



Veterinary Services.
Porcine Red Diseases.
Virological Control for
Classical Porcine Pest

Службы ветеринарные. Красные болезни
свиней. Вирусный контроль диагноза
классической свиной чумы

Esta norma establece los métodos de control virológico para el diagnóstico de la Peste Porcina Clásica.

1. Generalidades

- 1.1 La manipulación y distribución de todo el instrumental, previamente esterilizado, se realizará en área estéril.
- 1.2 Para la preparación de los reactivos se utilizará agua para análisis según la NC 21-01:72 "Agua para análisis". Los productos utilizados serán de calidad p.a. según la NC 20-03:72 "Productos químicos. Clasificación por calidades y definiciones" y la NC 21-05:72 "Productos químicos analíticos. Especificaciones".
- 1.3 Para la preparación de las soluciones reguladoras de pH, véase la NC 90-13-08:78 "Aseguramiento Metrológico. Medidores de pH. Soluciones reguladoras de pH. Requisitos para su elaboración".
- 1.4 Todos los materiales utilizados serán colocados en recipientes con tapas y pasados por autoclave a 98,066 kPa, a 121 °C, durante 45 min.
- 1.5 Las pipetas serán colocadas en recipientes que contengan solución germicida.
- 1.6 Todos los frascos de soluciones se rotularán.
- 1.7 Para los términos y definiciones véase la NC 55-05:85 "Servicios veterinarios. Actividad de laboratorio. Términos y definiciones" y la NC 55-12:86 "Servicios veterinarios. Enfermedades rojas del cerdo. Control virológico para el diagnóstico de la Fiebre Porcina Africana".

METODOS DE CONTROL

2. Inmunofluorescencia directa:

- 2.1 Objetivo y alcance. Este método se establece para determinar la presencia o no del virus de Peste Porcina Clásica.

2.2 Fundamento del método. Se basa en poner en contacto los cortes de tejidos sospechosos de Peste Porcina Clásica, con el conjugado específico y valorar la fluorescencia.

2.3 Reactivos químicos, bioquímicos y biológicos

2.3.1 Acetona

2.3.2 Disolución reguladora de hidrogenocarbonato de sodio 0,05 M

Disolución de hidrogenocarbonato de sodio 0,5 M; pH 9,5	100 mL
Agua	900 mL
Cloruro de sodio	8,5 mL

2.3.2.1 Disolución de hidrogenocarbonato de sodio 0,5 M

Disolución de hidrogenocarbonato de sodio 0,5 M; pH 9,5 (A)

Hidrogenocarbonato de sodio	42 g
Agua	1 000 mL

Disolución de carbonato de sodio 0,5 M (B)

Carbonato de sodio	62 g
Agua	1 000 mL

Se unirán ambas disoluciones y se ajustará el pH.

2.3.3 Disolución reguladora con glicerina

Disolución reguladora de hidrogenocarbonato de sodio 0,05 M	1 mL
Glicerina	9 mL

2.3.4 Disolución reguladora de fosfatos (PBS madre)

Disolución de hidrogenofosfato de sodio 0,1 M (A)

Dihidrogenofosfato de sodio	15,6 g
Agua	1 000 mL

Disolución de hidrogenofosfato de disodio 0,1 M (B)

Hidrogenofosfato de disodio	14,2 g
Agua	1 000 mL

Unir:

Disolución A 100 mL

Disolución B 200 mL

2.3.5 Disolución PBS de trabajo 0,005 M

PBS madre 100 mL

Agua 1 900 mL

Cloruro de sodio 12 g

2.3.6 Disolución de azul de Evans (disolución madre)

Azul de Evans 1 g

Agua 100 mL

2.3.7 Disolución de azul de Evans al 0,25 % (para trabajo)

Azul de Evans madre 1 mL

PBS de trabajo 39 mL

2.3.8 Conjugados. Diluidos según indicaciones del fabricante.

- Peste Porcina Clásica (PPC)
- Control negativo
- Fiebre Porcina Africana (FPA).

