

PROTOCOLO DE NECROPSIA Y ANALISIS DE ENFERMEDADES EN ORCAS

Actualizado 15 de Mayo, 2014

**Stephen A. Raverty, DVM, MSc, PhD, Diplomado ACVP^{1,2}, Joseph K. Gaydos, VMD, PhD³ y
Judy A. St. Leger, DVM, Diplomado ACVP⁴**

¹Animal Health Center, Ministry of Agriculture, Abbotsford, British Columbia, Canada

²Marine Mammal Research Unit, University of British Columbia, Vancouver, B.C. Canada

³SeaDoc Society, UC Davis Wildlife Health Center — Orcas Island Office, Eastsound, Washington State, USA

⁴SeaWorld Parks and Entertainment, San Diego, California, USA

NOTA: Si usted se dirige al campo a realizar una necropsia de una orca, por favor imprima los Apéndices XXII-XXVII (páginas 75–94) y llévelos consigo



Orca viva varada en Hawaii, Foto cortesía de Jessica Aschettino, NOAA/NMFS/PIRO Permiso #932-1489-09

**Si los tejidos no son recolectados al momento de la necropsia,
se pierde la oportunidad de muestrear al animal
de manera apropiada.**

Este protocolo es una guía para realizar dicho muestreo.

Tabla de Contenidos

ALERTA DE PATÓGENOS SIGNIFICATIVOS:	4
BRUCELLA EN CETÁCEOS:	4
MORBILLIVIRUS DE CETÁCEO:	5
INFLUENZA:	5
SALMONELLA:	6
APICOMPLEXA:	6
PATÓGENOS REPORTADOS ANTERIORMENTE:	6
INTRODUCCIÓN:	7
CHECKLIST DE EQUIPAMIENTO:	8
RECOMENDACIONES SOBRE LOGÍSTICA Y NECROPSIA	10
SEGURIDAD	10
ROLES DEL EQUIPO DE NECROPSIA ¡Error! Marcador no definido.	
EXAMEN EXTERNO Y MUESTREO PRE-DISECCIÓN	11
TABLA DE DESCOMPOSICIÓN	12
CONSIDERACIONES SOBRE LA TOMA DE IMÁGENES ¡Error! Marcador no definido.	
CONSIDERACIONES SOBRE PREPARACIÓN Y EXAMEN ÓSEO	14
AGRADECIMIENTOS	15
BIBLIOGRAFÍA CITADA:	15
PROTOCOLO PARA NECROPSIA DE ORCAS: CHECKLIST DETALLADO PARA MUESTREO DE TEJIDOS	19
APÉNDICE I: Prioridades de Muestreo Según la Condición de los Tejidos	26
MUESTRAS DE PRIORIDAD ALTA:	26
MUESTRAS DE PRIORIDAD INTERMEDIA:	27
MUESTRAS DE PRIORIDAD BAJA:	28
APÉNDICE II: Patógenos Reportados en Orcas	30
Tabla 1: Patógenos detectados en forma directa o por serología en orcas	30
Tabla 2: Endoparásitos identificados o sugeridos por serología en orcas	31
APÉNDICE III: Protocolo Para Necropsia En Una Hora	32
APÉNDICE IV: Listado de Investigadores Solicitando Muestras de Tejidos de Orcas ..	33
APÉNDICE IVB: Solicitud de Muestras <i>post mortem</i> de Mamíferos Marinos	39
APÉNDICE V: Consideraciones Sobre Permisos y Autoridades	40
APÉNDICE VI: Lista de Patógenos y Muestras de Tejidos Para Ensayos de Reacción en Cadena de la Polimerasa	41
APÉNDICE VII: Protocolo Para Muestreo de Grasa en Mamíferos Marinos	43
APÉNDICE VIII: Muestreo Para Análisis de Contaminantes	45
APÉNDICE IX: Muestreo Para Análisis de Biotoxinas	47
APÉNDICE X: Recursos en la Web Para Formularios de Envío de Muestras	49

APÉNDICE XI: Instrucciones y Consideraciones Para la Toma de Fotografías	50
APÉNDICE XII: Instrucciones Para la Toma de Imágenes Complementarias	51
APÉNDICE XIII: Consideraciones Sobre Derrames de Petróleo y Muestreo	52
APÉNDICE XIV: Consideraciones y Muestreo en Varamiento de Orcas Vivas	54
APÉNDICE XV: Protocolo de Extracción y Fijación de Oídos de Cetáceos	57
APÉNDICE XVI: Consideraciones Sobre Barotrauma y Protocolo de Muestreo de Burbujas de Gas	62
APÉNDICE XVII: Medición de Aleta Dorsal y Solicitud de Muestras	64
APÉNDICE XVIII: Archivo de Muestras de Tejidos	66
APÉNDICE XIX: Formulario de Descripción de Lesiones	67
APÉNDICE XX: Protocolo Para Varamiento de Orcas del Servicio de Pesquerías del NW de EEUU, NOAA	70
*Para Varamientos de Orcas en Otras Partes del Mundo.....	73
APÉNDICE XXI: Protocolo Para Detectar Signos de Interacción Humana en Orcas	74
APÉNDICE XXII: Examen Fetal y Manejo de Muestras	75
APÉNDICE XXIII: Análisis Morfométrico de Orcas Varadas.....	78
APÉNDICE XXIV: Formulario Para Registro de Datos de Patología Macroscópica.....	80
APÉNDICE XXV: Checklist - Tejidos a Muestrear en un Cadáver de Orca Código 2 o Código 3	89
APÉNDICE XXVI: Checklist - Tejidos a Muestrear en una Cadáver de Orca Código 4 ..	91
APÉNDICE XXVII: Checklist - Tejidos a Muestrear en una Cadáver de Orca Código 5.	93
Identificador de Fotografías:.....	94

ALERTA DE PATÓGENOS SIGNIFICATIVOS:

Los patógenos son significativos cuando causan daño a las personas o a los animales. El examen de animales muertos conlleva importantes consideraciones sobre seguridad. Determinados patógenos como *Brucella* sp., influenza, y arbovirus requieren de gran atención y cuidado. Asimismo, la detección rápida de agentes letales transmisibles que pudieran impactar sobre la salud de la población de orcas es crítica para las actividades de manejo. Los patógenos que requieren mayor consideración son *Brucella* spp., morbillivirus, influenza, *Salmonella* spp., y apicomplexa.

BRUCELLA EN CETÁCEOS:

Bacterias del género *Brucella* spp. que difieren de las especies reconocidas dentro del género han sido encontradas con creciente frecuencia en pinípedos y cetáceos en el Reino Unido, Nueva Zelandia, Estados Unidos y Canadá (Ross et al., 1996; Foster et al., 1996; Nielsen et al., 2001; Van Bresseem et al., 2001a). Anticuerpos de *Brucella* spp. han sido identificados en sangre cardíaca *post mortem* y en orcas capturadas vivas (A73) sin patología o enfermedad clínica aparente (Jepson et al., 1997; Raverty et al., 2004).

La infección por *Brucella* ha resultado en abortos y placentitis en delfines mulares (*Tursiops truncatus*) en cautiverio y abscesos de grasa y meningoencefalitis en delfines listados silvestres (Ewalt et al., 1994; Gonzalez et al., 2002). No hay lesiones macroscópicas específicas del género **Brucella**. Para determinar la posible contribución de estas bacterias a lesiones microscópicas y alteraciones de la función reproductora en orcas varadas, debe realizarse cultivo y aislamiento de *Brucella* así como análisis molecular como parte de la rutina de muestreo de todo animal varado. Las muestras de tejidos deben incluir niveles múltiples del tracto reproductor, el cerebro, pulmones, bazo, ganglios linfáticos y cualquier lesión macroscópica. Para asegurar una recuperación óptima de las bacterias, las muestras obtenidas de la necropsia deben ser remitidas a un laboratorio de referencia al día siguiente de la toma conservadas con hielo, o congeladas a -70° C (Tabla 2). Se debe considerar la realización de serología para *Brucella* aun cuando al momento no existen exámenes serológicos validados para orcas (Gall et al., 2000). Si la histopatología lo indica, el diagnóstico inmunohistoquímico con anticuerpos monoclonales o policlonales específicos de *Brucella* puede ser de utilidad para confirmar la enfermedad y evaluar el proceso infeccioso.

Alerta de Zoonosis: *Brucella* spp. de origen marino infectó a un trabajador de un laboratorio luego de haber sido expuesto a la bacteria en su trabajo (Brew et al., 1999). Asimismo, se han documentado dos casos de individuos sin exposición que contrajeron neurobrucelosis con formación de granuloma (Sohn et al., 2003). La virulencia de estas cepas para los humanos no se conoce actualmente y, por tal motivo, se deben tomar medidas apropiadas de seguridad al momento de realizar las necropsias. Estas precauciones deben incluir el uso de guantes, gafas de seguridad y una máscara o pantalla de protección facial cuando exista la posibilidad de la aerosolización de tejidos (como en el caso de estar utilizando una sierra alternante).

MORBILLIVIRUS DE CETÁCEO:

Los morbillivirus hallados en marsopas y delfines son antigénicamente y genéticamente similares por lo cual son considerados cepas de la misma especie viral, el morbillivirus de cetáceos (Kennedy, 1998). Este virus ha causado epizootias de gran magnitud en varias especies de odontocetos (Van Bresse et al., 1991; Duignan et al., 1995; Van Bresse et al., 2001b). La detección de anticuerpos en una orca subadulto muerta por neumonía bacteriana muestreada recientemente en el Noroeste del Océano Pacífico (A. Mironova, com. pers.) sugiere que las orcas han tenido exposición a morbillivirus. Si bien no se han detectado al momento anticuerpos o secuencias genéticas de morbillivirus en cetáceos varados en las zonas templadas del Noreste del Océano Pacífico, es probable que el virus sea endémico en múltiples cetáceos alrededor del mundo (Van Bresse et al., 2001b). Debido a la alta virulencia de este virus y su capacidad para generar mortalidad a gran escala en pequeñas poblaciones, es preciso descartar la presencia de morbillivirus durante la realización de necropsias de orcas. Se recomienda la vigilancia continua para detectar la presencia de anticuerpos de morbillivirus de cetáceos en suero *ante mortem* y en muestras de sangre cardíaca *post mortem* mediante el ensayo inmunoenzimático (iELISA) o por neutralización o aislamiento del virus.

El morbillivirus de cetáceos es pantrópico (infecta diversos tipos de células) y los hallazgos macroscópicos en necropsias incluyen ulceraciones en la piel, estomatitis, neumonía y signos de sepsis generalizada como edema de órganos internos y la acumulación de líquido serosanguinolento en cavidades pleurales y peritoneales (Lipscomb et al., 1994). Las grandes lesiones no son específicas del morbillivirus pero son una frecuente característica del mismo (Domingo et al., 2002). Lesiones microscópicas halladas en forma frecuente asociadas a morbillivirus tales como sincitios o inclusiones acidofílicas en el citoplasma y núcleo de células epiteliales pueden ser generalizadas, focalizadas o encontrarse oscurecidas por necrosis severas generadas por infecciones bacterianas o fúngicas oportunistas. El examen microscópico y análisis de laboratorio para la confirmación de infección por morbillivirus son esenciales. Los ensayos utilizados incluyen inmunohistoquímica, reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa reversa (RT-PCR), y aislamiento del virus mediante células Vero o células pulmonares de fetos bovinos (Domingo et al., 1990; Van Bresse et al., 1991; Barrett et al., 1993; Van Bresse et al., 1999; Saliki et al., 2002). Las secuelas potenciales de la infección por morbillivirus incluyen la infección por hongos o bacterias oportunistas así como toxoplasmosis (Lipscomb et al., 1994; Schulman y Lipscomb, 1999). Los morbillivirus no son patógenos de importancia para poblaciones humanas pero representan una amenaza significativa para la salud de las poblaciones de orcas.

INFLUENZA:

La detección del virus de influenza (H3N8) en focas varadas en el Noreste de Estados Unidos en el año 2011 ha renovado el interés y la preocupación por el riesgo de exposición e infección de otras especies marinas, animales terrestres, aves y humanos que pudieran entrar en contacto con animales portadores. Hasta la fecha, el examen histopatológico de orcas varadas en el Noreste del Pacífico no ha detectado lesiones consistentes con infección por influenza y no se han identificado estos virus en los casos testeados por medio de la reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa reversa. Sin embargo, un reporte reciente de Virus del Nilo

Occidental en un orca en exhibición (St. Leger et al., 2012) sugiere que estos cetáceos son susceptibles a una mayor diversidad de patógenos virales que lo que se creía anteriormente. La presencia de influenza en cetáceos presenta una preocupación a nivel de zoonosis y por lo tanto, se debe utilizar el equipo de protección personal adecuado (especialmente protección de las vías respiratorias) para reducir la posibilidad de infección.

SALMONELLA:

El examen *post mortem* de un neonato varado en la costa central de California y de una hembra adulta en Hawaii no revelaron evidencias macroscópicas de septicemia o infección bacteriana localizada. Sin embargo, el examen microscópico de los tejidos muestreados del neonato presentaron signos de inflamación multisistémica y del ombligo provocada por *Salmonella newport*. A su vez, se aisló *Salmonella muenchen* de la hembra adulta. La ausencia de infiltrado inflamatorio en los tejidos evaluados indica que se trataba de un portador asintomático. Existen más de 2.200 serotipos reconocidos de *Salmonella*. *Salmonella newport* es un patógeno emergente de creciente interés para la salud humana hallado frecuentemente en el ganado lechero. Es importante recordar que estas bacterias pueden generar infección en humanos en forma directa y son transportadas en ropa, calzado o equipamiento contaminando. Para minimizar la exposición el lavado de manos debe ser minucioso y todo el material utilizado para la realización de las necropsias debe desinfectarse.

APICOMPLEXA:

Con el advenimiento del análisis molecular y la secuenciación genética se ha incrementado notablemente nuestra habilidad para detectar una gran variedad de agentes causantes de enfermedades, incluyendo parásitos Apicomplexa. En animales marinos, estos incluyen *Toxoplasma gondii*, *Sarcocystis neurona*, *Sarcocystis* spp, *Neospora caninum* y *Neospora* spp (Miller, 2008; Colgrove et al., 2010; Gibson et al., 2011). Los protozoarios en este grupo son de creciente interés debido a su potencial transmisión de la tierra al mar (Miller et al., 2004, etc.). La reorganización sexual ha dado por resultado la emergencia de clones hipervirulentos. Si bien estos patógenos han estado implicados en forma esporádica en mortalidades costeras o en altamar de cetáceos, se han observado históricamente mortandades significativas en pinípedos y nutrias marinas. Estos parásitos se encuentran asociados con meningoencefalitis e infecciones intraplacentarias o placentitis. Infecciones individuales y duales por los parásitos *Toxoplasma gondii* y *Sarcocystis* spp. han sido detectadas en orcas; sin embargo no ha podido establecerse la contribución de dichos parásitos a los varamientos de los animales. Los esfuerzos para examinar las orcas varadas en busca de posible infección continúan y las pruebas genotípicas que se realizan forman parte de la rutina para determinar la fuente de exposición al patógeno.

PATOGENOS REPORTADOS ANTERIORMENTE:

Los reportes de patógenos en orcas silvestres y en cautiverio continúan creciendo en número. La implementación de necropsias exhaustivas y diagnósticos complementarios han contribuido de forma significativa a este incremento (Barbieri et al., 2013). El aumento de patógenos reconocidos y su potencial contribución a enfermedades clínicas mejora nuestro conocimiento

sobre factores de mortandad y morbilidad de las orcas. Para un listado de los patógenos infecciosos reportados por favor diríjase al Apéndice II (Tabla 1), y a la Tabla 2 para los endoparásitos identificados en orcas.

INTRODUCCIÓN:

El presente protocolo fue creado en 2005 con los siguientes objetivos:

1. Proveer lineamientos para la realización de necropsias y evaluación de enfermedades más detalladas y exhaustivas a fin de incrementar nuestro conocimiento sobre las enfermedades que afectan a las orcas (*Orcinus spp.*)
2. Estandarizar los métodos de evaluación para facilitar los estudios retrospectivos de historia natural y del desarrollo de enfermedades.

En los últimos siete años este protocolo ha facilitado e incrementado el examen de orcas en la región Noreste del Pacífico. Esperamos que esta versión revisada refleje el avance de los métodos de detección de enfermedades y aumente el número de necropsias estandarizadas llevadas a cabo en orcas para concientizar sobre la salud de las poblaciones animales y humanas.

Este proyecto ha sido esponsorado por la U.S. National Oceanic and Atmospheric Administration (NOAA Fisheries) en respuesta a la limitada información existente respecto de las enfermedades en poblaciones silvestres de orcas. La información obtenida es de crítica importancia para conocer el impacto de enfermedades en la recuperación de pequeñas poblaciones de orcas, tales como las orcas residentes del sur. Las estimaciones históricas de esta población eran de más de 200 orcas hasta mitad y fines del 1800, mientras que el censo más reciente indica que sólo quedan 80 individuos. Desde el comienzo de la foto identificación de orcas en 1974, la población ha sufrido períodos de crecimiento y declinación, incluyendo una reducción de un 17% (tasa media de caída 2,9%) entre 1996 y 2001, lo cual generó la petición y consecuente listado de dicha población en el Acta Federal de Especies Amenazadas de Estados Unidos (US Federal Endangered Species Act). La población creció a 90 individuos desde 2001 a septiembre de 2006. A partir de allí ha fluctuado, llegando a un total de 81 individuos en septiembre de 2013. El Plan de Recuperación de las Orcas Residentes del Sur (Recovery Plan for Southern Resident killer whales, NMFS 2008) recomienda el desarrollo de protocolos para responder a varamientos y la investigación de orcas muertas para informar acerca de su recolección, incluyendo la realización de necropsias a partir del protocolo de 2005. El presente protocolo actualizado contribuye a la implementación de estas acciones y ayudará en la recolección de información de gran importancia sobre la salud de las orcas y las amenazas a su población.

Una evaluación retrospectiva de los varamientos mostró que se reportan anualmente en el mundo un promedio de entre 7 y 8 muertes o varamientos costeros de orcas. Cada uno de estos sucesos representa una gran oportunidad para aprender acerca de la biología y estado sanitario de las poblaciones de dichos animales (Barbieri et al., 2013). Esperamos que el presente protocolo sea de utilidad a investigadores alrededor del mundo para incrementar la información obtenida de los exámenes *post mortem*.

Los objetivos de este protocolo revisado y estandarizado de necropsia y análisis de enfermedades

son:

- Facilitar la realización de exámenes *post mortem* de orcas en forma más detallada y sistemática
- Priorizar muestreos morfométricos y de tejidos cuando no sea posible realizar necropsias completas o en casos de autólisis avanzada
- Establecer patrones de base sobre morbilidad y mortalidad en orcas para facilitar la evaluación retrospectiva de diferencias temporales o geográficas en la salud de las orcas
- Determinar la contribución de la acumulación de contaminantes y metales pesados en la salud de las orcas
- Mejorar los reportes de interacción con humanos (trauma por golpes o heridas cortantes)
- Introducir métodos para investigar varamientos relacionados con la acción de sonares o exploración sísmica
- Desarrollar protocolos para la realización de exámenes en neonatos
- Aumentar la documentación fotográfica de anormalidades y lesiones macroscópicas
- Identificar recursos que brinden información acerca de factores climáticos y oceanográficos que contribuyan y faciliten la detección de factores ambientales asociados a los varamientos
- Proveer información de contactos y direcciones para el envío de muestras prioritarias a investigadores para la realización de los diagnósticos adecuados y contribuir a las investigaciones de largo plazo
- Proveer una lista de protocolos y contactos para casos de un derrame catastrófico de petróleo u otro agente químico nocivo
- Priorizar los órganos más importantes para suministrar información adicional acerca de la historia natural y la biología de las poblaciones silvestres de orcas varadas mediante formularios de pedido de muestras

El siguiente protocolo revisado y ampliado sobre necropsia y muestreo se refiere específicamente a América del Norte. Sin embargo, las evaluaciones realizadas son universales y el protocolo puede ser implementado globalmente. Si los recursos se encuentran disponibles, se recomienda que todas las necropsias de orcas sigan el presente protocolo. Si sus instalaciones disponen de un agente de fijación de tejidos (formalina), un freezer y acceso a un laboratorio de microbiología, las evaluaciones detalladas a continuación podrán realizarse de forma satisfactoria.

CHECKLIST DE EQUIPAMIENTO:

Nota: Este checklist representa una situación ideal. Las evaluaciones *post mortem* pueden llevarse a cabo con menos equipo.

1. Planillas de evaluación morfométrica, formulario de necropsia macroscópica, formulario de interacción humana y checklist de recolección de muestras
2. Instrumentos estándar para necropsia: múltiples mangos para escalpelos/bisturí, fórceps/pinzas, tijeras, cuchillos (3-10), afilador para cuchillos y 1-3 tablas de corte, si fuera posible todo dentro de un envase seguro

3. Cuchillos para necropsia de grandes ballenas (flensing knives) (1-3) y ganchos con punta apropiada junto con herramientas para afilar dichos elementos, motosierras, hachas o sierras manuales de movimiento alternativo para cortar a través del cráneo, pecho y vértebras. Martillos, cinceles y sierras de mano.
4. Retractores y ganchos de diversas formas y tamaños. Retractores de autorretención con uno o dos brazos móviles montados sobre una barra móvil serán de gran utilidad.
5. Instrumentos estériles, antorchas de propano/quemador de gas y espátula para alta temperatura para la recolección de muestras estériles para cultivo
6. Alcohol para el flameado de instrumentos
7. Linternas y/o linternas para cabeza con baterías y focos de repuesto
8. Generador y reflectores con focos de repuesto y gasolina extra (para la realización de exámenes nocturnos)
9. Solución buffer al 10% de formalina neutra (1- 10L) en recipientes anti derrame de boca ancha con tapa a rosca. Bolsas plásticas con cremallera de boca ancha que resultarán útiles para colocar los recipientes con formalina junto con paños absorbentes para limitar y prevenir derrames
10. Solución buffer al 4% de glutaraldehído o un fijador bufferado adecuado para microscopía electrónica (10-20 mL en varios viales pequeños)
11. Solución salina saturada al 20% DMSO para análisis genético en un tubo con tapa a rosca (5mL)
12. RNA-later para el análisis molecular posterior de muestras (5-20 mL en varios viales pequeños)
13. Recipientes sellados con tapa (desde viales hasta recipientes para residuos) para la recolección de muestras, incluyendo una nevera, hielo seco y si fuera posible, nitrógeno líquido)
14. Hisopos para cultivo, recipientes estériles para orina, viales grandes de tapa a rosca y portaobjetos
15. Tubos para suero para recolección de fluidos tales como sangre y orina
16. Foil de aluminio, bolsas de Teflon y bolsas plásticas/Whirl-paks para congelar tejidos
17. Papel para tomar notas, etiquetas (como por ejemplo, etiquetas de lavandería con clips metálicos, marcadores a prueba de agua (Sharpie®) y lápices (para el rotulado de muestras que serán inmersas en fijador)
18. Cinta métrica de por lo menos 20 metros de largo y reglas plásticas pequeñas de 12-15 o 30 cm.
19. Grúa/aparejo o montacargas (para órganos pesados), balanzas en g/kg para pesaje de órganos y tejidos pequeños
20. Mamelucos, delantales, botas, guantes, gorras, máscaras y elementos de protección para la vista y la cara
21. Fuente de agua accesible con una manguera grande (para lavado y limpieza posterior)
22. Cámara digital, cámara GoPRo, baterías de repuesto y tarjetas de memoria adicionales
23. Etiquetas para identificar imágenes digitales
24. Kit de primeros auxilios
25. Varias lonas plásticas de 10 metros
26. Cadena o soga gruesa, por lo menos 20 metros
27. Cinta plástica y postes para acordonar y proteger el área de necropsia
28. Nevera o conservadora con hielo para contener muestras frescas
29. Bolsas para basura, detergente, desinfectante, cepillos y toallas de papel para limpieza

30. Cartelería: PELIGRO – PELIGRO PARA LA SALUD PÚBLICA – NO PASAR

RECOMENDACIONES SOBRE LOGÍSTICA Y NECROPSIA:

Desde el punto de vista logístico, el desarrollo previo de planes de contingencia facilitará las tareas de identificación, reporte, comunicación, recuperación, necropsia y disposición final de animales varados. Las personas claves a contactar en caso de un varamiento deben ser identificadas y la información de contacto provista para autoridades responsables, el coordinador regional de varamientos, acuarios locales y las redes de avistaje y varamiento de ballenas. A modo de ejemplo, la Red de Varamiento de Mamíferos Marinos de la Costa Oeste posee un protocolo para las comunicaciones iniciales y consideraciones sobre la respuesta a varamientos de orcas, incluyendo la identificación de la logística para el desarrollo de necropsias (Apéndice XX).

