



REPUBLICA DE CUBA

Servicios Veterinarios

ENFERMEDADES ROJAS DEL CERDO



55-12

1986

Control virológico para el diagnóstico de la Fiebre Porcina Africana

Veterinary Services.
Porcine Red Diseases.
Virological Control for Diagnosis of African Porcine Fever

Службы ветеринарные. Красные болезни свиней. Вирусный контроль диагноза африканской свиной лихорадки

Esta norma establece los métodos de control virológico para el diagnóstico de la Fiebre Porcina Africana.

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 Las pipetas serán colocadas en recipientes que contengan solución germicida.
- 1.5 Todos los frascos de soluciones se rotularán.
- 1.6 En la determinación del método inmunofluorescencia directa se investigarán simultáneamente las muestras para FPA y PPC. Esta última según la NC 55-13:86 "Servicios veterinarios. Enfermedades rojas del cerdo. Control virológico para el diagnóstico de la Peste Porcina Clásica".
- 1.7 Los medios nutritivos y disoluciones se esterilizarán en autoclave a 115°C, con vapor de presión de 68,646 kPa, durante 15 min.
- 1.8 El filtrado de las disoluciones, medios nutritivos y suero, se realizará con filtro esterilizado y las placas tendrán poros con las siguientes dimensiones: 1,2; 0,9 y 0,7 μ m.

Aprobada:
Junio 1986

ESTA NORMA ES OBLIGATORIA

Vigente a partir de:
Enero 1987

- 1.9 Todo el proceso de elaboración de cultivos celulares se realizará con bata quirúrgica, gorros y tapabocas estériles, de uso exclusivo para el área estéril, con ambiente de aire filtrado y acondicionado.
- 1.10 Todos los materiales utilizados en la elaboración de cultivos celulares serán estériles, sometiéndose posteriormente a la acción de radiaciones ultravioletas, durante 30 min en el área estéril, antes de su uso.
- 1.11 Durante el proceso de elaboración de los cultivos celulares, no podrá abrirse la puerta, para entrar o salir del área estéril.
- 1.12 Sólo se permitirá el agitador magnético, como equipo en el área estéril.
- 1.13 Antes de comenzar el trabajo de elaboración de los cultivos celulares, las manos se lavarán con jabón y agua corriente, cepillando las uñas y desinfectándose con alcohol etílico al 70% v/v o cloramina T al 2% v/v.
- 1.14 Se retirará el material sucio del área estéril, inmediatamente después de concluida cada etapa de trabajo.
- 1.15 Todos los equipos, cristalerías, instrumental y materiales en general, destinados a la elaboración de cultivos celulares, serán de uso exclusivo.
- 1.16 La limpieza del área estéril y demás áreas destinadas a la elaboración de cultivos celulares, se hará húmeda, diariamente y con desinfectantes, utilizando frazadas individuales.
- 1.17 Cada fin de semana se realizará limpieza general de paredes y mesas de trabajo, con cloruro de benzalconio o timerosal al 1%, aplicando vapores de formaldehído con ayuda del permanganato de potasio, según el siguiente cálculo:
- | | |
|---------------------------|--------------------------------|
| Por cada m ³ : | Permanganato de potasio 6 g |
| | Formaldehído de 38 a 40% 12 mL |
- Depositar el permanganato en un recipiente cuyo volumen sea 3 ó 4 veces mayor, añadir el formaldehído y cerrar la puerta.
- 1.18 La esterilización en autoclave se realizará a 121°C, con vapor de presión de 98,066 kPa, durante 45 min.
- 1.19 La esterilización en horno y estufa se realizará a 180°C, durante 2 h.
- 1.20 El fregadero destinado para la cristalería de cultivos celulares, será de uso exclusivo para este fin.
- 1.21 La manipulación de ácidos y álcalis se realizará con medios de protección (guantes, caretas y delantal antiácido).

