

 <i>República de Colombia</i> <i>Gobernación de Santander</i>	MANUAL PARA LA VIGILANCIA DE VIBRIO CHOLERAЕ EN AGUA LABORATORIO DEPARTAMENTAL DE SALUD PÚBLICA	CÓDIGO	MI-GS-MA-67
		VERSIÓN	0
		FECHA DE APROBACIÓN	02/06/2023
		PÁGINA	1 de 19

República de Colombia



Gobernación de Santander

MANUAL PARA LA DETERMINACION DE VIBRIO CHOLERAЕ EN AGUA

Versión	Elaboración	Revisión Técnica	Revisión de Calidad
0	Vianey Portilla	Vianey Portilla	Alejandra Galvis Vargas

 <p>República de Colombia DEPARTAMENTO DE SALUD Gobernación de Santander</p>	<p>MANUAL PARA LA VIGILANCIA DE VIBRIO CHOLERA E EN AGUA LABORATORIO DEPARTAMENTAL DE SALUD PÚBLICA</p>	CÓDIGO	MI-GS-MA-67
		VERSIÓN	0
		FECHA DE APROBACIÓN	02/06/2023
		PÁGINA	2 de 19

TABLA DE CONTENIDO

1. OBJETIVO.....	4
2. ALCANCE.....	4
3. RESPONSABILIDADES.....	4
4. DEFINICIONES Y ABREVIATURAS.....	4
5. CONDICIONES GENERALES.....	5
6. FUNDAMENTO DEL METODO DE ENSAYO.....	6
7. LIMITACIONES O INTERFERENCIAS.....	6
8. RECOLECCION E IDENTIFICACION DE LA MUESTRA.....	6
9. CONSERVACION DE LA MUESTRA.....	7
10. EQUIPOS.....	7
11. REACTIVOS, CONTROLES Y MATERIALES DE REFERENCIA.....	7
12. PROCEDIMIENTO.....	8
13. CONTROL DE CALIDAD ANALITICO.....	15
14. ANALISIS Y EXPRESION DE RESULTADOS.....	16
15. EMISION DEL INFORME DE RESULTADOS.....	16
16. EXAMENES COMPLEMENTARIOS.....	16
17. DOCUMENTOS DE REFERENCIA.....	16
18. ANEXOS.....	17

Versión	Elaboración	Revisión Técnica	Revisión de Calidad
0	Vianey Portilla	Vianey Portilla	Alejandra Galvis Vargas

 <p>República de Colombia Departamento de Santander</p>	MANUAL PARA LA VIGILANCIA DE VIBRIO CHOLERAЕ EN AGUA LABORATORIO DEPARTAMENTAL DE SALUD PÚBLICA	CÓDIGO	MI-GS-MA-67
		VERSIÓN	0
		FECHA DE APROBACIÓN	02/06/2023
		PÁGINA	3 de 19

INTRODUCCION

El cólera es causado por un bacilo, anaerobio facultativo, Gram negativo, con un solo flagelo polar, llamado *Vibrio cholerae* perteneciente a la familia Vibrionaceae. Existen más de 206 serogrupos basados en la diversidad antigénica del lipopolisacárido O de la membrana externa. Los serogrupos asociados a epidemias han sido O1 y O139. Los aislamientos de *Vibrio cholerae* O1 responsables del cólera endémico y epidémico están clasificados en cuatro biotipos, de acuerdo con los métodos de biotipificación y perfiles moleculares de la toxina, islaspatogénicas y el factor de colonización de los cuales se encuentran: el clásico, híbrido, variante El Tor y El Tor, este último biotipo fue el responsable de la séptima epidemia y de múltiples brotes en el presente siglo, y tienen la característica de ser resistentes al medio ambiente, causar mayor infección y mantener una tasa de portadores asintomáticos elevada, mayor que el biotipo clásico.

El *Vibrio cholerae* O1 se clasifica en dos serotipos principalmente Ogawa y el Inaba, con base a la expresión de antígenos A, B y C, y un tercer serotipo el Hikojima que es inestable, llamado también de conversión. Estos serotipos pueden cambiar durante las epidemias.” **VIGILANCIA Y ANÁLISIS DEL RIESGO EN SALUD PÚBLICA PROTOCOLO DE VIGILANCIA EN SALUD PÚBLICA CÓLERA. INS.2017**

El cólera se transmite por ingesta de agua y alimentos contaminados con vómitos o heces de personas infectadas, y en menor grado, de portadores.

El único huésped susceptible es el ser humano. Para adquirir la enfermedad se requiere ingerir un alto número de microorganismos viables.

- Los pacientes infectados por *Vibrio cholerae* O1 u O139 que son asintomáticos, generalmente eliminan el microorganismo por pocos días, sin embargo, los pacientes que son sintomáticos eliminan el microorganismo entre dos días a dos semanas, y rara vez más de dos semanas.
- *Vibrio cholerae* está presente en las heces de personas, tanto como en células planctónicas (individuales), como en agregados (biopelículas). En el medio ambiente, especialmente en el agua, los microorganismos se convierten en células ambientales condicionalmente viables dentro de 24 horas.