Si una orca se encuentra varada en un sitio inaccesible o remoto, o si es identificada flotando en altamar, se recomienda realizar los esfuerzos necesarios para recuperar el animal y relocalizarlo en un área más accesible. Si es posible se debe reflotar el animal. Esto se logra colocando una soga larga o cadena alrededor del pedúnculo o en la zona inmediata posterior a las aletas pectorales y luego remolcarla con una embarcación adecuada. Para limitar el arrastre, las dos aletas delanteras deben ser atadas juntas y mantenidas fuera del agua. Para facilitar el examen *post mortem*, el animal debe ser posicionado en decúbito lateral y colocado en la costa en el momento de marea alta. Debido a que los cambios de mareas pueden limitar la duración de la necropsia, debe considerarse el uso de equipo pesado (grúas, retroexcavadoras, poleas) y camionetas de plataforma plana para transportar al animal a instalaciones más seguras o a un laboratorio de diagnóstico. Las orcas pueden llegar a un peso de entre 1800-2700 kg y se deberán utilizar vehículos apropiados para trabajar con estos animales. Si el cadáver será movilizado utilizando una camioneta, el vehículo deberá pesarse en una balanza comercial antes y después de transportar al animal para obtener el peso del mismo.

Si el animal requiere de la práctica de eutanasia, se deberá consultar al coordinador regional de varamientos y se requiere la presencia de un veterinario de mamíferos marinos. Se deberán tomar y conservar adecuadamente muestras de sangre *ante mortem* para realizar en forma posterior análisis de patología clínica (hematología y química clínica), análisis hormonal, serología, archivo, función inmunológica y diagnósticos complementarios e investigación en general. En el caso de un animal muerto fresco (código 2), la sangre *post mortem* deberá tomarse de la aleta caudal, aleta dorsal, arteria axilar o el corazón. Incluso cuando se trate de animales en estado avanzado de descomposición, se deberán realizar esfuerzos para recuperar tejidos para examen histopatológico, contaminantes, evaluación genética y estudios moleculares. Los restos esqueléticos de animales en estado de descomposición severa (código 5) también pueden ser de gran utilidad para los estudios sobre la historia natural de las orcas.

SEGURIDAD

La seguridad de la población y de las personas involucradas en el examen *post mortem* debe ser una prioridad. En toda necropsia de campo, existe un cierto riesgo de exposición del personal a

patógenos zoonóticos así como la interferencia inapropiada de personas ajenas a la investigación. Se recomienda el uso de mascarillas, protección para la vista y guantes. En áreas con gran afluencia de público, el acceso debe ser restringido mediante el uso de postes, cinta o sogas y puede ser necesario requerir la presencia de personal policial o funcionarios del sector pesquero.

ROLES DEL EQUIPO DE NECROPSIA

Para facilitar las tareas *post mortem*, los miembros del equipo deben ser identificados y las tareas asignadas antes de iniciar la necropsia. Un patólogo líder deberá ser designado, así como personas para el registro de datos, procesamiento de muestras (Apéndice IV), rotulado y registro de material diagnóstico (Apéndice I), documentación de lesiones y observaciones mediante la toma de fotografías, actuación como nexo con la prensa o desarrollo de otras tareas de acuerdo con las necesidades que surjan. Las mediciones apropiadas (Apéndice XXIII) deberán ser registradas por una persona designada para tal fin, que también deberá fotografiar la aleta dorsal, la montura y cualquier otra característica que permita identificar al individuo previo al inicio de la necropsia (Apéndice XXIV). Una cámara de fotos digital o una GoPro® deberán utilizarse para registrar los detalles del examen *post mortem*.

Se recomienda considerar la creación de dos equipos de trabajo para incrementar la recolección de tejidos y datos. Un equipo podrá recabar información morfométrica mientras que el otro toma fotos y documenta lesiones externas. En caso de contar con dos patólogos líder se pueden dividir las tareas de forma que uno comience por la cabeza y el otro por el abdomen hasta que se encuentren en el centro del animal.

Se recomienda considerar la organización de una sola estación de muestreo cercana al sector de necropsia. TODOS los tejidos recolectados deberán enviarse a la mesa de muestreo para la toma de submuestras. Los líderes del equipo de muestreo y recolección de datos deben encontrarse en dicha mesa de forma de asegurar el cumplimiento del protocolo. De este modo, por ejemplo, un solo bloque de hígado se tomará del cadáver y será entregado a la mesa de muestreo para la toma de submuestras y datos. Los tubos para toma de muestras (generalmente fluidos) deben llenarse en el cadáver antes de extirpar los órganos.

EXAMEN EXTERNO Y MUESTREO PRE-DISECCIÓN

En el caso de varamiento de animales vivos, las muestras *ante mortem* deben recolectarse y conservarse de forma apropiada para realizar luego los exámenes de patología clínica (hematología y química clínica), análisis hormonal, serología, archivo, función inmunológica, diagnósticos complementarios e investigación. Cuando el animal ha muerto en forma reciente, las muestras de sangre *post mortem* pueden tomarse de las aletas de la cola, aletas dorsales, arteria axilar o del corazón. Incluso en animales con avanzado estado de descomposición se deben hacer esfuerzos para tomar muestras de tejidos para realizar exámenes histopatológicos, detectar contaminantes, realizar pruebas genéticas y parasitología, así como estudios moleculares. Incluso restos esqueléticos de animales con estado de descomposición severo pueden resultar de importancia para los estudios de la historia natural de las orcas.

Previo a la realización del corte del animal, se debe realizar el examen externo y la documentación fotográfica de los ojos, boca, espiráculo, piel, glándulas mamarias, orificios genitales y ano. Tanto la aleta dorsal como el área alrededor de la misma deben examinarse para verificar la presencia o indicios de un localizador satelital LIMPET (Andrews et al. 2009). Se debe registrar cualquier signo de interacción humana (Apéndice XXI). Una vez finalizado el examen externo, realizada la toma de muestras de tejidos (hisopados, citología y tejidos) y documentadas las lesiones (por medio de fotografía y descripción) se puede proceder con la disección del animal.

TABLA DE GRADOS DE DESCOMPOSICIÓN:

Código 1	Varamiento vivo	Evidente
Código 2	Muerte reciente	Piel firme, órganos frescos
Código 3	Descomposición moderada	Cuerpo hinchado, piel deteriorada, signos de ataque por carroñeros, órganos rojos y blandos pero todavía discernibles
Código 4	Descomposición avanzada	órganos de difícil identificación, desprendimiento de la piel, frecuentemente tracto gastro-intestinal y órganos reproductores hinchados y protruidos
Código 5	Descomposición severa	Restos óseos con porciones residuales de tejidos blandos

El examen *post mortem* dependerá de la posición del animal, su accesibilidad, lesiones y otros factores. Si existiera la necesidad de realización de necropsia cosmética para preservar la integridad del esqueleto, este procedimiento no debe comprometer o impedir la toma apropiada de muestras de tejidos.

CONSIDERACIONES SOBRE LA TOMA DE IMÁGENES

Previo al comienzo de la disección deberá realizarse la toma de imágenes tales como radiografías, tomografía computada (TC) y resonancia magnética (RM), (Apéndice XII). Generalmente es posible tomar imágenes del cuerpo completo en aquellos animales dentro del código 2, con un peso inferior a los 225 kg. En aquellos individuos con pesos de hasta 1000 kg se podrán tomar imágenes en forma parcial (cabeza, columna vertebral, aletas). La descomposición conlleva producción de gas acompañada de putrefacción bacteriana, sin embargo, incluso en aquellos cadáveres con un avanzado estado de descomposición se pueden tomar imágenes por TC para evaluar la condición del esqueleto y documentar cambios complejos a nivel óseo. Las imágenes tomadas por TC permiten detectar posibles fracturas óseas, barotrauma y balas. Si se sospecha de heridas ocasionadas por balas, la toma de imágenes por RM está contraindicada. Se recomienda la consulta con clínicas veterinarias especialistas en radiología u hospitales en forma previa a la toma de imágenes.

Si el animal fuera demasiado grande para tomar imágenes en forma estándar, se podrá remover la cabeza luego de la evaluación morfométrica y el examen externo. La cabeza puede ser trasladada rápidamente a algún centro local para la toma de imágenes. NOTA: la cabeza solo debe

congelarse una vez que se han tomado las muestras de cerebro y ojos.

DISECCIÓN

Con el animal en posición decúbito lateral (recostado sobre su lateral), se realiza una incisión curvilínea atravesando la grasa subcutánea desde el límite del ano con la aleta caudal, a lo largo de la zona dorsolateral del abdomen y la cavidad torácica, finalizando a nivel del ramus mandibular en el límite del rostro. La realización de cortes perpendiculares desde la región dorsal al centro del abdomen facilitará la remoción de la piel y la grasa para lograr la exposición de los tejidos subyacentes. La piel y grasa de la zona lateral podrán separarse de la musculatura en forma conjunta mediante la utilización de separadores o dividida en porciones de 0,5-1,0 m y removida. Todos los tejidos extraídos deberán separarse de la zona de disección y colocarse sobre una lona plástica para facilitar la limpieza y limitar la contaminación ambiental. Los tejidos necesarios para diagnóstico e investigación se encuentran listados en los Apéndices I y II.

La incisión en la musculatura abdominal puede realizarse a lo largo del arco costocondral y su límite con la cavidad abdominal, para luego apartarse lateral y ventralmente de forma de exponer las vísceras. Se debe examinar el diafragma y realizar una incisión para desinflarlo y prevenir neumotórax si se encuentra intacto. Si se precisa realizar un examen *post mortem* cosmético, las costillas podrán desprenderse a nivel de la articulación costoesternal o, en forma alternativa, se podrá utilizar una sierra manual (serrucho o motosierra) para remover la pared torácica. Es de suma importancia la utilización de gafas protectoras y escudo facial durante la realización de estas operaciones. La lengua puede retirarse mediante incisión longitudinal a través de la grasa y musculatura ósea del centro de la mandíbula y luego apartarse ventralmente. En caso de ser posible, los pulmones, corazón, laringe, tráquea, esófago y lengua deberán ser removidos a una lona para realizar una evaluación minuciosa de los mismos. Cuando se trate de animales de gran tamaño, puede ser necesario realizar la disección de las vísceras torácicas *in situ*. La cabeza puede separarse por medio de la disección de la articulación atlanto-occipital y la piel que recubre la zona dorsolateral de la nuca y el cráneo podrá ser removida. Este paso facilitará la remoción de la región dorsal del cráneo mediante la utilización de una motosierra o sierra de movimiento alternativo exponiendo el cerebro. Es importante evaluar la columna vertebral completa para observar posibles fracturas o subluxaciones asociadas a golpes con embarcaciones u otras lesiones. Es preciso tomar una muestra representativa de médula espinal de las regiones cervical, torácica media, toracolumbar y lumbar.

Dada la importancia que poseen los órganos reproductores para la evaluación de enfermedades y el estatus reproductivo de la especie, es necesario recuperar y separar de forma completa el tracto reproductor para su evaluación. Del mismo modo que para los demás sistemas de órganos, las características físicas y el estado de descomposición del animal determinarán el mejor plan de muestreo.

El tallo mesentérico debe ser identificado a fin de evaluarlo para observar lesiones y luego seccionado para facilitar su remoción y evaluación de las vísceras abdominales. Las vísceras deberán colocarse en una lona separada de aquella utilizada para los contenidos del tórax a fin de evitar la contaminación cruzada. El intestino en su totalidad debe ser separado del tejido

mesentérico y abierto para su inspección visual mediante la realización de una incisión a lo largo del borde mesentérico. El estómago debe ser abierto mediante incisión a lo largo de su curvatura mayor y el contenido gástrico debe recuperarse en un envase apropiado rotulado. Las muestras deberán separarse para la realización de los estudios complementarios (Apéndice I). Las restantes vísceras internas deberán ser evaluadas mediante los métodos de rutina o protocolos de diagnóstico convencionales y las muestras deberán tomarse y rotularse de forma apropiada.

En aquellos casos donde haya sospechas de varamientos relacionados con la acción de sonares, se deberán tomar las previsiones necesarias para realizar una evaluación por TC de la cabeza entera así como de los oídos y una evaluación minuciosa de la laringe para detectar evidencias de hemorragias en la submucosa. Si la TC no se realiza en forma previa a la necropsia, la cabeza y oídos pueden recolectarse para su escaneo posterior. Los oídos también pueden ser separados y fijados para análisis posterior (Apéndice XV). Las muestras de tejido adiposo peribullar deben conservarse en una solución buffer de formalina neutra al 10% para su evaluación histopatológica. Nota: La descomposición código 3 puede producir burbujas de gas en forma intravascular y parenquimal. Estas burbujas se distinguen de aquellas generadas por trauma acústico evaluando el estado de los tejidos y las lesiones asociadas tales como hemorragias pulmonares y mediante el análisis de la grasa peribullar, así como la presencia de daño a los huesos del oído. El Apéndice XVI provee una guía para el muestreo de burbujas de gas.

CONSIDERACIONES SOBRE PREPARACIÓN Y EXAMEN ÓSEO

Las evaluaciones *post mortem* involucran tanto los tejidos blandos como los duros. El examen óseo para la detección de malformaciones, cambios degenerativos, fracturas, inflamación y masas anómalas resulta crítico para conocer de forma integral el estado de salud del individuo. El examen óseo se realiza comúnmente por medio del diagnóstico por imágenes (radiografías y TC) y a través de un examen grueso por exposición de los huesos. Debido al gran tamaño de las orcas y la dificultad que presenta la remoción de los tejidos, una evaluación minuciosa requiere de la maceración de los tejidos o la remoción de los mismos por medio de insectos necrófagos o descomposición por entierro. Este paso suele ser fundamental para permitir la evaluación del esqueleto y obtener un diagnóstico claro.

Las fisuras y fracturas óseas pueden ocurrir en forma *ante* o *post mortem*. Por este motivo, la presencia o ausencia de hemorragias, cambios reactivos a lo largo de las márgenes de los huesos o daños a los músculos vecinos a fracturas deben notarse en forma cuidadosa. Los golpes contra embarcaciones pueden ocurrir *post mortem* así como también las raspaduras en los huesos pueden ser ocasionadas por trauma directo o por exposición de los huesos en forma *post mortem* a rocas o fricción con la arena. Los hallazgos complementarios serán de utilidad para determinar el origen de las lesiones y su relevancia. Por último, el patrón de una fractura y la morfología de sus bordes, como por ejemplo la presencia de coágulos de sangre, contribuirán de forma sustancial al diagnóstico de lesiones *ante mortem*.

Los esqueletos limpios son de gran valor para los museos e instituciones educativas, por lo cual se solicita que una vez completo el examen, se tome contacto con Dr. Brad Hanson o el Dr. John Ford (Apéndice IIB) para su preservación a largo plazo.

APÉNDICES, CONTACTOS, AUTORIZACIONES Y PERMISOS

En el presente protocolo se incluye una lista del equipo necesario (Página 10) así como listas de los tejidos para diagnóstico e investigación en los Apéndices I y II. En caso de derrames de petróleo, los formularios de la cadena de custodia deben completarse y enviarse de forma apropiada junto con las muestras de tejidos (Apéndice XIII). Cuando las muestras sean remitidas a un laboratorio o individuo fuera del país de origen, deberán completarse los formularios y permisos apropiados de autorización de las agencias gubernamentales tales como la Agencia de Pesca y Vida Silvestre de Estados Unidos /US Fish and Wildlife Service (para CITES) y NOAA/NMFS (para MMPA) según sean requeridos (ver Apéndice V).

AGRADECIMIENTOS

Deseamos agradecer a todas las personas que facilitaron material para el desarrollo del presente protocolo. Agradecemos especialmente a los coordinadores de varamientos y al personal de First Nations que permite realizar estas investigaciones. Los fondos para este proyecto fueron suministrados por la Administración Nacional del Océano y la Atmósfera del Departamento de Comercio Estados Unidos (U.S. Department of Commerce National Oceanic & Atmospheric Administration). Contribuciones no materiales fueron provistas por SeaDoc Society; un programa del Wildlife Health Center, School of Veterinary Medicine, University of California, Davis; Sea World Parks and Entertainment, y el Animal Health Center, British Columbia Ministry of Agriculture. Deseamos agradecer en forma puntual a Lynne Barre, Kathy Burek, John Ford, Sal Frasca, Justin Greenman, Michael Grigg, Frances Gulland, Brad Hanson, Aleria Jensen, Linda Lowenstine, Bill Mc Lellan, Michael Moore, Erika Nilson, Hendrick Nollens, Ann Pabst, Lisa Spavin, Justin Viezbicke, y Gina Ylitalo por realizar la revisión del presente documento previo a su difusión en 2014. Las ilustraciones de las orcas sobre patología macroscópica pertenecen a Lee Harrison/©Fundación Free Morgan.

BIBLIOGRAFÍA CITADA:

- Barbieri, M. M., S. A. Raverty, M. B. Hanson, and S. Venn-Watson, J. K. B. Ford and J. K. Gaydos. 2013. Spatial and temporal analysis of killer whale strandings in the North Pacific Ocean and the benefits of a coordinated stranding response protocol. *Marine Mammal Science* DOI: 10.1111/mms.12044, 15 pages.
- Barrett, T., I. K. G., L. Mamaev, L. Goatley, M-F. Van Bresseem, and A.D.M.E. Osterhaus. 1993. Dolphin and porpoise morbilliviruses are genetically distinct to phocine distemper virus. *Virology* 200: 10101012.
- Bossart, G. D., and E. Eimstad. 1988. *Erysipelothrix* vesicular glossitis in a killer whale (*Orcinus orca*). *Journal of Zoo Animal Medicine* 19:42-47.
- Bossart, G. D., T. A. Brawner, C. Cabal, M. Kuhns, E. A. Eimstad, J. Caron, M. Trimm, and P. Bradley. 1990. Hepatitis B-like infection in a Pacific white-sided dolphin. *Journal of the*

- American Veterinary Medical Association 196:127-130.
- Bossart, G. D., C. Cray, J. L. Solorazano, S. J. Decker, L. H. Cornell, and N. H. Altman. 1996. Cutaneous papillomaviral-like papillomatosis in a killer whale (*Orcinus orca*). *Marine Mammal Science* 12:274-281
- Brew, S.D., L. L. Perrett, J. A. Stack, A. P. MacMillan, and N.J. Staunton. 1999. Human exposure to *Brucella* recovered from a sea mammal. *Veterinary Record* 144:483
- Cloekaert A., M. Grayon, O. Grepinet, and K.S. Boumedine. 2003. Classification of *Brucella* spp. Isolated from marine mammals by DNA polymorphism at the omp-2 locus. *Microbes and Infections* 5(7):593-602
- Dailey, M. D., 2001. Parasitic Diseases. *In* CRC Handbook of Marine Mammal Medicine, 2nd Edition L. A. Dierauf and F. M. D. Gulland (eds.). CRC Press, Boca Raton, Florida. Pp. 357-379.
- Daily, M. D. and R. L. Brownell. 1972. A checklist of marine mammal parasites. *In* Mammals of the Sea, Biology and Medicine. S. Ridgway (ed.). Charles C. Thompson, Springfield, Illinois. Pp. 528-589.
- Domingo, M, L. Ferrer, M. Pumarola, A. Marco, J. Plana, S. Kennedy, M. McAlisky, and B.K. Rima. 1990. Morbillivirus in dolphins. *Nature* 348:21.
- Domingo, M., Kennedy, S. and M-F. Van Bresseem. 2002. Marine Mammal Mass Mortalities. *In* Marine Mammals Biology and Conservation P.J.G.H. Evans and A.J. Raga (eds.). Kluwer Academic / Plenum Publishers, New York, Pp. 425-456.
- Duignan, P. J., C. House, J. R. Geraci, N. Duffy, B. K. Rima, M. T. Walsh, G. Early, D. J. St Aubin, S. Sadove, H. Koopman, and H. Rhinehart. 1995. Morbillivirus infection in cetaceans of the western Atlantic. *Veterinary Microbiology*. 44:241-249.
- Dunn, J. L., J. D. Buck, and T. R. Robeck. 2001. Bacterial Diseases of Cetaceans and Pinnipeds. *In* CRC Handbook of Marine Mammal Medicine, 2nd Edition. L. A. Dierauf and F. M. D. Gulland (eds.). CRC Press, Boca Raton, FL. Pp. 309-335.
- Ewalt, D. R., D. R. Payeur, B. M. Martin, D. R. Cummins, and W.G. Miller. 1994. Characteristics of a *Brucella* species isolated from bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*). *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 6:448-452.
- Ford, J. K. B., G. M. Ellis, K. C. Balcomb. 2000. *Killer whales: The natural history and genealogy of Orcinus orca in British Columbia and Washington*. University of British Columbia Press, Vancouver.
- Foster, G., K. L. Jahans, R. J. Reid, and H. M. Ross. 1996. Isolation of *Brucella* species from cetaceans, seals and an otter. *Veterinary Record*. 138:583-586.
- Gall, D, K. Nielsen, L. Forbes, D. Davis, P. Elzer, S. Olsen, S. Balsevicius, L. Kelly, P. Smith, S. Tan, and D. Joly. 2000. Validation of the fluorescent polarization assay and comparison to other serologic assays for the detection of serum antibodies to *Brucella abortus* in Bison. *Journal of Wildlife Diseases*. 36:469-476.
- Gaydos, J.K., K. C. Balcomb, III, R. Osborne, and L. Dierauf. 2004. Evaluating potential infectious disease threats for southern resident killer whales, *Orcinus orca*: a model for endangered species. *Biological Conservation*. 117:253-262.
- Geraci, J. R, J. Harwood, and V. J. Lounsbury. 1999. Marine mammal die-offs. Causes, investigations and issues. *In* Conservation and Management of Marine Mammals. J. R. Twiss and R. R. Reeves (eds.). Smithsonian Institution Press, Washington, D.C. Pp. 367-396.
- Gibson, D. I. and R. A. Bray. 1997. *Oschmarinella albamarina* (Treschev, 1968) n. comb., a liver fluke from the killer whale *Orcinus orca* (L.) off the British coast. *Systematic*