2. Términos, definiciones y símbolos

- 2.1 Triturar. Reducir a polvo o pasta por aplastamiento en un mortero.
- 2.2 Hemadsorción. Fijación de glóbulos rojos.
- 2.3 FPA. Fiebre Porcina Africana.
- 2.4 IFD. Inmunofluorescencia directa
- 2.5 Conjugado. Anticuerpo específico marcado con isotiocianato de fluoresceína.
- 2.6 PBS. Solución de fosfato, reguladora.
- 2.7 PPC. Peste Porcina Clásica.
- 2.8 Suero homólogo. Suero de la misma especie animal.

Para los restantes términos y definiciones, véase la NC 55-05:85 "Servicios veterinarios. Actividad de laboratorio. Términos y definiciones".

MÉTODOS DE CONTROL

3. Aislamiento

- 3.1 Objetivo y alcance. Este método se establece para determinar la presencia o no del virus de la Fiebre Porcina Africana y definir el diagnóstico en cultivos de tejidos.
- 3.2 Fundamento del método. Se basa en inocular los cultivos de tejidos de leucocitos de cerdos y demostrar la hemadsorción.
- 3.3 Reactivos químicos, bioquímicos y biológicos

3.3.1 Disolución de fosfato reguladora (PBS)

Cloruro de sodio	8,0 g
Cloruro de potasio	0,20 g
Cloruro de calcio	0,10 g
Cloruro de magnesio hexahidratado	0,10 g
Fosfato de magnesio dihidratado	1,15 g
Fosfato de potasio	0,20 g
Agua	1 000 mL

Se ajustará el pH a 7,2 y se distribuirá en frascos de vidrio por 400 mL. Se rotulará y se esterilizará

a 121°C, con vapor de presión de 98,066 kPa, durante 30 min.

3.3.2 Disolución de Lugol

Yodo metálico	10 g
Yoduro de potasio	20 g
Agua	1 000 mL

Se trituran en un mortero los dos reactivos y se añadirá el agua. Se filtrará por papel.

3.3.3 Disolución de citrato de sodio al 3,8%

3.3.4 Disolución de antibióticos

Penicilina G Potásica	10 ⁶ UI
Estreptomina	1 g

Se disolverá en 20 mL de PBS. Se conservará a -20°C y se utilizará 0,2 mL por cada 100 mL de medio M-199.

3.3.5 Medio M-199. Medio nutritivo especial para cultivos de tejidos. Se prepara según indicaciones del fabricante.

3.3.6 Caldo simple de carne. Véase apartado 3.3.6 de la NC 55-13.

3.3.7 Suero de cerdo. Se obtendrá de cerdo de 30 ± 2 kg, sano y limpio, bañado con detergente y agua abundante.

- Se obtendrá la sangre por punción intracardíaca, utilizando un "tróquer"
- Se dejará deslizar la sangre por las paredes del frasco
- Se incubará a 37°C, durante 1 a 3 h
- Se separará el suero y se clarificará centrifugando de 125,66 a 209,55 rad/s, durante 30 min. Repetir el proceso de 2 a 3 veces
- Se colocará el filtro bajo la campana de protección, con el extremo superior instalado a un kitasato que comunica con la bomba compresora. Se instalará el extremo inferior del filtro a una campana de vidrio para proteger los frascos
- Se depositará 500 mL de PBS en el kitasato y se pasará por el filtro para lavar la membrana filtrante
- Se depositará en el frasco kitasato el suero que va a ser filtrado y se hará pasar por el filtro a un

- frasco hasta 100 ó 200 mL, el cual se pondrá a 37°C durante 5 d. Se continuará el proceso de filtración envasando y controlándose de la forma anterior, se tapará y protegerá con papel de aluminio; rotular e inactivar a 56°C, durante 30 min, dejándose enfriar y congelar posteriormente a -20°C.

3.3.7.1 Control bacteriológico. Se depositará en un tubo de caldo simple, 1 mL de la última fracción del suero filtrado y se incubará a 37°C, durante 5 d.