2.4 Aparatos, utensilios y medios de medición

- Microscopio para fluorescencia
- Centrífuga hasta 628,320 rad/s
- Incubadoras
- Crióstato - 30 °C o micrótomo de congelación
- Balanza técnica LSP 1 Kg, vD 1 g
- Balanza analítica LSP 500 g, vD 0,001 g
- Congelador de - 70 °C
- Lámparas germicidas
- Balón de dióxido de carbono
- Pipetas de 1 mL, vD 0,01
- Pipetas de 10 mL, vD 0,1

- Pipetas de Pasteur
- Frascos de vidrio de 10; 20; 50; 100 y 500 mL
- Placas Petri de (200 . 20) mm
- Frascos Koplín
- Bandejas esmaltadas con tapa
- Tubos de 15 mL, fondo cónico
- Papel de filtro cualitativo.

2.5 Toma de muestras. Según la NC 55-01:85 "Servicios veterinarios. Enfermedades rojas del cerdo. Selección y obtención de muestras".

2.6 Preparación de las muestras de ensayo

2.6.1 Corte por congelación. Se realizarán 3 cortes de cada muestra, cada uno con 5 μ m de espesor, en crióstato o en un micrótomo de congelación. Se colocarán los mismos sobre láminas portaobjetos y se dejarán secar al ambiente durante 30 min.

2.6.2 Frotis de la médula roja. Se seccionará el esternón a lo largo de la línea de unión costal. Se presionará y se extraerá la médula, preparándose los frotis en láminas portaobjetos. Se dejará secar al ambiente.

2.6.3 Frotis de concentración leucositario de sangre periférica

- la sangre obtenida se mantendrá con anticoagulante, en una gradilla, durante 60 min al ambiente
- Con pipeta de Pasteur se extraerá la capa de leucocitos, depositándose en un tubo de 15 mL, de fondo cónico
- Se centrifugará a $10^4,720$ rad/s, durante 10 min
- Se eliminará el sobrenadante
- Se preparará el frotis en láminas portaobjetos, utilizando el sedimento, evitándose los hematíes
- Se dejará secar al ambiente.

2.7 Determinación

2.7.1 Fijación. Se colocarán las láminas en frascos Koplín que contengan acetona helada a -20°C , durante 5 a 10 min. La acetona bañará totalmente el corte. Se sacarán las láminas, dejándose al ambiente hasta la total evaporación de la acetona. Los preparados podrán conservarse a -20°C , durante 6 meses.

2.7.2 Hidratación y secado. Se llenarán 3 frascos Koplín con PBS de trabajo (marcarlos I, II y III).

- Se colocarán las láminas en el I, durante 5 min
- Se pasarán al II, durante 5 min, y luego al III, durante 10 min
- Se conservarán las láminas hasta 3 d en cámara húmeda tapada y colocadas a 4°C .

2.7.2.1 Preparación de la cámara húmeda

- Se cubrirá el fondo de una bandeja esmaltada con papel filtro humedecido con agua
- Se situarán varillas de vidrio paralelas, para colocar las láminas.

2.7.3 Conjugación. Se prepararán tres láminas con el conjugado de Peste Porcina Clásica, una con el conjugado de Fiebre Porcina Africana y una con el conjugado de control negativo, diluyendo los mismos con PBS de trabajo, según las indicaciones del fabricante. Se añadirá azul de Evans al 0,25 % en proporción de 3:1 (3 volúmenes de conjugados, 1 volumen de colorante).

- Con pipeta de 1 mL se dejará caer una gota de conjugado sobre la lámina
- Se dejará contactar durante 45 min a 37°C , en cámara húmeda.

2.7.3.1 Lavado

- Se llenarán 3 frascos Koplín con PBS de trabajo y se marcarán I, II y III.
- Se pasarán las láminas por cada frasco, a intervalos de 5 min

- Se lavará con agua corriente durante 10 min
- Se secará al ambiente
- Se depositará una gota de disolución reguladora con glicerina sobre la lámina, utilizando una pipeta de 1 mL y colocando un cubreobjetos

Se observará al microscopio.

2.8 Expresión de los resultados

En caso positivo. Se observará luminiscencia clara en el citoplasma celular, de color amarillo-verdoso o verdoso. El núcleo, de color oscuro y el fondo, de color anaranjado.

Se considera con valor diagnóstico, la visualización de grupos celulares entre 5 y 10 células por campo óptico.

En caso negativo. Se observará ausencia de luminiscencia citoplasmática amarillo-verdosa o verdosa. Los núcleos no se colorean.

En caso de conjugado de control negativo. Se observará una imagen opalescente de color verdoso.

