sólo cultivos)	Virus de la Rabia (sólo cultivos)
Virus de la Encefalitis equina del Este (sólo cultivos)	<i>Rickettsia prowazekii</i> (sólo cultivos)
<i>Escherichia coli</i> , verotoxigénico (sólo cultivos)	<i>Rickettsia rickettsii</i> (sólo cultivos)
Virus del Ébola	Virus de la Fiebre del Valle del Rift (sólo cultivos)
Virus Flexal	Virus de la Encefalitis rusa de primavera-verano (sólo cultivos)
<i>Francisella tularensis</i> (sólo cultivos)	Virus de la Sabia
Virus Guanarito	Virus de la Disentería Shigella tipo 1 (sólo cultivos)
Virus Hantaan	Virus de la Encefalitis rusa estival (sólo cultivos)
Hantavirus causante de la fiebre hemorrágica con síndrome renal	Virus de la Viruela
Virus de Hendra	Virus de la Encefalitis equina venezolana (sólo cultivos)
Virus de la Hepatitis B (sólo cultivos)	Virus del Oeste del Nilo (sólo cultivos)
Virus del Herpes B (sólo cultivos)	Virus de la Fiebre amarilla (sólo cultivos)
Virus de la Inmunodeficiencia humana (sólo cultivos)	<i>Yersinia pestis</i> (sólo cultivos)
Virus de la Gripe aviar muy virulenta (sólo cultivos)	

**Cuadro 2.** Ejemplos indicativos de patógenos animales prohibidos que deben enviarse como sustancias infecciosas que afectan a los animales (UN 2900).

Virus de la peste equina africana	<i>Mycoplasma mycoides</i> – Pleuroneumonía contagiosa bovina (sólo cultivos)
Paramixovirus aviar – Virus velogénico de la Enfermedad de Newcastle (sólo cultivos)	Virus de la peste de los pequeños rumiantes (sólo cultivos)
Virus de la peste porcina clásica (sólo cultivos)	Virus de la peste ovina (sólo cultivos)
Virus de la fiebre aftosa (sólo cultivos)	Virus de la viruela ovina (sólo cultivos)
	Virus de la viruela caprina (sólo cultivos)
Virus de dermatosis nodular contagiosa (sólo cultivos)	Virus de la estomatitis vesicular (sólo cultivos)

Los patógenos nuevos o emergentes deben asignarse a UN 2814 o UN 2900.

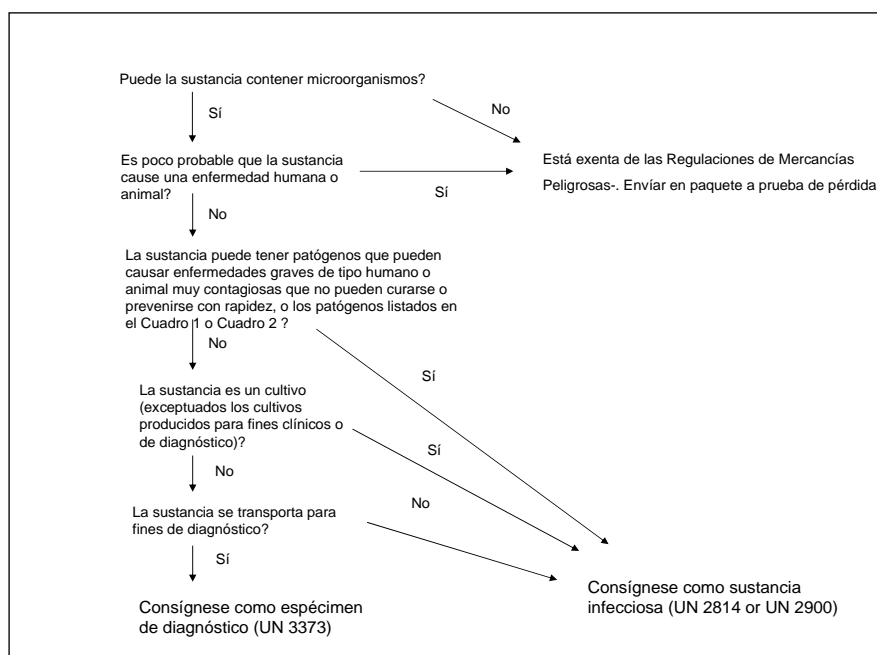
He aquí la definición de incremento de cultivo según la IATA:

“Los cultivos son el resultado de un proceso por el que los patógenos son propagados intencionadamente. Esta definición no incluye a los especímenes de pacientes.”

“Los especímenes de pacientes son los que se han recogido directamente de humanos o animales, como excreciones y secreciones corporales, sangre y sus componentes, tejido y frotis de fluidos tisulares, y partes del cuerpo que se transportan con fines de investigación, diagnóstico, actividades de investigación, y tratamiento y prevención de enfermedades.”

*Nota:* Los Cultivos de organismos que no se ajustan a la definición de sustancias infecciosas de la Categoría A pueden transportarse como productos biológicos, de la Categoría B.

En el siguiente diagrama de flujo se resume la clasificación de **ESPECÍMENES DE DIAGNÓSTICO, ESPECÍMENES CLÍNICOS y SUSTANCIAS BIOLÓGICAS DE LA CATEGORÍA B.**



No se debe utilizar animales vivos para el transporte de sustancias infecciosas.

Los cadáveres de animales afectados por agentes patógenos de la Categoría A o que pudieran asignarse a la Categoría A sólo cuando se hallan en cultivos deben asignarse a UN 2814 o UN 2900, según procesa. Otros cadáveres de animales afectados por patógenos pertenecientes a la Categoría B deben transportarse de acuerdo con las especificaciones de la Autoridad Competente.

El embalaje de sustancias y especímenes infecciosos procedentes de enfermedades animales graves, UN 2814, o, UN 2900, se trata de forma resumida en la instrucción de embalaje 620; La Declaración de Mercancía Peligrosa por parte del remitente debe cumplimentarse y entregarse junto con las muestras. También existe el requisito de que el remitente reciba entrenamiento sobre procedimientos de embalaje aprobados por la IATA para los embarques de UN 2814 y UN 2900. Debido a la complejidad de estas directrices, se le recomienda al remitente que consulte el Reglamento de la IATA par obtener más información sobre los embarques de UN 2814 y UN 2900 (5,11).

El otro grupo, UN 3373, cubre los “Especímenes de diagnóstico, especímenes clínicos o sustancias biológicas de la categoría B”. Esta categoría entraña un riesgo menor, y los paquetes que contienen tales especímenes deben llevar la etiqueta “Especímenes de diagnóstico, especímenes clínicos o sustancias biológicas”; no es necesario hacer una declaración de mercancías peligrosas. La instrucción de embalaje 650 de la IATA proporciona las directrices para embalar sustancias infecciosas clasificadas como NU3373, ofreciéndose a continuación un resumen de las instrucciones de embalaje mencionadas. No obstante, debe seguirse el procedimiento completo, tal como se explica en el Reglamento de Mercancías Peligrosas más recientes de la IATA (5, 11).