- Parasitology. 36:39-45.
- Gibson, D.I., E. A. Harris, R. A. Bray, P. D. Jepson, T. Kuiken, J. R. Baker, and V.R. Simpson. 1998. A survey of the helminth parasites of cetaceans stranded on the coast of England and Wales during the period 1990-1994. *Journal of Zoology*, London. 244:563-574.
- Gonzalez L, I. A. Patterson, R. J. Reid, G. Foster, M. Barberan, J. M. Blasco, S. Kennedy, F. E. Howie, J. Godfroid, A. P. MacMillan, A. Schock, and D. Buxton. 2002. Chronic meningoencephalitis associated with *Brucella* sp. infection in live-stranded striped dolphins (*Stenella coeruleoalba*). *Journal of Comparative Pathology*. 126:147-152.
- Greenwood, A. G., and D. C. Taylor. 1985. Captive Killer Whales in Europe. *Aquatic Mammals* 1:10-12.
- Gulland, F. M., L. A. Dierauf, and T. K. Rowles. 2001. Marine mammal stranding networks. In *CRC Handbook of Marine Mammal Medicine 2nd Edition*. L. A. Dierauf and F. M. Gulland (eds.). CRC Press, New York, New York. Pp. 45-67.
- Harms, C.A., W. A. McLellan, M. J. Moore, S. G. Barco, E. O. Clarke EO, V. G. Thayer and T. K. Rowles. 2014. Low residue euthanasia of stranded mysticetes. *Journal of Wildlife Diseases* 50:63-73.
- Heptner, V.G., K. K. Chapskii, V. A. Arsen'ev., and V. E. Sokolov. 1976. Mammals of the Soviet Union. Volume II, part 3. Pinnipedia and Odontoceti. Vysshaya Shkola Publishers, Moscow, Soviev Union. (English translation, 1996, Science Publishers, Lebanon, New Hampshire).
- Hicks, C. L., R. Kinoshita, and P. W. Ladds. 2000. Pathology of meliodosis in captive marine mammals. *Australian Veterinary Journal* 78:193-195.
- Jepson, P. D., S. Brew, A. P. MacMillan, J. R. Baker, J. Barnett, J. K. Kirkwood, T. Kuiken, I. R. Robinson, and V. R. Simpson. 1997. Antibodies to *Brucella* in marine mammals around the coast of England and Wales. *The Veterinary Record* 141:513-515.
- Kennedy S. Morbillivirus infection in aquatic mammals. 1998. *Journal of Comparative Pathology*. 119:201-225.
- Lipscomb T.P., Kennedy S., Moffett D., and B.K. Ford. 1994. Morbilliviral disease in an Atlantic bottlenose dolphin (*Tursiops truncatus*) from the Gulf of Mexico. *Journal of Wildlife Diseases*. 30:572-576.
- Nielsen, O., R. E. Stewart, K. Nielsen, L. Measures, and P. Duignan. 2001. Serologic survey of *Brucella* spp. antibodies in some marine mammals of North America. *Journal of Wildlife Diseases*. 37:89-100.
- NMFS. 2008. Recovery plan for Southern Resident killer whales (*Orcinus orca*). National Marine Fisheries Service, Northwest Region, Seattle, Washington.
- Raverty, S., K. Nielsen, O. Nielsen, B. Hanson, and J. K. Gaydos. 2004. Detection of *Brucella* spp. antibodies in post mortem heart blood and antemortem serum of killer whales (*Orcinus orca*) in the Pacific Northwest. *Proceedings of the 35th International Association for Aquatic Medicine Conference*, Galveston, Texas. Pp 114-115.
- Reidarson, T. H., J. F. McBain, L. M. Dalton, and M. G. Rinaldi. 1999. Diagnosis and treatment of fungal infections in marine mammals. In *Zoo and Wild Animal Medicine Current Therapy 4th Edition*. M. E. Fowler and R. E Miller (eds.). W.B. Saunders Company, Philadelphia, Pennsylvania. Pp. 478-485.
- Ridgway, S.H. 1979. Reported causes of death of captive killer whales (*Orcinus orca*). *Journal of Wildlife Diseases* 15: 99-104. Ross, H.M., K. L. Jahans, A. P. MacMillian, R. J. Reid, P. M. Thompson, and G. Foster. 1996. *Brucella* species infection in North Sea seal and

- cetacean populations. *Veterinary Record* 138:647-648.
- Rowles, T. K., F. Van Dolah, and A. A. Hohn. 2001. Gross necropsy and specimen collection protocols. In *CRC Handbook of Marine Mammal Medicine* 2nd Edition. L. A. Dierauf and F. M. Gulland (eds.). CRC Press, New York, New York. Pp. 449-470.
- Saliki J. T., E. J. Cooper, and J. P. Gustavson. 2002. Emerging morbillivirus infections of marine mammals: development of two diagnostic approaches. *Annals of the New York Academy of Science*. 969:51-59.
- Schulman, Y.S and T. Lipscomb. 1999. Dermatitis and invasive ciliated protozoa in dolphins that died during the 1987-1988 Atlantic bottlenose dolphin morbillivirus epizootic. *Veterinary Pathology* 36:171-174.
- Sneizek, J.H., D. W. Coates, and E.B. Small. 1995. *Kyaroikeus cetarius* n.g., n. sp., a parasitic ciliate from the respiratory tract of odontocete cetacea. *Journal of Eukaryotic Microbiology*. 42:260-268.
- Sohn, A.H., W. S. Probert, C. A. Glaser, N. Gupta, A. W. Bollen, J. D. Wong, E. M. Grace, and W.C. McDonald. 2003. Human neurobrucellosis with intracerebral granuloma caused by a marine mammal *Brucella* spp. *Emerging Infectious Diseases*. 9(4): 485-8.
- St. Leger, J.A., G. Wu, M. Anderson, L. Dalton, E. Nilson, and D. Wang. West Nile Virus Infection in Killer Whale, Texas, USA, 2007. *Emerging Infectious Diseases*. 17:1531-1533.
- Sweeney, J. C., G. Miyaki, P. M. Vainik, and R. H. Conklin. 1976. Systemic mycoses in marine mammals. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 169:946-948.
- US Federal Register. 2005. Endangered and threatened wildlife and plants: Endangered status for southern resident killer whales. 70(222):69903-69912.
- Van Bresseem, M. F., K. Van Waerebeek, and J. A. Raga. 1999. A review of virus infections of cetaceans and the potential impact of morbilliviruses, poxviruses, and papillomaviruses on host population dynamics. *Diseases of Aquatic Organisms* 38:53-65.
- Van Bresseem, M. F., K. Van Waerebeek, J. A. Raga, J. Godfroid, S. D. Brew, and A. P. MacMillan, 2001a. Serological evidence of *Brucella* species infection in odontocetes from the south Pacific and the Mediterranean. *Veterinary Record*, 148:657-661.
- Van Bresseem, M. F., K Van Waerebeek, P. Jepson, J. A. Raga, P. J. Duignan, O. Nielsen, A. P. Di Benedetto, S. Siciliano, R. Remos, W. Kant, V. Peddemors, R Kinoshita, P. S. Ross, A. Lopez-Fernandez, K. Evans, E. Crespo, and T Barrett. 2001b. An insight into the epidemiology of dolphin morbillivirus worldwide. *Veterinary Microbiology* 81:287-304.
- Van Bresseem, M.-F., I. K. G. Visser, M. W. G. Van De Bildt, J. S. Teppema, J. A. Raga, and A. D. M. E. Osterhaus. 1991. Morbillivirus infection in Mediterranean striped dolphins (*Stenella coeruleoalba*). *Veterinary Record*. 129:471-472.
- Young, S. J., R. L. Lewis, J. K. B Ford, and G. Ellis. 1997. First case report – mortality of a wild resident killer whale (*Orcinus orca*) from *Erysiplothrix rhusopathiae*. *Proceedings of the International Association for Aquatic Animal Medicine*, Baltimore Maryland, pp. 64-68.

PROTOCOLO DE NECROPSIA PARA ORCAS: CHECKLIST DETALLADO PARA MUESTREO DE TEJIDOS

Tejido	Análisis	Muestra	Conservación
Espiráculo	Bacteriológico	Hisopado	Medio de transporte para cultivo
Hendidura genital	Bacteriológico	Hisopado	Hisopo para cultivo
Vagina	Bacteriológico	Hisopado	Hisopo para cultivo
Utero	Bacteriológico	Hisopado	Hisopo para cultivo
Ovario	Bacteriológico	Hisopado	Hisopo para cultivo
Pene/testículos	Bacteriológico	Hisopado	Hisopo para cultivo
Pulmón	Bacteriológico	Hisopado	Hisopo para cultivo
Tráquea	Bacteriológico	Hisopado	Hisopo para cultivo
Nódulo linfático, sitios múltiples	Bacteriológico	Hisopado	Hisopo para cultivo
Timo	Bacteriológico	Muestra de tejido de 1-2 cm ³	Bolsa plástica y congelar
Bazo	Bacteriológico	Muestra de tejido de 1-2 cm ³	Bolsa plástica y congelar
Corazón	Bacteriológico	5 ml de sangre cardíaca post mortem	Tubo de tapa roja (vacutainer de tapa roja) o bolsa plástica y enfriar
Estómago	Bacteriológico	Estómago	Hisopo para cultivo
Intestino delgado, íleon y yeyuno	Bacteriológico	Hisopado	Hisopo para cultivo
Colon	Bacteriológico	Hisopado	Hisopo para cultivo
Conjuntiva	Bacteriológico	Hisopado	Hisopo para cultivo
Dientes	Determinación de edad	1-2 intacto	Bolsa plástica
Aleta dorsal	Anatomía	Extraer intacto	Sellar en plástico y congelar
Cabeza	Anatomía	Intacto	Bolsa plástica y congelar
Timo	Archivo	Múltiples porciones, 1-2 cm	Bolsa plástica y congelar
Bazo	Archivo	Múltiples porciones, 1-2 cm ³	Bolsa plástica y congelar
Glándula tiroides	Archivo	Múltiples porciones, 1-2 cm ³	Bolsa plástica y congelar
Glándula paratiroides	Archivo	Múltiples porciones, 1-2 cm ³	Bolsa plástica y congelar

Cerebro	Archivo	Múltiples porciones, 1-2 cm ³	Bolsa plástica y congelar
Cerebelo	Archivo	Múltiples porciones, 1-2 cm ³	Bolsa plástica y congelar
Tronco del encéfalo	Archivo	Múltiples porciones, 1-2 cm ³	Bolsa plástica y congelar
Médula espinal (torácica)	Archivo	Múltiples porciones, 1-2 cm ³	Bolsa plástica y congelar
Hígado	Archivo	Múltiples porciones, 1-2 cm ³	Bolsa plástica y congelar
Riñón	Archivo	Múltiples porciones, 1-2 cm ³	Bolsa plástica y congelar
Glándulas suprarrenales	Archivo	Múltiples porciones, 1-2 cm ³	Bolsa plástica y congelar
Uretra	Archivo	Múltiples porciones, 1-2 cm ³	Bolsa plástica y congelar
Vejiga urinaria	Archivo	5-10 ml de orina y pared de la vejiga	Bolsa plástica y congelar
Rib/Costilla/Médula ósea	Archivo	1-2 cm ³	Bolsa plástica y congelar
Diafragma	Archivo	2x2 cm	Bolsa plástica y congelar
Leche	Archivo	Aspirado	Bolsa plástica y congelar
Utero	Archivo	Muestras de tejidos	Bolsa plástica y congelar
Ovario	Archivo	Si es posible mantener intacto	Histopatología
Oviducto	Archivo	Muestras de tejidos	Bolsa plástica y congelar
Tráquea	Archivo	Muestras de tejidos	Bolsa plástica y congelar
Nódulos linfáticos, sitios múltiples	Archivo	Nódulos enteros o parciales	Bolsa plástica y congelar
Glándula pituitaria	Archivo	Mitad	Bolsa plástica y congelar
Corazón	Archivo	Muestras de tejidos	Bolsa plástica y congelar
Bilis	Archivo	5-10 ml	Bolsa plástica y congelar
Páncreas	Archivo	5-10 g	Bolsa plástica y congelar
Intestino delgado, niveles múltiples	Archivo	Intestino ligado	Bolsa plástica y congelar
Colon	Archivo	Organo ligado	Bolsa plástica y congelar
Músculo esquelético	Archivo	5x5 cm	Bolsa plástica y congelar

Orofaringe/amígdala	Bacteriología	Hisopado	Hisopo para cultivo
Cordón umbilical	Bacteriología	Hisopado	Hisopo para cultivo
Glándula mamaria	Bacteriología	Hisopado	Hisopo para cultivo
Líquido sinovial	Bacteriología	Hisopado	Hisopo para cultivo
Vejiga urinaria	Ensayo de biotoxinas, citología/cultivo	5-10 ml	Bolsa plástica estéril y congelar
Estómago	Ensayo de biotoxinas, selección de presas	Entero o porción de la ingesta	Bolsa plástica y congelar
Ojo	Química clínica	Aspirado de 3-5 ml del vítreo	Tubo de tapa roja y enfriar
Intestino delgado, íleon y yeyuno	Examen de contenidos	Intestino ligado	Bolsa plástica y enfriar
Oídos	Escaneo por TC	Intacto	Bolsa plástica y congelar
Espiráculo	Citología	Raspaje	Secar al aire y teñir
Glándula mamaria	Citología	Aspirado	Bolsa plástica y enfriar
Líquido sinovial	Citología	5 ml	Tubo de tapa roja
Costilla/Médula ósea	Citología	Frotis	Fijar al aire/alcohol
Fluido pericárdico	Citología y serología	10 ml	Tubo de tapa roja o bolsa plástica y congelar
Conjuntiva	Microscopía electrónica	Hisopado seco	Bolsa Whirl-pak® y enfriar
Piel	Genética	1 cm ³	DMSO o congelar
Piel, sitios múltiples incluyendo lesionados y no lesionados	Histopatología	Ver Lineamientos (*)	Formalina
Mucosa oral	Histopatología	Ver Lineamientos (*)	Formalina
Orofaringe	Histopatología	Ver Lineamientos (*)	Formalina
Espiráculo y sacos de aire	Histopatología	Ver Lineamientos (*)	Formalina
Amígdalas	Histopatología	Ver Lineamientos (*)	Formalina
Conjuntiva	Histopatología	Ver Lineamientos (*)	Formalina
Cordón umbilical	Histopatología	Ver Lineamientos (*)	Formalina
Glándula mamaria	Histopatología	Ver Lineamientos (*)	Formalina
Lengua	Histopatología	Ver Lineamientos (*)	Formalina
Ojo	Histopatología	Intacto, inyectar con 1-2 cc de formalina	Formalina
Orificio genital	Histopatología	Ver Lineamientos (*)	Formalina
Vagina	Histopatología	Ver Lineamientos (*)	Formalina
Utero	Histopatología	1x2 cm	Formalina
Ovario	Histopatología	Ver Lineamientos (*)	Formalina
Oviducto	Histopatología	Ver Lineamientos (*)	Formalina

Pene/testículos	Histopatología	Ver Lineamientos (*)	Formalina
Glándulas sexuales accesorias	Histopatología	Ver Lineamientos (*)	Formalina
Pulmones	Histopatología	Ver Lineamientos (*)	Formalina
Tráquea	Histopatología	Ver Lineamientos (*)	Formalina
Nódulos linfáticos, sitios múltiples	Histopatología	Ver Lineamientos (*)	Formalina
Timo	Histopatología	Ver Lineamientos (*)	Formalina
Bazo	Histopatología	Ver Lineamientos (*)	Formalina
Glándula tiroides	Histopatología	Ver Lineamientos (*)	Formalina
Glándula paratiroides	Histopatología	Ver Lineamientos (*)	Formalina
Cerebro	Histopatología	Ver Lineamientos (*)	Formalina
Cerebelo	Histopatología	Ver Lineamientos (*)	Formalina
Cerebro – encéfalo, puente, médula, colículo	Histopatología	Ver Lineamientos (*)	Formalina
Oídos	Histopatología	Grasa peribular	Formalina
Glándula pituitaria	Histopatología	Media	Formalina
Médula espinal (torácica)	Histopatología	Ver Lineamientos (*)	Formalina
Plexo braquial	Histopatología	1-2 cm ³	Formalina
Corazón, septo interventricular, ventrículos, aurícula, músculo papilar y válvulas	Histopatología	Ver Lineamientos (*)	Formalina
Vena cava y aorta, niveles múltiples	Histopatología	Vena cava y aorta, niveles múltiples	Histopatología
Hígado	Histopatología	Ver Lineamientos (*)	Formalina
Páncreas	Histopatología	Ver Lineamientos (*)	Formalina
Estómago	Histopatología	Ver Lineamientos (*)	Formalina
Intestino delgado, íleon y yeyuno	Histopatología	Ver Lineamientos (*)	Formalina
Colon	Histopatología	Ver Lineamientos (*)	Formalina
Riñón	Histopatología	Ver Lineamientos (*)	Formalina
Adrenales	Histopatología	Ver Lineamientos (*)	Formalina
Uretra	Histopatología	Ver Lineamientos (*)	Formalina
Vejiga urinaria	Histopatología	Ver Lineamientos (*)	Formalina
Músculo esquelético	Histopatología	Ver Lineamientos (*)	Formalina
Costilla/medula ósea	Histopatología	Ver Lineamientos (*)	Formalina
Nervios periféricos	Histopatología	Ver Lineamientos (*)	Formalina
Diafragma	Histopatología	Ver Lineamientos (*)	Formalina
Grasa	Análisis lipídico	10 cm ³	Foil de aluminio y congelar
Orofaringe	Estudios moleculares	Hisopado seco	Bolsa plástica y enfriar

Espiráculo	Estudios moleculares	Hisopado seco	Bolsa plástica y enfriar
Amígdalas	Estudios moleculares	1-2 cm ³	Bolsa plástica y congelar
Conjuntiva	Estudios moleculares	Hisopado	Bolsa Whirl-pak® y enfriar
Orificio genital	Estudios moleculares	Hisopado seco	Bolsa plástica y enfriar
Vagina	Estudios moleculares	Hisopado seco	Bolsa plástica y enfriar
Utero	Estudios moleculares	Hisopado seco	Bolsa plástica y enfriar
Ovario	Estudios moleculares	Hisopado seco o muestra de tejido de 1-2 cm	Bolsa plástica y enfriar
Pene/testículos	Estudios moleculares	Hisopado seco	Bolsa plástica y enfriar
Pulmones	Estudios moleculares	Tejido de 1x1 cm	Bolsa plástica y enfriar
Nódulos linfáticos, sitios múltiples	Estudios moleculares	Hisopado seco	Bolsa plástica y enfriar
Timo	Estudios moleculares	Muestra de tejido de 1-2 cm ³	Bolsa plástica y enfriar
Bazo	Estudios moleculares	Muestra de tejido de 1-2 cm ³	Bolsa plástica y enfriar
Muestra de agua	Estudios moleculares	10 ml	Bolsa plástica y congelar
Mandíbula	Estudio morfométrico	Intacta	Bolsa plástica y congelar
Espiráculo	Micología	Hisopado	Medio de transporte para cultivo
Orificio genital	Micología	Hisopado	Hisopo para cultivo
Vagina	Micología	Hisopado	Hisopo para cultivo
Utero	Micología	Hisopado	Hisopo para cultivo
Pene/testículos	Micología	Hisopado	Hisopo para cultivo
Pulmones	Micología	Hisopado	Hisopo para cultivo
Nódulos linfáticos, sitios múltiples	Micología	Hisopado	Hisopo para cultivo
Intestino delgado	Micología	Hisopado	Hisopo para cultivo
Colon	Micología	Hisopado	Hisopo para cultivo
Espiráculo	Cultivo de Micoplasma	Hisopado	Hisopo para cultivo
Pulmones	Cultivo de Micoplasma	Hisopado	Hisopo para cultivo

Orificio genital/canal urogenital	Cultivo de Micoplasma	Hisopado	Hisopo para cultivo
Oído medio	Cultivo de Micoplasma	Hisopado	Hisopo para cultivo
Espiráculo	Parasitología	Hisopado	Preservar en solución Bouin
Lengua	Parasitología	3x3 cm	Bolsa plástica y congelar
Estómago	Parasitología	Ingesta	Bolsa plástica y enfriar
Colon	Cultivo de Salmonella	Hisopado	Hisopo para cultivo
Mandíbula	Lesiones relacionadas con sonares	Grasa interna y mandibular	Histopatología
Pericardio	Cultivo de tejidos	Pericardio	Cultivo para tejidos
Grasa	Contaminantes toxicológicos	3x3 cm	Foil de aluminio y congelar
Hígado	Contaminantes toxicológicos	3x3 cm	Foil de aluminio y congelar
Riñón	Contaminantes toxicológicos	3x3 cm	Foil de aluminio y congelar
Bilis	Contaminantes toxicológicos	1-2 ml	Vial de vidrio y congelar
Heces	Contaminantes toxicológicos	2- 5g	Recipiente de vidrio y congelar
Riñón	Análisis de minerales traza	5x5 cm	Bolsa plástica y congelar
Hígado	Análisis de minerales traza y vitaminas	5x5 cm	Bolsa plástica y congelar
Vejiga urinaria	Análisis de orina	5-10 ml	Tubo de tapa roja
Amígdalas	Aislamiento viral	5 g	Bolsa plástica y enfriar o congelar
Pulmones	Aislamiento viral	5 g	Bolsa plástica y enfriar o congelar
Nódulos linfáticos, sitios múltiples	Aislamiento viral	5 g	Bolsa plástica y congelar
Bazo	Aislamiento viral	5 g	Bolsa plástica y enfriar o congelar
Cerebro	Aislamiento viral	5 g	Bolsa plástica y enfriar o congelar
Riñón	Aislamiento viral	5 g	Bolsa plástica y enfriar o congelar
Glándula tiroides	Peso	Glándula intacta	Fresca

Revisión 15 de Mayo, 2014

Glándula pituitaria	Peso	Intacta	Fresca
Riñón	Peso	Intacto	Fresca

APÉNDICE I: Prioridades de Muestreo según la Condición de los Tejidos

Es importante considerar que las condiciones asociadas a los varamientos y a los recursos disponibles para la evaluación *post mortem* serán de gran variabilidad. En aquellas situaciones cuando autólisis, ubicación, equipamiento, personal y otros factores restrinjan el acceso y la posibilidad de realizar una necropsia de forma minuciosa, la escala presentada a continuación servirá para facilitar la priorización de la recolección de muestras para su evaluación diagnóstica. Dentro de lo posible, deberán realizarse todos los esfuerzos para obtener las muestras de alta prioridad en cada varamiento. La disposición final de los tejidos será responsabilidad de la agencia gubernamental involucrada o del coordinador regional de mamíferos marinos del área.

Todos los pedidos de muestras deberán ser aprobados por el coordinador regional previo al envío de las mismas a otros investigadores.

MUESTRAS DE ALTA PRIORIDAD:

En todos los varamientos de orcas, intentar la recolección de las muestras listadas a continuación independientemente de la condición *post mortem* del cadáver.

