



REPUBLICA DE CUBA

Servicios Veterinarios

ENFERMEDADES ROJAS DEL CERDO

Control anatomopatológico para el diagnóstico de la Fiebre Porcina Africana y Peste Porcina Clásica

NC

55-10

1986

Veterinary Services. Porcine Red Diseases. Anatomopathological Control for African Porcine Fever and Classic Porcine Plague

Студии ветеринарные. Красные болезни свиней. Анатомопатологический контроль диагнозы африканской лихорадки свиней и классической чумы

Esta norma establece los métodos de control anatomopatológicos para el diagnóstico de la Fiebre Porcina Africana y la Peste Porcina Clásica.

GENERALIDADES

1. El instrumental a utilizar en los métodos de control estará limpio y afilado.
2. En la expresión de los resultados se considerarán las variaciones del cuadro de lesiones que se presentan entre individuos de un mismo grupo.
3. Todas las incisiones se efectuarán con rapidez y exactitud.
4. Los fragmentos de muestras que se tomen no serán comprimidos, doblados o torcidos.
5. Para los métodos de control se utilizará agua para análisis según la NC 21-01:72 "Agua para análisis", cuando no se especifique lo contrario. Los reactivos utilizados serán de calidad p.a. según la NC 20-03:72 "Productos químicos. Clasificación por calidades y definiciones" y NC 21-05:72 "Productos químicos analíticos. Especificaciones".
6. La cuchilla de micrótopo utilizada, se secará con un pedazo de gasa, entre cada corte por congelación o parafina, para evitar irregularidades y perforaciones en los mismos.
7. Todos los frascos de soluciones se rotularán.
8. Términos, definiciones y símbolos
 - 8.1 Montaje. Presentación o pegado de cortes tisulares en láminas portaobjetos.

Aprobada:

Abril 1986

ESTA NORMA ES OBLIGATORIA

Vigente a partir de:

Enero 1987

- 8.2 Fijación. Conservación de la estructura primitiva de los tejidos mediante reactivos químicos llamados fijadores.
- 8.3 PPC. Peste Porcina Clásica.
- 8.4 FPA. Fiebre Porcina Africana.
- 8.5 Para los restantes términos y definiciones véase la NC 55-05:85 "Servicios veterinarios. Actividad de laboratorio. Términos y definiciones".

MÉTODOS DE CONTROL

9. Examen macroscópico

- 9.1 Objetivo y alcance. Este método se establece para determinar las alteraciones de los órganos presuntamente afectados, para orientar el diagnóstico.
- 9.2 Fundamento del método. Se basa en examinar los órganos, describir las alteraciones, seleccionar fragmentos de los mismos y fijarlos en solución de formaldehído al 10 % v/v.
- 9.3 Reactivo químico
- 9.3.1 Solución de formaldehído neutro al 10 % v/v. Según NC 55-01:85 "Servicios veterinarios. Enfermedades rojas del cerdo. Selección y obtención de las muestras".
- 9.4 Aparatos, utensilios y medios de medición. Según NC 55-01
- 9.5 Muestras. Según NC 55-01.
- 9.6 Determinación. Se realizará la necropsia y se observarán las cavidades, órganos y tejidos.
- 9.7 Expresión de los resultados. Se describirán las distintas alteraciones observadas en la necropsia que caracterizan las distintas formas de presentación de las entidades siguientes:
- 9.7.1 PPC
- En la forma sobreaguda. Podrá no observarse cambios macroscópicos.
 - En la forma aguda. Se observarán hemorragias petequiales en mucosas y serosas, riñón, en ganglios, linfáticos (ganglios marmóreos) vejiga, laringe, tráquea, pulmones, epicardio y piel. En algunos casos se presentarán úlceras en forma de botón, a nivel de colon (aunque esta lesión se presenta más en

la forma crónica). Se aprecian infartos esplénicos (únicos o múltiples).

