

IBP/UCLA PROTOCOLO DE MUESTREO CLOACAL Y DE PLUMAS

El Instituto de Poblaciones de Aves (IBP) esta colaborando con el Centro de Investigación Tropical de la Universidad de California, en Los Angeles (UCLA) para reunir muestras de influenza aviar con el fin de identificar rutas de transmisión viral en aves migratorias terrestres norteamericanas, con el objetivo principal crear vacunas contra el tipo de influenza A. Nuestro objetivo es el de facilitar la colección de muestras vírales por medio del muestreo cloacal de aves capturadas en las estaciones MAPS (Monitoreo de Productividad y Sobrevivencia de Aves) Sobrevivencia Invernal) durante el verano, y en estaciones MoSI (Monitoreo de Sobrevivencia Invernal) durante los inviernos de 2006-2009. IBP esta tambien trabajando con la Red de Monitoreo de Aves Migratorias de las Américas (LaMMNA) para seguir incorporando muestras cloacales de otros esfuerzos de investigacion.

Nuestra meta para el 2007-08 es de obtener la mayoría de muestras virales posible de las estaciones MoSI que se han unido al IBP en este proyecto. Durante esta temporada, nosotros sólo estaremos muestreando especies que migran entre el Neártico y el Neotropico (llamadas desde ahora “migratorias”) las cuales son sujeto a los procedimientos de anillamiento con anillos proporcionados por el Laboratorio de Anillamiento de Aves de los U.S. (BBL por sus siglas en ingles) o por la oficina de Anillamiento de Aves del Servicio de Vida Silvestre del Canada (CWS). Esperamos que los operarios de las estaciones MoSI puedan muestrear tantas aves como sean posible. Para coleccionar información sobre la conectividad entre areas de reproduccion y de invernación (y por hende potenciales rutas de dispersion del virus de influenza aviar) pedimos que se colecten plumas para los análisis de ADN así como de isótopos de todos los individuos de los cuales se tomaron muestras cloacales. Este documento proporciona información para la estrategia de muestreo y los detalles sobre las técnicas para la coleccion de muestras cloacales y la extraccion de plumas de IBP que seran utilizados durante la temporada de muestreo del 2008-09 de MoSI.

Equipos de muestreo

A todos los participantes en este proyecto se les proporcionara con equipos de muestreo que constan de isopos de algodón los cuales serán utilizados para tomar las muestras cloacales de las aves capturadas. Además, el equipo consta de pequeños tubos de muestra cuyos números dependerán de la frecuencia de captura de cada estación. Estos equipos serán enviados desde UCLA a cada estación de muestreo. Cada equipo contendrá: ·

- Equipo de seguridad (limpiador antiséptico para piel, guantes, gafas de seguridad, y máscaras)
- Paquetes individuales de isopos de algodón de 1 mm marca Dacron
- Tubos de plástico con código de barras conteniendo 1 ml de etanol
- Un par de alicates para cortar el alambre del isopo
- Un marcador de punta fina
- Un cilindro de rollo cinematográfico de 35 mm (para colocar la tapa del frasco plástico mientras el isopo de algodón es colocado en el frasco)
- Sobres de papel etiquetados para la colección de plumas

- Hojas de recolección de datos para llenar con la información obtenida de las muestras cloacales
- Fundas-bolsas extra de plástico para empacar frascos para el envío del regreso a UCLA
- Un cartón para el envío de los frascos con las muestras y de los sobre con plumas junto con un formulario prepago de envío

Los protocolos de muestreo y los formularios de seguridad también estarán disponibles en el sitio web del IBP en www.birdpop.org/aimaps.htm. Los equipos de muestro cloacal serán enviados por UCLA a todos los operarios de las estaciones que participen en el proyecto. El número de frascos y de isopos de cada equipo enviado (entre 50 y 300) dependerá del número de capturas de aves migratorias de cada estación de años anteriores.