Tejido	Análisis	Muestra	Conservación	√
Mayor cantidad posible de tejidos representativos	Histopatología	Ver lineamientos (*)	Formalina	
Grasa y piel/hígado/riñón	Contaminantes toxicológicos	3 cm ³	Foil de aluminio y congelar	
Piel	Genético	1 cm ³	Congelar o DMSO	
Orofaringe/amígdala/espiráculo	Estudios moleculares y cultivo	Hisopo seco con medio de transporte	En bolsa plástica y enfriar	
Glándula mamaria	Bacteriología/citología	3 cm ³ de tejido	En bolsa plástica y enfriar	
Ojo	Química clínica	Aspirar 3-5 ml de vítreo	Tubo de tapa roja y enfriar	
Orificio genital/ canal urogenital	Estudios moleculares y cultivo	Hisopado seco con medio para transporte	En bolsa plástica y enfriar	
Ovario	Estudios reproductivos y moleculares	Hisopado seco y ovario intacto	En bolsa plástica y enfriar	
Morfometría y fotografías	Identificación	Digital o diapositivas	Disco	

Pulmón/nódulos linfáticos de la zona/bazo	Estudios moleculares y bacteriología	2x2 cm de tejido	En bolsa plástica y enfriar	
Muestras de sangre <i>post mortem</i>	Serología y cultivo bacteriológico	10-20 ml	En tubo de tapa roja y enfriar	
Estómago e intestino delgado	Ensayo de biotoxinas, análisis de contenido estomacal	Ligado	En bolsa plástica y congelar	
Vejiga urinaria/bilis	Ensayo de biotoxinas/citología/cultivo/uroanálisis	5-10 ml	Bolsa plástica estéril y congelar	

MUESTRAS DE PRIORIDAD INTERMEDIA:

Tomar las muestras de la lista a continuación si se dispone de tiempo y el cadáver se encuentra razonablemente fresco (códigos 2-3)

Tejido	Análisis	Muestra	Conservación	√
Intestino delgado	Parasitología	Ingesta	En bolsa plástica y enfriar	
Amígdala	Histopatología	Ver lineamientos (*)	Formalina	
Amígdala	Estudios moleculares	5 g	En bolsa plástica y enfriar o congelar	
Mandíbula	Lesiones por sonar	Grasa mandibular interna	Histopatología	
Cabeza	Anatomía	Intacta	En bolsa plástica y congelar	
Utero	Estudios moleculares	Hisopado seco	En bolsa plástica y enfriar	
Cerebro, hígado, riñón, bazo, nodules linfáticos y pulmón	Aislamiento de virus	5 g	Bolsas plásticas individuales y enfriar o congelar	
Oídos	Histopatología	Grasa peribular	Formalina	
Oídos	Escaneo por TC	Intactas	En bolsa plástica y congelar	
Bilis	Contaminantes toxicológicos	1-2 ml	Vial de vidrio y congelar	
Heces	Contaminantes toxicológicos	4-5 g	Frasco de vidrio enjuagado con solvente y congelar	
Hígado	Análisis de vitaminas y minerales traza	5 cm ³	En bolsa plástica y congelar	

MUESTRAS DE PRIORIDAD BAJA:

Si se dispone de suficiente tiempo y recursos, las siguientes muestras y mediciones morfométricas deben recolectarse.

Tejido	Análisis	Muestra	Conservación	√
Aleta dorsal	Anatomía	Extraer intacta	Sellar en bolsa plástica y congelar	
Dientes	Envejecimiento	1-2 intactos	Bolsa plástica	
Órganos	Peso	Intactos	Frescos	
Mandíbula	Estudios morfométricos	Intacta	En bolsa plástica y congelar	
Mediciones de grasa	Estudios morfométricos	Tomar y registrar	Registrar información	

Al momento de la necropsia, se deben consultar las listas de muestreo de tejidos (Apéndice I) y las listas de pedidos de muestras (Apéndice IV). Se deben tomar muestras de todos los órganos de mayor importancia y lesiones para realizar estudios de histopatología y se deben congelar muestras representativas para estudios complementarios.

El checklist de tejidos ha sido desarrollado siguiendo la secuencia de pasos del examen *post mortem* de la orca. Marcar con una “x” la columna a la derecha a medida que se extirpen los órganos y las muestras sean tomadas y conservadas.

TAMAÑO DE LAS MUESTRAS Y CONSERVACIÓN

*Lineamientos para la fijación de tejidos para su evaluación histopatológica: conservar todas las lesiones y la mayor cantidad posible de tejidos de la lista detallada a continuación en una solución de formalina bufferada al 10%. Las muestras de tejidos deberán tener un área de entre 3-5 cm² y un ancho máximo de 0.5 a 1.0 cm. La inmersión en solución de formalina debe ser 1 parte de tejido por cada 10-15 partes de solución. Si se cuenta con un fijador para microscopía electrónica (ME) como el glutaraldehído, se recomienda conservar trozos pequeños de muestras (1-2 mm³) de hígado, riñón, bazo y pulmón.

Bloques representativos de tejidos de 3-5 cm obtenidos de lesiones y de órganos importantes (por ejemplo, pulmón, hígado, riñón, bazo) deben colocarse individualmente en bolsas plásticas rotuladas (preferentemente Whirl-pak[®]) y conservarse sobre hielo seco o hielo común para su almacenamiento y transporte. A su vez, se deberá recolectar suero *post mortem* (de sangre del corazón), orina, fluido ocular, bilis, ingesta y cualquier acumulación anormal de líquidos. La sangre cardíaca deberá centrifugarse lo antes posible para limitar la hemólisis. Una vez que las muestras lleguen al laboratorio de diagnóstico o de referencia, deberán congelarse a -70°C. Si esto no fuera posible, se considera aceptable la conservación en un freezer convencional sin ciclo de descongelamiento automático. Un bloque de piel, músculo o aleta de 1-2cm debe extirparse, envolverse en foil de aluminio y congelarse para su análisis genético. Esta muestra puede colocarse en DMSO/solución salina si se prevee que no permanecerá congelada hasta su destino

final, aunque es preferible la conservación sin un agente de preservación.

Por cada lesión, se deberán realizar 2-3 hisopados y las muestras deben enfriarse para su transporte al laboratorio de diagnóstico. Además de los cultivos en TSA y agar sangre, se deberá contar con medio para aislamiento de bacterias halofílicas.

APÉNDICE II: Patógenos Reportados en Orcas

Tabla 1: Patógenos Detectados en Forma Directa o por Serología en Orcas

Agente	Referencia	Lugar
Bacteria		
<i>Brucella</i> spp.	Jepson et al., 1997; Raverty et al., 2004	Atlántico Noreste y Pacífico
<i>Edwardsiella tarda</i>	Ford et al., 2000	Noreste del Pacífico
<i>Salmonella</i> spp.	Ridgway, 1979; Colegrove et al., 2010	Noreste del Pacífico y en cautiverio
<i>Burkholderia pseudomallei</i>	Hicks et al., 2000	En cautiverio
<i>Clostridium perfringens</i>	Walsh et al., 1994	En cautiverio
<i>Erysipelothrix rhusiopathiae</i>	Young et al., 2002; Bossart et al., 1988	Noreste del Pacífico y en cautiverio
<i>Nocardia asteroides</i>	Sweeney et al., 1976	En cautiverio
<i>Nocardia farcinica</i>	St. Leger et al., 2009	En cautiverio
<i>Nocardia otitidiscaviarum</i>	Dunn et al., 2001	En cautiverio
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Rozanova et al., 2003	Golfo de Avacha (Kamchatka)
<i>Streptococcus</i> sp., beta-hemolítico	Greenwood y Taylor, 1985	En cautiverio
<i>Staphylococcus aureus</i>	Power y Murphy 2002	Atlántico
Virus		
Virus Símil Viruela de Cetáceos (Cetacean pox like virus, Orthopoxvirus)	Van Bressemer et al., 1999	Not Reportado
Virus símil Hepatitis-B (Hepatitis B like virus)	Bossart et al., 1990	En cautiverio
Influenza (sospechado)	Ridgway, 1979	En cautiverio
Virus cutáneo similar al papiloma (Cutaneous papilloma-like virus)	Bossart et al., 1996	En cautiverio
Virus del Nilo Occidental (West Nile Virus)	St. Leger et al., 2011	En cautiverio
Hongos		
<i>Aspergillus fumigatus</i>	Reidarson et al., 1999	En cautiverio
<i>Candida albicans</i>	Greenwood and Taylor, 1985; Ridgway, 1979; Sweeney et al., 1976	En cautiverio
<i>Cunninghamella bertholletiae</i>	Kakizoe et al., 2012	En cautiverio
<i>Saksenaea vasiformis</i>	Reidarson et al., 1999	En cautiverio

Tabla 2: Endoparasitos Identificados o Sugeridos por Serología en Orcas

Parásito	Referencia
Acantocefala	
<i>Bolbosoma niponicum</i>	Heptner et al., 1976
<i>Bolbosoma physeteris</i>	Heptner et al., 1976
Cestoda	
<i>Phyllobothrium sp.</i>	Dailey y Brownell, 1972
<i>Trigonocotyle spasskyi</i>	Dailey y Brownell, 1972
Nematoda	
<i>Anasakis simplex</i>	Dailey y Brownell, 1972
<i>Anasakis pacificus</i>	Heptner et al., 1976
Amfipoda	
<i>Cymus orcini</i>	Leung, 1970
Trematoda	
<i>Campula sp.</i>	Gibson et al., 1998
<i>Fasciola skrjabini</i>	Dailey and Brownell, 1972
<i>Leucasiella subtilla</i>	Heptner et al., 1976
<i>Oschmarinella albamarina</i>	Gibson y Bray, 1997
Protozoa	
<i>Kyaroikeus cetarius</i>	Sneizek et al, 1995; Schulman y Lipscomb, 1999
<i>Toxoplasma gondii</i> y <i>Sarcocystis spp.</i>	Gibson et al., 2011

APÉNDICE III: Protocolo para Necropsia en una Hora

El tiempo y las mareas pueden resultar factores limitantes para la realización de una necropsia. Cuando este sea el caso, es fundamental realizar una recolección eficiente de datos y muestras para recuperar la mayor cantidad de información posible dentro de un marco de trabajo seguro. Para facilitar esta tarea, se provee el siguiente checklist que puede seguirse en el orden establecido a continuación. En todos los casos, deben tomarse muestras de gran tamaño para luego subdividirlas de acuerdo con lo descrito en el Apéndice I de modo de maximizar la toma de muestras en el menor tiempo posible.

- Tomar los datos de Nivel A – ubicación, fecha, clase etaria, sexo (si es posible determinarlo)
- Tomar fotografías de todos los ángulos y superficies visibles. Girar el animal si fuera posible para facilitar la toma de imágenes
- Tomar las mediciones morfométricas básicas – longitud (medición crítica), circunferencia (1 a 2 veces, generalmente dos mediciones funcionan mejor), altura de aleta dorsal y longitud de base
- Examinar la aleta dorsal para localizar evidencia de un equipo de rastreo satelital o la cicatriz del dispositivo. Si se localiza, recuperar el equipo o medir y fotografiar la cicatriz
- Cortar y separar la grasa para buscar indicaciones de hemorragias, hematomas o fracturas óseas. Incluir en la revisión las costillas, vertebras y el cráneo para examinar lo más posible
- Tomar muestras de piel/grasa del dorso de ser posible
- Muestrear el músculo esquelético
- Abrir el abdomen
- Recolectar fluido abdominal, hígado, riñón, bazo, nódulos linfáticos, gónadas, útero (si aplica) y orina.
- Abrir el tórax – una incisión en el diafragma permitirá rápido acceso aunque limitará la visualización
- Tomar el corazón, pulmón, tráquea, timo (si se encuentra presente), laringe y amígdalas
- Tomar el contenido estomacal (o el estómago completo –lo que sea posible), el contenido intestinal y secciones del intestino
- Retirar el esófago
- Remover 2-3 dientes del centro de la arcada del lado más accesible de la mandíbula
- Desarticular la cabeza, abrir el cráneo y remover el cerebro

APÉNDICE IV: Listado de Investigadores Solicitando Muestras de Tejidos de Orcas

Estudio	Muestra	Investigador	Información de Contacto
Toxinas de algas	Ingesta (estómago), Hígado/Bilis/Heces/Orina	Dr. LeFebvre	206-302-2454
Anatomía	Mandíbula	Dr. Barrett-Lennard	604-659-3428
Anatomía	Cabeza	Dr. Barrett-Lennard	604-659-3428
Anatomía (USA)	Aleta dorsal	Dr. Hanson Dr. Andrews	206-860-3220
Anatomía (USA)	Esqueleto completo	Dr. Hanson	206-860-3220
Bacteriología (Canadá)	Múltiples tejidos	Dr. Raverty	604-556-3003
Bacteriología (USA)	Múltiples tejidos	Dr. Goldstein	530-754-7953
Cultivo de Brucella	Pulmón, cerebro, líquido céfalo raquídeo, útero/testículos y nódulos linfáticos	Dr. Byrne, UC Davis	
Escaneo por TC	Oídos/Cabeza	Dr. Hanson Dr. Dennison	206-860-3220
Cultivo celular	Tejidos frescos representativos	Dr. Wise	207-228-8050
Química clínica	Muestra de suero	Dr. St. Leger	619-225-4259
Análisis de ácidos grasos	Grasa y piel	Ms. Ylitalo	206-860-3325
Genética	Biopsia de piel	Dr. Barrett-Lennard Dr. Parsons Dr. Morin	604-659-3428 206-302-2428 858-546-7165
Hematología (USA)	Sangre (fresca/no congelada)	Dr. St. Leger	619-225-4259
Histopatología	Tejidos fijados en formalina	Dr. St. Leger Dr. Raverty Dr. Rotstein	619-225-4259 604-556-3003 240-238-1165
Análisis hormonal	Suero y heces	Dr. St. Leger	619-225-4259
PCR	Tejidos múltiples	Dr. Raverty	604-556-3003
Cultivo de <i>Mycoplasma</i> (USA)	Hisopados del tracto respiratorio, oído medio y orificio genital/canal urogenital	Dr. Frasca	860 486-1138
Parasitología	Ingesta y parásitos	Dr. Kinsella	415-289-7346
Análisis de presas (USA)	Contenido estomacal	Dr. Hanson	206-860-3220
Análisis de presas(Canadá)	Contenido estomacal	Dr. Ford	250-756-7245
Radionucleótidos	Músculo esquelético	Dr. Dasher	907-474-6840
Reproductivos	En formalina, intacto	Dr. Hanson	206-860-3220
Serología	Sangre de corazón	Dr. Saliki/O. Nielsen	405-744-6623/204-983-5126
Toxicología – Contaminantes	Grasa, hígado y riñón	Ms. Ylitalo	206-860-3325

Orgánicos Persistentes			
Análisis de vitamina A, minerales traza	Hígado y riñón	CAHFS Lab	530-752-8700
Investigación de virus (técnicas moleculares)	Cerebro, tráquea, pulmón, hígado, bazo, piel, nódulos linfáticos y heces	Dr. Anthony	760-500-4639
Virología	Tejidos múltiples: sangre en EDTA	Dr. Saliki/Dr. Raverty	405-744-6623/604-556-3003

APÉNDICE IVA: Investigación Específica / Pedidos de Evaluación de Casos

A continuación detallamos una lista de los protocolos y pedidos aprobados (hasta Marzo de 2014).

1. Dr. Lance Barrett-Lennard, Vancouver Aquarium Marine Science Centre: 845 Avison Way, Vancouver, British Columbia V6G 3E2. Teléfono: 604-659-3428.
Email: barrett@zoology.ubc.ca.
 - **Cráneo intacto o quijada inferior (mandíbula) para estudios morfométricos.** Por favor contactar a Dr Barrett-Lennard antes de realizar el estudio *post mortem*.
 - **Muestra de piel.** Biopsia por punción o extracción de piel, incluyendo epidermis e hipodermis. Colocar en DMSO (dimetilsulfóxido) o solución salina y refrigerar; o envolver en foil de aluminio y congelar.
2. Dr. Rebecca Pugh, NIST: 219 Fort Johnson Road, Charleston, South Carolina 29412. Tel. laboral: 843-762-8952. Email: Rebecca.pugh@nist.gov.
 - **Tejido recientemente muerto (fresco).** Muestras para la recopilación y archivo de tejidos de diversas especies indicadoras. Por favor contactar previamente a la realización de la necropsia para solicitar datos adicionales.
3. Dr. Mike Kinsella, HelmWest Laboratory: 2108 Hilda Avenue, Missoula, Montana 59801, USA. Email: Wormdwb@aol.com.
 - **Preservación de parásitos para estudios de especiación.** Muestras de parásitos estomacales. Congelar en bolsas Whirl-pak® a -70°C; o, en forma alternativa, congelar en freezer estándar y enviar en el día conservadas con hielo seco. Todos los demás parásitos, deben conservarse en etanol al 90% dentro de bolsas Whirl-pak®. En lo posible, permitir que los platelmintos permanezcan en agua corriente dentro de una nevera durante la noche previa a su fijación.
4. Mycobacteria and Brucella Section Diagnostic Bacteriology Laboratory, National Veterinary Services Laboratories: 1800 Dayton Road, Ames, IA 50010.
Teléfono: 515-663-7347. Fax: 515-663-7904.
 - **Muestras de tejidos congeladas para cultivo de *Brucella*.**
5. Dr. Bradley Hanson, NOAA/NMFS/Northwest Fisheries Science Center: 2725 Montlake Blvd. E, Seattle, WA 98112. Teléfono laboral: 206-860-3220. Fax: 206-860-3475.
Teléfono celular: 206-300-0282. Email: Brad.Hanson@noaa.gov.
 - **Contenido estomacal, cabeza y aleta dorsal para análisis anatómicos.** Se debe ligar el esófago o remover todo el contenido estomacal y luego congelar para su

análisis. En el caso de la aleta dorsal, se solicita removerla 10 cm debajo de su inserción, colocarla en una bolsa plástica y congelar. La cabeza puede desarticularse y luego colocarse en una bolsa plástica y congelar.

Ovarios. Conservar intactos en formalina.

6. Dr. John Ford, Fisheries and Oceans Canada Pacific Biological Station: 3109 Hammond Bay Road, Nanaimo, BC, Canada V9T 6N7. Tel. laboral: 729-8375. Fax: 250-756-7053. Email: john.k.ford@dfo-mpo.gc.ca
7. Dr. Stephen Raverty, Animal Health Center: 1767 Angus Campbell Road, Abbotsford, BC, Canada V3M 2G3. Tel. laboral: 604-556-3003 / 800-661-9903. Email: Stephen.Raverty@gems3.gov.bc.ca.
 - **Muestras de tejidos frescas y fijadas para investigaciones en curso sobre mortandad de orcas varadas.** Por favor contactar a los investigadores previamente a la realización de la necropsia para solicitar datos adicionales. Se solicita el envío de muestras congeladas de lengua, músculo masetero y diafragma para testeo de *Apicomplexa*. A su vez, se solicitan muestras de contenido estomacal y bilis congelados para testeo de toxinas de algas, así como también tejidos múltiples congelados para bacteriología. Muestras congeladas de hígado y riñón (envueltas en foil de aluminio) serán utilizadas para análisis de minerales traza.
 - **Muestras de hígado, riñón, cerebro y grasa (investigación toxicológica) de orcas varadas.** Se solicita registrar la especie, edad, ubicación y fecha. Envolver 30-50g de tejidos en foil de aluminio y congelar a -20°C para luego enviar sobre hielo seco.
8. Dr. Jeremiah Saliki, University of Georgia Athens Diagnostic lab: 0149 Athens Vet Med Diagnostic Lab, Athens, GA 30602. Teléfono 706- 542-5906. Email: jsaliki@uga.edu.
 - **Muestras de sangre de corazón *post mortem* y tejidos congelados.** Estudios de serología molecular y aislación viral en líneas celulares específicas de mamíferos marinos. Remover el suero de la muestra de sangre y congelar a -80°C. Se solicitan diferentes muestras como amígdalas, bazo, nódulos linfáticos, riñón, hígado y pulmón para aislamiento de virus. En lo posible se requieren muestras enfriadas con envío en el día de recolección; de lo contrario, se pueden congelar hasta su envío.
9. Dr. J. L. Stott, Marine Mammal Immunology Laboratory: Veterinary Medicine PMI VM3A Rm 4206, One Shields Avenue, University of California Davis, CA 95616. Teléfono laboral: 530-752-2543. Teléfono celular: 530-902-3971. E-mail: jlstott@ucdavis.edu.
 - **Muestras de sangre para la realización de pruebas de la función inmunológica en animales vivos.** Sólo para casos código 1 (varamiento vivo).

Los recipientes para la toma de muestras deberán ser vacutainers y las instrucciones para su uso se encuentran en el Apéndice IVa. Se DEBE coordinar el envío. Se solicita dejar mensaje en el teléfono de contacto laboral y el celular provisto, así como el envío de un correo electrónico.

10. Dr. Phil Morin, NOAA/NMFS/Southwest Fisheries Science Center, Population Identification Program: 8604 La Jolla Shores Drive, La Jolla, CA 92037-1508. Teléfono: 858-546-5620. E-mail: Phil.morin@noaa.gov; y, Dr. Kim Parsons, National Marine Mammal Laboratory, Alaska Fisheries Science Center/NOAA: 7600 Sand Point Way, N.E., Seattle, WA 98115-6349. Teléfono: (206)-526-4041. E-mail: Kim.Parsons@noaa.gov.

- **Muestra de piel para análisis genéticos.** Biopsia por punción o extracción de piel incluyendo epidermis e hipodermis. Colocar las muestras en solución salina DMSO y refrigerar o envolver en foil de aluminio y congelar.

11. Dr. Sal Frasca, Connecticut Veterinary Medical Diagnostic Laboratory, Department of Pathobiology and Veterinary Science, University of Connecticut: 61 North Eagleville Road, Storrs, CT 06269-3089. Teléfono: 860-486-1138. Email: salvatore.frasca@uconn.edu.

- **Muestras de tejidos para ensayos de aislamiento de *Mycoplasma spp.*** Se deberán tomar hisopados o muestras de tejidos frescos en forma aséptica de niveles representativos del sistema respiratorio, incluyendo el espiráculo, laringe, tráquea, bifurcación traqueal, pulmones, ganglios linfáticos mediastínicos, oído medio y orificio genital/tracto urogenital. Los hisopados deben enfriarse y enviarse vía courier.

12. John Pierce Wise, Sr., Ph.D. Director, Center for Integrated and Applied Environmental Toxicology, Associate Professor of Toxicology and Molecular Epidemiology, Bioscience Research Institute, University of Southern Maine: 178 Science Building 96, Falmouth Street, Portland, ME 04103. Teléfono: 207-228-8047. Email: WiseLab@usm.maine.edu.

- **Muestras frescas de tejidos para su cultivo y estabilización (inmortalización) para estudios toxicológicos posteriores, muestras para su almacenamiento en el archivo de células de mamíferos marinos para su uso por otros investigadores autorizados.** Se solicita tomar la piel (con dermis), riñón, hígado, bronquios, testículos/ovarios y cerebro de todos los animales jóvenes y llamar para recibir instrucciones acerca de su almacenamiento y envío.

13. Ms. Gina Ylitalo, NOAA Fisheries / Northwest Science Center: 2725 Montlake Boulevard, East Seattle, WA 98112. Teléfono: 206-860-3325. E-mail: Gina.Ylitalo@noaa.gov.

- **Muestras de hígado, riñón, grasa con piel, músculo esquelético, bilis y heces (investigación de contaminantes).** Se solicita registrar la especie, edad, ubicación y fecha. Envolver las muestras de 30-50g en foil de aluminio o colocar en recipientes de vidrio apropiados y luego congelar a -20°C para enviar sobre hielo seco (Apéndice IX).

14. Dr. Doug Dasher, University of Alaska Fairbanks: 905 N. Koyukuk, 245 O'Neill Building, P.O. Box 757220, Fairbanks, AK 99775-7220. Teléfono: 907-474-6840.
E-mail: dhdasher@alaska.edu.

- **Muestras de músculo esquelético para detección de los radionucleótidos Cs 137 y Cs 134.** Tomar **1kg** de músculo esquelético dorsal y congelar (-20°C es adecuado) en una bolsa Ziploc o Whirl-pak®. Utilizar guantes limpios y mantener la muestra libre de arena o sedimento. Enviar congelada para su análisis.

15. Dr. Dawn Noren, Research Fishery Biologist, NOAA NMFS: Northwest Fisheries Science Center, Seattle, WA. Teléfono laboral: 206-302-2439. Celular: 206-423-0215.
E-mail: dawn.noren@noaa.gov.