- En la forma crónica. Se observan procesos neumónicos secundarios y ulceraciones necróticas en forma de botón (úlceras botonosas) a nivel de la mucosa del intestino grueso.

9.7.2 FPA. Las alteraciones son bastante semejantes a la PPC, aunque generalmente son más severas.

- En la forma aguda. Las lesiones que se presentan son propias de un proceso septicémico, representadas por esplenomegalia y hemorragias en diversos órganos, mucosas y serosas. Hidropericardio, hidrotórax y ascitis.

Las hemorragias se presentan en todos los órganos, siendo más intensas a nivel córtico-renal, corazón, pulmones e hígado.

Los ganglios linfáticos regionales se observan tumefactos y hemorrágicos, llegando a constituir verdaderos coágulos de sangre los renales y gastrohepáticos y con menor intensidad los mesentéricos y pulmonares. Se observa edema y congestión pulmonar, vesícula biliar distendida con edema a nivel de la serosa y en ocasiones son intensas las hemorragias a nivel de la serosa y mucosa.

- En la forma subaguda. Lesiones hemorrágicas más intensas en ganglios linfáticos y riñones. Hiperplasia esplénica. Pueden presentarse hemorragias en músculos esqueléticos y en intestinos.
- En la forma crónica. Las lesiones se asemejan frecuentemente a las de forma subaguda. Las hemorragias pueden ser acusadas. Se observa pericarditis y pleuritis fibrinosa. Zonas de consolidación y lesiones granulomatosas en forma de nódulos en pulmones, hasta procesos neumónicos secundarios. La característica más importante de esta forma es la hiperplasia del tejido linforreticular en diferentes órganos, por lo cual los ganglios linfáticos y el bazo pueden estar aumentados de tamaño y de consistencia firme.

10. Examen microscópico

10.1 Objetivo y alcance. Este método se establece para determinar las alteraciones histopatológicas en los cortes de las muestras.

10.2 Fundamento del método. Se basa en realizar cortes de las distintas muestras, colorearlas y observarlas al microscopio.

10.3 Reactivos químicos

- Alcohol etílico 50 % v/v
- Alcohol etílico 70 % v/v
- Alcohol etílico 95 % v/v
- Alcohol etílico absoluto 99,5 % v/v
- Acetona
- Xilol
- Aceite de cedro
- Bálsamo de Canadá
- Cera alba o cera de abejas
- Parafina con intervalo de fusión de 53 a 60°C.

Alcohol clorhídrico

Alcohol etílico al 70 % v/v 100 mL

Acido clorhídrico concentrado 1 mL

- Carbol-xilol

Fenol 20 mL

Xiol 180 mL

- Disolución de eosina 10 g/L. Se disolverá y se filtrará por papel.
- Albúmina glicerizada de Mayer. Separar las claras de varios huevos, medirlas y batirlas a punto de merengue. Añadir un volumen igual de glicerina y agregar un cristal de timol. Mezclar y filtrar con papel. Envasar en frasco de vidrio ámbar; se tapará y conservará en refrigeración.
- Hematoxilina alúmina de Harris

Disolución I

Cristales de hematoxilina 5 g

Alcohol etílico absoluto 99,5 % v/v 50 mL

Se disolverá al calor.

- Disolución II

Alumbre de potasio	100 g
Agua	1 000 mL

Se disolverá al calor, se mezclarán las dos disoluciones y se hervirán rápidamente.

Se añadirá 2,5 g de óxido de mercurio rojo lentamente y se hervirá rápidamente hasta obtener color púrpura oscuro. Se enfriará rápidamente en baño de hielo y se filtrará por papel. Se conservará en frasco bien tapado.

Para trabajo se añadirá 2 ó 3 mL de ácido acético glacial por 100 mL de colorante, utilizando pipeta de 1 mL. Se filtrará por papel. El colorante es utilizable durante 1 año.