Versión	Elaboración	Revisión Técnica	Revisión de Calidad
0	Vianey Portilla	Vianey Portilla	Alejandra Galvis Vargas

 <p>República de Colombia DEPARTAMENTO DE SALUD PÚBLICA Gobernación de Santander</p>	MANUAL PARA LA VIGILANCIA DE VIBRIO CHOLERAЕ EN AGUA LABORATORIO DEPARTAMENTAL DE SALUD PÚBLICA	CÓDIGO	MI-GS-MA-67
		VERSIÓN	0
		FECHA DE APROBACIÓN	02/06/2023
		PÁGINA	4 de 19

1. OBJETIVO

Describir los lineamientos y proceso para la vigilancia por laboratorio de *Vibrio cholerae* en agua, mediante la técnica de filtración por membrana SM 9260H

2. ALCANCE.

El presente manual está dirigido a los profesionales del laboratorio de Salud Pública, para la identificación de *Vibrio cholerae* de muestras de agua, incluye los métodos de diagnóstico y /o confirmación en el laboratorio de microbiología de aguas.

3. RESPONSABILIDADES

Coordinador(a) LDSP: aprobar el presente documento, supervisar el estricto cumplimiento de lo establecido en el mismo y avalar los resultados que de éste se generen.

Profesional del Laboratorio Microbiológico de Agua, del Laboratorio Departamental de Salud Pública: aplicar las técnicas descritas en el presente manual con estándares de calidad, oportunidad y avalar los resultados que se generen del mismo.

Auxiliar del laboratorio de Agua del laboratorio Departamental de Salud Pública: es responsable de cumplir con lo definido para la ejecución de actividades relacionadas con lavado de material y limpieza de áreas, con el fin de que cumplan con los requerimientos necesarios para la ejecución del ensayo.

4. DEFINICIONES Y ABREVIATURAS.

- **Muestra:** Sustancia, material, elemento o producto a ensayar.
- **Método de ensayo:** Es el nombre que se le da al conjunto de operaciones cuyo objeto es conocer el valor o las características de una matriz
- ***Vibrio cholerae*:** Pertenece a la familia Vibrionaceae, género *Vibrio*. Es un bacilo pequeño, curvo, móvil mediante un flagelo polar único, no encapsulado, no esporulado, Gram negativo, aerobio y anaerobio facultativo, oxidasa positiva.
- **Medios de cultivo:** Cualquier preparación líquida o sólida hecha específicamente para

Versión	Elaboración	Revisión Técnica	Revisión de Calidad
0	Vianey Portilla	Vianey Portilla	Alejandra Galvis Vargas

 <p>República de Colombia Departamento de Santander</p>	MANUAL PARA LA VIGILANCIA DE VIBRIO CHOLERAЕ EN AGUA LABORATORIO DEPARTAMENTAL DE SALUD PUBLICA	CÓDIGO	MI-GS-MA-67
		VERSIÓN	0
		FECHA DE APROBACIÓN	02/06/2023
		PÁGINA	5 de 19

cultivo almacenamiento o transporte de microorganismos u otros tipos de células. La variedad de los medios que existen permite el cultivo de microorganismos y tipos de células específicos, como medios diferenciales, y medios definidos. Los medios sólidos están constituidos por medios líquidos que han sido solidificados con un agente como el agar o la gelatina.

- **Agar TBSC:** Medio selectivo para el aislamiento y cultivo de *Vibrio cholerae*, *Vibrio parahemolyticus* y otras especies de *Vibrio* a partir de heces, agua y alimentos contaminados. También es conocido como Agar Tiosulfato Citrato Bilis Sacarosa, o como Agar Selectivo para Vibrios.
- **Agar nutritivo al 0,5% de NaCl:** Es un medio para el cultivo de microorganismos no fastidiosos que se usa para muestras de aguas y alimentos, el medio contiene extracto de carne que aporta carbohidratos, vitaminas, compuestos de nitrógeno orgánico y sales, también contiene peptona que es fuente de nitrógeno. La adición de 0.5% de NaCl es necesaria para potenciar el crecimiento de *Vibrio cholerae* por su naturaleza halófila.
- **Pruebas bioquímicas:** Medios de cultivos líquidos o sólidos que contienen sustancias especiales de enriquecimiento, suplemento que al ser inoculados permiten la diferenciación de las bacterias.
- **Serotipificación de *Vibrio cholerae*** Consiste en una prueba serológica de tipo antígeno (microorganismo) anticuerpo (anti-suero). Esta reacción in vitro produce la formación de grumos macroscópicos denominada aglutinación.
- **Medio de transporte Cary-Blair.** El medio de transporte Cary-Blair es adecuado para el transporte de este tipo de muestra (aislamiento de *Vibrio cholerae*) , debido a que sus escasos nutrientes y el pH de 8,4 mantienen al microorganismo viable y evita su replicación.

5. CONDICIONES GENERALES

El personal de laboratorio debe recibir adiestramiento específico en cuanto al manejo de los agentes patógenos.

El acceso al laboratorio debe ser restringido a personal ajeno a la dependencia.