- **Muestra de músculo esquelético para medición de mioglobina en músculo y su capacidad para buferar ácidos** (para evaluar la variabilidad en la bioquímica del músculo y la evolución de la capacidad de buceo con el desarrollo y entre diferentes ecotipos). Tomar muestras de músculo de cadáveres de todas las edades en condiciones frescas (Código 2). Las muestras deben tomarse de la región central del músculo locomotor primario (*m. longissimus dorsi*). La ubicación del sitio de muestreo es debajo del lugar de inserción anterior de la aleta dorsal. Las muestras (en bloques de 3x3) deben envolverse completamente en foil de aluminio, colocarse en bolsas Ziploc y congelar inmediatamente luego de su recolección.

APÉNDICE IVB: Solicitud de Muestras *Post Mortem* de Mamíferos Marinos

Nombre _____
Fecha de pedido _____
Institución _____
Domicilio _____
Teléfono laboral (____) _____
Celular (____) _____
Fax (____) _____
Email _____

Todas las muestras deben ir acompañadas de una descripción de dos a cinco páginas de los ensayos que se llevarán a cabo, incluyendo antecedentes, muestras solicitadas, forma óptima de recolección y conservación, forma de envío, plazo de análisis de las muestras y su integración en estudios ecológicos a largo plazo. Este material, junto con los permisos y CV de los investigadores deberán ser provistos a los Drs. Hanson y Ford (Información de contacto en la próxima página).

Muestras solicitadas

Finalidad del estudio _____

Duración del estudio (fechas de inicio y conclusión) _____

Instrucciones para la preparación de la muestra _____

Instrucciones de envío (¿Permisos? ¿Hielo seco? ¿Envío en el día? ¿Pago en destino?) _____

Instrucciones especiales:

Dr. Brad Hanson, NOAA/NMFS/Northwest Fisheries Science Center: 2725 Montlake Blvd. E, Seattle, WA 98112. Teléfono laboral: 206-860-3220. Fax: 206-860-3475.
Celular: 206-300-0282. Email: Brad.Hanson@noaa.gov.

Dr. John Ford, Fisheries and Oceans Canada, Pacific Biological Station: 3109 Hammond Bay Road, Nanaimo, BC, Canada V9T 6N7. Teléfono laboral: 729-8375. Fax: 250-756-7053.
Email: john.k.ford@dfo-mpo.gc.ca

APÉNDICE V: Consideraciones sobre Permisos y Autoridades

Los mamíferos marinos se encuentran protegidos internacionalmente por diversos tratados. La acción al notificarse de un varamiento debe comenzar contactando a las autoridades competentes.

En los Estados Unidos, los mamíferos marinos se encuentran protegidos por el Marine Mammal Protection Act y el Endangered Species Act. En Canadá, las orcas se encuentran contempladas en el Species at Risk Act (SARA).

El envío internacional de muestras y materiales debe cumplir con los requisitos de la Convención Sobre el Comercio Internacional de Especies Amenazadas de Fauna y Flora Silvestres (CITES) así como también del US Department of Agriculture/ Animal and Plant Health Inspection Service (USDA/APHIS). Además, se requiere de una serie de permisos para los envíos internacionales.

USA: NOAA Office of Protected Resources (OPR) <http://www.nmfs.noaa.gov/pr/>
Dr. Teri Rowles. Teri.Rowles@noaa.gov (301) 713-2322 x-178 Líneas de contacto para varamientos: <http://www.nmfs.noaa.gov/pr/health/networks.htm>

CITES: <http://www.cites.org/common/cop/15/doc/E15-30-01T.pdf>

USDA/APHIS: <http://www.aphis.usda.gov/>

US Fish and Wildlife Service: <http://www.fws.gov/>

CANADA: Fisheries and Oceans Canada, <http://www.pac.dfo-mpo.gc.ca/fm-gp/species-especies/mammals-mammiferes/index-eng.html>

Paul Cottrell, DFO Marine Mammal Coordinator (604) 666-9965

SARA: http://www.sararegistry.gc.ca/default_e.cfm

CITES: <http://www.dfo-mpo.gc.ca/acts-lois/cites-eng.htm>

DFO Línea de contacto y acción sobre mamíferos marinos (British Columbia): (800) 465-4336

APÉNDICE VI: Lista de Patógenos y Muestras de Tejidos para Ensayos de Reacción en Cadena de la Polimerasa

A continuación presentamos la lista de patógenos que pueden detectarse por medio de la reacción en cadena de la polimerasa. Estos ensayos pueden realizarse sobre tejidos recolectados en animales dentro de las categorías código 1 y 2 y en *algunos casos* código 3. Diversos laboratorios realizan estos estudios.

Patógeno	Tejidos
Adenovirus	Nódulo linfático, bazo, pulmón, hígado
Apicomplexa	Diafragma, músculo esquelético, lengua, cerebro, nódulo linfático, hígado, corazón
<i>Bartonella sp</i>	Nódulo linfático, bazo, pulmón, hígado, cerebro
<i>Brucella spp</i> , variante de mamíferos marinos	Nódulo linfático, bazo, pulmón, cerebro, líquido céfaloraquídeo, útero/testículos, líquido amniótico
Virus de moquillo canino (Canine distemper virus)	Nódulo linfático, bazo, pulmón, cerebro
Viruela de cetáceos (Cetacean pox; orthopox virus)	Piel, pulmón, bazo
Morbillivirus de delfines	Nódulo linfático, bazo, pulmón, cerebro
Calicivirus, marino	Heces, intestino delgado, lesiones en la piel
<i>Chlamydophila psittaci</i> -Aviar	Nódulo linfático, bazo, pulmón, cerebro
<i>Chlamydophila abortus</i> –Ovino	Nódulo linfático, bazo, pulmón, cerebro
Circovirus	Nódulo linfático, bazo, pulmón, cerebro
<i>Clostridium</i> genotipificación (toxina)	Intestino delgado y grueso, aislamiento bacteriano
<i>Clostridium piliforme</i> –Enfermedad de Tyzzer	Intestino o hígado
Coronavirus consenso (Coronavirus consensus)	Intestino, hígado, cerebro
<i>Coxiella burnetii</i>	Nódulo linfático, bazo, pulmón, cerebro, placenta
<i>Cryptococcus gattii</i>	Aislamiento, genotipificación
<i>Cryptosporidium parvum</i>	Intestino delgado, heces
Enterovirus	Intestino delgado, corazón, pulmón, cerebro
<i>Erysipelothrix rhusiopathiae</i>	Nódulo linfático, bazo, pulmón, cerebro, ascites
<i>Escherichia coli</i> genotipificación - Bovina/Porcina	Aislamiento bacteriano
Filovirus consenso (Filovirus consensus)	Cerebro, pulmón, bazo, nódulos linfáticos
Flavivirus	Cerebro, pulmón, bazo, nódulos linfáticos
Hongos - Universales	Aislamiento fúngico
<i>Giardia lamblia</i>	Heces, intestino delgado
<i>Helicobacter spp</i>	Estómago, compartimento glandular
Hepatitis A,B y C	Hígado
Hepatovirus	Hígado
Herpesvirus – Universal (consensus)	Nódulo linfático, bazo, pulmón, cerebro, hígado, glándula adrenal
Virus de Influenza – Universal	Nódulo linfático, bazo, pulmón, cerebro
<i>Leptospira</i> (multivalente)	Hígado, riñón

<i>Listeria monocytogenes</i>	Cerebro, bazo, nódulo linfático, pulmón
<i>Morbillivirus</i> - Universal	Nódulo linfático, bazo, pulmón, cerebro
<i>Mycobacterium</i> - Universal	Nódulos linfáticos, bazo, pulmón, cerebro
<i>Mycobacterium avium</i>	Intestino, nódulos linfáticos mesentéricos, heces
<i>Mycobacterium paratuberculosis</i>	Intestino, nódulos linfáticos mesentéricos, heces
<i>Mycoplasma (Mollicutes)</i> - Universal	Nódulos linfáticos, bazo, pulmón, oviducto, placenta, narinas
<i>Neospora caninum</i>	Nódulos linfáticos, bazo, pulmón, cerebro
<i>Nocardia</i> - Universal	Piel, pulmón, nódulos linfáticos, bazo
Papilomavirus- universal	Piel, prepucio, vulva, gingiva, lengua
Virus de Parainfluenza	Pulmón, nódulos linfáticos, bazo
Paramixovirus	Pulmón, cerebro, nódulos linfáticos, bazo
Parapoxvirus-consensus	Pulmón, piel, genitales
Picornavirus	Páncreas, intestino delgado
Viruela (Poxvirus)	Piel, prepucio, vulva, gingiva, lengua
Reovirus	Pulmón, intestino delgado, hígado, nódulos linfáticos
Retrovirus-consensus	Nódulos linfáticos, sangre entera, bazo, pulmón,
Rhabdovirus	Cerebro, nódulos linfáticos, bazo, pulmón
Rotavirus	Intestino delgado
<i>Sarcocystis spp</i>	Nódulos linfáticos, bazo, pulmón, cerebro, músculo esquelético, diafragma, lengua
<i>Sarcocystis neurona</i>	Nódulos linfáticos, bazo, pulmón, cerebro, músculo esquelético, diafragma, lengua
<i>Salmonella</i>	Intestinos, heces, aislado
<i>Streptococcus</i>	Aislado
<i>Toxoplasma gondii</i>	Nódulos linfáticos, lengua, hígado, pulmón, cerebro
<i>Trichinella spp</i> consensus	Lengua, diafragma
Virus del Nilo Occidental (West Nile virus)	Cerebro, pulmón, nódulos linfáticos, bazo
Virus de la Encefalitis Equina del Oeste	Cerebro, nódulos linfáticos, bazo, pulmón

APÉNDICE VII: Protocolo para Muestreo de grasa de Mamíferos Marinos

Muestreo de Tejidos para Análisis de Contaminantes Químicos

Los insumos necesarios para el muestreo incluyen:

- Cuatro láminas de Teflon enjuagadas en solvente de 30 x 33 cm, viales con tapa a rosca de Teflon de 17 mL enjuagados con solvente para muestras de sangre y viales de vidrio color ámbar de 4 mL para muestras de bilis.
- Cuatro bolsas Whirl-pak® de 500 g (11 x 22 cm) o bolsas Zip-Lock.
- Lapiceros y marcadores.

Protocolo de Muestreo:

- La prioridad de muestreo debe ser la siguiente: grasa completa con piel, hígado, músculo, sangre (siempre que sea posible) y bilis.

Procedimiento para recolección de grasa: es de suma importancia el seguimiento de un procedimiento estandarizado de muestreo de modo que incluso en casos de niveles bajos de contaminantes, las diferencias obtenidas se deban a procesos biológicos y la exposición a los químicos y no debido al procedimientos de muestreo empleado. Los siguientes pasos son esenciales para evitar la contaminación cruzada de los tejidos del animal y asegurar la uniformidad en el muestreo.

1. Recolectar la grasa en todo su espesor y con la piel adherida, siempre que sea posible. Esto reducirá variaciones causadas por posibles diferencias en la composición de los tejidos de un mismo animal. A su vez, esta forma de muestreo provee muestras uniformes e información comparable en forma directa de todas las organizaciones que participan de los ensayos en base a la demografía de los animales. Tamaño de la muestra: 10 – 20 g de grasa. NOTA: por favor recolectar el espesor total de la grasa de la región dorsal (detrás de la aleta dorsal).
2. Siempre que sea posible, enjuagar todos los instrumentos con alcohol isopropílico antes de la toma de cada una de las muestras de grasa. De este modo se minimiza la contaminación cruzada de los tejidos.
3. Mantener las muestras a la menor temperatura posible luego de su recolección. Algunos de los contaminantes orgánicos son volátiles o son degradados por compuestos que se liberan durante la muerte celular. A su vez, se pueden perder lípidos (por ejemplo por lixiviación) si las muestras no se mantienen a la menor temperatura posible. Para minimizar los cambios en el nivel de contaminantes y lípidos debido a estos procesos, las muestras deben mantenerse sobre hielo luego de realizar la necropsia y se deben congelar en el menor tiempo posible en

un freezer a -20°C o temperaturas inferiores (por ejemplo, -80°C). Para el análisis de ácidos grasos, las muestras deberán conservarse en freezer a -80°C.

Para la toma de muestras de tejidos, se recomienda utilizar un cuchillo de acero inoxidable y realizar la limpieza y desinfección del mismo con alcohol entre necropsias de distintos animales. Las muestras deben envolverse en una lamina de Teflon pre enjuagada o en un vial pre enjuagado y colocarse en bolsas Whirl-pak[®] or a Ziploc rotuladas.

Cada bolsa deberá rotularse con los siguientes datos:

- Número de Identificación del Animal
- Especie
- Tipo de Tejido
- Fecha de Recolección

Antes de sellar las bolsas se debe intentar eliminar todo el aire que sea posible.

Las muestras deben colocarse en hielo y congelarse a la menor temperatura posible dentro del lapso mas corto de tiempo.

Se deberá proveer con las muestras una copia completa del reporte de la necropsia.

Envío de Muestras:

Enviar las muestras en hielo o aproximadamente 2-3 kg de hielo seco, lo antes posible via FedEx a: Gina Ylitalo/Jennie Bolton, NWFSC, ECD, 2725 Montlake Blvd. E., Seattle, WA 98112-2097.

Se deberá proceder a contactar a Gina (206-860-3325) o Jennie (206-860-3359) el mismo día en que se realiza el envío de las muestras y proveer el número de envío para realizar el rastreo de las mismas.

**Marine Mammal Tissue Contaminant Analyses Environmental Conservation Division,
Northwest Fisheries Science Center**

**National Marine Fisheries Service, National Oceanic and Atmospheric Administration
2725 Montlake Blvd. East, Seattle, WA 98112-2097
Phone: (206) 860-3325, FAX (206) 860-3335**

APÉNDICE VIII: Muestreo para Análisis de Contaminantes

OBJETIVOS: Obtener muestras de tejidos relativamente frescas de modo de determinar la concentración de diversos contaminantes.

FUENTES APROPIADAS DE MUESTRAS

Todos los animales Código 2 (muerte reciente) y material obtenido de la necropsia.

PROTOCOLO DE MUESTREO

1. Obtener 50- 75 g (se requiere un mínimo de 10g para realizar los análisis básicos) de los siguientes tejidos:
Piel Riñón Corazón
Grasa Hígado Cerebro
Músculo Pulmón Testículos/Ovarios
2. Para análisis de metales: Colocar las muestras en bolsas para toma de muestras Whirl-pak[®] o tubos cónicos (LAS MUESTRAS NO DEBEN TOMAR CONTACTO CON FOIL DE ALUMINIO).
3. Para análisis de contaminantes orgánicos: Utilizar viales de vidrio color ámbar enjuagados con hexano (LAS MUESTRAS NO DEBEN TOMAR CONTACTO CON PLASTICOS)
4. Rotular con el número de identificación del animal y el tipo de tejido.
5. Las muestras deben congelarse de forma inmediata (en lo posible a -80°C).

Muestras Adicionales

Para análisis genéticos: colocar 2 g de tejido en un vial plastic de 2 mL. Rotular y congelar a -20°C.

PROTOCOLO DE ENVIO

1. Enviar con hielo seco (método de preferencia) en una conservadora de telgopor en el menor tiempo posible luego de la recolección y utilizando el método de envío mas rápido. Se solicita llamar a los contactos listados de forma inmediata para comunicar que las muestras se encuentran en camino. Se acepta el envío de muestras durante los fines de semana aunque en dichos casos deberá contactarse al destinatario para solicitar la dirección postal para envíos fuera de la semana laboral.
2. Se debe enviar junto con las muestras una copia de toda la documentación oficial requerida (por ejemplo, NMFS Nivel A en caso de varamientos, Formularios de Cosecha de Subsistencia, u otros documentos oficiales que correspondan) detallando la persona que

realizó la recolección, la locación, circunstancias del incidente y la información del animal. (El permiso NMFS que poseemos, requiere los datos del recolector y origen de todas las muestras).

3. En caso de utilizar FedEx, contamos con el siguiente número de cuenta: 2546-3232-5.
4. Las muestras deberán enviarse a: Wise Lab, 476 Science Bldg, 96 Falmouth St, Portland, ME 04103.

INFORMACIÓN DE CONTACTO

Para obtener la información de contacto dirigirse a nuestro sitio web:

<http://www.usm.maine.edu/toxicology/research/nmcl.html>

Sandy Wise. Teléfono 207-228-8047. E-mail: swise@usm.maine.edu

APÉNDICE IX: Muestreo para Análisis de Biotoxinas

Insumos

* Muestras de tamaño normal: tubos plásticos de centrifugación de 50 mL u otros tubos plásticos.

* Muestras de gran tamaño: bolsas sellables Ziploc o botellas

Peces presa

En la medida de lo posible, la especie debe ser identificada en forma previa a su congelación. Los peces pequeños deben recolectarse enteros y congelarse. Aquellas especies de mayor tamaño, contenido estomacal (estómago entero), hígado y carne deberán recolectarse y congelarse en forma separada. Todos los tejidos pueden colocarse en bolsas Ziploc, a -20°C hasta el momento de su envío en hielo seco.

Mamíferos

Se considera de mayor valor el muestreo de animales Código 1 o 2. Sin embargo, se pueden utilizar animales Código 3 y en estado más avanzado de descomposición para el análisis de toxinas.

Los tejidos y fluidos de mayor utilidad para confirmar la exposición a biotoxinas son generalmente las heces, hígado, orina y contenido estomacal. Sin embargo, las muestras de contenido intestinal, riñón, pulmón, cerebro, sangre completa y suero, también resultan de valor dependiendo de las toxinas de interés y son útiles para estudios del metabolismo y carga orgánica de los animales. Todas las muestras deben colocarse en conservadoras con hielo y congelarse (-20°C o -80°C) lo antes posible luego de su recolección. El envío de las muestras al laboratorio para análisis debe ser sobre hielo seco. Se deberá contactar al laboratorio de destino antes de realizar el envío de modo de asegurar una adecuada recepción de las muestras y de la información asociada.

Todos los recipientes que contengan muestras deberán rotularse con marcador indeleble, indicando el número de identificación del animal y tipo de muestra. Los rótulos deberán permanecer legibles aún cuando se mojen. En caso que esto no sea posible, se puede considerar insertar dentro del contenedor de la muestra, un rótulo pequeño con la información. Cada envío debe ir acompañado de una copia de la hoja de información NOAA nivel A. En caso de no contar con este formulario, se deberá incluir con las muestras la siguiente información: especie y nombre común, fecha de varamiento (típicamente será el dato de su avistaje inicial), localización (latitud/longitud expresada en sistema decimal) longitud del animal, peso, código de la condición en que se encuentra, sexo y cualquier otra información que se considere relevante. A su vez, se deberá enviar una versión digital de las planillas de datos y muestreo al contacto indicado en el laboratorio de recepción. Se deben incluir los números de identificación alternativos en aquellos casos en que exista más de un número de identificación para un mismo animal. Los números de identificación deben ser consistentes con aquellos enviados a la base de datos nacional de

varamientos. A continuación se presenta una lista sugerida (pero no necesariamente requerida) de envases para muestras y los volúmenes a tomar de las mismas.

Orina – Tomar un mínimo de 1 mL de orina o mayor cantidad si se encuentra disponible (hasta 5 mL). Almacenar congelada (-20°C) en tubos plásticos de centrifugación con tapa.

Heces – Tomar un mínimo de 5 g (hasta 50 g). Almacenar congelada (-20°C) en tubos de centrifugación con tapa u otro contenedor que tolere en freezer.

Contenido intestinal – Tomar un mínimo de 5 g (hasta 50 g). Almacenar congelado (-20°C) en tubos plásticos de centrifugación u otro contenedor adecuado para almacenamiento congelado. Indicar qué porción de intestino fue muestreada (por ejemplo, intestino superior, medio o inferior). La bilis también resulta útil para el análisis de toxinas lipofílicas.

Contenido estomacal – Tomar un mínimo de 5 g (hasta 50 g) de muestra sólida o semi-sólida si se encuentra disponible. Almacenar congelada (-20°C) en tubos plásticos de centrifugación con tapa u otro recipiente apto para conservación en freezer. Si sólo se encuentra disponible el líquido estomacal, tomar una muestra de un mínimo de 5 mL en un tubo plástico o vial. Indicar qué porción del estómago fue muestreada si se puede (por ejemplo, pilórica, fúndica, etc.). Si el estómago contuviera material sin digerir o digerido parcialmente, se solicita muestrear de forma separada del fluido gástrico. La presencia de especies presa o cualquier registro de contenido estomacal son de gran valor para la interpretación de los análisis.

Hígado, riñón, pulmón, bazo, cerebro – tomar una muestra de un mínimo de 5 g (hasta 50 g). Almacenar congelada (-20°C) en tubos plásticos, bolsas Ziploc o cualquier otro recipiente a prueba de derrames.

Suero – obtener el suero por centrifugación (1500-3000 x g; 5 minutos) de sangre entera heparinizada. La capa superior será el suero. Tomar una muestra mayor a 0,5 mL de suero y almacenar congelada (-20°C) en un tubo plástico.

Sangre entera – La sangre entera heparinizada puede aplicarse directamente sobre tarjetas de papel de filtro (FTA Whatman Cards) y almacenarse a temperatura ambiente en presencia de material desecante. Las Tarjetas FTA con sus instrucciones detalladas pueden obtenerse por pedido del contacto en el Marine Biotoxins Program laboratory. Si no cuenta con estas tarjetas, puede muestrear la sangre entera en forma líquida.

**Por favor tener en cuenta que si las muestras serán utilizadas para analizar la presencia de múltiples toxinas marinas, será necesario extraer una mayor cantidad de las mismas.*

APÉNDICE X: Recursos en la Web Para Formularios de Envío de Muestras

NVSL: http://www.aphis.usda.gov/library/forms/pdf/VS_Form10_4.pdf

Laboratorio CAHFS:

http://cahfs.ucdavis.edu/local-assets/pdfs/StandardSubmissionForm_6-13.pdf

UC Davis Marine Mammal Diagnostic: <http://www.vetmed.ucdavis.edu/whc/mehds/>

Connecticut Diagnostic Lab:

<http://cvmdl.uconn.edu/forms/CVMDL%20Submission%20Form.pdf>

APÉNDICE XI: Instrucciones y Consideraciones Para la Toma de Fotografías

La toma de fotografías permite al observador la posibilidad de compartir lo visto. Una vez que el cadáver ha sido cortado, las imágenes del examen del animal se pierden. La toma de imágenes digitales permite documentar en forma rápida la presencia de lesiones o cambios que permitirán su discusión y consulta en forma posterior. En el peor de los casos, las imágenes pueden tomarse con un teléfono celular con cámara. El método de preferencia es la toma de imágenes con una cámara digital que cuente con 1-3 tarjetas de memoria de forma de tomar numerosas imágenes en archivos de gran tamaño.

Reglas generales:

1. Fotografiar la aleta forsal, region ocular y cualquier otra característica que permita identificar al animal (cicatrices, coloración, etc.).
2. Comenzar tomando **imágenes identificadoras** del caso que permitan su reconocimiento en forma posterior.
3. Tomar una **serie de imágenes externas** para registrar la condición del cadáver y su ubicación en forma previa al inicio del examen.
4. Incorporar a la fotografía elementos que permitan **fixar una escala** – preferentemente una regla, aunque un rotulador, moneda o incluso una mano con guante servirán para demostrar el tamaño del material fotografiado.
5. Colocar los elementos que indican la escala **al lado** del material fotografiado. No colocar sobre el material ya que no deben obstruir lo fotografiado.
6. Tomar imágenes **panorámicas** en primera instancia y luego en **forma cercana** de modo que las lesiones puedan verse claramente e integrarse al contexto en que se encuentran.
7. Tomar imágenes **antes de iniciar la toma de muestras** – en caso de olvidar la toma de imágenes inicial, proseguir con las tareas y fotografiar todo el procedimiento del modo más completo posible.
8. **Quitar la sangre/arena y otros elementos** que obstaculicen la toma de fotografías de modo de obtener una imagen lo más despejada posible.
9. Comprobar que la imagen tomada se encuentra **en foco** antes de continuar con el trabajo.
10. Tomar imágenes de toda la superficie externa, la boca, los genitales, el tórax, el abdomen, contenido gástrico y todo lo que se observe fuera de lo normal.
11. Descargar y rotular las imágenes dentro de las 24 hs de realizada la necropsia. El examen no se considera finalizado hasta que se realiza este paso.
12. Ajuste de fotografías a considerar luego de la necropsia:
 - Ajuste de brillo o contraste
 - Recorte de la imagen
 - Modificación de los colores de fondo
 - Quitar exceso de reflejo

Nota: Al final del presente documento, se adjunta un identificador de fotografías para que Ud. pueda cortar y utilizar como escala y para identificar las fotos. Se recomienda imprimir y plastificar o colocarlo en una bolsa plástica para facilitar su uso y limpieza.