10.4 Aparatos, utensilios y medios de medición

- Estufa para histología
- Micrótomos de parafina
- Micrótomos de congelación por dióxido de carbono o freón
- Pipeta de 1 mL, vD 0,001 mL
- Balanza técnica LSP 500 g, vD 0,1 g
- Cuchillas de micrótomos
- Frasco cónico de 500 y 100 mL
- Vaso de precipitado de 250; 500 y 1000 mL
- Jarras esmaltadas de 500
- Pincel de pelo fino
- Balón de dióxido de carbono
- Varilla de vidrio fusible con punta agregada en uno de los extremos y doblada en ángulo recto
- Reloj de intervalo
- Baño de agua regulable para histología
- Cuchillo
- Mangos y hojas para visturí
- Placas de Petri

- Portaobjetos y cubreobjetos
- Cilindros graduados de 100 mL
- Moldes de Leuckart
- Papel de filtro
- Gasa

10.5 Muestras. Según NC 55-01.

10.6 Determinación. Se realizará por el método de corte por parafina, cuando se requiera mayor precisión, y por congelación, como método rutinario.

10.6.1 Método de corte por parafina

10.6.1.1 Fijación. Se basa en sumergir las muestras obtenidas, en la solución de formaldehído neutro al 10 % v/v para que se preserve lo más posible su estructura tisular para estudios histopatológicos.

Se utilizará el formaldehído neutro al 10 % v/v durante 24 a 48 h. Lavar con agua corriente durante 4 a 16 h.

10.6.1.2 Deshidratación. Los fragmentos seleccionados y fijados se envolverán en pequeños pedazos de gasa, confeccionando una bolsa y atándola con cordel. Dentro de la bolsa se colocará un pedacito de cartulina o cartón blanco, donde se escribirá con lápiz el número del caso y el año.

Se lavarán los tejidos fijados, con agua corriente durante 16 a 24 h y se pasarán por los alcoholes siguientes:

- Alcohol 70 % v/v, durante 30 min
- Alcohol 95 % v/v, durante 30 min
- Alcohol 99,5 % v/v, 5 veces, durante 30 min cada vez
- Acetona, 2 veces, durante 30 min cada vez. Puede sustituirse este paso por dos pases de alcohol al 99,5 %, durante 30 min cada vez.

El volumen de los líquidos deshidratantes será diez o más veces el volumen de las piezas.

10.6.1.3 Aclaración. Las muestras se pasarán por xilol 2 veces, durante 30 min cada vez, utilizando el aclarador en proporción de 10:1 en relación con el volumen de las muestras.

10.6.1.4 Inclusión. Se prepararán 3 jarras con parafina fundida y filtrada por papel y se marcarán con los números I, II y III. Para mantener licuada la parafina, se mantendrá la estufa 2°C por encima del punto de fusión del reactivo.

- Pasar la muestra por parafina de la jarra I, durante 24 h
- Pasar la muestra por parafina de la jarra II, durante 16 h
- Pasar la muestra por parafina de la jarra III, a la cual se le añade el 5 % de cera alba o cera de abejas, según el volumen de parafina
- Sobre una placa de vidrio, plástica o formica, colocar los moldes Leuckart y verter un poco de parafina de la jarra III, para crear una base
- Sacar los fragmentos de la parafina de la jarra III y colocarlos en el centro del molde. Verter rápidamente parafina de esta misma jarra hasta completar la altura del mismo.

Identificar el tejido con una tarjeta colocada en uno de los extremos del molde, donde se escribirá con lápiz el número del caso y el año, antes que se solidifique la parafina. Ayudar a la solidificación con fragmentos de hielo.

10.6.1.5 Corte

Se recortará el extremo de parafina de las caras del bloque, utilizando un cuchillo o espátula ligeramente calentado.