La muestra recibida se verifica que cumpla con el protocolo de recepción de muestras del Laboratorio, se radica en la base de datos, identificándola con el número de radicación y se almacena refrigerada, hasta su proceso

Versión	Elaboración	Revisión Técnica	Revisión de Calidad
0	Vianey Portilla	Vianey Portilla	Alejandra Galvis Vargas

 <p>República de Colombia DEPARTAMENTO DE SALUD Gobernación de Santander</p>	MANUAL PARA LA VIGILANCIA DE VIBRIO CHOLERAЕ EN AGUA LABORATORIO DEPARTAMENTAL DE SALUD PUBLICA	CÓDIGO	MI-GS-MA-67
		VERSIÓN	0
		FECHA DE APROBACIÓN	02/06/2023
		PÁGINA	6 de 19

Se debe poner en práctica todas las normas de Bioseguridad y las buenas prácticas de laboratorio

6. FUNDAMENTO DEL METODO DE ENSAYO.

El método de filtración por membrana es un método útil para concentrar microorganismos presentes en el agua para consumo humano, aguas superficiales, naturales, de las que se presume, un nivel bajo de contaminación de microorganismos, la técnica es aceptada por la legislación Colombiana, de acuerdo a lo descrito en el artículo 11 de la Resolución 2115 de 2007, para evaluar las características microbiológicas del agua para consumo humano, incluyendo coliformes totales, E. coli, bacterias heterótrofas, entre otros microorganismos

7. LIMITACIONES O INTERFERENCIAS.

NO APLICA.

8. RECOLECCION E IDENTIFICACION DE LA MUESTRA.

Para la recolección de la muestra tener en cuenta:

- Diligencia el acta de toma de muestras con toda la información solicitada, legible
- Rotular los frascos, con los datos básicos del acta de toma de muestras
- Utilizar los elementos de protección personal para la toma de la muestra
- En caso de transferencia de la cadena de custodia, las muestras deben ir acompañadas del acta de toma de muestras; y si por alguna razón en el proceso de transporte es necesario transferir la posesión de las muestras, las personas que la ceden y los que la reciben deberán firmar con la fecha y hora en el registro del acta. Este registro documenta la transferencia de la custodia del grupo de salud ambiental (técnico) al

Versión	Elaboración	Revisión Técnica	Revisión de Calidad
0	Vianey Portilla	Vianey Portilla	Alejandra Galvis Vargas

	MANUAL PARA LA VIGILANCIA DE VIBRIO CHOLERAЕ EN AGUA LABORATORIO DEPARTAMENTAL DE SALUD PUBLICA	CÓDIGO	MI-GS-MA-67
		VERSIÓN	0
		FECHA DE APROBACIÓN	02/06/2023
		PÁGINA	7 de 19

laboratorio de salud pública.

- El análisis de Vibrio cholerae se hará por solicitud del grupo de salud ambiental del departamento, de acuerdo con el mapa de riesgo o situaciones que ameriten su análisis
- Para la toma de muestra se utilizan hisopos de Moore, colocados en el sitio de muestreo, con el fin de detectar los casos de colera (Vibrio cholerae 01)

9. CONSERVACION DE LA MUESTRA

La muestra debe estar a temperatura ambiente, antes del análisis, se destapa y se toma el volumen requerido para el análisis

Parámetro	Tipo de frasco	Volumen de muestra	Preservación	Tipo de almacenamiento
Vibrio cholerae (NMP) Aguas superficiales Agua potable	Vidrio o plástico	200 ml de agua	Refrigerada a 4 ⁰ C	24 horas

10. EQUIPOS

- Incubadoras a 35^aC.
- Micropipetas Automáticas 100 a micras 1000 micras, de 2 a 20 micras.
- Autoclave.
- Cabina de seguridad biológica.
- Cuarto frio.

11. REACTIVOS, CONTROLES Y MATERIALES DE REFERENCIA

REACTIVOS.

- ❖ Agua peptonada alcalina.
- ❖ Agar TCBS
- ❖ Agar nutritivo 0.5% de NaCl
- ❖ Prueba de Oxidasa

Versión	Elaboración	Revisión Técnica	Revisión de Calidad
0	Vianey Portilla	Vianey Portilla	Alejandra Galvis Vargas

 <i>República de Colombia</i> <i>Departamento de Santander</i>	MANUAL PARA LA VIGILANCIA DE VIBRIO CHOLERAЕ EN AGUA LABORATORIO DEPARTAMENTAL DE SALUD PUBLICA	CÓDIGO	MI-GS-MA-67
		VERSIÓN	0
		FECHA DE APROBACIÓN	02/06/2023
		PÁGINA	8 de 19

- ❖ Prueba de la cuerda Desoxicolato de sodio al 0.5.
- ❖ Agar TSI
- ❖ Prueba de tolerancias de cloruro de sodio
- ❖ Antisuero Diagnostico O (opcional)
- ❖ Medio de leche descremada

MATERIALES

- ❖ Asas bacteriológicas.
- ❖ Cajas de Petri
- ❖ Lamina de vidrio de 20x20 cm
- ❖ Gradillas
- ❖ Puntas plásticas azules y amarillas
- ❖ Pipetas pasteur de vidrio y plásticas
- ❖ Palillos de madera
- ❖ Servilletas de papel
- ❖ Erlemeyer de 1000 ml.
- ❖ Tubos falco de 50 ml
- ❖ Tubos 13x100 mm limpios, secos y estéril
- ❖ Frascos ámbar
- ❖ Escobillones estériles.