Para su seguridad y protección

Hasta la fecha, ningún ser humano ha sido infectado con el virus de la gripe aviar por medio del contacto con un ave silvestre viva. Así mismo la variante H5N1, sumamente patógena, no ha sido registrada en el hemisferio occidental. Sin embargo, es importante tomar en cuenta que muchas de las aves que usted manipulara y anillara (y ha manejado y ha anillado en años pasados) puedan llevar otras formas de la influenza aviar. Por lo cual las precauciones básicas de higiene tienen que ser aplicadas. Estas incluyen la desinfección de manos antes del contacto con la boca y antes de tocar cualquier alimento después de haber manipulado las aves.

Para proteger a los operarios MoSI, nosotros requerimos que todas las personas que manipulan aves, apliquen el limpiador antiséptico de piel en las manos al manipular las aves después de ser capturadas en la red y durante la toma de datos en la estación. Los operarios deberán aplicar una pequeña cantidad del limpiador antiséptico de la piel en las manos y dejar secar (esto sólo toma unos pocos segundos). Recuerde de cerrar el frasco del limpiador para evitar la evaporación del mismo. Los operarios no deben frotar sus ojos, comer, beber, ni fumar durante el proceso de anillamiento y todo alimento deberá estar localizado lejos del área de trabajo. El operario podrá beber agua solamente después de haberse limpiado las manos con el limpiador o después de haberse lavado las manos con agua y con jabón. Los guantes y gafas de seguridad proporcionados tendrán que ser utilizados por el operario que se encuentre tomando la muestra cloacal para evitar el contacto de guanidina con la piel. más cómodolos. La máscara tendrá que ser utilizada sólo en áreas donde el HPAI-H5N1 ha sido encontrado (hasta la fecha de este protocolo no se ha encontrado en ninguna parte del hemisferio occidental).

Que aves hay que muestrear

Como mencionado anteriormente, nuestra meta es el de muestrear la mayor cantidad de aves migratorias como sea posible. Estas son las que se encuentran catalogadas en la Guía de Aves de Norteamérica y para las cuales se utilizan los anillos del BBL y CWS. Solicitamos que usted **no** muestree colibrís (demasiado pequeños) o ningún aves sin anillos. Debido a la existencia de un periodo limitado de proliferación viral en la cloaca, aves recapturadas, incluyendo las que hayan sido capturadas durante el mismo año pero en pulsos (meses) diferentes, podrán ser muestreadas nuevamente para incrementar la probabilidad de detección de virus o permitir la detección de nuevos variantes de influenza en el mismo individuo. No existe la necesidad de muestrear nuevamente a un individuo recapturado durante el mismo pulso de anillamiento. Recomendamos suspender temporalmente la tomar muestras cloacales y plumas en momentos de

saturación de aves en la estación de procesamiento de datos para así agilizar el anillamiento y minimizar el tiempo de manipulación de las aves en cada ronda de captura.

Protocolo de muestreo recomendado

Para evitar la contaminación entre muestras, es imprescindible mantener tener las bolsas de captura lo más limpias como sea posible. Idealmente, cada bolsa debe ser utilizada sólo una vez (conteniendo una sola ave para el muestreo cloacal) durante un día entero de anillamiento MoSI, y deben ser lavadas (utilizando una taza de cloro por cada carga de lavado) y secarlas entre los días de muestreo. Estamos conscientes que algunas estaciones capturan muchas aves en un solo día o pulso de anillamiento por lo que dificulta cumplir con la situación (ideal) presentada. Si una bolsa tiene que ser reusada antes de ser lavada y secada, esta deberá ser limpiada sacudiéndola fuertemente, darle la vuelta (interior hacia exterior), sacudirla nuevamente otra vez para ser utilizada. Si usted va a sacudir sosteniendo la bolsa, por favor asegúrese de llevar puestas las gafas de seguridad y la máscara y hágalo lejos de la estación de toma de datos y de otras personas.

Recomendamos que todo el proceso de anillamiento, procesamiento de datos, incluyendo el pesado y la colección de plumas de la cola sea realizado antes de la colección de la muestra cloacal. De esta manera, el ave podrá ser liberada inmediatamente después de la muestra cloacal.