En caso de conjugado de control de FPA. Será según apartado 4.6.2 de la NC 55-12.

2.9 Informe. El mismo recogerá los datos siguientes:

- Número del caso
- Nombre de la unidad
- Empresa
- Municipio
- Provincia
- Resultados
- Firma del jefe del Dpto.
- Firma de la dirección
- Fecha de entrada
- Fecha de salida.

3. Prueba biológica

3.1 Objetivo y alcance. Este método se establece para definir la presencia de PPC o FPA.

3.2 Fundamento del método. Se basa en inocular muestras de animales presuntamente afectados, a cerdos sensibles e hiperinmunes a PPC.

3.3 Reactivos químicos, bioquímicos y biológicos

3.3.1 Alcohol etílico 95 % v/v

3.3.2 Disolución salina fisiológica al 0,85 % v/v

3.3.3 Disolución de hidróxido de sodio 1 mol/L

Hidróxido de sodio 40 g

Agua 1 000 ml.

3.3.4 Disolución de ácido clorhídrico 1 mol/L

Acido clorhídrico 37 %; 1,19 g/cm³ 85 mL

Agua 1 000 mL

3.3.5 Mezcla de antibióticos

Penicilina G-potásica 5 000 000 UI

Estreptomicina 4 g

Agua estéril 50 mL

Se envasará por 5 mL y se conservará a - 20 °C .

3.3.6 Caldo simple de carne

- Se limpiará la carne de bovino adulto, de membranas y tendones

- Se molerán las carnes y se pasarán a frasco cónico y se añadirá agua corriente (1 l. de agua por cada 0,5 kg de picadillo). Se agitará con agitador de vidrio y se guardará de 4 a 8 °C, hasta el día siguiente

- Se hervirá durante 1 h, mezclando con el agitador. Se añadirá agua corriente para restituir el volumen original. Se retirará del fuego y se dejará reposar durante 20 min

- Se filtrará por papel en otro frasco cónico y se tapará con tapón de gasa y algodón, cubriéndose con papel Kraft y atándose con cordel.

- Se esterilizará a 98,060 kPa a 121 °C, durante 15 min

- Se unirán:

Caldo de carne 100 mL

Peptona 10 g

- Se disolverán los componentes a 100 °C, en baño de agua, durante 20 min. Se retirará del baño y se dejará refrescar durante 20 min. Se ajustará el pH de 7,2 a 7,4, con disolución de hidróxido de sodio 1 mol/L o disolución de ácido clorhídrico 1 mol/L.
- Se filtrará por papel y se distribuirá en tubos por 5 mL y se esterilizará en autoclave a 98,066 kPa, a 121 °C, durante 5 min.

3.3.7 Animales. Dos cerdos hiperinmunes a Peste Porcina Clásica, de 2 a 3 meses de edad.

Cinco cerdos sensibles, de 2 a 3 meses de edad.

3.4 Aparatos, utensilios y medios de medición

- Lámparas germicidas
- Centrífuga hasta 628,320 rad/s
- Jeringuillas de vidrio de 2 mL, vD 0,1 mL
- Agujas hipodérmicas No. 20 de 2,5 cm
- Tubos de centrifugas de 15 mL
- Pipetas de 1 mL, vD 0,01 mL
- Pipetas de 1 mL, vD 0,1 mL.

3.5 Toma de muestras. Según la NC 55-01.

3.6 Preparación de las muestras de ensayo. Se triturará 1 g de la muestra en un mortero, preparando una suspensión al 10 % en PBS o disolución salina fisiológica. Se añadirán 200 UI de penicilina y 200 µg de estreptomina, por mililitro de suspensión. Se conservará a 4 °C, durante 4 h.

Se centrifugará a 471,24 ó 523,60 rad/s, durante 10 min y se utilizará el sobrenadante como inóculo.

3.6.1 Control de esterilidad. Se sembrará 0,5 mL del sobrenadante, utilizando pipeta de 1 mL, en un tubo de caldo simple por cada muestra.

Se incubará a 37 °C, durante 5 d.

3.6.1.1 Lectura. En caso negativo, no se observará turbiedad en el medio

3.7 Determinación

3.7.1 Inoculación de cerdos sensibles. Se inocularán 3 cerdos sensibles a la Peste Porcina Clásica, por vía intramuscular, en la cara interna del muslo, con 2 mL del inóculo.