- Montar el bloque en la platina del micrótomo
- Cortar secciones de 10 a 15 μ hasta llegar al tejido
- Hacer un corte de prueba para asegurar que toda la muestra está siendo cortada.
- Enfriar la superficie de corte con un fragmento de hielo
- Graduar el micrótomo y realizar 1 μ cortes del grosor deseado
- Utilizando un pincel de pelo fino, humedecido en agua, trasladar los cortes a un baño de agua regulable para histología, manteniendo 2°C por encima del punto de fusión de la parafina

- Introducir una lámina portaobjetos, previamente preparada con albúmina glicerizada de Mayer, bajo el corte y recogerlo, sobre el mismo, ayudado con un pincel.

10.6.2 Método de corte por congelación

10.6.2.1 Fijación. Según apartado 10.6.1.1.

10.6.2.2 Corte por congelación con dióxido de carbono. Se colocarán los fragmentos fijados hasta el momento del corte, en un recipiente que contenga agua corriente.

- Cortar con bisturí los bordes para darles forma definitiva y colocarlos en la platina del microtomo, sobre un disco de papel filtro humedecido en agua
- Abrir bruscamente por pocos segundos, la llave de salida de dióxido de carbono. Repetir esta operación a cortos intervalos, hasta que el fragmento se haya congelado
- Realizar cortes hasta que los mismos abarquen toda la superficie del fragmento
- Dar salida nuevamente al dióxido de carbono y realizar el corte del grosor deseado
- Trasladar los cortes, utilizando la yema del dedo anular mojado en agua, a una placa de Petri que contenga agua, hasta el momento de ser montados; si el tiempo de montaje excede de 1 h, agregar 2 mL de formaldehído al 10 % v/v
- Pasar los cortes por alcohol al 70 % durante 3 a 4 min, con ayuda de una varilla de vidrio
- Pasarlos por alcohol al 50 % durante 1 min.
- Extraerlos con un portaobjetos preparado con albúmina glicerizada de Mayer, secada a la llama.
- Secar entre papel filtro o poner a secar sobre la estufa.

10.6.2.3 Corte por congelación con freon. Se colocarán los fragmentos fijados hasta el momento del corte, en un recipiente que contenga agua corriente.

- Cortar con bisturí los bordes para darles forma definitiva y colocarlos en la platina del microtomo, sobre un disco de papel de filtro humedecido en agua
- Encender el equipo y controlar hasta que el fragmento se haya congelado
- Realizar cortes hasta que los mismos abarquen toda la superficie del fragmento
- Realizar los cortes del grosor deseado

- Trasladar los cortes, utilizando la yema del dedo anular mojado en agua, a una placa de Petri que contenga agua, hasta el momento de ser montado. Si el tiempo de montaje excede de 1 h, agregar 2 mL de formaldehído al 10 % v/v
- Pasar los cortes por alcohol al 70 % durante 3 a 4 min, con ayuda de una aguja o varilla de vidrio
- Pasarlos por alcohol al 50 % durante 1 min. Extraerlos con un portaobjetos preparado con albúmina glicerizada de Mayer, secada a la llama
- Secar entre papel filtro o poner a secar sobre la estufa.

10.6.3 Tratamiento de los cortes antes de la coloración. Se efectuarán los pasos siguientes:

- Para cortes incluidos en parafina. Desparafinado
 Pasar por xilol, 3 veces, durante 5 min cada vez
 Pasar por alcohol al 95 %, 3 veces, durante 5 min cada vez
 Pasar por alcohol al 70 %, durante 3 min
 Pasar por agua, durante 1 min a 2 h.
- Para cortes por congelación. Los cortes montados y completamente secos, se pasarán por alcohol al 95 %, durante 3 min, y por agua, durante 1 min hasta 2 h.