El anillamiento completo, procesamiento de datos, toma de muestra cloacal deberá ser realizado por una sola persona y es recomendable contar con una otra persona que asista con la toma de datos y llenado de las hojas de datos. Si dos operarios trabajan en conjunto, se sugiere que una persona complete el anillamiento, procesamiento, y la toma de datos y luego entregue el ave al segundo operario el cual tomará la muestra cloacal con el isopo. Alternativamente, si muchas aves son capturadas en una red de una vez, puede ser ventajoso para cada operario el procesar completamente cada ave desde el anillamiento hasta la toma de muestra cloacal.

Protocolo de colección de plumas

Cuando las plumas de la cola son retiradas, una pequeña cantidad de células de la piel se queda conectado al cañón de la pluma. Estas células son una fuente valiosa de ADN que pueden ser utilizadas para determinar la población del origen del ave. Además, una porción de la pluma puede ser utilizada para el estudio de isótopos fijos, que puede proporcionar información importante sobre la ubicación (por lo menos latitud) donde la pluma fue crecida. Investigaciones en UCLA y en otros lugares utilizan estos resultados de ADN y de isótopos fijos para analizar los patrones de conectividad migratoria en aves detectando los sitios de reproducción e invernación de dichas poblaciones.

Recomendamos que dos plumas de cola sean retiradas de cada ave durante el proceso que muestreo, antes de tomar la muestra cloacal. No hay necesidad de coleccionar plumas más de una vez durante la misma temporada, incluso si el individuo haya sido probado para IA más de una vez durante las capturas dentro de la temporada (ver arriba). También, aunque esperamos obtener tanto muestras de AI como muestras de plumas de todos los individuos capturados, la colección de solo una de estas muestras proporcionará datos valiosos.

Arranque la pluma exterior de la cola (rectrix) de un lado de la cola de pájaro, y también la pluma central de la cola del otro lado de la cola. Para arrancar las plumas, sostengalas firmemente cerca a la base de la cola y tire suavemente. No toque el canon ya que el ADN es extraído de las células de la piel que se encuentran en esta parte. Coloque las plumas de cada ave en uno de los sobres etiquetados proporcionados por UCLA. Llene la información solicitada en el sobre: el nombre de la especie (código de 6 letras es suficiente), el número del anillo, la fecha (por favor usar letras para el mes en vez de números), código de ubicación, código de estación, y, si es posible, la edad, el sexo, y la condición reproductiva (determinado por el parche de cría-incubación o protuberancia cloacal). Por favor tome nota si nota que la rectrix central es de una generación diferente que la rectrix exterior (por ejemplo, alterna vs. pluma básica).

Protocolo detallado del uso del isopo para la colecta de muestras cloacal

Las células virales se encuentran localizadas en el tracto gastrointestinal en aves y pueden estar presente en las paredes de la cloaca y en los excrementos. El muestro cloacal correcto proporciona una muestra de las células de la superficie interior de la pared de cloacal, y es tomado metiendo la parte del isopo con el algodón en la cloaca girando lentamente para colectar estas células.

Para obtener una muestra cloacal, siga los pasos siguientes:

- 1) Sostenga el ave con el puño y saque el isopo Dacrón de su paquete, asegúrese que nada toque la punta del isopo en el proceso.
- 2) Utilice los dedos para asegurar las patas y cola del ave.
- 3) Sople ligeramente en el vientre del ave para abrir las plumas exponiendo la cloaca. El uso de una lupa óptica podría facilitar este paso.
- 4) Inserte lentamente y suavemente la cabeza de algodón del isopo Dacrón en la cavidad cloacal del ave. Recuerde que estas cavidades suelen ser muy angostas en aves pequeñas; así que la cabeza del isopo no debe ser metida muy profundamente en la cloaca. Una vez que el algodón este metido, cambie levemente el ángulo del isopo hasta que este quede alineado con el cuerpo del ave y la cabeza del isopo más hacia la cabeza del ave. Esto ayudará a prevenir posibles daños a las membranas más suaves de la pared de la cloaca.
- 5) Gire suavemente el isopo de 2-5 veces para exfoliar (reunir) las células de la pared cloacal.
- 6) Quite el isopo completamente de la cavidad cloacal y libere el ave.