3.3.7.1.1 Lectura. Si aparece enturbiamiento del medio de control bacteriológico o en la fracción incubada en frasco, se repetirá el control bacteriológico según 3.3.7.1. Si reaparece la contaminación, el lote filtrado se elimina.

3.3.8 Glóbulos rojos de cerdo. Se obtendrá del mismo cerdo, por punción intracardíaca, sangre con disolución de citrato de sodio, en proporción 2:3.

3.3.8.1 Lavado de los glóbulos rojos. Se centrifugará en tubo cónico de 15 mL, a 125,66 rad/s durante 10 min. Se eliminará el sobrenadante y se añadirá PBS, centrifugando nuevamente. Se repetirá 3 veces el proceso con PBS, y se conservarán en refrigeración hasta el momento de usarse.

3.3.9 Cultivo de leucocitos de cerdo. El cerdo sangrado, se sacrifica por corte de la yugular.

En la extremidad posterior, a nivel del fémur, se realizará un corte con cuchillo o bisturí, previa desinfección con agua yodada. Se separará piel y músculos con ayuda de tijeras y pinzas. Se extraerá el fémur, separándolo de las articulaciones coxofemoral y tibiofemoral. Se cortará con una sierra o serrucho el hueso, a 2 cm del borde de las articulaciones. Con tijera y espátula se extraerá, raspando, la médula de dicho hueso, depositándola en frasco cónico de 200 mL que contenga un magneto y 100 mL del medio M-199.

Se colocará el frasco cónico en agitador magnético y se mantendrá durante 15 min. Se centrifugará en tubos cónicos por volúmenes de 50 mL, a 104,00 rad/s, durante 10 min. Se eliminará el sobrenadante y se resuspenderá el sedimento en 20 mL de medio M-199.

3.3.9.1 Conteo celular

- En cámara de Neubauer. Se preparará una mezcla de la suspensión celular en disolución de Tripán azul al 0,5% (1 mL de suspensión celular y 2 mL del colorante).

Se preparará la cámara, ajustando la lámina cubreobjeto hasta aparición de los anillos de Newton.

Se tomará 0,1 mL de la suspensión coloreada, con pipeta de 1 mL (limpiándose la punta con papel), y se aplicará al borde de la lámina cubreobjeto, en el espacio comprendido entre las ranuras de la cámara.

Se realizará la microscopía óptica utilizando objetivos de 16 . 32 mm. Se contarán todas las células vivas en los cuatro cuadrados mayores, compuestos cada uno por 16 subcuadrados menores, en los cuales se cuentan las células en forma de L, determinándose el valor promedio y multiplicándose éste por $3 \cdot 10^4$. El resultado corresponde al número de células en 1 mL de suspensión.

- En cámara de Gorjaev. Se preparará una mezcla de una suspensión celular en disolución de Tripán azul al 0,5% (1 mL de suspensión celular y 1 mL del colorante).

Se cargará la cámara como en la de Neubauer y se realizará microscopía óptica.

Se contarán las células en toda la cámara (25 cuadrados mayores y 100 subcuadrados). Se contará en forma de L y se multiplicará el número de células obtenidas por 2 200. El resultado corresponde al número de células en 1 mL de suspensión.

- 3.3.9.2 Siembra de las células. Se preparará una suspensión de células con una concentración de $8,5 \cdot 10^5$ para los tubos Leighton y $7,5 \cdot 10^5$ para los frascos de cultivo, según la fórmula siguiente:

$$X = \frac{a}{b} \cdot c \quad (\text{mL})$$

donde:

- X volumen total de la suspensión, con la concentración celular necesaria, para la siembra (mL)
- b número de células en 1 mL de suspensión
- a concentración de células requerida para la siembra (cél./mL)
- c volumen necesario de suspensión de células con $8,5 \cdot 10^5$ ó $7,5 \cdot 10^5$ (mL).