10.6.4 Coloración de hematoxilina y eosina

- Se colocará con hematoxilina alúmina de Harris, de 1 a 4 min
- Se enjuagará con agua
- Se diferenciará con alcohol-clorhídrico, durante 15 a 30 min. Se controlará la diferenciación en el microscopio, donde el núcleo se distinguirá y el resto del tejido será incoloro
- Se lavará con agua corriente, durante 30 min
- Se coloreará con eosina de 30 s a 2 min, dependiendo de la brillantez del contraste deseado
- Se diferenciará con agua durante 1 min
- Alcohol etílico al 70 % v/v durante 1 min

- Alcohol de 95 % v/v, cuatro pases, durante 30 s a 1 min cada uno
- Carbol-xilol o xilol puro, dos pases, durante 2 a 3 min cada uno
- Se montará el cubreobjetos con bálsamo de Canadá. Se observará al microscopio.

10.7 Expresión de los resultados

10.7.1 PPC. A nivel de encéfalo se observará inflamación, diapedesis, endoteliosis vascular, degeneración hialina fibrinoide y mucoide de las paredes vasculares. Degeneración neuronal con picnosis, cariorrexis y cariólisis. Satelitosis, neuronofagia y gliosis focal difusa. En ocasiones observamos microhemorragias.

Estas variaciones se observan en la sustancia gris y blanca y en su conjunto caracterizan una encefalitis no purulenta.

10.7.2 FPA. Se producen cambios degenerativos graves en los tejidos linfoides, más evidentes en la forma aguda, incluidos el bazo y los ganglios linfáticos, observándose picnosis y cariorrexis de los linfocitos de estos órganos y en otros. Las lesiones cerebrales se caracterizan por degeneración neuronal e infiltración perivascular, no muy severas, por células mononucleares con frecuente cariorrexis, picnosis y necrosis fibrinosa de las paredes vasculares, acompañados de hiperemia y trombosis mural. Necrosis de los hepatocitos portaes e infiltrado linfocitario. Hemorragias en los diferentes órganos.

En las formas subagudas y crónicas se observan hiperplasia de los elementos linfoides del sistema reticuloendotelial.

Las lesiones degenerativas están sobrepuestas a los ganglios hiperplásticos en todos los órganos.

10.8 Informe

El mismo recogerá los siguientes datos:

- Número del caso
- Fecha de entrada
- Unidad
- Empresa
- Municipio
- Provincia

- Resultados
- Firma del patólogo
- Firma del Jefe de Departamento
- Fecha de salida.

COMPLEMENTO

Normas estatales de referencia:

- NC 20-03:72 Productos químicos. Clasificación por calidades y definiciones
- NC 21-01:72 Agua para análisis
- NC 21-05:72 Productos químicos analíticos. Especificaciones
- NC 55-01:85 Servicios veterinarios. Enfermedades rojas del cerdo. Selección y obtención de muestras
- NC 55-05:85 Servicios veterinarios. Actividad de laboratorio. Términos y definiciones

Recomendación internacional consultada:

- CAME RS 21.700.07.77 Animales de cría. Métodos para el diagnóstico de laboratorio de la Peste Porcina Clásica

Bibliografía consultada:

- CONCELLUN, A. La Peste Porcina Africana y la Clásica. Editorial Aedos. Barcelona. 1960
- JUBB, K.V.F y KENNEDY, P.C. Patología de los animales domésticos. Academia Press. New York. 1974
- KONNO, W.D.; TAYLOR; W.R.y HENSCHKELE. Patología hepática en la Fiebre Porcina Africana. Plum. Island Animal. Centro de enfermedades (USA). 1969
- RAMOS, R.LESCAY, M FERNANDEZ, H. y SANCHEZ, C. Fiebre Porcina Africana experimental, consideraciones anatomopatológicas. Rev.CUBA,C.Vet.,Vol. 3 No. 1982

Instituto Nacional de Medicina Veterinaria, reporte preliminar del brote de Fiebre Porcina Africana en Cuba. Informe Oficial de Cuba al XIX Congreso Mundial de Med. Vet. y Zoot. CIUDAD MEXICO. 1971