PATRONES DE REFERENCIA

ATCC Vibrio cholerae

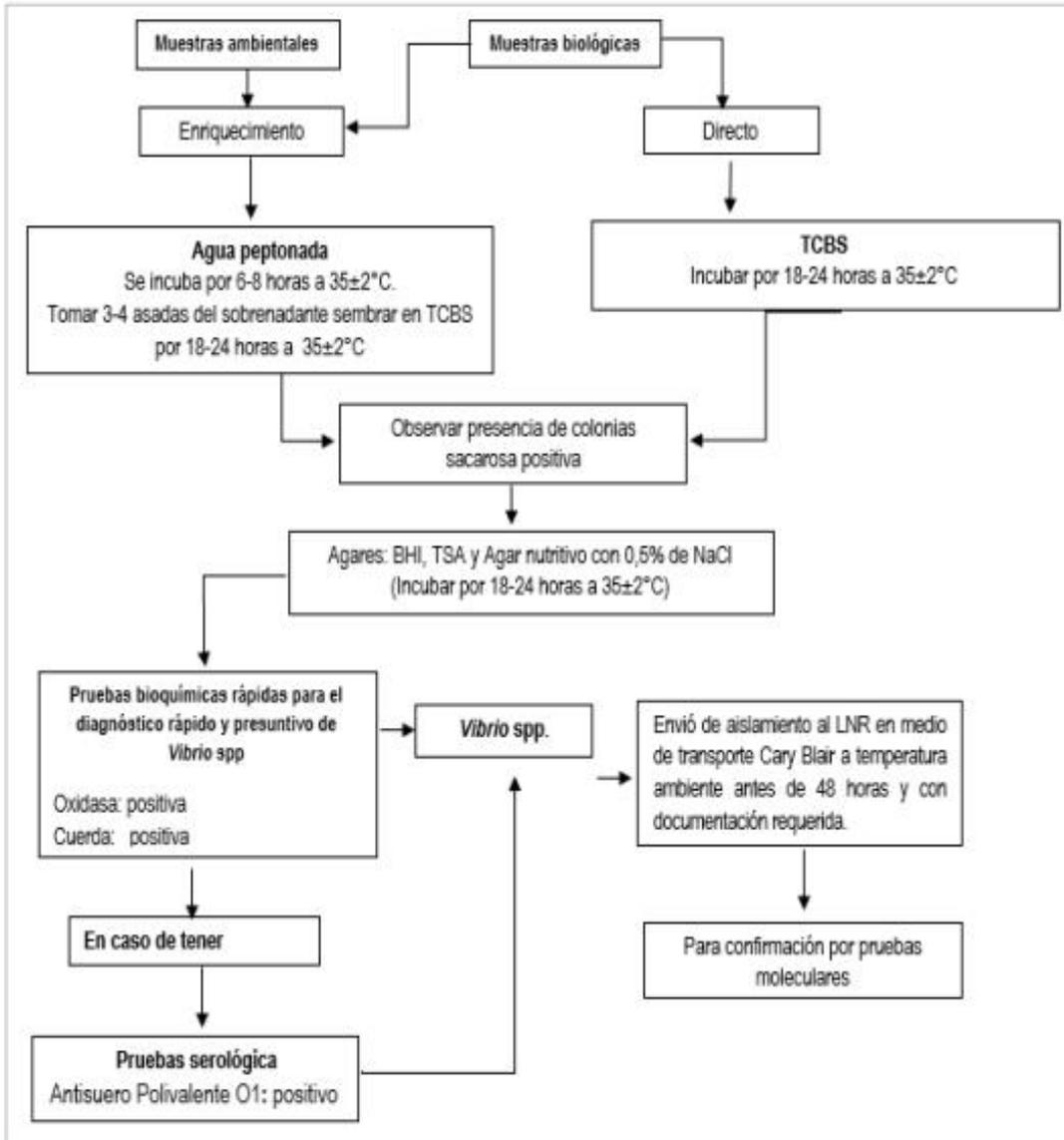
12. DESCRIPCION DEL PROCEDIMIENTO

Versión	Elaboración	Revisión Técnica	Revisión de Calidad
0	Vianey Portilla	Vianey Portilla	Alejandra Galvis Vargas



Procesamiento de coprocultivo para el diagnóstico de *Vibrio cholerae*

Diagrama de flujo para identificación de *Vibrio cholerae*



Guía para la vigilancia por laboratorio de colera. INS.2022-03-08

Versión	Elaboración	Revisión Técnica	Revisión de Calidad
0	Vianey Portilla	Vianey Portilla	Alejandra Galvis Vargas

 <i>República de Colombia</i> <i>Gobernación de Santander</i>	MANUAL PARA LA VIGILANCIA DE VIBRIO CHOLERAЕ EN AGUA LABORATORIO DEPARTAMENTAL DE SALUD PUBLICA	CÓDIGO	MI-GS-MA-67
		VERSIÓN	0
		FECHA DE APROBACIÓN	02/06/2023
		PÁGINA	10 de 19

FILTRACIÓN POR MEMBRANA PARA LA DETECCIÓN PRESUNTIVA DE VIBRIO CHOLERAЕ. *Ver instructivo de uso equipo filtración por membrana*