- 3.3.9.2.1 Preparación del medio para suspensión celular

- Se añadirá al medio M-199, 0,2 mL de solución de antibióticos por cada 100 mL de medio (equivalente a 100 UI de penicilina y 100 μg de estreptomina por mL de medio), utilizando pipeta de 1 mL

- Se añadirá 10% de suero homólogo, utilizando pipeta de 10 mL
- Se añadirá una suspensión celular para una concentración final de 600 000 u 800 000 células por mL
- Se añadirán los glóbulos rojos de cerdo, lavados, para una concentración final de 1%

3.4 Aparatos, utensilios y medios de medición

- Lámparas germicidas
- Incubadora
- Refrigerador doméstico
- Congelador de -20°C
- Microscopio invertido binocular
- Autoclave
- Centrífuga hasta 520,00 rad/s
- Centrífuga refrigerada hasta 2 618,00 rad/s
- Cámara contadora Newbaeur o Gorlaev
- Tubos de centrifuga fondo cónico de 15; 50; 100 y 500 mL
- Tubos Leighton (16 . 100) mm
- Frascos de vidrio de 500 mL
- Frasco de cultivo de 1 000 mL
- Agitador magnético
- Magnetos
- Frascos cónicos de 250; 500 y 1 000 mL
- Equipo de filtración
- Membrana filtrante
- Dispensador automático
- Mortero de 75 mm de diámetro
- Pipetas de 1 mL, vD 0,01 mL
- Pipetas de 2 mL, vD 0,01 mL
- Pipetas de 5 mL, vD 0,1 mL

- Pipetas de 10 mL, vD 0,1 mL
- Placas de Petri de (200 . 20) mm
- Balanza técnica LSP 500 g, vD 1 g
- Balanza analítica LSP 200 g, vD 0,1 mg
- Bomba de vacío.

3.5 Muestras. Véase la-NC 55-01:85 "Servicios Veterinarios. Enfermedades rojas del cerdo. Selección y obtención de muestras".

3.6 Preparación de la porción de ensayo. Se seleccionará 1 g de cada muestra y se preparan en morteros individuales suspensiones al 10% en PBS que contengan 200 UI de penicilina y 200 µg de estreptomycin por mL, previa trituración de los mismos.

Se centrifugará a 154,00 rad/s, a 4°C, durante 15 minutos, en centrifuga refrigerada y se utilizará el sobrenadante decantado.

3.6.1 Control bacteriológico. Se tomará con asa bacteriológica el sobrenadante y se introducirá en un tubo de caldo simple. Se agitará y se incubará a 37°C, durante 5 d, observándose diariamente.

3.6.1.1 Lectura. En caso negativo, no se observará enturbiamiento del medio.

3.7 Determinación

3.7.1 Inoculación. Los cultivos se inocularán entre las 18 y las 24 h de sembrados.

- Se identificarán 2 tubos de cultivos de leucocitos por cada tipo de muestra y se identificarán 4 tubos como controles del cultivo
- Se inoculará 0,1 ó 0,2 mL de la porción de ensayo de la muestra a investigar, utilizando pipeta de 1 mL
- Se incubará a 37°C, observándose diariamente al microscopio durante 3 d.

3.7.2 Expresión de los resultados. En caso positivo, se observará imagen de hemadsorción, con hematíes alrededor de los leucocitos formando coronas.

En caso de no observación de la hemadsorción se realizarán pases.

3.7.2.1 Pases. Se congelarán los tubos con los cultivos inoculados, al tercer día de observación.

- Se descongelará e inocularán cultivos celulares frescos con 0,1 ó 0,2 mL, utilizando pipeta de 1 mL
- Se continuará el mismo procedimiento hasta obtener 3 pases, repitiendo la microscopía en cada uno

3.8 Informe. El mismo recogerá los datos siguientes:

- No. del caso
- Nombre de la unidad
- Empresa
- Provincia
- Municipio
- Resultados
- Firma del jefe de departamento
- Firma de la dirección
- Firma del analista
- Fecha de entrada
- Fecha de salida.