3.7.2 Inoculación de cerdos hiperinmunes a la Peste Porcina Clásica. Se inocularán 2 cerdos según apartado 3.7.1.

3.7.3 Cerdos controles. Se mantendrán 2 cerdos sensibles sin inocular, separados de los inoculados.

3.7.4 Se observarán todos los cerdos durante 14 d, controlando los síntomas clínicos diariamente y la temperatura cada 12 h .

3.8 Expresión de los resultados. Será positivo:

- Si 2 de los 3 cerdos sensibles inoculados, presentan síntomas de Peste Porcina Clásica y mueren
- Si los 2 cerdos hiperinmunes permanecen sanos o presentan signos clínicos débiles (fiebre) por corto tiempo, durante el período de observación
- Si los cerdos controles enferman y mueren, se demuestra la sensibilidad del grupo a la Peste Porcina Clásica.

Si todos los cerdos inoculados (sensibles e hiperinmunes) presenta síntomas, y mueren, se demuestra la sensibilidad del grupo a la FPA. En este caso no se realizará la prueba de confrontación.

3.9 Confrontación. Todos los cerdos que concluyan el período de observación vivos y sanos, se inocularán con virus patógeno de Peste Porcina Clásica según apartado 3.7.1.

3.9.1 Expresión de los resultados. Será positivo.

- De los sensibles: Si enferman y mueren demuestran que en el material que se investiga no existía virus de Peste Porcina Clásica. Si no enferman, ocurrencia excepcional, en el material que se investiga existe virus patógeno débil de Peste Porcina Clásica, que inmunizó a los cerditos.
- De los hiperinmunes: si permanecen sanos
- De los controles: si enferman y mueren.

3.10 Informe. Según apartado 2.9.

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 90-13-08:78 Aseguramiento Metrológico. Medidores de pH. Soluciones reguladoras de pH. Requisitos para su elaboración
- NC 55-01:85 Servicios veterinarios. Enfermedades rojas del cerdo. Selección y obtención de muestras
- NC 55-01:85 Servicios veterinarios. Enfermedades rojas del cerdo. Selección y obtención de muestras
- NC 55-12:86 Servicios veterinarios. Enfermedades rojas del cerdo. Control virológico para el diagnóstico de la fiebre Porcina Africana
- NC 55-05:85 Servicios veterinarios. Actividad de laboratorio. Términos y definiciones

Documento técnico normalizativo internacional consultado:

- CAME: RSR 21.700.07.77 Animales de cría. Método para el Diagnóstico de Laboratorio de la Peste Porcina Clásica

Bibliografía consultada:

- AYMAND J. M y BIBARD C. Balance de las técnicas de inmunofluorescencia en el campo de la Peste Porcina Clásica. Los Cahiers de Med. y Vet. Vol 40, No. 5 1971
- CARTER, G.R. Procedimientos de diagnóstico en bacteriología y micología veterinaria. 3ra edición. pág. 193 a 195, 1979
- CONCELIER A. La Fiebre Porcina Africana y Peste Porcina Clásica. Editorial Aedos, Barcelona, 1960
- GREGG, D.A., W.R. HES e I.C. PAN. Centro de enfermedades de animales extranjeras (EUA). 1978
- HES, W.R., I.C. PAN y C.I. DEBOER. Fiebre Porcina Africana Centro de enfermedades animales extranjeras (EUA), 1978
- 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 México, 1971
- JUBB, K.V.F. y P.C. KENNEDY. Patología de los animales domésticos. Academia Press. New York, 1974
- LUCAS, A. HAAG, JYB. LADENAUDIE. Peste Porcina Africana. Ed. Acribia. Zaragoza, 1971
- MARCHANT. I.A PACKER, P.A. Bacteriología y Virología. 3ra Ed. Editorial Acribia. Barcelona. España, 1970

MERCY, A. y BOND, M. Profilaxis de la Erisipela y Poliartri-
tis en cerdos. Pig. Farmer. 12:427, 1978

RAMOS, R. LESCAY, M FERNANDEZ, H. y SANCHEZ, C. Fiebre Porci-
na Africana experimental, consideraciones anatomopatológi-
cas. Rev. CUBA, C. Vet., Vol. 3 No. 1982.