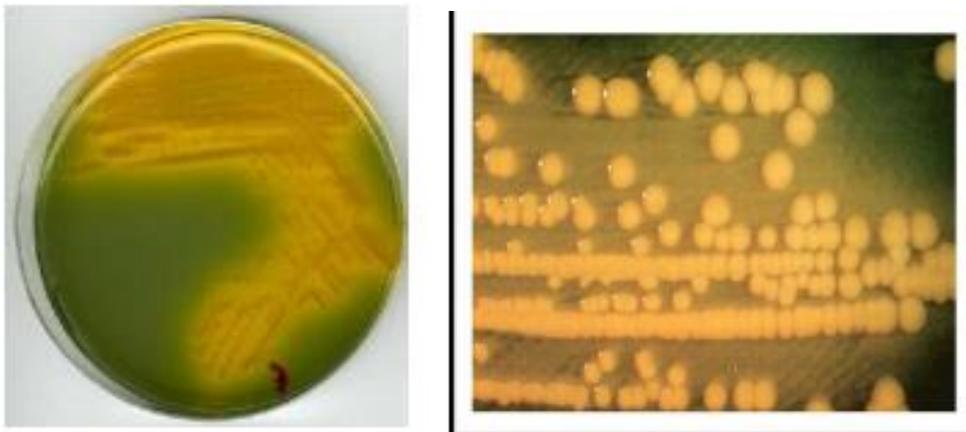
12.1 PROCEDIMIENTO:

- Filtrar a través de una membrana (milipore) de poro 0.22 a 0,45 micras de diámetro, 100 ml de muestra de agua.
- Una vez realizada la filtración, colocar el filtro en un recipiente con 100 ml de agua peptonada alcalina (medio de enriquecimiento selectivo)). La viabilidad de *Vibrio* spp. se mantiene intacta a pH alcalino y el uso de agua peptonada alcalina ha sido recomendado para incrementar la recuperación de *Vibrio* spp
- Incubar entre 35°C a 37°C por 6 a 8 horas.
- Luego de la incubación, y evitando mezclar el recipiente, utilizando un asa, se toma de la superficie del caldo , se siembra en un Agar nutritivo al 0,5% de NaCl (medio no selectivo para pruebas preliminares), sembrar por agotamiento en agar TCBS.
- Incubar el agar TCBS y el Agar nutritivo al 0,5% de NaC de 18-24 horas a una temperatura de 35°C-37°C.
- Observar las características de *Vibrio cholerae* en un medio de cultivo así:
- Agar TCBS: Colonias amarillas brillantes, pegajosas con centro opaco y periferia traslucida, lisas de 2-3 mm de diámetro. Sacarosa positiva

Versión	Elaboración	Revisión Técnica	Revisión de Calidad
0	Vianey Portilla	Vianey Portilla	Alejandra Galvis Vargas

 <p>República de Colombia Departamento de Santander Gobernación de Santander</p>	MANUAL PARA LA VIGILANCIA DE VIBRIO CHOLERAЕ EN AGUA LABORATORIO DEPARTAMENTAL DE SALUD PUBLICA	CÓDIGO	MI-GS-MA-67
		VERSIÓN	0
		FECHA DE APROBACIÓN	02/06/2023
		PÁGINA	11 de 19

Agar TCBS Es un medio altamente selectivo para *Vibrio* spp., por su contenido de sales biliares, inhibe el crecimiento de las bacterias Gram positivas y otros Gram negativos. Además, contiene sucrosa (sacarosa) como carbohidrato fermentable debido a que la mayoría de los integrantes del género *Vibrio* fermenta este azúcar. El pH alcalino del medio favorece el aislamiento de *V. cholerae*. El azul de timol y de bromotimol están incluidos como indicadores de pH.



12.2 PRUEBAS DE IDENTIFICACIÓN

12.2.1 PRUEBA DE LA OXIDASA

- Siembra en Agar nutritivo al 0,5% de NaCl
- Tomar una colonia característica del agar nutritivo con 0,5% de NaCl, para realizar la prueba de oxidasa que debe dar POSITIVA

Prueba de la oxidasa El dehidrocloruro de tetrametil-parafenilendiamina al 1% se emplea para la determinación del citocromo oxidasa. Este reactivo actúa como aceptor artificial de electrones sustituyendo al oxígeno. En su estado reducido es incoloro, pero en la presencia del citocromo oxidasa C del microorganismo y el oxígeno atmosférico se oxida formando el azul de indofenol.

Lectura:

Reacción positiva: azul violeta

Versión	Elaboración	Revisión Técnica	Revisión de Calidad
0	Vianey Portilla	Vianey Portilla	Alejandra Galvis Vargas

 <p>República de Colombia Departamento de Santander Gobernación de Santander</p>	MANUAL PARA LA VIGILANCIA DE VIBRIO CHOLERAЕ EN AGUA LABORATORIO DEPARTAMENTAL DE SALUD PÚBLICA	CÓDIGO	MI-GS-MA-67
		VERSIÓN	0
		FECHA DE APROBACIÓN	02/06/2023
		PÁGINA	12 de 19



Prueba de la oxidasa: positiva^a

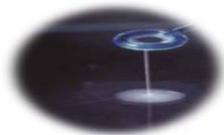
Reacción negativa: No hay cambio de color.

Imágenes: a Fuente Grupo Microbiología INS; b Fuente Perilla, M. J. (2003). Manual de laboratorio para la identificación y prueba de susceptibilidad a los antimicrobianos de patógenos bacterianos de importancia para la salud pública en el mundo en desarrollo.

