



## Seguimiento en caso de sueros sospechosos en áreas libres de brucelosis: Investigación de *Yersinia enterocolitica*

### Toma de muestras

Se tomarán muestras individuales de recto de 5-10 animales seropositivos, o de todos si su número es inferior.

### Procedimiento de aislamiento e identificación de *Yersinia enterocolitica*. Heces.

#### **Preparación de la suspensión inicial**

Preparar una suspensión inicial de la muestra al 1/10 (peso/volumen) en caldo PSB. Por ejemplo pesar 25gr de heces y añadir 225 ml de PSB atemperado a T<sup>a</sup> ambiente.

#### **Enriquecimiento en medio de enriquecimiento y en medio selectivo**

A partir de la suspensión inicial en PSB preparar una suspensión al 1/100 (peso/volumen) en caldo ITC.

Por ejemplo tomar 10ml de la suspensión inicial en PSB y ponerlos en 90ml de caldo ITC.

Incubar a 25°C<sub>±1</sub> durante 44h<sub>±4</sub>h.

Incubar la suspensión inicial en PSB sobrante a 25°C<sub>±1</sub> durante 44h<sub>±4</sub>h.

#### **Enriquecimiento adicional en frío**

**Adicionalmente puede** llevarse a cabo un enriquecimiento en frío preparando otra suspensión inicial de muestra en PBS al 1/10 (por ej. con 10g en 90 ml de PBS) que se incubará a 4°C<sub>±2</sub> durante 21 días dando pases a medio sólido selectivo en los días 7, 14 y 21 de incubación.

#### **Aislamiento en medio sólido selectivo**

A partir de cada uno de los caldos incubados sembrar una placa de CIN con 100µl.

Para ello depositar los 100µl del caldo en un extremo de la placa, pasados unos minutos cuando se haya absorbido extender con un hisopo. Después realizar un aislamiento en estría.

Incubar las placas de CIN a 30<sub>±1</sub>°C durante 24<sub>±2</sub>h

#### **Identificación de colonias características**



Tras la incubación examinar las placas de CIN para detectar colonias características de *Y. enterocolitica*

Se tendrá en cuenta la morfología de la colonia, tamaño, color y olor (en algunos casos pueden descartarse *Pseudomonas* que aparecen en el medio y tienen un olor característico). Las colonias típicas de *Yersinia enterocolitica* en agar CIN son pequeñas  $\leq 1$ mm, y lisas con un centro rojo y un borde translúcido. A las 48 h aparecen con mayor tamaño pero no superando los 2 mm (aprox)

### Confirmación

Tomar con un asa de siembra las colonias sospechosas y sembrarlas en Agar Nutriente. Incubar a 30° durante 18 a 24h.

Realizar las siguientes pruebas bioquímicas:

Oxidasa (-) (para descartar posibles no enterobacterias, principalmente *Pseudomonas*)

Urea (+) incubar a 30°C 24 $\pm$ 2h

Finalmente confirmar las colonias con estas características bioquímicas con API20E (incubación a 30°C) y/o PCR.

Las cepas confirmadas como *Yersinia enterocolitica* podrán ser remitidas al LCV para su serotipado.

### Conservación de las cepas.

Las cepas podrán conservarse de diferentes formas, p.ej:

Resuspender en medio de congelación FBP a -80°C ó

Subcultivar en TSB (caldo tripticasa soja), incubar a 30° 24 $\pm$ 2h, añadir un volumen igual de glicerol estéril al 40%, mezclar y congelar a -70/80°C

