



Veterinary Services. Porcine
Red Diseases. Bacteriological
Control for Erysipelas Diagno-
sis

Ветеринария. Красные болезни свиней.
Бактериологический контроль диагноза
рожи

Esta norma establece los métodos de control bacteriológico para el diagnóstico de erisipela en el cerdo.

GENERALIDADES

1. La manipulación y distribución de todo el instrumental previamente esterilizado, se realizará en área estéril.
2. Para la preparación de los medios de cultivos se utilizará agua para análisis según NC 21-01:72 "Agua para análisis" y los productos 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".
3. En todos los medios donde sea necesario el ajuste de pH, el mismo se efectuará con disolución de hidróxido de sodio 10 mol/L y ácido clorhídrico puro para cantidades grandes de medio y 1:10 para cantidades pequeñas.
4. En el proceso de producción de los medios de cultivos, los frascos y tubos que los contengan, serán tapados con tapones de algodón y gasa, retapados con papel Kraft y atados con cordel, antes de la esterilización.
5. Durante la siembra, las pinzas, tijeras y espátulas, se limpiarán con algodón embebido en alcohol y se flamearán entre cada muestra. Las asas se flamearán al rojo entre cada muestra y entre cada medio de cultivo.
6. Todos los envases que contengan las soluciones, se rotularán.
7. Para los términos y definiciones véase la NC 55-05:85 "Servicios veterinarios. Actividad de laboratorio Términos y definiciones".

METODO DE CONTROL

8. Aislamiento de *Erysipelothrix rhusiopathiae*

- 8.1 Objetivo y alcance. Este método se establece para determinar la presencia o no del agente bacteriano en las muestras seleccionadas y realizar el diagnóstico.

8.2 Fundamento del método. Este método se basa en sembrar las muestras en medios bacteriológicos e incubarlos hasta obtener o no crecimiento bacteriano.

8.3 Reactivos químicos, bioquímicos y biológicos

8.3.1 Agar sangre

Agar simple 500 mL

Sangre de carnero desfibrinada 50 mL

Se añade la sangre al agar simple y se enfría entre los 45 a 50 °C, luego se mezcla bien sin formar espuma y se vierten 15 ó 20 mL en placas de Petri; se flama con mechero la superficie del medio en la placa, para destruir cualquier burbuja de aire.

- Agar simple

Caldo simple 1 000 mL

Agar No. 1 16 g

Se distribuirá el caldo simple en dos frascos cónicos de 500 mL, conteniendo ambos 8 g de agar. Se esterilizará en autoclave a 121 °C y vapor de presión a 107,873 kPa durante 20 min y se mantendrá al ambiente.

Se usará agar No. 1 o la masa equivalente en otras calidades de agar.

- Caldo simple

Infusión de carne o corazón. Se limpiará de aponeurosis, tendones y grasa, 1 kg de carne o corazón. Se muele y añaden 2 000 mL de agua y se guarda en refrigeración hasta el día siguiente. Se cocinará la carne molida, que hervirá entre 30 ó 60 min.

Se dejará refrescar y filtrará por gasa, exprimiéndole el sedimento que quede sobre la misma. Se restituirá el volumen inicial con agua y se añadirá:

Peptona para bacteriología 20 g

Cloruro de sodio 10 g

Se hervirá hasta total disolución de los mismos, se dejará reposar durante 20 min y se filtrará por papel, cuidando de no agitar el sedimento, y se ajustará el pH de 7,2 a 7,4 .

Se distribuirá en frascos cónicos de 500 mL y en tubos de cultivos de 5 mL y se esterilizará en

autoclave a 121 °C y vapor de presión a 107,873 kPa durante 20 min. Se conserva en refrigeración.

- Sangre de carnero desfibrinada. Se depilará la zona del cuello del carnero y desinfectará con alcohol, utilizando un algodón. Se punciona la yugular con la aguja del equipo extractor o de venoclisis. Se perfora con la aguja del otro extremo del equipo, el tapón del frasco colector. Este frasco colector con vacío contendrá perlas de vidrio. Se dejará correr la sangre por las paredes del frasco, agitando constantemente por movimientos giratorios para provocar la desfibrinación y se filtrará la sangre por gasa.