12.2.2 PRUEBA DE LA CUERDA

- Elegir una colonia del Agar nutritivo 1 % NaCl o Agar BHI, emulsificarla sobre una lámina portaobjeto, con ayuda de un asa, en una gota de suspensión acuosa al 0.5% de desoxicolato sódico. En 60 segundos se forma una masa mucoide, que, al ser elevada del portaobjeto, por medio del asa, forma hilos.
- debe dar como resultado la FORMACIÓN DEL HILO MUCOIDE: prueba positiva
- Esta prueba se realiza para diferenciar el género *Vibrio* de otros géneros como *Plesiomonas* y *Aeromonas*. La actividad lítica del ácido desoxicólico sobre la pared de los *Vibrios* favorece la liberación del ADN que al contacto con el ácido desoxicólico forma una suspensión adherente o mucoide.

Si la prueba de la oxidasa y de la cuerda es positiva; a partir de las colonias de Agar nutritivo o Agar BHI realizar las pruebas bioquímicas.



Prueba de la cuerda: positiva^b

Imágenes: a Fuente Grupo Microbiología INS; b Fuente Perilla, M. J. (2003). Manual de laboratorio para la identificación y prueba de susceptibilidad a los antimicrobianos de patógenos bacterianos de importancia para la salud pública en el mundo en desarrollo.

Versión	Elaboración	Revisión Técnica	Revisión de Calidad
0	Vianey Portilla	Vianey Portilla	Alejandra Galvis Vargas

 <p>República de Colombia DEPARTAMENTO DE SALUD Gobernación de Santander</p>	MANUAL PARA LA VIGILANCIA DE VIBRIO CHOLERAЕ EN AGUA LABORATORIO DEPARTAMENTAL DE SALUD PUBLICA	CÓDIGO	MI-GS-MA-67
		VERSIÓN	0
		FECHA DE APROBACIÓN	02/06/2023
		PÁGINA	13 de 19

12.2.3 COLORACIÓN DE GRAM

Bacilos curvos Gram negativos.

12.2.4 PRUEBAS BIOQUÍMICAS PARA VIBRIO CHOLERAЕ

PRUEBA	Microorganismos						
	<i>Vibrio cholerae</i>	<i>Vibrio mimicus</i>	Vibrios halophilicos	<i>Aeromonas hydrophila</i>	<i>Aeromonas veronii</i>	<i>Plesiomonas shigelloides</i>	Enterobacteriaceae
KIA	K/A	K/A	V	V	K/AG	K/A	V
TSI 1% NaCl	A/A	K/A	V	V	A/AG	K/A	V
Cuerda	+	+	+	-	-	-	-
Oxidasa	+	+	+	+	+	+	-
Gas de glucosa	-	-	-	+	+	-	V
Sacarosa	+	-	V	V	+	-	V
Lisina 1% NaCl	+	+	V	V	+	+	V
Arginina 1% NaCl	-	-	V	+	-	+	V
Ornitina 1% NaCl	+	+	V	-	+	+	V
VP 1% NaCl	V	-	V	V	+	-	V
Crecimiento en 0% de NaCl	+	+	-	+	+	+	+
Crecimiento en 1% de NaCl	+	+	+	+	+	+	+

V: Reacción variable, a: *V.parahaemolyticus*, *V.cincinnatiensis*, y *V.damsei* dan reacciones variables, b: *V.furnissi* y *V damsei* son variables para gas de glucosa, c: Base de caldo nutritivo (Difco)

Adaptación de: Métodos de laboratorio para el diagnóstico de *Vibrio cholerae*, CDC/OPS 1999

Versión	Elaboración	Revisión Técnica	Revisión de Calidad
0	Vianey Portilla	Vianey Portilla	Alejandra Galvis Vargas

Tabla 4. Diferenciación de las especies del género *Vibrio*

Reacciones de las especie en grupo	Especie	Sacarosa	Crecimiento en NaCl		Oxalasa	Fermentación del <i>myo</i> -inositol	Dihidrolasa de arginina (Moller 1% de NaCl)	Descarboxilasa de lisina (Moller 1% de NaCl)	Descarboxilasa de ornitina (Moller 1% de NaCl)	Voges Proskauer (1% de NaCl;Barrrt)	Producción de gas apartir de D-Glucosa	Motilidad 36 °C	Celobiosa	D-sorbitol
			0%	1%										
Grupo 1	<i>V. cholerae</i>	100	100	100	100	0	0	99	99	75	0	99	8	1
	<i>V. mimicus</i>	0	100	100	100	0	0	100	99	9	0	98	0	0
Grupo 2	<i>V. metschnikovii</i>	100	0	100	0	40	60	35	0	96	0	74	9	45
Grupo 3	<i>V. cincinnatiensis</i>	100	0	100	100	100	0	57	0	0	0	86	100	0
Grupo 4	<i>V. hollisae</i>	0	0	99	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	<i>V. damsela</i>	5	0	100	95	0	95	50	0	95	10	25	0	0
Grupo 5	<i>V. fluvialis</i>	100	0	99	100	0	93	0	0	0	0	70	30	3
	<i>V. furnissi</i>	100	0	99	100	0	100	0	0	0	100	89	11	0
Grupo 6	<i>V. alginolyticus</i>	99	0	99	100	0	0	99	50	95	0	99	3	1
	<i>V. parahaemolyticus</i>	1	0	100	100	0	0	100	95	0	0	99	5	1
	<i>V. vulnificus</i> biogrupo 1	15	0	99	100	0	0	99	55	0	0	99	99	0
	<i>V. harveyi</i>	50	0	100	100	0	0	100	0	50	0	0	50	0

Adaptación de: Métodos de laboratorio para el diagnóstico de *Vibrio cholerae*, CDC/OPS 1994

12.2.5 IDENTIFICACIÓN DE VIBRIO CHOLERAЕ MEDIANTE PRUEBAS SEROLÓGICAS

Los aislamientos de *Vibrio cholerae* sospechosos se deben someter a la prueba de aglutinación en lámina con antisuero polivalente contra *Vibrio cholerae* 01. Si no se cuenta con reactivos para serotipificación en el laboratorio se remite al INS para confirmación.