Para colocar el isopo en el frasco o tubo plástico y almacenar los frascos utilizados, siga los pasos siguientes:

- 1) Con el isopo en su mano, quite la tapa del frasco y colóquela dentro del tubo vacío y limpio de rollo de fotografías que fue proporcionado. Asegúrese en todo momento que la cabeza del isopo no entre en contacto con nada.

- 2) Coloque primero la cabeza del isopo en el frasco conteniendo el etanol y gire rápidamente pero brevemente el algodón 2-5 veces en el frasco para suspender el material viral en el etanol.
- 3) Retire el isopo parcialmente fuera del etanol y utilice el alicate para cortar el alambre de aluminio cerca de la cabeza de algodón del isopo Dacrón. Esto permitirá que la cabeza de algodón se quede en el frasco mientras usted enrosca la tapa en el frasco y sella el contenido. Apriete la tapa tanto como sea posible para prevenir la evaporación de la guanidina durante el almacenamiento.
- 4) Utilice el marcador de punta fina para marcar la tapa del frasco para indicar que ha sido utilizada, y para registrar el código de seis letras de la especie y el número del anillo en el frasco.
- 5) Llene la hoja de datos anotando el número de anillo, el número de frasco de muestra (código de barras), código de seis letras de la especie, la edad, el sexo, la fecha, la estación, y algún comentario pertinente. No se olvide de anotar el código de la ubicación en la parte superior de la hoja de datos.
- 6) Coloque el frasco utilizado en una bolsa plástica con los otros frascos utilizados y almacénelos en un lugar a la sombra y fresco hasta el fin de la sesión de anillamiento diario.
- 7) Al terminar el día de anillamiento, almacene la bolsa plástica conteniendo todos frascos utilizados en un lugar fresco y seco hasta que todo los tubos de cada caja sean utilizados (no necesitan ser refrigerados).

Envío completo de las muestras a UCLA

Finalmente, tan pronto como la temporada de anillamiento termine, coloque todos los frascos plásticos utilizados dentro de su funda plástica y junto con las muestras de plumas y las hojas de datos del muestreo cloacal, coloquelos en la caja de envío que fue proporcionada por UCLA. Utilice el formulario de envío prepagado para enviar la caja a UCLA. Nos contactaremos con ustedes antes del mes de marzo para informarles sobre los permisos para el envío de las muestras a UCLA.

¡Muchas gracias por su participación en este proyecto tan importante!

Protocolo ilustrado del muestreo cloacal



El ave es sostenida por el operario y esta lista para la colección de la muestra cloacal (izquierda). Observe que una pata esta siendo sostenida entre el pulgar y el índice y la otra pata entre el índice y el dedo medio, mientras el dedo meñique de la mano conteniendo el isopo mantiene la base de la cola separada del cuerpo. Esto le permitira localizar la cloaca y colocar el isopo correctamente (en este caso la cabeza de algodón de 1 mm). Note el ángulo del isopo en relacion al ave (ver texto).

La cloaca es muy evidente como en esta fotografia de una hembra (derecha). Sin embargo, la cloaca no estara claramente visible hasta que usted sopla suavemente en el área de abertura para mover las plumas del abdomen hacia afuera (abajo).



Una vez que la cloaca este visible, como se ve abajo, meta el algodón en la abertura, incline el isopo levemente hacia atras (ver arriba), y suavemente y gire el algodón de 2-5 veces para colectar el materia de las paredes de la cloaca. Continúe soplando suavemente en el abdomen para que la cloaca quede visible durante el procedimiento.



Después de sacar el isopo, colóquelo en el frasco que contiene el etanol y mezcle de 2-5 veces moviendo el isopo dentro del tubo. Corte el alambre y cierre el tubo girando la tapa fuertemente. Escriba el código de la especie y el número del anillo en el frasco. Registre el número del código de barras, junto con el número del anillo, código de la especie, la edad, el sexo, la fecha, la estación, y cualquier comentario en la hoja de datos de muestreo cloacal.