- i) Los especímenes para diagnóstico (UN 3373) deben disponerse en embalajes de buena calidad, que deben ser suficientemente fuertes para resistir los golpes y el peso que tienen que soportar durante el transporte. Los embalajes se deben hacer y cerrar de forma que se evite cualquier fuga de contenido que pudiera producirse en condiciones normales de transporte.
- ii) El embalaje debe constar de tres componentes
  - un recipiente primario;
  - un envoltorio secundario; y
  - un envoltorio exterior rígido.
- iii) Para sustancias líquidas:
  - el recipiente primario debe ser hermético y no debe contener más de un litro; el envoltorio secundario también debe ser hermético;
  - el recipiente primario debe envolverse con material absorbente adecuado para poder absorber todo el líquido del recipiente o recipientes primarios;
  - Si se utilizan varios recipientes primarios éstos deberán envolverse individualmente o por separado para impedir el contacto entre ellos.
  - El recipiente primario o el envoltorio secundario deben poder soportar una presión interna de 95 kPa a entre -40°C y 55°C (-40°F y 130°F) sin que se produzca ningún escape;
  - el envoltorio exterior no debe contener más de 4 litros. De esa cantidad hay que excluir el hielo, el hielo seco y el nitrógeno líquido, utilizados para los especímenes refrigerados.
- iv) Para sustancias sólidas:
  - El recipiente o recipientes primarios deben ser a prueba de filtrado y no deben sobrepasar el límite de peso del envoltorio exterior; el envoltorio secundario debe ser a prueba de filtrado;
  - el recipiente primario debe envolverse con material absorbente adecuado para poder absorber todo el líquido del recipiente o recipientes primarios;
  - excepto con los embalajes que contengan partes del cuerpo, órganos o cuerpos enteros, el envoltorio exterior no debe pesar más de 4 kg. De esa cantidad hay que excluir el hielo, el hielo seco y el nitrógeno líquido, utilizados para los especímenes refrigerados;
  - Si existe duda alguna sobre la presencia de líquido residual en el recipiente primario durante el transporte, deberá utilizarse un material de embalaje adecuado para los líquidos, incluyendo materiales absorbentes;
- v) Debe incluirse una lista detallada del contenido entre el envoltorio secundario y el exterior.
- vi) Si el envío se realiza a temperatura ambiente o superior, el recipiente primario tiene que tener un medio que asegure su estanqueidad, tal como un cierre hermético, un cierre sellable por calor o un tapón con reborde. Si se usan tapones a rosca, deben reforzarse con cinta adhesiva.
- vii) Las bolsas refrigerantes o el hielo seco deben colocarse fuera del recipiente secundario. Si se usa hielo seco debe haber un soporte interno que mantenga el recipiente secundario en la posición original, una vez que el hielo seco se haya derretido. El embalaje exterior debe permitir la liberación de dióxido de carbono. Cuando se utiliza nitrógeno líquido, hay requisitos adicionales que se describen en el DGR.
- viii) No es necesario que los paquetes que contengan especímenes de diagnóstico o clínicos tengan la cantidad neta consignada en el exterior del paquete. No obstante, cuando se utilice hielo seco como refrigerante, debe indicarse la cantidad neta del mismo.
- ix) Los recipientes primario y secundario se pondrán dentro de un embalaje de transporte con material de amortiguamiento.
- x) El embalaje debe resistir una prueba de caída desde 1,2 metros. Existen requisitos adicionales de resistencia de embalajes usados para los especímenes NU2900 y NU2814.
- xi) Al menos una superficie del envoltorio exterior debe tener una dimensión mínima de 100 mm x 100 mm.
- xii) Para el transporte, debe mostrarse la etiqueta **3373** en la superficie externa del envoltorio exterior con un fondo de color para contraste y debe ser perfectamente visible y legible. La anotación debe ser en forma de un cuadrado dispuesto en un ángulo de 45° (en forma de diamante), cuyos lados deben medir, al menos, 50 mm; el grosor de la línea debe ser de al menos 2 mm. y las letras y números deben tener 6 mm de alto. En la parte exterior del envoltorio adyacente a la marca en forma de diamante debe anotarse el nombre adecuado de envío "Especimen de diagnóstico", "Especimen clínico" o "Sustancia biológica categoría B" con letras de 6 mm de altura.

#### 4. Documentos de embarque

Todos los documentos de embarque, incluidos la licencia de importación y el formulario de envío deben ponerse en un sobre pegado en la parte exterior del embalaje de transporte. Los formularios y las etiquetas de mercancía peligrosas requeridas se cumplimentarán tal como se explica en el DGR y se ponen también en la parte exterior del embalaje.