APÉNDICE XII: Instrucciones Para la Toma de Imágenes Complementarias

Imágenes por Tomografía Computada (TC)

La toma de imágenes por TC es indicada para detectar evidencias de lesiones óseas, torácicas, acumulaciones anormales de gas o examinar tejidos blandos. Es importante tener en cuenta el código del cadáver y deben tomarse las precauciones adecuadas en caso de observar autólisis o descomposición (incluso histológica) con acumulación de gas.

Los equipos de TC poseen limitaciones. Generalmente el peso máximo de las mesas es de 136 kg (330lb) aunque existen mesas adaptadas para soportar pesos mayores en algunas universidades de Cs. Veterinarias. El diámetro de la abertura del túnel también puede presentar una limitación ya que generalmente es de entre 80 y 90cm de ancho (aunque existen algunas de mayor tamaño) pero la altura es menor al ancho debido a la mesa, lo cual reduce el espacio disponible a 60 cm. Es importante recordar que el cuerpo no puede tocar la boca del aparato durante el escaneo (debe haber un pequeño espacio de aire para la toma de una buena imagen). Es importante tomar en cuenta estas limitaciones de peso y espacio previamente a la realización de las imágenes. En el caso de cadáveres pequeños, la remoción de la aleta dorsal permitiría una evaluación completa de todo el cuerpo. En animales de mayor tamaño puede ser necesaria la decapitación para poder lograr un escaneo de la cabeza.

Protocolo para escáner de múltiples cortes:

- Espesor de corte de 0.5mm a través de cada oído, modo de escaneo axial, algoritmo de reconstrucción ósea únicamente
- Espesor de corte de 3mm a través de la cabeza y 3-5mm de espesor a través del tórax y abdomen utilizando algoritmos de reconstrucción ósea y de tejidos blandos. Se puede utilizar el modo de escaneo helicoidal con factor de paso equivalente a 1.4-1.7 de escáner de un solo corte.

Protocolo para escáner de un sólo corte:

- Espesor de corte de 1mm a través de cada oído (de ser posible) o en los dos oídos en forma simultánea, algoritmo de reconstrucción ósea únicamente
- Espesor de corte de 3mm a través de la cabeza y 3-5mm de espesor de corte a través del tórax y abdomen utilizando algoritmos de reconstrucción ósea y de tejidos blandos. Se puede utilizar el modo de escaneo helicoidal con factor de paso 1,4-1,7

APÉNDICE XIII: Consideraciones Sobre Derrames de Petróleo y Muestreo

Los derrames de petróleo pueden involucrar una gran variedad de especies marinas, incluyendo las orcas. Si bien estos animales poseen la capacidad de nadar y alejarse de las zonas de derrame, en el caso de derrames de gran dispersión el impacto se verá en el agua y la calidad y condición del alimento de las orcas. La duración de los efectos de un derrame pueden prolongarse por un largo tiempo, de modo que en caso de hallar orcas varadas en zonas donde hay, hubo o se sospecha de derrames de petróleo, deben realizarse determinaciones específicas para su evaluación. El reporte y la asistencia en caso de derrames se encuentran disponibles durante las 24 hs los 7 días de la semana por la siguiente vía:

<http://www.vetmed.ucdavis.edu/owcn/>

Este sitio web provee información sobre las personas a contactar y los formularios para la toma de muestras así como la cadena de custodia para aquellos derrames producidos en EEUU.

IMPORTANTE: NO ingresar en zonas de derrame de petróleo si no posee el entrenamiento y equipo de protección personal adecuados.

La respuesta a los derrames de petróleo se considera una acción de investigación y las tareas deben ser realizadas por:

1. Personal con conocimiento sobre las medidas de protección relativas al petróleo y los derrames
2. Personas con conocimiento y habilidades para la recolección de evidencias
3. Un equipo de personas interesada en el estudio de los derrames de petróleo, sus efectos y el estado de salud de las poblaciones de orcas en la zona de derrame

La medición de los efectos del petróleo y sus derivados así como los dispersantes comprenderá la medición de productos metabólicos y también tóxicos. Se deberán tomar múltiples muestras de tejidos en bolsas recubiertas de Teflon o foil de aluminio tal como lo indica el análisis a realizar, de modo de facilitar la evaluación posterior de las mismas. La documentación de las lesiones y condición del cadáver es de especial importancia en estos casos.

Para el manejo adecuado de las muestras tomadas a partir de un derrame de petróleo, es importante seguir las reglas establecidas para la cadena de custodia (CDC) de las mismas. Antes de registrar los muestreos es importante discutir la toma y registro con el responsable del manejo del derrame.

Si bien se encuentra en fase de borrador, la guía con los lineamientos de acción en casos de derrames de petróleo para mamíferos marinos en el NOAA, se encuentra disponible en el siguiente sitio web:

http://www.nmfs.noaa.gov/pr/pdfs/health/eis_appendixl.pdf

APÉNDICE XIV: Consideraciones y Muestreo en Varamientos de Orcas Vivas

Las orcas pueden vararse vivas y esto puede ocurrir en forma individual o masiva. En ambos casos se deben tomar precauciones para asegurar:

1. La protección de todas las personas en el área de seguridad y trato humanitario hacia las orcas
2. La recolección de muestras y datos en la mayor medida posible
3. La protección de las especies silvestres del lugar

El manejo de una varamiento vivo incluye los esfuerzos por mantener la temperatura de los animales y el mojado de los mismos, así como también la provisión de sombra y aseguramiento de su orientación adecuada en forma ventral de modo de facilitar la respiración. El manejo de estos eventos implica el desarrollo de un gran número de tareas debido al gran tamaño de los animales. La primera medida a tomar en un caso de un varamiento vivo es contactar a las autoridades locales a cargo de mamíferos marinos. El trabajo en equipo es fundamental para asegurar el éxito de los trabajos. Si bien el manejo de varamientos vivos excede al tema abarcado en el presente protocolo, la información acerca de la forma de proceder en estos casos se encuentra disponible en el libro de Geraci y Lounsbury de 2005, *Marine Mammals Ashore*.

Dos consideraciones importantes a tener en cuenta al momento de la toma de muestras:

1. Seguridad – las orcas son grandes y fuertes. Los trabajos deben realizarse teniendo en cuenta que aún cuando se encuentran varadas, las orcas pueden rotar en forma rápida y con gran fuerza.
2. Sensatez – Si se observa que el animal esta próximo a la muerte o se realizará una eutanasia, se deberá esperar y realizar la toma de muestras del cadáver fresco *post mortem*.

Dependiendo de la condición física del animal, las muestras y datos a tomar podrán incluir:

1. Medidas morfométricas – específicamente longitud total, altura de aleta dorsal, características de la aleta pectoral
3. Toma de imágenes (fotos) incluyendo aquellas que evidencien interacción humana – hélices, redes de pesca, embarcaciones
4. Toma de muestras de piel por raspaje para análisis genéticos
5. Toma de muestras de sangre – lo ideal será muestrear 50 mL e incluir 3 mL para Conteo Total de Células Sanguíneas y permitir la coagulación y separación del resto para realizar la recolección del suero. El suero será utilizado para estudios químicos y hormonales de la sangre mientras que el material restante se almacenará para evaluaciones posteriores adicionales
6. De ser posible se deberá recolectar sangre entera fresca para estudios inmunológicos – ver solicitudes de muestras - laboratorio de Jeff Stott.

7. Muestreo de lesiones – raspajes, hisopados para análisis microbiológico y molecular

Un comentario sobre la eutanasia:

Desgraciadamente existen circunstancias en las cuales es necesario llevar a cabo la eutanasia de los animales varados.

Estos casos incluyen:

- Lesiones incapacitantes como aquellas producidas por colisión con embarcaciones o heridas penetrantes y hemorragias significativas que no remiten
- Hipertermia e incapacidad de respuesta a los estímulos
- Ampollamiento masivo o descamación de la piel
- Pérdida de reflejos o tonicidad muscular

Es de suma importancia tener en cuenta que el procedimiento de eutanasia deberá ser rápido y completo con mínimas molestias para el animal en cuestión y la mayor seguridad para los demás animales en el área. Se debe contactar a las autoridades locales de respuesta a varamientos ya que es posible que posean un protocolo de eutanasia. Es probable que en algunos casos sea más humano permitir la muerte natural del animal que intervenir. Finalmente, se debe intentar minimizar el impacto sobre los especímenes a muestrear y completar el proceso de la forma más profesional posible.

Aquellas personas entrenadas podrán realizar la eutanasia mediante el uso de balística para evitar residuos de drogas en el animal varado. Sin embargo, este método no se recomienda en orcas de gran tamaño. En caso de utilizarlo, se deberá colocar una cortina, telón o pantalla para impedir la vista pública del procedimiento y tener en cuenta que el sitio de ingreso de la bala resulta crítico (ver debajo Harms et al., 2014).

La práctica de eutanasia con una sobredosis de barbitúricos es aceptable para orcas. El volumen de droga necesario deberá determinarse con exactitud y máximo cuidado de acuerdo con el tamaño del animal. Las orcas recién nacidas pesan entre 130-180 kg mientras que los adultos pesan aproximadamente 4500-7300 kg. Asimismo, debe considerarse el impacto de los residuos de estas drogas sobre los carroñeros y su vida media en el ecosistema acuático. La forma en que se realizará la disposición final del cadáver deberá considerarse al momento de definir el método de eutanasia. En caso de utilizar barbitúricos, el método de preferencia deberá ser la administración de un agente sedante en primer término y luego la droga por vía cardíaca (Geraci and Lounsbury, 2005). El uso de las venas periféricas o de la cola puede verse imposibilitado por retracción o shock vascular. Es importante considerar que si no se realiza la aplicación de un agente sedante previo a la realización de la eutanasia, el animal puede iniciar movimientos rítmicos de ascenso y descenso de la cola en forma vaivén. Estos movimientos pueden generar desplazamiento del animal respecto de su posición original.

Debido al gran tamaño de las orcas, es posible que los métodos de eutanasia desarrollado para ballenas barbadas sean los más apropiados para esta especie. Otros métodos de eutanasia emplean drogas como midazolam, acepromazina, y xylazina, seguidas de una solución saturada de KCL (Harms et al., 2014).

[Harms, C.A., W. A. McLellan, M. J. Moore, S. G. Barco, E. O. Clarke EO, V. G. Thayer and T. K. Rowles. 2014. Low residue euthanasia of stranded mysticetes. Journal of Wildlife Diseases 50:63-73.](#)

APÉNDICE XV: Protocolo de Extracción y Fijación de Oídos de Cetáceos

Introducción

Existe una creciente preocupación por el efecto de los sonidos antropogénicos debajo del agua y su impacto sobre las poblaciones de cetáceos. Por este motivo, el análisis de los oídos, específicamente la presencia de lesiones en el órgano de Corti son de suma importancia para evaluar las implicancias del trauma acústico en los varamientos. Estas lesiones no son detectables por las técnicas histopatológicas de rutina.

La dificultad radica en la obtención de material fresco, rápidamente fijado utilizando las soluciones apropiadas y en el acceso a la cochlea por métodos de decalcificación que no afecten las estructuras blandas del oído interno.

El Laboratorio de Bioacústica Aplicada(Laboratory of Applied Bioacoustics, LAB) ha desarrollado un protocolo para lograr una decalcificación rápida que puede utilizarse con las especies más comunes de odontocetos (ver Figura 1) y permite un diagnóstico veloz de trauma acústico.



Figura 1: Resultado de la decalcificación del hueso periótico de una marsopa (*Phocoena phocoena*) luego de una exposición rápida de 26 horas con el decalcificador RDO[®]. Mientras que otros métodos pueden demorar meses para lograr un resultado similar, el RDO[®] permite la obtención de resultados en muy corto tiempo.

COMPLEJO TIMPÁNICO-PERIÓTICO

Los huesos timpánicos y perióticos contienen al oído medio e interno, respectivamente. Estas estructuras se encuentran fusionadas en forma parcial formando el complejo timpánico-periótico (Figura 2). Este complejo se encuentra envuelto por senos aéreos llamados senos peribulares que se encuentran suspendidos en la cavidad peribullar mediante ligamentos que lo fijan y aíslan acústicamente del resto de los huesos del cráneo, excepto en los cachalotes y algunos zifios, que presentan al complejo timpánico-periótico fusionado parcialmente con el hueso temporal.

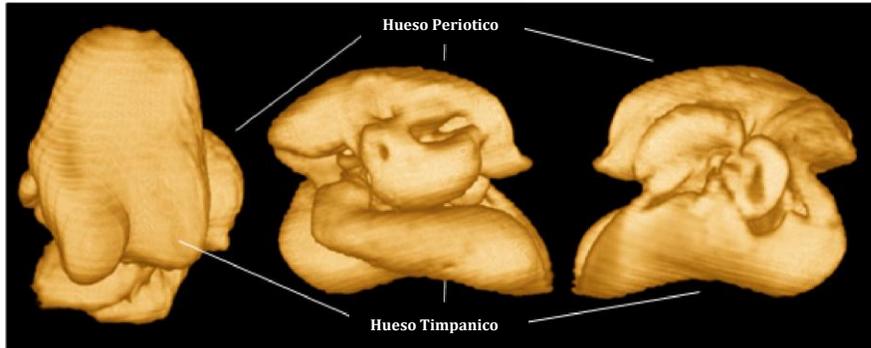


Figura 2.- Imagen de tomografía computarizada en 3D que muestran la reconstrucción del complejo timpánico-periótico de un delfín mular *Tursiops truncatus* en su vista ventral, medial y lateral de izquierda a derecha, respectivamente.

Extracción

1. En el caso de animales pequeños se recomienda remover la cabeza para facilitar la manipulación (Figura 3).

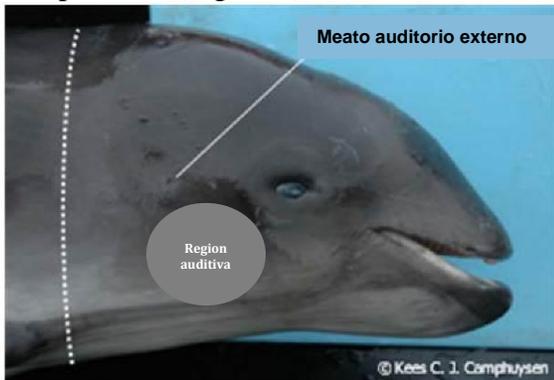


Figura 3.- En la figura se muestra la posición del complejo timpánico-periótico y el meatus auditivo externo. La línea de puntos indica el lugar de incision para la separación de la cabeza del resto del cuerpo. A su vez, se pueden extraer la laringe y sistema digestivo superior para facilitar el acceso a los oídos.

2. Considerando la localización del complejo timpánico-periótico (Figuras 3 y4), la forma mas efectiva de acceder a los oídos es mediante la cuidadosa remoción de la mandíbula inferior.



Figura 4.- Corte sagital de la cabeza de un delfín mular donde se indica la ubicación del complejo timpánico-periótico.

3. La ubicación de la cabeza en posición decúbito dorsal y remoción de los tejidos blandos y ligamentos (Figura 5) facilitan la extracción del complejo timpánico-periótico.



Figura 5.- Imagen tomada durante la necropsia de una *Phocoena phocoena* en la cual se observa la ubicación del complejo timpánico-periótico luego de la remoción de la mandíbula inferior (en esta toma se observa que no se ha realizado la limpieza de la zona de extracción).

4. Se debe realizar una incisión con un cuchillo pequeño bordeando al complejo timpánico-periótico (se puede utilizar un escalpelo para finalizar la extracción) cortando los ligamentos que mantienen los oídos en el seno paraótico (ver Figura 6).

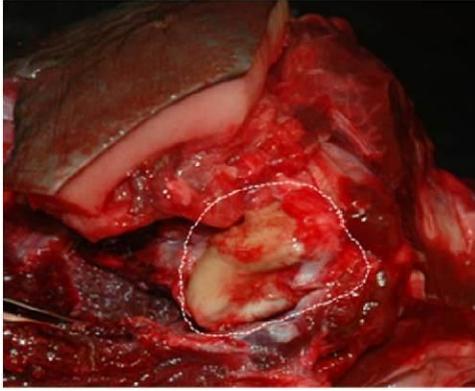


Figura 6.- Imagen tomada durante la necropsia de una *Phocoena phocoena*. La línea de puntos indica el lugar por donde deberá realizarse la incisión para extraer el complejo timpánico-periótico.

Fijación

El oído puede fijarse colocándolo en un solución fijadora, que puede ser glutaraldehído al 2.5% con buffer de cacodilato 0.1M, o buffer fosfato 0.1M (estas soluciones serán provistas). Asimismo, los oídos pueden inyectarse con una mezcla de paraformaldehído 0.5% con glutaraldehído 1% y buffer fosfato 0.1M o, inyectarse con formalina fosfatada y bufferada al 10%.

Para lograr los mejores resultados sugerimos seguir el protocolo de perfusión. En caso de estar familiarizado con este procedimiento, se podrá proceder a separar el hueso periótico del timpánico (Figure 7), cortando el ligamento stapedia y el estribo – si no se desprende fácilmente, se puede pasar el escalpelo en la unión, realizando un pequeño orificio superficial a través de las membranas redondeadas y oval utilizando un catéter suave. Finalmente, se debe introducir la solución fijadora (glutaraldehído 2.5% con buffer cacodilato 0.1M) de forma progresiva y lenta a través de la ventana oval (Figura 8).



Figura 7.- Localización de las ventanas redondeada y oval en el hueso periótico.

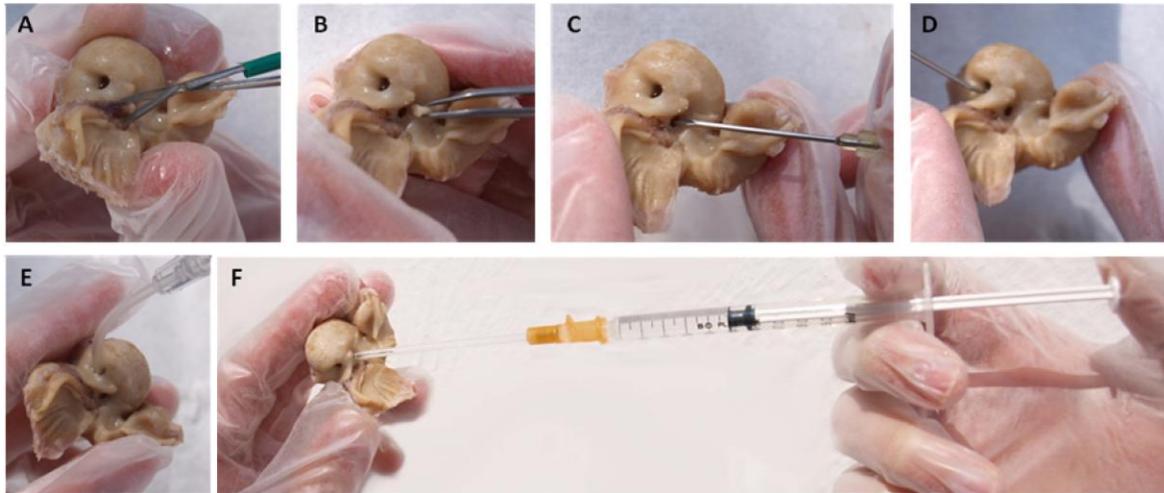


Figura 8. Hueso periótico de *Tursiops truncatus* utilizado para ilustrar el procedimiento de inyección: A) corte del ligamento stapedia ut, B) extracción del estribo, C y D) creación de un pequeño orificio en las membranas de la ventana redondeada y oval, respectivamente. E y F) perfusión progresiva y lenta (con muy poca presión) del fijador a través de las ventanas oval y redondeada. Continuar hasta que la solución salga desbordada.

Colocar los oídos en recipientes con líquido fijador (ver punto 6).

Contacto

Los oídos pueden enviarse por correo expreso a la siguiente dirección:

Stephen Raverty and Maria Morell
Animal Health Center
1767 Angus Campbell Road
Abbotsford., BC
CANADA, V3G 2M3

En caso de consultas, no dudar en contactar a Maria Morell en 604-445-2013 o 604-822-2373.
Email: morell@zoology.ubc.ca

APÉNDICE XVI: Consideraciones Sobre Barotrauma y Protocolo de Muestreo de Burbujas de Gas

Las siguientes instrucciones son un resumen del “Protocolo para Muestreo y Análisis de Burbujas de Gas en Mamíferos Marinos”. En caso de precisar mayor información se puede encontrar el artículo completo en el siguiente link:

<http://www.nature.com/protocolexchange/protocols/2299>

Material Necesario:

- 2-mL de un tubo de vidrio libre de aditivos (tubo para recolección de sangre Kendall Monoject™, ref: 301116)
- Soporte descartable BD Vacutainer® (ref: 364815)
- Aguja de dos puntas con barrera de goma en el extremo de punción del tubo (aguja para recolección de sangre BD Vacutainer® eclipse™, ref: 368607).
- Agujas de insulina descartables (BD Plastipak U-100 insulin, ref: 329651).

Disección:

1. Remover con cuidado la piel y grasa minimizando el daño a las venas subcutáneas.
2. Examinar las venas visibles y las venas subcutáneas más importantes para detectar burbujas de gas.
3. Muestrear las burbujas. *¹.

PASO CRÍTICO: Si se sospecha de neumotórax, el muestreo de gas podrá realizarse utilizando un Vacutainer® insertando la aguja de dos puntas entre las costillas*². No se debe abrir la cavidad torácica.

4. Abrir primero cuidadosamente la cavidad abdominal (se debe intentar no producir cortes en vasos sanguíneos medianos o grandes).
5. Examinar las venas mesentéricas y renales así como también el plexo lumbo-caudal para detectar posibles burbujas.
6. Tomar fotografías de las burbujas dentro de las venas.
7. Muestrear *in situ* el contenido de las burbujas utilizando jeringas de insulina*¹.
8. Observar cuidadosamente para detectar enfisema renal subescapular.
9. Muestrear el enfisema subescapular (gas) *in situ* utilizando un Vacutainer® ².
10. Muestrear gases intestinales utilizando un Vacutainer® ². Preferentemente tomar como mínimo tres muestras de diferentes zonas.
11. Abrir la cavidad torácica. Si se desea, se pueden desarticular las costillas excepto las primeras 3 o 4 craneales. Estas costillas deberán cortarse a 1/3 de la articulación vertebral.
13. Examinar las venas coronarias.
14. Tomar fotografías de las venas y de las burbujas.
15. Muestrear las burbujas*¹.
16. Continuar con el protocolo de necropsia de rutina.

PASO CRÍTICO: no cortar ninguna vena sistémica o muestrear órganos hasta llegar a este paso.