### Control de calidad

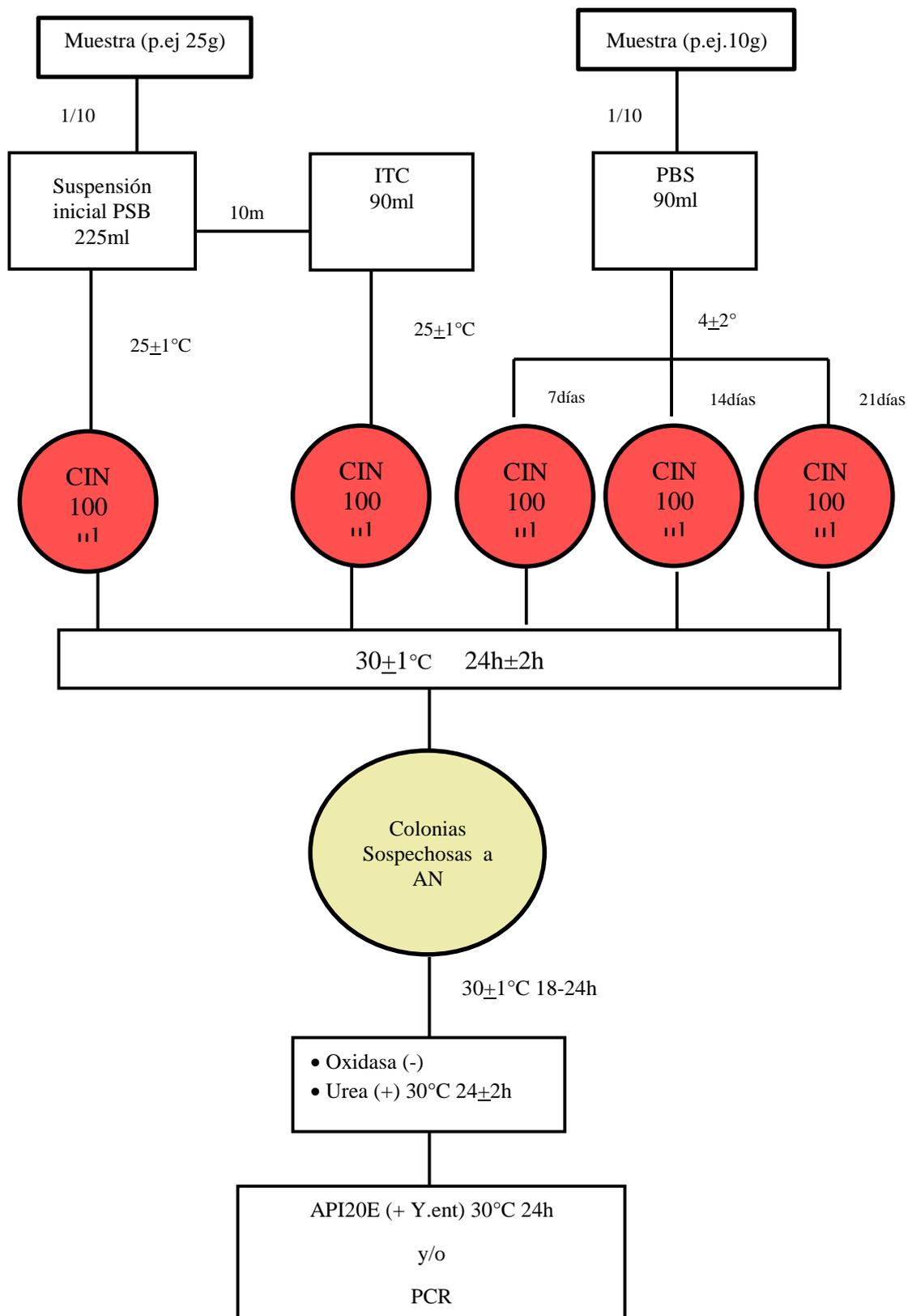
Incluir un control positivo con la cepa de referencia *Yersinia enterocolitica* ATCC 700822

*Yersinia enterocolitica* en Agar CIN





## Esquema detección *Yersinia enterocolitica*





Las cepas confirmadas como *Yersinia enterocolitica* podrán ser remitidas al LCV para su serotipado.

### Medios de Cultivo (ejemplos proveedores)

#### PSB (Peptone Sorbitol Bile Broth)

- ✓ SIGMA 17192-500G

#### ITC:

- ✓ Irgasan Ticarcilin and Potassium chlorate (ITC) Broth (CONDA 1361.00)
- ✓ ITC Supplement (CONDA 6051)

#### PBS (Phosphate Buffer Saline)

- ✓ SIGMA P4417-100TAB

#### CIN:

- ✓ Yersinia Selective Agar Base (CONDA 1126.00)
- ✓ Yersinia Selective Supplement (OXOID SR0109E)

#### Agar Nutriente:

- ✓ Agar nutriente (CONDA 1060.00)
- ✓ Bacto Agar (CONDA 1800.00)

#### Urea Broth: (CONDA 1226.00)

#### FBP:

##### **100ml**

- ✓ Caldo nutriente nº2 (OXOID CM 67) 2.5gr
- ✓ Agar Bacteriológico (DIFCO 214010) 0.12gr
- ✓ Glicerol (PANREAC) 15ml
- ✓ Extracto de levadura (DIFCO) 0.1gr
- ✓ Agua Destilada 85ml.
- ✓ 2.5 ml suplemento FBP

#### Suplemento FBP:

- ✓ Piruvato sódico (SIGMA P-2256) 6.25gr
- ✓ Agua destilada 20ml
- ✓ Colocar en un matraz aforado de 100ml de capacidad y agitar hasta disolución.
- ✓ Añadir: Hierro II Sulfato (PANREAC 131362) 6.25gr
- ✓ Sodio Disulfito (PANREAC 131698) 6.25gr
- ✓ Agua Destilada enrasar hasta 100ml