- Tomar una colonia aislada en agar nutritivo o agar BHI y emulsificada con una gota de solución salina 0.85% sobre una lámina portaobjeto. **CONTROL NEGATIVO**
- Tomar otra colonia aislada en agar nutritivo o agar BHI y emulsificada con una gota de antisuero polivalente sobre una lámina portaobjeto. **LECTURA PRUEBA**
- Mezclar por un minuto.
- Una reacción positiva está dada por la aglutinación con el antisuero polivalente, no se debe observar aglutinación con la solución salina.
- Si se observa aglutinación con el antisuero polivalente, realizar la prueba con los sueros Inaba y Ogawa.

Versión	Elaboración	Revisión Técnica	Revisión de Calidad
0	Vianey Portilla	Vianey Portilla	Alejandra Galvis Vargas

 <p>República de Colombia DEPARTAMENTO DE SALUD Gobernación de Santander</p>	MANUAL PARA LA VIGILANCIA DE VIBRIO CHOLERAЕ EN AGUA LABORATORIO DEPARTAMENTAL DE SALUD PUBLICA	CÓDIGO	MI-GS-MA-67
		VERSIÓN	0
		FECHA DE APROBACIÓN	02/06/2023
		PÁGINA	15 de 19

PRUEBAS SEROLÓGICAS

Polivalente	Inaba	Owaga	Interpretación
+	+	-	V. cholerae 01 serotipo Inaba
+	-	+	V. cholerae 01 serotipo Ogawa
+	+	+	V. cholerae 01 serotipo Hikojima
-	NR	NR	V. cholerae NO 01

NR: No se realiza

- El laboratorio Departamental de Salud Santander debe enviar todos los aislamientos positivos al Laboratorios del Instituto Nacional de Salud para ser confirmados; si no se cuenta con antisueros polivalentes, se remite con pruebas presuntivas realizadas, para su confirmación en el INS.
- Luego del procesamiento de muestras y obtención de aislamientos presuntivos de Vibrio spp., se realiza el envío de los aislamientos al Laboratorio Nacional de Referencia
 - Realice una siembra masiva del aislamiento presuntivo en un medio no selectivo (Agar BHI o Agar Trypticase soya) e incúbela de 18 a 24 horas a 35°C ± 2 °C.
 - Recoja con el escobillón del medio de Cary Blair, el crecimiento bacteriano.
 - Inserte el escobillón en el medio y cierre el tubo herméticamente.
 - Rotule el tubo con la identificación de la muestra y envíelo al Laboratorio de Referencia-laboratorio de microbiología, junto con la ficha de envió.
 - Enviar en sistema triple embalaje de acuerdo con las normas IATA
 - Las muestras y aislamientos enviados al Grupo de Microbiología son: Sustancias Infecciosas Categoría B, “

13. CONTROL DE CALIDAD ANALITICO.

- a. Cepa de referencia Vibrio ATCC (Control Positivo)
- b. E. Coli ATCC 25922 (Control negativo).

Versión	Elaboración	Revisión Técnica	Revisión de Calidad
0	Vianey Portilla	Vianey Portilla	Alejandra Galvis Vargas

	MANUAL PARA LA VIGILANCIA DE VIBRIO CHOLERA E EN AGUA LABORATORIO DEPARTAMENTAL DE SALUD PÚBLICA	CÓDIGO	MI-GS-MA-67
		VERSIÓN	0
		FECHA DE APROBACIÓN	02/06/2023
		PÁGINA	16 de 19

14. ANALISIS Y EXPRESION DE RESULTADOS.

Positivo y/o negativo para Vibrio cholerae en agua

15. EMISION DEL INFORME DE RESULTADOS.

Los resultados positivos serán reportados la coordinación de Salud Ambiental, mediante oficio. El resultado se da en el formato: Informe de análisis de la calidad del agua para consumo humano. MI-GS.RG.293

16. EXAMENES COMPLEMENTARIOS.

NO APLICA.

17. DOCUMENTOS DE REFERENCIA.

Decreto 1601 de 1984 por el cual se reglamentan parcialmente los títulos III, V y VII de la Ley 09 de 1979, en cuanto a sanidad portuaria y vigilancia epidemiológica en naves y vehículos terrestres

Reglamento sanitario internacional 2005 El alcance es prevenir la propagación internacional de enfermedades, proteger contra esa propagación, controlarla y darle una respuesta de salud pública proporcionada y restringida a los riesgos para la salud pública y evitando al mismo tiempo las interferencias innecesarias con el tráfico y el comercio internacionales.

Decreto 2323 de 2006 Por el cual se reglamenta parcialmente la Ley 9ª de 1979 en relación con la Red Nacional de Laboratorios y se dictan otras disposiciones.
Compilado en el Decreto 780 del 2016.