8.3.2 Disolución de hidróxido de sodio 10 mol/L

8.3.3 Agar verde brillante

Caldo simple	1 000 mL
Lactosa para bacteriología	10 g
Extracto de levadura	3 g
Sacarosa para bacteriología	10 g
Rojo fenol al 2 g/L	40 mL
Verde brillante al 5 g/L	1 mL
Agar No. 1	16 g

Se añadirán los componentes antes señalados al caldo simple, excepto el agar. Se distribuye el agar en 2 frascos cónicos de 1 000 mL y se añade 500 mL del caldo antes preparado en cada uno y se esteriliza en autoclave a 121 °C, con vapor de presión a 107,873 kPa, durante 20 min. Se distribuye en placas de Petri por 15 ó 20 mL.

- Rojo fenol al 2 g/L

Rojo fenol	1 g
Hidróxido de sodio 0,1 mol/L	40 mL
Agua	460 mL

Se mezclan los componentes.

- Disolución de hidróxido de sodio 0,1 mol/L

- Verde brillante al 0,5 %.

8.3.4 Gram No. 1

Disolución A

Cristal violeta	5 g
-----------------	-----

Alcohol etílico absoluto 99,5 %

200 mL

Se disuelve el cristal violeta, se mantiene a 37 °C durante 24 h. Se filtrará papel y se envasará en frascos ámbar; se tapa herméticamente.

Disolución B

Oxalato de amonio anhidro

8 g

Agua

800 mL

Para trabajar se unirán 20 mL de la disolución A y 80 mL de la disolución B.

8.3.5 Gram No. 2

Yodo metálico

2 g

Yoduro de potasio

4 g

Agua

200 mL

Se disuelve el yoduro de potasio en agua y se añade el yodo.

8.3.6 Gram No. 3

Disolución A

Fucsina básica

10 g

Alcohol etílico 95 %

100 mL

Disolución B

Solución de fenol al 5 % v/v

Se unirán 10 mL de A con 90 mL de B y se filtrará por papel.

8.3.7 Suero equino estéril

8.3.8 Solución de fenol al 5 %

8.3.9 Aceite para inmersión

8.4 Aparatos, utensilios y medios de medición

- Olla de aluminio de 50 L

- Incubadora

- Autoclave

- Estufa

- Microscopio binocular

- Esterilizadora
- Balanza analítica LSP 200 g; vD 0,1 mg
- Balanza técnica LSP 1 kg; vD 0,1 g
- Lámparas germicidas
- Equipos venoclisis
- Medidor de pH
- Placas de Petri (85 . 10); (100 . 10); (100 . 15) mm
- Tubos cónicos de 15 mL
- Tubos de cultivos de (15 a 18 . 150) mm
- Tubos de 5 mL
- Frascos cónicos de 250; 500; 1 000 y 2 000 mL
- Cilindros graduados de 250; 1 000 y 2 000 mL
- Pipetas de 1 mL; vD 0,01 mL
- Pipetas de 5 mL vD; 0,1 mL
- Frascos ámbar para reactivo, de 500 y 1 000 mL
- Morteros de 100 mm de diámetro.

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

8.6 Determinación. Se flamean las zonas afectadas y no afectadas de las muestras con un mechero.

Se hará un corte con tijera que abarque ambas zonas. En el caso de la articulación, se cortará con el bisturí y se expondrá el líquido.

Se toman las muestras con asa bacteriológica y se siembra: 1 placa de agar sangre por estrías, 1 placa de agar verde brillante por estrías y 1 tubo de caldo simple, al cual se le añadirá 0,05 mL de suero equino (utilice pipeta de 1 mL).

Se incubará a 37 °C durante 24 h .

8.6.1 Expresión de los resultados. En casos positivos:

- Agar sangre. Se observarán colonias pequeñas, translúcidas, con hemopepsia humolisis-alfa y hasta hemolisis-beta
- Agar verde brillante. No se observará crecimiento
- Caldo simple. Se observará turbidez uniforme sin presencia de película en la superficie del medio y con poco sedimento

Si el agar sangre resulta negativo, se tomará, con esa bacteriológica, del caldo simple con turbidez y se siembra en una placa de agar sangre por estrías.

Se incubará a 37 °C y se observa a las 24 h .

- Coloración de Gram. Se realizará coloración de Gram a las colonias observadas, se prepara frotis fino en láminas portaobjetos y se fija a la llama.

Cúbralos con Gram 1 durante 20 s

Lave con Gram 2 y cúbralos con éste durante 20 s

Lave con alcohol etílico de 95 % v/v hasta que decolore

Lave con agua

Cubra con Gram 3 diluido 1:20, durante 30 a 60 s

Lave con agua

Observe el microscopio con aceite para inmersión, previa limpieza de los lentes objetivos con éter dietílico.