### E. CONSERVACIÓN DE MUESTRAS EN ALMACENAMIENTOS PROLONGADOS

Puede resultar muy útil establecer una colección de muestras para futuros estudios. La colección puede incluir cultivos para la comparación con futuros aislados, muestras de tejido o de suero que pueden utilizarse para validación de nuevas pruebas, y una colección de tejidos fijados o bloques de parafina para futuros exámenes histológicos. Posiblemente la colección más útil es el almacenamiento de muestras de suero. Estas muestras pueden resultar útiles si se lleva a cabo una investigación retrospectiva para comparar el estado actual de la enfermedad con el de otras veces anteriores.

#### • Bancos de suero

Las muestras de suero pueden proporcionar información sobre los animales de los que se han tomado. Se pueden analizar diversos constituyentes de éstas, tales como inmunoglobulinas, elementos traza, toxinas, hormonas y enzimas. Si el número de muestras de suero recogido al azar de la población es suficiente, se pueden hacer comparaciones sobre la influencia del sexo, edad, raza y localización geográfica. Los resultados de esta comparación permiten identificar grupos de alto riesgo, se pueden establecer prioridades de vacunación y establecer patrones e índices de enfermedades (6).

Un banco de suero es una colección catalogada de sueros que se almacenan para conservar sus propiedades inmunológicas y otras bioquímicas. Las condiciones de catalogación y almacenamiento son fundamentales para que un banco de suero sea eficaz. Cada uno de los sueros se deberá documentar e identificar perfectamente. Las bases de datos deberían contener toda la información pertinente sobre el origen de la muestra y los resultados obtenidos de las pruebas. También se pueden incluir datos adicionales que pueden ser de interés, tales como las condiciones climáticas y la productividad del animal. Es fundamental la exactitud de los datos y estos deben obtenerse cuando se toman las muestras de sangre. El primer dato fundamental es la identificación completa del animal. La cantidad de detalles registrados dependerá de la pericia del operador, siendo más importante la exactitud que la cantidad de información. Debería evitarse la mezcla de sueros, pues, aunque reduce la cantidad de documentación y el espacio de almacenamiento, también reduce enormemente la utilidad del material. La recogida de muestras de sangre debe hacerse de la forma más aséptica posible, y la esterilidad debe mantenerse durante la separación del suero y otras manipulaciones. El catálogo del banco de suero debe organizarse bien, y mantenerse en una base de datos computarizada, con una adecuada copia de seguridad. Se ha sugerido y descrito con detalle una metodología (6).

Los sueros se pueden almacenar para un uso periódico o se pueden mantener almacenados a largo plazo para objetivos históricos, estas dos funciones deberán mantenerse separadas. Las condiciones de almacenamiento de los sueros deberán minimizar la pérdida de propiedades inmunológicas y de otras propiedades bioquímicas. Hay tres métodos de almacenamiento: ultracongelación, almacenamiento en seco sobre discos de papel a temperatura ambiente y liofilización (congelación-deseccación). Deberá mantenerse una temperatura central por debajo de  $-60^{\circ}\text{C}$  para el almacenamiento de sueros a largo plazo mediante ultracongelación. Cuanto más baja sea la temperatura mejor, pero resulta más caro de mantener. El nitrógeno en fase líquida se encuentra a  $-196^{\circ}\text{C}$ , el nitrógeno en fase de gas se encuentra a  $-100^{\circ}\text{C}$  y un congelador de temperatura ultrabaja se mantendrá a  $-90^{\circ}\text{C}$ . Algunos bancos de suero se han mantenido a  $-20^{\circ}\text{C}$ , pero el suero puede deteriorarse y no ser apropiado para la detección de algunas propiedades, especialmente, si se almacena durante largos períodos de tiempo a esta temperatura. Los ultracongeladores deberían tener un sistema de aviso si la temperatura sube, debido a avería mecánica o a un fallo de energía. Es imprescindible un generador de emergencia junto con un espacio alternativo para el almacenamiento en frío por si hay que transferir los contenidos del congelador. El almacenamiento en disco de papel es un método simple y barato, pero sólo permite almacenar una pequeña cantidad de suero, y el suero eluido sólo es apropiado para un número limitado de pruebas. Los discos deberán mantenerse en un lugar fresco y seco. Puede que proporcionen resultados satisfactorios durante 5 años. En general, se considera la liofilización como el mejor método para almacenamiento de sueros a largo plazo. Si se optimizan las condiciones de ultracongelación, se reducirá la pérdida de características séricas. Para la liofilización se precisa un equipo caro y, además, hay que invertir mucho tiempo. Los viales liofilizados deben mantenerse a  $4^{\circ}\text{C}$ .