17. Separar la cabeza del cuerpo.

18. Se podrá desarticular la mandíbula para tener acceso a los sacos pterigoideos.

19. Muestrear los sacos pterigoideos utilizando un Vacutainer® *².

PASO CRÍTICO: no abrir los senos paranasales antes de realizar el muestreo de burbujas de gas.

*¹Muestreo de burbujas de gas en venas

PASO CRÍTICO: colocar la vena en agua siempre que sea posible para evitar su contaminación con el aire.

1. Muestrear cada burbuja con una nueva aguja descartable para insulina (BD Plastipak U-100 insulin)

2. Inyectar el contenido en un Vacutainer® nuevo cada vez.

3. Rotular el Vacutainer® con el volumen recuperado y la ubicación de la burbuja.

PASO CRÍTICO: utilizar una jeringa nueva y un Vacutainer® nuevo para cada burbuja.

*² Muestreo de gas de cavidades (intestinos, sacos aéreos pterigoideos) y de lesiones asociadas a burbujas de gas (neumotórax y enfisema subescapular)

1. Unir el Vacutainer® con la aguja de dos puntas

2. Insertar la aguja dentro de la cavidad

3. Presionar el Vacutainer® contra el otro extremo de la aguja

4. Dejar por unos segundos

5. Remover el Vacutainer®

6. Remover la aguja

PASO CRÍTICO: Si cualquiera de estos pasos no se realiza siguiendo la secuencia indicada, se producirá contaminación con aire atmosférico.

Almacenamiento y transporte

1. Almacenar las muestras a temperatura ambiente y presión atmosférica.

2. Almacenar tubos en blanco junto con las muestras: un tubo en blanco por muestra o un mínimo de tres tubos en blanco por animal.

3. Si las muestras requieren de traslado aéreo, deberán transportarse dentro de la cabina de pasajeros para evitar cambios en la presión atmosférica que podrían alterar los tubos de vacío. En caso contrario, utilizar un recipiente de almacenamiento resistente a presiones negativas (PREVCO™ subsea housing).

APÉNDICE XVII: Medición de Aleta Dorsal y Solicitud de Muestras

Antecedentes:

Las mediciones de la aleta dorsal y los tejidos que la rodean son requeridas para el desarrollo de métodos de colocación de rastreadores satelitales que forman parte de un estudio colaborativo. A continuación se presenta una lista de las muestras y datos solicitados en orden decreciente de importancia, teniendo en cuenta que muchas veces los recursos son limitados al momento de responder a un varamiento. Para mayor información se puede contactar a Greg Schorr (gschorr@cascadiaresearch.org, 206.931.4638), Robin Baird (rwbaird@cascadiaresearch.org, 425.879.0360), Russ Andrews (RussA@alaskasealife.org) o Brad Hanson (brad.hanson@noaa.gov, 206.300.0282).

Nota: para realizar este muestreo los animales deben ser de muerte reciente (frescos) o estar apenas descompuestos (código 2).

1. Recolección de aleta dorsal (máxima prioridad)

- Remover la aleta dorsal junto con una porción de 15cm anteriores, posteriores y laterales a la misma, llegando a la interfase vaina/músculo
- De ser posible, cubrir con ungüento A&D (o una grasa similar no derivada del petróleo) previo a la congelación. Si no es posible realizar esta operación, envolver en plástico y congelar.

Nota: Es posible que el receptor de las muestras provea al remitente un número de envío de FedEx (contactar a Brad Hanson), o que gestione un reintegro de gastos. Las conservadoras o cajas utilizadas para el envío pueden devolverse en caso de ser necesario.

2. Mediciones de grasa y músculo (prioridad media)

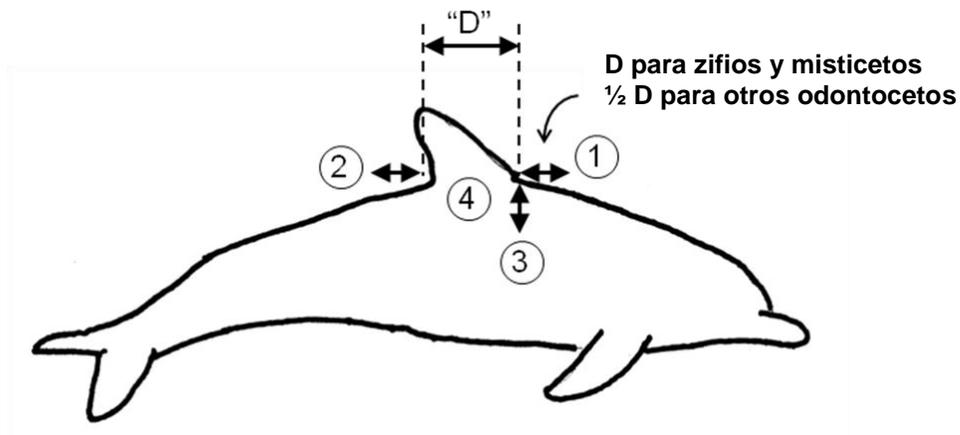
- Medir la longitud de la aleta dorsal desde los puntos de inserción anterior y posterior (ver figura 1, distancia “D”).
- Medir y registrar el espesor de la grasa y del músculo en los siguientes sitios:

Sitio 1: Desde el punto de inserción anterior de la aleta dorsal, medir la 1/2 de “D” hacia la cabeza.

Sitio 2: Desde el punto de inserción posterior de la aleta dorsal, medir la 1/2 de “D” en dirección caudal.

Sitio 3: En uno de los lados (el derecho o izquierdo, cualquiera que resulte más conveniente), medir la 1/2 de “D” desde el punto de inserción anterior lateralmente hacia la línea central.

Figura 1:

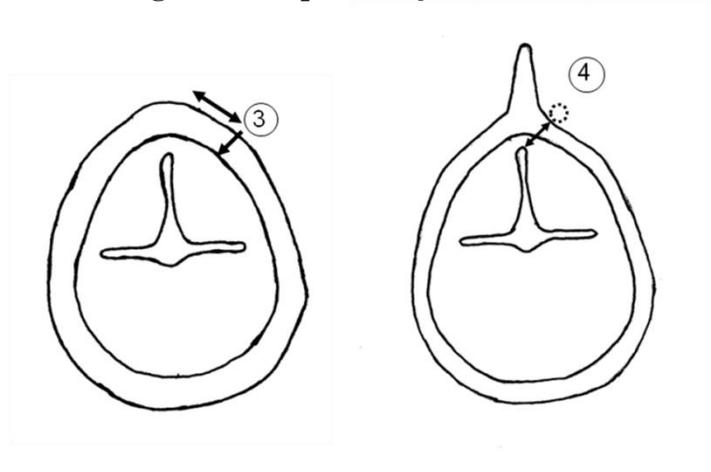


3. Distancia a la aleta dorsal (prioridad baja)

- Medir y registrar la distancia desde la epidermis a la aleta dorsal en los siguientes sitios (figuras 1 y 3):

Sitio 4: Medir $\frac{1}{2}$ de la longitud de la aleta dorsal entre los puntos de inserción anterior y posterior (figuras 1 y 3). Este sitio no debe ubicarse sobre la aleta dorsal, sino en el lado del cuerpo de la línea entre el punto de inserción anterior y posterior. Medir la profundidad desde la epidermis a la aleta dorsal en un ángulo perpendicular a la tangente del cuerpo (figura 3).

Figuras 2 (izquierda) y 3 (derecha):



APÉNDICE XVIII: Archivo de Muestras de Tejidos

El archivo de las muestras de tejidos resulta crítico para el éxito de los estudios realizados con posterioridad o retrospectivos. Si bien el protocolo de necropsia intenta cubrir todos los muestreos solicitados por investigadores, será inevitable que surjan nuevos pedidos de muestras. Se han establecido repositorios de tejidos de orcas en Estados Unidos y Canadá, que contienen equipos de frío a -80°C con generadores de emergencia y registro diario de temperatura para asegurar su adecuada conservación.

Aquellos investigadores que hayan recolectado tejidos de orcas y quieran depositarlos en un banco de muestras deberán contactar a:

En Estados Unidos:

Dr. Brad Hanson, NOAA/NMFS/Northwest Fisheries Science Center, 2725 Montlake Blvd. E, Seattle, WA 98112. Teléfono oficina: 206-860-3220. Fax: 206-860-3475. Teléfono celular: 206-300-0282. Email: **Brad.Hanson@noaa.gov**

En Canadá:

Dr. Stephen Raverty, Animal Health Center 1767 Angus Campbell Road, Abbotsford, BC, Canada V3M 2G3. Teléfono laboral: 604-556-3003 o: 800-661-9903. Email: **Stephen.Raverty@gov.bc.ca**

APÉNDICE XIX: Formulario de Descripción de Lesiones

ID de campo: _____

Fecha: _____

DESCRIPCIÓN DE LESIONES					FOTOGRAFÍAS			MUESTRAS	
Lesión	Ubicación	Color	Comentarios	Tamaño	En el animal previo al muestreo	Del tejido extraído del animal	Del animal luego del muestreo	Histo	Otras

APÉNDICE XX: Protocolo Para Varamientos de Orcas del Servicio de Pesquerías del NW de EEUU, NOAA

Noviembre 2012

**Todas las respuestas a varamientos de orcas Residentes del Sur en el listado ESA deben coordinarse con el Servicio de Pesquerías del NOAA y ser autorizadas bajo el Permiso del Programa Nacional de Respuesta a Varamientos y Salud de Mamíferos Marinos.*

Las orcas residentes del sur fueron listadas como especie amenazada bajo el Acta de Especies Amenazadas (Endangered Species Act, ESA) en el año 2005. Este protocolo fue desarrollado para implementar las acciones del Plan de Recupero de las Orcas Residentes del Sur (Sección 4.2.1) y coordinar las respuestas a los varamientos (Sección 4.2.1). La información obtenida de los varamientos es fundamental para la recuperación de la especie. El presente protocolo contiene los pasos a seguir para asegurar el cumplimiento de las condiciones establecidas en el Acta de Protección de Mamíferos Marinos y el Permiso 932-1905 de Investigación y Valoración de Especies Amenazadas emitido para el Programa de Respuesta a Varamiento y Salud de Mamíferos Marinos.

1. Confirmar el varamiento y la identificación de la especie por medio de fotos, una fuente confinable o un miembro del equipo de respuesta a varamientos.
2. Notificar a Kristin Wilkinson, del Servicio de Pesquerías del NOAA al 206-526-4747 (oficina), o 206-550-6208 (celular). A su vez, se solicita el envío de un mail con fotos e información detallada a Kristin.Wilkinson@noaa.gov tan pronto como sea posible.
 - a. Si no es posible localizar a Kristin o no se obtiene una respuesta de ella dentro de los 30 minutos de informado el suceso, se deberá contactar a:
 - i. Brent Norberg 206-526-6550 (oficina), 206-909-3771 (celular)
 - ii. Lynne Barre 206-526-4745 (oficina), 206-718-3807 (celular)
 - iii. El Servicio de Pesquerías del NOAA tomará contacto con Teri Rowles en las Oficinas Centrales del NOAA (301-427- 8448) una vez confirmado el varamiento, Brad Hanson (206-860- 3220, oficina; 206-300-2082 celular) en el Centro de Ciencias del Servicio de Pesquerías del Noroeste/Northwest Fisheries Science Center, Oficina del NOAA para la Aplicación de la Ley (206-526-6133), y el Departamento de Pesquerías y Océanos/Department of Fisheries and Oceans (604-666-9965) de acuerdo con lo que sea necesario en cada caso.
3. Si se confirma que el animal varado es una orca, se solicita la toma de fotografías del animal, la recolección de la mayor información posible y limitar el acceso del público al lugar. Se deberá asegurar la orca para evitar su arrastre por las mareas, siempre que sea posible realizar esta operación de forma segura.
 - a. Identificación Fotográfica: es prioridad la toma de fotos de la aleta dorsal, montura, región ocular y otras características que permitan la identificación del tipo de orca (por ejemplo, Residente del Sur, orca en tránsito o Transient,

alejada de la costa u Offshore) y la identificación del individuo. En caso de ser posible utilizar una sábana blanca como fondo al momento de la toma de fotografías para incrementar el contraste y permitir una mejor apreciación de las características anatómicas del individuo.

- b. Identificación Acústica: si el animal se encuentra vivo y flotando en el agua o acompañado de otras orcas y no ha sido aún identificado, se solicita realizar la toma de fotografías y contactar al Northwest Fisheries Science Center o Center for Whale Research para obtener asistencia en cuanto a la forma de grabado de material acústico. Los contactos se proveen en la lista que se encuentra en el cuadro presentado a continuación.
4. Se solicita la obtención de información referida a la ubicación y acceso al sitio para determinar si se dispondrá un traslado del animal por arrastre a la rampa para embarcaciones más cercana, remoción por vehículo o realización de una necropsia *in situ*.
 5. Personal de Pesquerías del NOAA o el coordinador del equipo de varamientos convocarán a una llamada en conferencia para discutir el varamiento. Participarán de esta llamada los expertos de la lista provista a continuación, quienes poseen experiencia en varamientos y han expresado su interés en participar de las operaciones de repuesta a estos eventos.

Nombre	Organización	Oficina	Cel.
Brent Norberg	NOAA Fisheries	206-526-6550	206-909-3771
Lynne Barre	NOAA Fisheries	206-526-4745	206-718-3807
Kristin Wilkinson	NOAA Fisheries	206-526-4747	206-550-6208
Brian Gorman	NOAA Fisheries Public Relations	206-526-6613	206-604-6399
Brad Hanson	NWFSC	206-860-3220	206-300-0282
Dawn Noren	NWFSC	206-302-2439	206-423-0215
Candi Emmons	NWFSC	206-302-2432	206-251-2733
Joe Gaydos	SeaDoc Society	360-376-3910	360-914-1083
Stephen Raverty	BC Animal Health Center	604-556-3026	778-839-6916
John Calambokidis	Cascadia Research	360-943-7325	206-280-5320
Jessie Huggins	Cascadia Research	360-943-7325 x111	206-949-7924
Steve Jefferies	WDFW MMI	253-589-7235	253-380-4963
Dyanna Lambourn	WDFW MMI	253-589-7235	253-208-2427
Jen Olson	Whale Museum	360-378-4710 x27	360-472-1852
Dave Ellifrit	Center for Whale Research	360-378-5835	360-317-5287
Ken Balcomb	Center for Whale Research	360-378-5835	360-472-1707
Pete Schroeder	Global Research and Rescue	360 683-7437	
Susan Berta & Howie Garrett	Orca Network	1-866-672-2638	360-661-3739

Stephanie Norman	Central Puget Sound MMSN		206-321-0249
Para contactar al personal de la red local de respuesta a varamientos, ver los mapas GISñ			
Informar al Washington Department of Fish and Wildlife Law Enforcement 360-902-2936 en caso de ser necesario.			
Informar a la Guardia Costera de Estados Unidos (US Coast Guard) 206-587-0307 si es necesario.			

6. En caso de ser necesaria una llamada en conferencia, se tratarán los siguientes temas:

- a. Identificación de un coordinar *in-situ* que será el Coordinador Local de Varamientos (Titular del Documento), personal del NOAA MMHSRP, o una persona designada en el Permiso. Este coordinador *in-istu* supervisará el trabajo de campo, la recolección de información y disposición de las muestras trabajando en forma conjunta con el Titular del Permiso o Co-investigador designado.
 - i. El coordinador *in-situ* tendrá a su cargo la designación de:
 1. un Veterinario Líder – responsable de llevar a cabo una evaluación del estado general de salud del animal al momento del hallazgo y su monitoreo durante el trabajo de campo.
 2. Un Encargado de Logística – responsable de la respuesta al varamiento, la coordinación de voluntarios y sus roles durante el trabajo de campo, y la comunación de cualquier información de relevancia a Pesquerías del NOAA.
 3. un Encargado de Registros– será resonsable de la disposición de las muestras y especímenes. Manejará toda la información recolectada durante la respuesta al varamiento y se encargará de su distribución a las personas que corresponda.
 4. un Líder de Necropsia (si es necesario) – será responsable de dirigir la necropsia del animal, trabajando en conjunto con el Encargado de Registros sobre la disposición de las muestras y los destinos donde serán enviadas para análisis.
 - b. Identificación de los pasos a llevar a cabo durante la respuesta al varamiento (ver debajo Respuesta a Varamientos)
 - c. Comunicación con los interesados en el varamiento y la preparación de información para los medios de prensa.

7. Respuesta a Varamientos

- a. Para una animal muerto:
 - i. Se conformará un equipo para llevar a cabo una necropsia completa. El Líder de Necropsia determinará donde se realizará (campo o laboratorio), el código de la condición del animal (fresco, moderado, avanzado) y qué muestras se tomarán (incluyendo duplicados, muestras para archivo y muestras para otros investigadores). Se deberá seguir el Protocolo de Necropsia y Análisis de Enferdades en Orcas.

1. El Protocolo puede encontrarse en: <http://www.vetmed.ucdavis.edu/whc/pdfs/orcanecropsyprotocol.pdf>
 2. El Protocolo provee información acerca de enfermedades, un checklist del equipo necesario, logística de las operaciones, etc.
- ii. En la tabla presentada a continuación se provee información sobre varamientos. Esta información puede ser necesaria al momento de responder a los medios de prensa.
- b. Para un animal vivo:
- i. La logística de la respuesta ante el varamiento de un animal vivo es compleja y cara. Se recomienda evaluar las consideraciones de la lista que se presenta a continuación al momento de determinar el nivel de intervención necesario y los recursos disponibles en respuesta al varamiento.
 1. Consideraciones para la evaluación de un cetáceo vivo varado:
 - a. La seguridad de las personas deberá ser prioridad y el acceso al animal deberá estar limitado al personal autorizado
 - b. Se deberá considerar si el animal puede ser devuelto al mar con la próxima marea alta y cuándo se producirá la misma
 - c. Evaluar si existe la posibilidad de contar con ayuda de embarcaciones
 - d. Si hay un arnés disponible para el arrastre del animal a aguas más profundas
 - i. Contactar a Dr. Karen Wolf en Point Defiance Zoo and Aquarium en: 253-404- 3639 (oficina) or 253-381-3115 (celular)
 - ii. En caso de no disponer de un arnés, este puede armarse utilizando línea Sampson y flotadores. Ver figura 6.10 en Marine Mammals Ashore, A Field Guide for Strandings. Geraci & Lounsbury, 2005.
 - e. En caso de que el animal deba permanecer sobre la playa por un período largo de tiempo, se deberá mantener su piel mojada y colocar ungüento si fuera necesario.
 - i. La aplicación de óxido de zinc protegerá la piel del sol y el viento evitando su deshidratación. La piel que se presente dañada deberá mantenerse húmeda y a la sombra, protegida con óxido de zinc, ungüento antibiótico o vaselina (Geraci & Lounsbury, 2005). Estos productos pueden adquirirse en cualquier farmacia.
 - ii. En climas fríos se deberá proteger al animal de la lluvia y el viento, cubriendo sus extremidades con un paño humedecido con aceite mineral o vegetal (Geraci & Lounsbury, 2005).

- iii. En climas cálidos o días de sol se deberán mantener húmedos estos vendajes para facilitar la pérdida de calor (siempre que el animal se encuentre accesible y sea posible realizar esta tarea en forma segura)
 - iv. De ser posible, tomar una muestra de sangre y realizar el exámen de química clínica y hematología tan pronto como sea posible. La toma de hisopados bacterianos y virales del espiráculo, boca, recto y cuañqier lesión que presente el animal sería de gran valor para evaluar el varamiento. A su vez, debe considerarse la posibilidad de realizar análisis de burgujas de gas y un ultrasonido. También deberá evaluarse la realización de una biopsia para obtener muestras para análisis genético.
2. Determinar si se cuenta con un equipo de rastreo satelital para monitorear al animal luego de su liberación.
- a. Coordinar con NMFS/NWR para definir la información que se dará a los medios de prensa. Brian Gorman de Relaciones Públicas de NOAA (206-526- 6613), y Janet Sears (206-526-6172) se encuentran disponibles para brindar asesoramiento.
8. Luego de la liberación del animal en un varamiento vivo, o de la necropsia de un animal muerto, el equipo responsable del area geográfica donde ocurrió el evento, deberá completar un Reporte Nivel A (y proveer información de Nivel B) y cerrar el circuito del suceso, finalizando el contacto en los medios de prensa y todos aquellos involucrados en el varamiento. Se recomienda la realización de una reunión en forma posterior a la respuesta al varamiento donde se definan las acciones de seguimiento, análisis de muestras, reportes y disposición final del cuerpo y/o sus partes. Deberá participar de esta reunión el equipo de respuesta a varamientos, Pesquerías del NOAA y otros organismos o personas involucrados en el varamiento.

Veterinarios de Contacto en la Región Noroeste Para la Evaluación de Orcas

Nombre	Organización	Ubicación	N°Tel	Email
Dr. Joe Gaydos	SeaDoc Society	Orcas Island	360-376-3910 Office 360-914-1083 Cell	jkgaydos@ucdavis.edu
Dr. Stephanie Norman	Central Puget Sound MMSN & Marine-Med	Bothell, WA	206-321-0249	whaledoctor@gmail.com

Dr. Marty Haulena	Vancouver Aquarium	Point Roberts, WA	415-847-2781 US Cell 604-831-9550 CA Cell	Martin.Haulena@vanaqua.org
Dr. Kelly Helmick	Woodland Park Zoo	Seattle, WA	206-605-9040	kelly.helmick@zoo.org
Dr. Pete Schroeder	East Jefferson Co. MMSN	Sequim, WA	360-683-7437 Cel 360-670-6345	jpsmmra@olympen.com
Dr. Lesanna Lahner	Seattle Aquarium	Seattle, WA	206-707-2613	L.Lahner@seattleaquarium.org

***Para varamientos de orcas en otras partes del mundo**

Nueva Zealandia: Contactar a Ingrid Visser, Orca Research Trust, ingrid@orca.org.nz, P.O. Box 402043, Tutukaka, Northland, 0153, New Zealand; oficina: + 64 (0)9 43 43 043, particular : + 64 (0)274 727 627, celular (solo dentro de NZ) 0800 733 7722

*Por favor contactarse con nosotros si Ud. desea ser una persona de contacto en su región.

APÉNDICE XXI: Protocolo Para Detectar Signos de Interacción Humana en Orcas

El formulario que se presenta a continuación deberá utilizarse para registrar signos de interacción humana en orcas. Para encontrar información detallada acerca de la detección de signos de interacción u obtener detalles sobre cómo completar el registro, se puede leer el documento completo a partir del cual se origina el formulario:

Moore, K. T. and S. G. Barco. 2013. Handbook for recognizing, evaluating and documenting human interaction in stranded cetaceans and pinnipeds. Memorandum Técnico del NOAA, NOAA-TM-NMFS-SWFSC-510, 102 pp.

Disponible también en:

<http://swfsc.noaa.gov/publications/TM/SWFSC/NOAA-TM-NMFS-SWFSC-510.pdf>

APÉNDICE XXII: Examen Fetal y Manejo de Muestras

En los varamientos de orcas hembra, es posible encontrarse con fetos en diferentes etapas de gestación. Incluso pueden encontrarse abortos o crías muertas al nacer (CMN). La preñez en las orcas dura entre 15-18 meses. Determinar si un animal pequeño es un neonato o un feto puede presentar cierta dificultad. La descomposición del feto puede ocurrir tanto dentro de la madre como luego de la expulsión. Asimismo, puede producirse el nacimiento de una cría completamente desarrollada muerta en forma previa al parto o en el momento del mismo. Dadas estas dificultades, es necesario un examen detallado y toma de muestras adecuada para evaluar el estado del feto.