En caso positivo, se observarán gérmenes pleomórficos en forma de bastones, que pueden presentarse agrupados en V, Y, cadenas o filamentos.

8.7 Informe. El mismo recogerá los siguientes datos:

- Número del caso
- Nombre de la unidad
- Empresa
- Provincia
- Municipio
- Resultados
- Firma del jefe de sección
- Firma del jefe de departamento
- Firma del director
- Fecha de salida.

9. Determinación bioquímica

9.1 Objetivo y alcance. Este método se establece para la clasificación del germen aislado, y determinar su especie.

9.2 Fundamento del método. Este método se basa en enfrentar la cepa aislada a diferentes medios bioquímicos y observar sus reacciones.

9.3 Reactivos químicos, bioquímicos y biológicos

9.3.1 Agar hierro de Kligler. Medio deshidratado preparado según indicación del fabricante.

9.3.2 Caldo triptófano (para reacción de indol)

Caldo nutriente	100 mL
Agar No. 1	0,2 g
Triptófano	0,025 g

Se añaden los componentes al caldo nutriente y se calienta hasta total disolución del agar. Se distribuirá en tubos por 2 mL y se esteriliza a 88,260 kPa a 115 °C durante 15 min.

Caldo nutriente. Medio deshidratado preparado según indicación del fabricante.

9.3.3 Sacarosa

Caldo simple	100 mL
Azul de bromotimol a 2 g/l.	1,2 mL
Sacarosa para bacteriología	1 g

Se mezclan los componentes hasta total disolución. Se ajustará el pH de 7,2 a 7,4. Se distribuirá en tubos de 5 mL por 2 mL. Se esteriliza en autoclave a 107,873 kPa a 115 °C, durante 15 min.

- Disolución azul de bromotimol a 2 g/l.

Azul de bromotimol	0,2 g
Disolución de hidróxido de sodio 0,1	5 mL
Agua os	95 mL

Se mezclan los componentes hasta disolución total.

Se esteriliza a 121 °C, con vapor de presión a 107,873 kPa, durante 15 min.

9.3.4 Manitol. Será según 9.3.3 sustituyéndose la sacarosa por manitol.

9.3.5 Dulcitol. Será según 9.3.3 sustituyéndose la sacarosa por dulcitol.

9.3.6 Glucosa. Será según 9.3.3 sustituyéndose la sacarosa por glucosa.

9.3.7 Reactivo de Ehrlich

p-dimetil-amino-benzaldehido	1 g
Alcohol etílico absoluto 99,5 %	95 mL
Acido clorhídrico	20 mL

Se disuelve p-dimetil-amino-benzaldehido en ácido clorhídrico y se añade el alcohol. Se envasará en frascos ámbar.

9.3.8 Indicadores para detectar reducción de nitratos a nitritos

- Disolución A

Acido acético glacial	60 mL
Agua	140 mL
Acido sulfanílico	1,6 g

Se mezclará y envasará en frasco ámbar.

- Disolución B

Acido acético glacial	30 mL
Agua	70 mL
1-naftilamina	0,5 g

Se mezclará y envasará en frasco ámbar.

9.3.9 Agar Gelatina

Agar Base No. 2	1 000 mL
Gelatina	16 g

Se esterilizará en autoclave a 121 °C con vapor de presión a 107,873 kPa, durante 20 min. Se distribuye 15 ó 20 mL en placas de Petri.

9.3.10 Caldo con nitrato

Caldo simple	100 mL
Nitrato de potasio	0,1 g

Se diluye el nitrato en el caldo. Se distribuye en tubos de cultivos por 5 mL y se esteriliza en autoclave a 121 °C con vapor de presión a 107,873 kPa, durante 15 min.

- Caldo simple. Según el apartado 8.3.1 .

9.3.11 Reactivo de Clark

Cloruro de mercurio (II)	75 g
Acido clorhídrico	100 mL
Agua	500 mL

Se mezclan los componentes.

9.3.12 Suero equino estéril

9.3.13 Peróxido de hidrógeno al 3 % v/v

9.4 Aparatos, utensilios y medios de medición

- Incubadora
- Autoclave
- Estufa
- Olla de aluminio de 50 L
- Balanza analítica LSP 200 g; vD 0,1 mg
- Balanza técnica LSP 1 kg; vD 0,1 g
- Embudos de vidrio de 200 mm de diámetro
- Cilindros graduados de 100; 1 000 y 2 000 mL
- Frascos cónicos de 250; 500 y 1 000 mL
- Tubos de 5 mL
- Frascos ámbar para reactivo de 250 mL.