Decreto 3518 de octubre 9 de 2006 del Ministerio de la Protección Social por el cual se crea y reglamenta el Sistema de vigilancia en salud pública y se dictan otras disposiciones

Decreto 1575 del 9 de mayo de 2007 "Por el cual se establece el Sistema para la Protección y Control de la Calidad del Agua para Consumo Humano".

Resolución 2115 del 22 de junio de 2007 "Por medio de la cual se señalan características, instrumentos básicos y frecuencias del sistema de control y vigilancia para la calidad del agua para consumo humano.

Resolución 4716 de 2010 (noviembre 18) Por medio del cual se reglamenta el parágrafo del artículo 15 del Decreto 1575 de 2007. Tiene por objeto establecer las condiciones, recursos y

Versión	Elaboración	Revisión Técnica	Revisión de Calidad
0	Vianey Portilla	Vianey Portilla	Alejandra Galvis Vargas

	MANUAL PARA LA VIGILANCIA DE VIBRIO CHOLERAЕ EN AGUA LABORATORIO DEPARTAMENTAL DE SALUD PUBLICA	CÓDIGO	MI-GS-MA-67
		VERSIÓN	0
		FECHA DE APROBACIÓN	02/06/2023
		PÁGINA	17 de 19

obligaciones mínimas que deben cumplir las autoridades sanitaria departamental, distrital y Municipal categoría especial, 1, 2 y 3 y ambiental competente, para elaborar los Mapas de Riesgo de la Calidad del Agua para Consumo Humano.

Plan de contingencia del sector salud para la prevención y control de cólera en Colombia. MPS.INS.OPS. Colombia Bogotá D.C, junio de 2011

Protocolo de Vigilancia en Salud Pública Enfermedades Transmitidas por Alimentos. INS 2015

Protocolo de Vigilancia en Salud Pública. Cólera. INS. 2017. <http://www.ins.gov.co/lineas-de-accion/Subdireccion-Vigilancia/sivigila/Protocolos%20SIVIGILA/PRO%20Colera.pdf>

Guía para la vigilancia por laboratorio de Vibrio cholerae. Dirección de Redes en Salud Pública. Subdirección Laboratorio Nacional de Referencia Grupo de Microbiología 2017.

Manual para la obtención y envío de muestras – INS ISBN: 978-958-13-0145-4.
<http://www.ins.gov.co/tramites-y-servicios/examenes-de-inter%20C3%A9s-en-salud-publica/SiteAssets/Manual%20obtencion%20y%20envio%20de%20muestras%20de%20EIS P.pdf>

Guía para la vigilancia por laboratorio de Vibrio cholerae. Dirección de redes en Salud Pública Subdirección Laboratorio Nacional de Referencia grupo de microbiología 2022

1. ANEXOS

Anexo 1: Procesamiento de muestras de agua tratadas y crudas para aislamiento e identificación de Vibrio cholerae

Versión	Elaboración	Revisión Técnica	Revisión de Calidad
0	Vianey Portilla	Vianey Portilla	Alejandra Galvis Vargas

 <p>República de Colombia DEPARTAMENTO DE SALUD Gobernación de Santander</p>	<p>MANUAL PARA LA VIGILANCIA DE VIBRIO CHOLERAE EN AGUA LABORATORIO DEPARTAMENTAL DE SALUD PUBLICA</p>	CÓDIGO	MI-GS-MA-67
		VERSIÓN	0
		FECHA DE APROBACIÓN	02/06/2023
		PÁGINA	18 de 19

Una vez se toma la muestra, se lleva al LDSP

Ingreso y codificación de muestra

Preparación la muestra para el análisis de acuerdo con la metodología establecida

Enriquecimiento con agua peptonada alcalina

Incubar a 35°C +/2 ° C, por 6-8 horas.



Pasado el tiempo de incubación, sin mezclar el frasco o erlemeyer, realizar un barrido de la superficie del cultivo con el asa y sembrar en superficie por agotamiento en Agar TCBS.

Versión	Elaboración	Revisión Técnica	Revisión de Calidad
0	Vianey Portilla	Vianey Portilla	Alejandra Galvis Vargas

 <p>República de Colombia Gobernación de Santander</p>	MANUAL PARA LA DETERMINACION DE VIBRIO CHOLERA E EN AGUA LABORATORIO DEPARTAMENTAL DE SALUD PÚBLICA	CÓDIGO	MI-GS-MA-67
		VERSIÓN	0
		FECHA DE APROBACIÓN	02/06/2023
		PÁGINA	19 de 19

19. CONTROL DE CAMBIOS.

CONTROL DE CAMBIOS				
VERSIÓN	FECHA	DESCRIPCIÓN DEL CAMBIO	REVISÓ	APROBÓ
0	18/05/2023	Emisión inicial del documento	Alba Rocío Orduz Amézquita Líder Grupo LDSP German Eduardo Marín Cárdenas Director de Salud Integral Diego Sánchez Báez Coordinador Grupo de Apoyo a la Gestión y Calidad César Ernesto Sánchez Aranda Director de Planeación y Mejoramiento en Salud	Javier Alonso Villamizar Suarez Secretario de Salud de Santander

Versión	Elaboración	Revisión Técnica	Revisión de Calidad
0	Vianey Portilla	Vianey Portilla	Alejandra Galvis Vargas