## REFERENCIAS

1. CAMERON A.R. & BALDOCK F.C. (1998). A new probability formula for surveys to substantiate freedom from disease. *Prev. Vet. Med.*, **34**, 1–17.
2. CANADIAN FOOD INSPECTION AGENCY, LABORATORY DIRECTORATE: ANIMAL HEALTH (2002). Manual of Common Procedures. Section: Specimen Collection and Submission; Specimen Packaging; Specimen Transportation. Canadian Food Inspection Agency, Ottawa, Canada, 61 pp.
3. CANNON R.M. & ROE R.T. (1982). Livestock Disease Surveys – A Field Manual for Veterinarians. Department of Primary Industry, Water and Environment, Australia, 15 pp.
4. COOK R., BARTON M., GLEESON L. & MAIN C. (1996). AUSVETPLAN Management Manual: Laboratory Preparedness. Animal Health Australia, Canberra, 56 pp. <http://www.aahc.com.au/ausvetplan/index.htm> .
5. INTERNATIONAL AIR TRANSPORT ASSOCIATION (2006). Dangerous Goods Regulations, 44th Edition. International Air Transport Association, 800 Place Victoria, P.O. Box 113, Montreal, Quebec H4Z 1M1, Canada, 824 pp.
6. MOORHOUSE P.D. & HUGH-JONES M.E. (1981). Serum banks. *Vet. Bull.*, **51**, 277–290.
7. NATIONAL VETERINARY SERVICES LABORATORIES (2006). Procedures for Collection and Submission of Specimens. National Veterinary Services Laboratories, Ames, Iowa, USA. <http://www.aphis.usda.gov/vs/nvsl/html/shipping.html>
8. STRAFUSS A.C. (1988). Necropsy: Procedures and Basic Diagnostic Methods for Practicing Veterinarians. Charles C. Thomas, Springfield, IL, USA, 244 pp.
9. VETERINARY LABORATORIES AGENCY (2003). Submission of Samples to the Veterinary Laboratories Agency. Veterinary Laboratories Agency, New Haw, Addlestone, Surrey, United Kingdom, 27 pp. [www.vla.gov.uk/servtovet/documents/Submissions.pdf](http://www.vla.gov.uk/servtovet/documents/Submissions.pdf)
10. VETERINARY SERVICES (OF THE UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE) (2005). Regulations for Classifying Infectious Substances and Diagnostic Specimens, USDA Veterinary Services Notice NO. 06-02
11. WORLD HEALTH ORGANIZATION (2005). Guidance on regulations for the transport of infectious substances. [http://www.who.int/csr/resources/publications/biosafety/WHO\\_CDS\\_CSR\\_LYO\\_2005\\_22/en/](http://www.who.int/csr/resources/publications/biosafety/WHO_CDS_CSR_LYO_2005_22/en/)
12. WORLD ORGANISATION FOR ANIMAL HEALTH (OIE: OFFICE INTERNATIONAL DES EPIZOOTIES) (2006). Terrestrial Animal Health Code. OIE, Paris, France, [www.oie.int](http://www.oie.int)

\*

\* \*