4. Inmunofluorescencia directa

4.1 Objetivo y alcance. Este método se establece para determinar la presencia del antígeno de la Fiebre Porcina Africana y establecer el diagnóstico.

4.2 Fundamento del método. Se basa en la observación microscópica de la reacción antígeno-anticuerpo fluorescente.

4.3 Reactivos, químicos, bioquímicos y biológicos.

4.3.1 Disolución de fosfato reguladora (PBS). Según apartado 3.3.1.

4.3.2 Acetona refrigerada a -20°C

4.3.3 Solución reguladora glicerinada

Glicerina	1 mL
PBS	9 mL

4.3.4 Conjugados. Diluidos según indicaciones del fabricante.

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

4.4 Aparatos, utensilios y medios de medición

- Microscopio para fluorescencia
- Crióstato de -30°C o micrótopo de congelación
- Balón de dióxido de carbono
- Incubadora de 37°C
- Congelador de -20°C
- Bandejas esmaltadas con sus tapas
- Pipetas de 1 mL, vD 0,01 mL
- Pipetas de 10 mL, vD 0,1 mL
- Placas de petri (200 . 20) mm
- Frascos Koplín.

4.5 Muestras. Fragmentos de bazo, riñón, hígado, pulmón y ganglios.

4.6 Determinación

4.6.1 Preparación de la porción de ensayo. De las muestras escogidas se colocará un fragmento de 3 mm de espesor por 10 mm de largo, sobre un disco de papel filtro embebido en agua.

Se congelará a -25°C en la cámara del crióstato o con el balón de dióxido de carbono y se realizarán cortes de 2 a 4 μm , montándose los cortes sobre láminas portaobjetos y se identificarán. Se secarán al ambiente durante 15 min y se fijarán en acetona, contenida en frascos Koplín, durante 60 min.

Se secarán a 37°C , durante 15 min, y se cubrirán los cortes con 0,1 mL del conjugado, utilizando pipeta de 1 mL, e incubándose en cámara húmeda durante 30 min.

Se eliminará el conjugado y se lavará con PBS, tres veces, a intervalos de 10 min. Se secará en papel filtro y se montarán cubreobjetos con disolución reguladora de glicerina, colocándose en cámara húmeda

- Controles. Se prepararán en la misma forma, láminas teñidas con conjugados de control negativo y de PPC, y se observarán las láminas al microscopio

4.6.2 Expresión de los resultados

En caso positivo, se observará presencia de inclusiones yuxtannucleares, fuertemente luminiscentes y núcleo negro.

En caso negativo, se observará que las células no afectadas se tiñen en verde claro sin luminiscencia.

En caso de conjugado de control negativo, se observará una imagen opalescente de color verde.

En caso de conjugado de control de PPC, será según apartado 2.8 de la NC 55-13.

4.7 Informe. Según apartado 3.8

5. Prueba biológica

Según sección 3. de la NC 55-13.

5.1 Inmunofluorescencia directa de la prueba biológica. Se procederá según sección 4., con las muestras que se tomarán de los animales enfermos o muertos, en la prueba biológica.

5.2 Informe. Según apartado 3.8.

COMPLEMENTO

Normas estatales de referencia:

- NC 55-01:85 Servicios veterinarios. Enfermedades rojas del cerdo. Selección y obtención de muestras
- NC 55-05:85 Servicios veterinarios. Enfermedades rojas del cerdo. Actividad de laboratorio. Términos y definiciones
- NC 55-13:86 Servicios veterinarios. Enfermedades rojas del cerdo. Control virológico para el diagnóstico de la Peste Porcina Clásica
- 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

Documentos técnico normalizativos internacionales consultados:

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

Bibliografía consultada:

- Centro de Enfermedades Animales de Plum Island del Servicio de Investigaciones Agrícolas. Dpto. de Agricultura de los E.U.A. Segunda Edición. Mayo, 1975