9.5 Muestras. Será la cepa aislada.

9.6 Determinación

Se añadirá a todos los medios líquidos 0,05 mL de suero equino (se utilizará pipeta de 1 mL)

- Se tomará de la cepa aislada con un asa bacteriológica y se siembra en un tubo de cada medio líquido, introduciendo y rotando el asa
- Se sembrará en un tubo de medio agar Kligler por punción y estría
- Se sembrará en un tubo de caldo triptófano por punción
- Se sembrará en una placa de gelatina por estrías
- Se incubará a 37 °C durante 24 h

- Se depositará una gota de peróxido de hidrógeno al 3 % v/v en una lámina portaobjeto (se utilizará pipeta de 1 mL). En una lámina podrán realizarse 4 u 8 pruebas.

Se añadirá con un asa un fragmento de la colonia y se diluye en el peróxido. Se observará en el momento.

9.7 Expresión de los resultados. En casos positivos:

Azúcares. Se observará la presencia de color amarillo en los tubos de glucosa, sacarosa y manitol.

No se observará cambio de color en el tubo de dulcitol.

Caldo con nitrato. Se añadirá 1 mL de disolución B y 1 mL de disolución A, gota a gota, de la solución indicadora para reducción de nitratos a nitritos (se utilizará pipeta de 1 mL), en el momento de la observación.

Se observará cambio de color del medio, a rosado o rojo.

Indol. Se añadirá 0,5 mL de reactivo de Ehrlich (se utilizará pipeta de 1 mL) en el momento de la observación.

Se observará presencia de un anillo rosado, entre la superficie del medio y el reactivo.

Kliger. Se observará negra el área de punción y crecimiento de las estrías.

Catalasa. No se observará la formación de burbujas.

Gelatina. Se añadirá 0,5 mL de reactivo de Clark (se utilizará pipeta de 1 mL) en el momento de la observación.

No se observa hidrólisis de la gelatina.

9.8 Informe. Según el apartado 8.7 .

10. Determinación biológica

10.1 Objetivo y alcance. Este método se establece para aislar el agente etiológico, cuando las siembras y resiembras resulten negativas.

10.2 Fundamento del método. Este método se basa en inocular ratones de capa blanca por vía intraperitoneal, con suspensión de vísceras sospechosas.

10.3 Reactivos químicos y biológicos

- Disolución salina fisiológica al 0,85 % v/v
- Ratones de capa blanca con una masa de 12 a 15 g .

10.4 Aparatos, utensilios y medios de medición

- Morteros de 50 a 75 mm de diámetro

- Tubos de fondo cónico de 15 mL
- Tapones de goma No. 11 ó 12 1/2
- Jeringuillas de vidrio LS 1 ó 2 mL; vD 0,1 mL
- Agujas hipodérmicas No. 22 ó 25 . 10 mm .

10.5 Muestras. Según el apartado 8.5 .

10.6 Procedimiento

10.6.1 Preparación de las muestras. Se triturará en morteros individuales 1 g de cada muestra y se prepara una suspensión al 10 % v/v en disolución salina fisiológica al 0,85 % v/v .

10.6.2 Determinación. Se inoculará por vía intraperitoneal a 2 ratones, con 0,5 a 1 mL de sobrenadante de cada muestra; se utiliza jeringuilla de 1 ó 2 mL y aguja 22 ó 25 . 10 mm .

Se observarán diariamente durante 10 d.

10.7 Expresión de los resultados. En caso positivo: Los ratones morirán entre el segundo y octavo día post inoculación.

Reaísle el germen de los órganos de los ratones, según el apartado 8.6 .

10.8 Informe. Según el apartado 8.7 .

COMPLEMENTO

Normas estatales de referencia:

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

Bibliografía consultada:

- BERGEY'S. Manual de determinación bacteriológica. 8va Ed. Compañía de Willian y Wilking. Baltimore, E.U.A. 1974
- CARTER, G.R. Procedimientos de diagnóstico en bacteriología y micología veterinaria. 3ra. Ed. Pág. 193-195. U.S.A. 1979

MERCY, A y BOND, M. Profilaxis de la orisipela y poliartritis en cerdos. 12:427-429. U.S.A. 1978.