Una orca puede indentificarse como un feto cuando:

- El feto se encuentra en un útero gravido, en el canal de parto o en el abdomen de una hembra adulta con ruptura uterina interna
- El desarrollo fetal es incompleto

Los hallazgos que **sugieren** pero no confirman que estamos en presencia de un feto, incluyen:

- Un cuerpo de menos de 2,5 cm de largo o 182 kg de peso
- Contenido gástrico que incluye líquido amniótico pero no leche
- Pliegues fetales presentes

Registro histórico de un feto:

1. Información de la madre incluyendo edad, estado general de salud, preñeces pasadas y su resultado
2. Situación medioambiental, incluyendo eventos específicos – existencia de la posibilidad de agresión o trauma
3. Identificación del padre del feto en caso de ser posible
4. Cualquier situación asociada a un aborto – tiempo/evidencia de anorexia, contracciones, complicaciones al parto, presencia de otros abortos

Evaluación de tejidos del feto:

1. Muestrear la placenta, el feto y el líquido amniótico
2. Medir la longitud fetal, peso, distancia entre los ojos, señales de desarrollo, estimación del grado de descomposición (fresco, leve, moderado, avanzado o momificado)
3. Exámen de la piel para detectar manchado del meconio (verde o naranja). A su vez, buscar indicios de decoloración en la tráquea y los bronquios que sugieran la posible inhalación del meconio.
4. Examinar la placenta para verificar su expulsión completa. Si la placenta se presenta en secciones, intentar recomponerla para obtener una membrana completa. Pesar, medir su longitud y el número de vueltas del cordón umbilical. Para mayor información se puede consultar el siguiente sitio web: <http://placentation.ucsd.edu/killerwhalefs.htm>

Puntos específicos a evaluar:

Nota: fotografiar y muestrear en formalina cualquier anomalía

1. Observar detenidamente para detectar malformaciones o abiotrofias de órganos (cuando un órgano no termina de formarse)
2. Observar para detectar hinchazón/edema o hemorragia – principalmente en la zona de la cabeza y cuello que podrían indicar distocia
3. Observar cuidadosamente el ombligo para detectar hinchazón o hemorragia
4. Observar las costillas y el cráneo para detectar hinchazón, fracturas o irregularidades
5. Observar los órganos para hallar cualquier irregularidad, evaluar su firmeza, detectar necrosis, manchado del meconio o la presencia de abscesos
6. Examinar el cerebro para evaluar si esta completo y descartar hidrocefalia
7. Observar la placenta para detectar su engrosamiento, reducción o decoloración
8. Observar detenidamente el contenido estomacal – líquido amniótico versus leche

Toma de muestras fetales para su congelamiento y evaluaciones complementarias:

Fluido torácico/abdominal (5 mL)	Bazo
Sangre (3-5mL)	Timo
Cerebro	Pool de tejidos (hígado, bazo, pulmón, cerebro) en medio para transporte viral
Fluido gástrico (5-10 mL)	Pool de tejidos (hígado,bazo, pulmón, cerebro) en RNA later
Riñón	Cordón umbilical/placenta
Hígado	
Pulmón	
Fluido pericárdico (3mL)	

Muestras fetales para cultivo:

Contenido estomacal – aeróbico, anaeróbico, fúngico y cultivos de *Campylobacter* sp.
Hígado – cultivo aeróbico
Pulmón – cultivo aeróbico
Ombligo – aeróbico
Otros cultivos de acuerdo a lo detectado durante las observaciones macroscópicas

Muestras fetales en formalina neutra buferada al 10%:

Cerebro	Paratiroides
Vejiga	Placenta (ver debajo detalles del examen)
Colon/recto	Músculo esquelético
Gónadas	Piel
Esófago	Bazo
Corazón	Estómago
Intestinos	Tráquea
Riñón	Timo
Laringe	Tiroides
Hígado	Amígdalas
Glándula pituitaria	Ombligo
Nódulos linfáticos del pulmón	

Examen de la placenta:

1. Conservar secciones de placenta, saco amniótico y ombligo en una solución 10% de formalina neutra bufferada
2. Conservar dos secciones de placenta de 10 x 10cm congeladas en bolsas whirl paks
3. Conservar secciones pequeñas de placenta (1cm x 1cm – cortada en fragmentos) en RNA later y congelar
4. Conservar secciones pequeñas en fijador para ME (Glutaraldehído o solución de Karnovski)

APÉNDICE XXIII: Análisis Morfométrico de Orcas Varadas

Nota: En caso de limitaciones de tiempo o por razones de seguridad, registrar como mínimo la información indicada en **negrita**

Observador _____ **Fecha** _____

N° de Identificación _____ **Género** _____ **Peso** _____

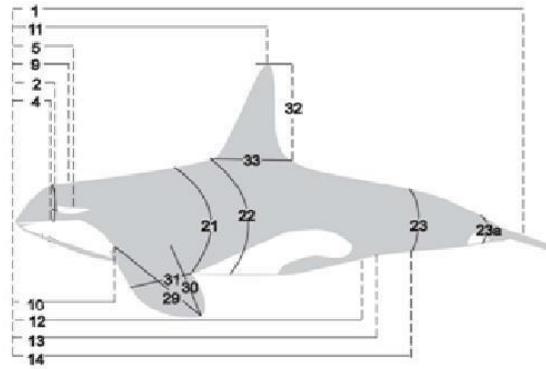
MEDIDAS, CUERPO (especificar unidad de medida utilizada _____)

1	Longitud total, rostrum a muesca		13	Rostrum a orificio genital	
2	Rostrum al centro del ojo (izq)		14	Rostrum a ano	
3	Longitud de boca (izq)		15	Ojo a espiráculo (centro)(izq)	
4	Rostrum a ápice de la frente		16	Proyección de mandíbula inferior	
5	Rostrum a oído (izq)		17	Espesor de grasa*, medio dorsal	
6	Centro del ojo a oído (izq)		18	Espesor de grasa*, medio lateral	
7	Centro del ojo al ángulo de la boca		19	Espesor de grasa*, medio ventral	
8	Centro de ojo a ojo (curvada – de frente)		20	Circunferencia ocular	
9	Rostrum a centro del espiráculo		21	Circunferencia axilar	
10	Rostrum a aleta (izq)		22	Circunferencia borde anterior de aleta dorsal	
11	Rostrum a extremo de aleta dorsal		23	Circunferencia anal	
12	Rostrum a centro del ombligo		23a	Circunferencia ___ cm anterior al rostrum	

*Grosor de grasa medido en ítem 22-sólo del cráneo a la aleta dorsal

MEDIDAS APÉNDICES (especificar unidades de medida _____)

29	Longitud de aleta (ant) (izq)		33	Longitud de base de aleta dorsal	
30	Longitud de aleta (post) (izq)		34	Ancho de aletas caudales (derecho)	
31	Ancho máximo de aleta (izq)		35	Longitud de aletas caudales (izq)	
32	Altura de aleta dorsal		36	Profundidad de orificio caudal	



APÉNDICE XXIV: Formulario Para Registro de Datos de Patología Macroscópica

Información del Evento

Fecha de Varamiento: _____

Fecha de Hallazgo: _____

Eutanasia / Muerte Natural

Fecha y Hora de Muerte: _____

Fecha y Hora de Necropsia: _____

Almacenamiento Previo a Necropsia: _____

Locación de Varamiento: _____

Latitud/Longitud: _____ N / _____ O

Información del Animal

Sexo: M / F / Natimorto

Longitud: _____ cm / in / ft

Peso: _____ lbs / Kg

Cría de Temporada / Sub-adulto / Adulto / Natimorto

Condición de Varamiento: 1 2 3 4 5 6

Condición al Momento de Necropsia: 2 3 4 5 6

Interacción Humana: Si / No / Natimorto

Varamiento Masivo: Si / No

Número de Individuos: _____

Reseña Histórica:

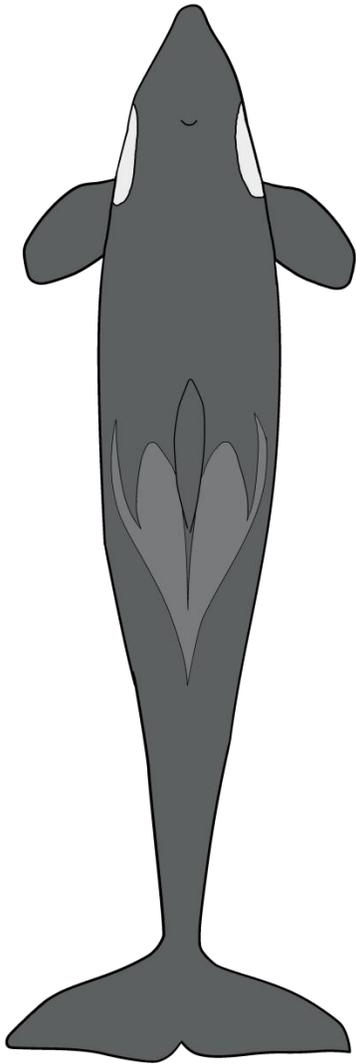
Observaciones de la Necropsia: Por favor registrar observaciones generales referidas a color, condición, textura, etc. indicando cuando corresponda NA= no aplica, NE= no examinado, SHS= sin hallazgos significativos, SLV= sin lesiones visibles. Listar los pesos (g) de cada órgano examinado.

Examen Externo (Por favor describir todas las lesiones e indicar si hay secciones no visibles u obstruidas – típicamente debido a la imposibilidad de mover o rotar al animal para visualizar).

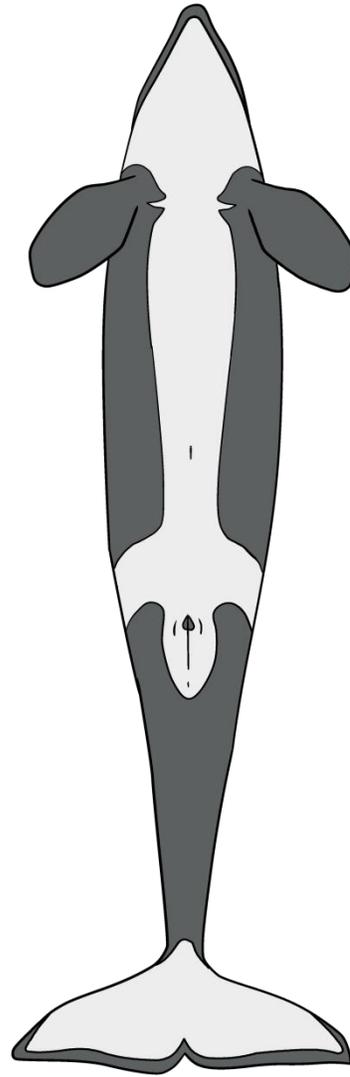
Condición Corporal: robusta / delgada / caquéctica / natimorto

Piel (pliegues fetales, color, condición, heridas, cicatrices, parásitos – por favor diagramar todos los cambios observados):

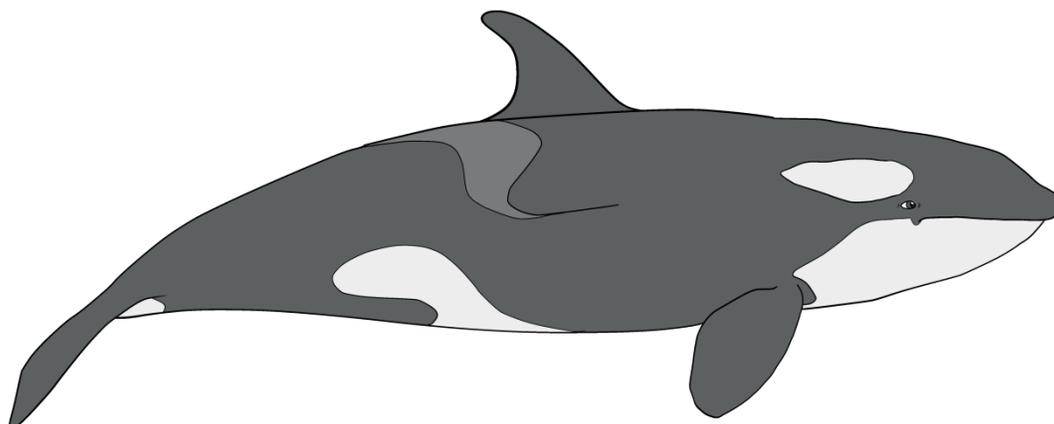
Superficie Dorsal:



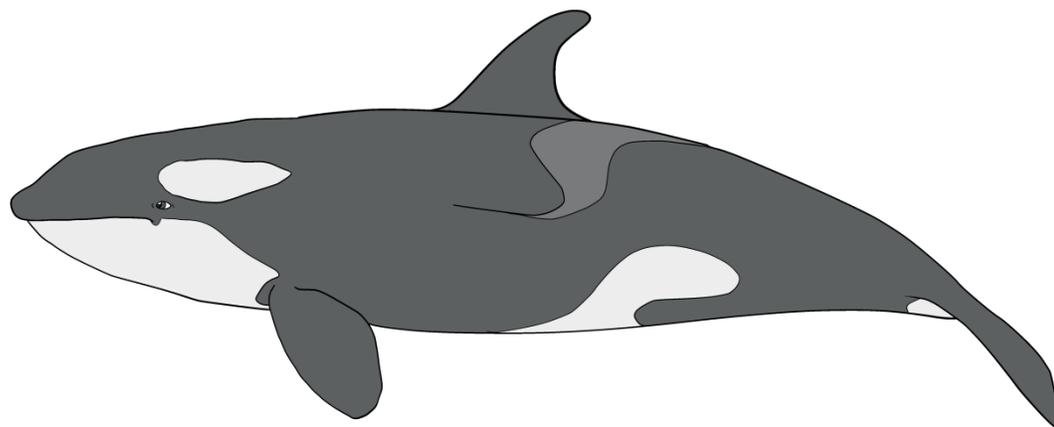
Superficie Ventral:



Lado Drecho:



Lado Izquierdo:



Espiráculo:

Boca (lengua, dientes)/ Membranas Mucosas (color):

Ojos (secreción, color, rupturas): (D) (I)

Oídos: (D) (I)

Orificio genital/Ano/Aberturas Mamarias/Omblico:

Músculo Esquelético (huesos, articulaciones, músculos)

Grasa:

Diafragma:

Esqueleto:

Sistema Circulatorio

Pericardio

Corazón: (peso - kg)

Vasos:

Sistema Pulmonar

Laringe:

Tráquea:

Bronquios:

Pulmones (color, condición, edema, congestión, consolidación, granulomas, enfisema, lesiones):

(D)(Peso kg)

(I)(Peso kg)

Nódulo Traqueobronquial:

Sistema Gastrointestinal

Esófago:

Estómago (contenidos, úlceras, mucosa, parásitos):

Intestino Delgado:

Intestino Grueso/Colon/Ano:

Peritoneo, Mesenterio, Epiplón:

Hepático/ Pancreático

Hígado (peso kg, color, congestión, lesiones, tamaño):

Ducto Biliar / Ducto Pancreaticoduodenal (color, cantidad):

Páncreas:

Nódulos Linfáticos Asociados:

Sistemas Urinario / Reproductivo

Riñones (diferenciación renicular, color, condición):

(D)(peso kg)

(I)(peso kg)

Vejiga:

Testículos / Ovarios: Inmaduros / Maduros

(D) Peso: kg, Lx P x A cm:

(I) Peso: kg, Lx P x A cm:

Glándulas Mamarias:

Útero / Cervix / Vagina:

Preñada: S / N / NA (macho) / Natimorto

Sistema Linfático

Bazo (peso kg):

Nódulo Linfático Escapular:

Senos Pterigoideos:

Cavidad Torácica:

Parásitos Internos (ubicación, tipo, N°)

RESUMEN-Diagnóstico Diferencial del Exámen Macroscópico:

DISPOSICIÓN DEL CADÁVER:

Tejidos Blandos:

Esqueleto:

PERSONAL A CARGO DE LA NECROPSIA (listar los nombres de las personas involucradas y la firma de la persona a cargo de la necropsia)

MUESTRAS/Disposición (Utilizar lista adjunta)

FOTOS/VIDEO

Cámara

Encuadres:

Descripción:

APÉNDICE XXV: Checklist – Tejidos a Muestrear en un Cadáver de Orca Código 2 o 3

Definición de Código 2: Animal de muerte reciente, piel firme, órganos frescos

Definición de Código 3: Descomposición moderada, piel firme, cuerpo hinchado, deterioro de la piel, estado de predación avanzado, órganos rojos y blandos pero discernibles

Tejido	Histopatología	Hisopo para cultivo	Hisopado seco	Ensayos auxiliares	Citología
Piel, sitios múltiples	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>			<input type="checkbox"/>	
Grasa	<input type="checkbox"/>			<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	
Aleta dorsal				Intacto <input type="checkbox"/>	
Cabeza				Intacto <input type="checkbox"/>	
Ojo	1 globo <input type="checkbox"/>			5-10 ml <input type="checkbox"/>	
Conjuntiva	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		
Oídos				Intacto <input type="checkbox"/>	
Oído, grasa	<input type="checkbox"/>				
Espiráculo	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		Raspaje <input type="checkbox"/>
Mandíbula	(grasa) <input type="checkbox"/>			Intacto <input type="checkbox"/>	
Dientes (1-2)				Intacto <input type="checkbox"/>	
Cerebro	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	
Cerebro-cerebelo	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>			<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	
Cerebro-encéfalo	<input type="checkbox"/>			50 g <input type="checkbox"/>	
Glándula pituitaria	<input type="checkbox"/>			Mitad <input type="checkbox"/>	
Médula espinal	Torácica <input type="checkbox"/> Lumbar <input type="checkbox"/>			Torácica <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> Lumbar <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	
Plexo braquial	<input type="checkbox"/>				
Mucosa oral	<input type="checkbox"/>				
Orofaringe	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		
Amígdala	<input type="checkbox"/>			<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	
Lengua	<input type="checkbox"/>			50 g <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	
Nódulo linfático, sitios múltiples	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	50 g <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	
Tráquea	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	5 cm <input type="checkbox"/>	
Glándula tiroides	<input type="checkbox"/>			1 entera <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	

Glándula paratiroides	<input type="checkbox"/>			<input type="checkbox"/>	
Timo	<input type="checkbox"/>			50 g <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	
Bronquio	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	5 cm <input type="checkbox"/>	
Pulmón	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	50 cm <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	
Sangre cardíaca				50 ml <input type="checkbox"/>	
Pericardio	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		50 g <input type="checkbox"/>	
Líquido pericardial				10 ml <input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Corazón	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>			50 g <input type="checkbox"/>	
Vena aorta y vena cava	<input type="checkbox"/>				
Diafragma (1-2)	<input type="checkbox"/>			100 g <input type="checkbox"/>	
Hígado	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>			100 g <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	
Bilis				10 ml <input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Bazo	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	
Páncreas	<input type="checkbox"/>			50 gm <input type="checkbox"/>	
Estómago	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		Ingesta <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	
Intestino delgado	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>		Ingesta <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	
Colon	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>		Ingesta <input type="checkbox"/>	
Glándulas suprarrenales	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>			50 g <input type="checkbox"/>	
Riñón	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>			100 g <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	
Uretra	<input type="checkbox"/>			<input type="checkbox"/>	
Orina				50 ml <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	
Vejiga urinaria	<input type="checkbox"/>			<input type="checkbox"/>	
Ombigo	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>			
Glándula mamaria	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	100 g <input type="checkbox"/>	Aspirado <input type="checkbox"/>
Leche				50 ml <input type="checkbox"/>	
Orificio genital	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		
Canal urogenital	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		
Vagina	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		
Útero	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	50 cm <input type="checkbox"/>	
Ovario	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	Órgano intacto <input type="checkbox"/>	
Oviducto	<input type="checkbox"/>			2-4 cm <input type="checkbox"/>	
Pene/testículos	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		
Glándulas sexuales accesorias	<input type="checkbox"/>				
Músculo esquelético	<input type="checkbox"/>			100 g <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	
Líquido sinovial		<input type="checkbox"/>			<input type="checkbox"/>
Costilla/hueso	<input type="checkbox"/>			100 g <input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Nervio periférico	<input type="checkbox"/>				

APÉNDICE XXVI: Checklist – Tejidos a Muestrear en un Cadáver de Orca Código 4

Definición de Código 4: Estado de descomposición avanzado, órganos de difícil identificación, descamación de la piel, generalmente tracto GI y órganos reproductores hinchados y protruidos

Tejido	Histopatología	Hisopo para cultivo	Hisopado seco	Ensayos auxiliares	Citología
Piel, sitios múltiples	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>			<input type="checkbox"/>	
Grasa	<input type="checkbox"/>			<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	
Aleta dorsal				Intacto <input type="checkbox"/>	
Cabeza				Intacto <input type="checkbox"/>	
Conjuntiva	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		
Oídos				Intacto <input type="checkbox"/>	
Espiráculo	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		Raspaje <input type="checkbox"/>
Dientes (1-2)				Intacto <input type="checkbox"/>	
Cerebro-general	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	
Mucosa oral	<input type="checkbox"/>				
Orofaringe	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		
Amígdala	<input type="checkbox"/>			<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	
Lengua	<input type="checkbox"/>			50 g <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	
Nódulos linfáticos, sitios	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	50 g <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	
Tráquea	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	5 cm <input type="checkbox"/>	
Glándula tiroides	<input type="checkbox"/>			1 entera <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	
Glándula paratiroides	<input type="checkbox"/>			<input type="checkbox"/>	
Timo	<input type="checkbox"/>			50 g <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	
Pulmón	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	50 cm <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	
Corazón	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>			50 g <input type="checkbox"/>	
Vena aorta y vena cava	<input type="checkbox"/>				
Diafragma	<input type="checkbox"/>			100 g <input type="checkbox"/>	
Hígado	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>			100 g <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	
Bazo	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	

Páncreas	<input type="checkbox"/>			50 g <input type="checkbox"/>	
Estómago	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		Ingesta <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	
Intestino delgado	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>		Ingesta <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	
Colon	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>		Ingesta <input type="checkbox"/>	
Glándula suprarrenal	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>			50 g <input type="checkbox"/>	
Riñón	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>			100 g <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	
Orina				50 ml <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	
Vejiga urinaria	<input type="checkbox"/>			<input type="checkbox"/>	
Ombliigo	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>			
Glándula mamaria	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	100 g <input type="checkbox"/>	Aspirado <input type="checkbox"/>
Orificio genital	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		
Vagina	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		
Útero	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	50 cm <input type="checkbox"/>	
Ovario	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	Órgano intacto <input type="checkbox"/>	
Pene testículos	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		
Glándulas sexuales accesorias	<input type="checkbox"/>				
Músculo esquelético	<input type="checkbox"/>			100 g <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	
Costilla médula ósea	<input type="checkbox"/>			100 g <input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Nervio periférico	<input type="checkbox"/>				

APÉNDICE XXVII: Checklist – Tejidos a Muestrear en un Cadáver de Orca Código 5

Definición de Código 5: Descomposición severa, restos óseos con vestigios de tejidos blandos asociados

Tejido	Histopatología	Hisopo para cultivo	Hisopado seco	Ensayos auxiliares	Citología
Piel, sitios múltiples	<input type="checkbox"/>				<input type="checkbox"/>
Grasa					<input type="checkbox"/>
Oídos				Intacto	<input type="checkbox"/>
Músculo esquelético					<input type="checkbox"/>
Dientes (1-2)				Intacto	<input type="checkbox"/>
Costilla/médula osea					<input type="checkbox"/>
Cráneo/esqueleto	<input type="checkbox"/>				<input type="checkbox"/>

Identificador de Fotografías:

(Por favor cortar esta hoja y utilizarla como escala e identificación de las fotografías tomadas)

N° ID del Animal(s):

Sexo:

Clase etárea:

Lugar de Varamiento:

Fecha de Necropsia:

Persona que dirige la necropsia:

