

 <i>República de Colombia</i> <i>Gobernación de Santander</i>	MANUAL DE DETERMINACIÓN VIBRIO CHOLERAЕ SEGÚN LA ISO 21872-1:2017 LABORATORIO DEPARTAMENTAL DE SALUD PÚBLICA	CÓDIGO	MI-GS-MA-68
		VERSIÓN	0
		FECHA DE APROBACIÓN	02/06/2023
		PÁGINA	1 de 18

República de Colombia



Gobernación de Santander

MANUAL DE DETERMINACIÓN VIBRIO CHOLERAЕ SEGÚN LA NORMA ISO 21872-1:2017

Versión	Elaboración	Revisión Técnica	Revisión de Calidad
0	Ayde López Sánchez Sandra Isabel Bohórquez	Vianey Portilla	Alejandra Galvis Vargas

	MANUAL DE DETERMINACIÓN VIBRIO CHOLERA E SEGÚN LA ISO 21872-1:2017 LABORATORIO DEPARTAMENTAL DE SALUD PÚBLICA	CÓDIGO	MI-GS-MA-68
		VERSIÓN	0
		FECHA DE APROBACIÓN	02/06/2023
		PÁGINA	2 de 18

TABLA DE CONTENIDO

1. OBJETIVO.....	3
2. ALCANCE	3
3. RESPONSABILIDADES.....	3
4. DEFINICIONES.....	3
5. CONDICIONES GENERALES	5
6. FUNDAMENTO DEL MÉTODO DE ENSAYO.....	6
7. LIMITACIONES E INTERFERENCIAS	6
8. RECOLECCIÓN E IDENTIFICACIÓN DE LA MUESTRA	7
9. CONSERVACIÓN DE LA MUESTRA	7
10. EQUIPOS, REACTIVOS, CONTROLES Y MATERIAL DE REFERENCIA	7
10.1 Equipos	7
10.3 Controles (no aplica)	8
10.4 Material de referencia (si aplica)	8
11. DESCRIPCIÓN DEL PROCEDIMIENTO	8
12. CONTROL DE CALIDAD ANÁLITICO.....	9
13. ANÁLISIS Y EXPRESIÓN DE RESULTADOS.....	10
14. EMISIÓN DEL INFORME DE RESULTADOS.....	10
15. EXÁMENES COMPLEMENTARIOS	11
16. DOCUMENTOS DE REFERENCIA	16
17. ANEXOS	17
18. CONTROL DE CAMBIOS	18
CONTROL DE CAMBIOS.....	¡Error! Marcador no definido.

Versión	Elaboración	Revisión Técnica	Revisión de Calidad
0	Ayde López Sánchez Sandra Isabel Bohórquez	Vianey Portilla	Alejandra Galvis Vargas

	MANUAL DE DETERMINACIÓN VIBRIO CHOLERA E SEGÚN LA ISO 21872-1:2017 LABORATORIO DEPARTAMENTAL DE SALUD PÚBLICA	CÓDIGO	MI-GS-MA-68
		VERSIÓN	0
		FECHA DE APROBACIÓN	02/06/2023
		PÁGINA	3 de 18

VERSIÓN ¡Error! Marcador no definido.
FECHA..... ¡Error! Marcador no definido.
DESCRIPCIÓN DEL CAMBIO ¡Error! Marcador no definido.
REVISÓ ¡Error! Marcador no definido.
APROBÓ ¡Error! Marcador no definido.
0 ¡Error! Marcador no definido.
Emisión inicial del documento ¡Error! Marcador no definido.

1. OBJETIVO

Determinar la presencia de *Vibrio cholerae* presente en los alimentos según la norma ISO 21872-1:2017.

2. ALCANCE

Esta técnica aplica a los productos destinados al consumo humano, muestras ambientales en el área de producción y manipulación de alimentos.

Este método puede no ser apropiado en todos los detalles para ciertos productos, en este caso, se pueden utilizar diferentes métodos que son específicos para estos productos, si es absolutamente necesario por razones técnicas justificadas.

3. RESPONSABILIDADES

Será responsabilidad del profesional asignado, según cronograma de análisis de muestras verificar que, este procedimiento se lleve a cabo según esta consignado en este documento.

4. DEFINICIONES

Agua de Peptona Alcalina Salina (ASPW): se utiliza como medio de enriquecimiento tanto primario como secundario para la detección de *Vibrio spp.* en productos de alimentos.

Agar Nutritivo Salino (SNA): es un medio para el cultivo de microorganismos no fastidiosos que se usa para muestras de alimentos, el medio contiene extracto de carne que aporta carbohidratos, vitaminas, compuestos de nitrógeno orgánico y

Versión	Elaboración	Revisión Técnica	Revisión de Calidad
0	Ayde López Sánchez Sandra Isabel Bohórquez	Vianey Portilla	Alejandra Galvis Vargas

 <p>República de Colombia GOBIERNO DE SANTANDER</p>	<p>MANUAL DE DETERMINACIÓN VIBRIO CHOLERAЕ SEGÚN LA ISO 21872-1:2017 LABORATORIO DEPARTAMENTAL DE SALUD PÚBLICA</p>	CÓDIGO	MI-GS-MA-68
		VERSIÓN	0
		FECHA DE APROBACIÓN	02/06/2023
		PÁGINA	4 de 18

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.

Medio de agar tiosulfato, citrato, bilis y sacarosa (TCBS): medio selectivo de diferenciación para el aislamiento y cultivo de *Vibrio cholerae* en muestras de alimentos, en especial mariscos.

Prueba de oxidasa: sirve para determinar la presencia de enzimas oxidadas. La reacción de la oxidasa se debe a la presencia de un sistema citocromooxidasa que activa la oxidación del citocromo el cual es reducido por el oxígeno molecular produciéndose agua o peróxido de hidrógeno según la especie bacteriana.

Prueba de indol: ensayo cualitativo utilizado para diferenciar microorganismos en base a la capacidad para separar indol a partir de L-triptofano.

Prueba de hilo mucoide: se realiza para diferenciar el género *Vibrio* de otros 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.

Prueba de β-galactosidasa: se utiliza para determinar la presencia o ausencia de la enzima β-galactosidasa, utilizando el reactivo o-nitrofenil-D-galactopiranosido (ONPG); para poder diferenciar, de esta manera, los microorganismos con reacción retardada a la lactosa de los lactosa negativo.

Prueba L-lisina descarboxilasa: determina la capacidad de un microorganismo de producir una enzima que descarboxila el aminoácido lisina.

***Vibrio cholerae*:** es un bacilo gran negativo delgado y curvo (en forma de coma) móvil por flagelos polares, anaerobio facultativo, no forman esporas, fermenta sin producción de gas, Crece en caldo nutritivo sin agregado de sales, es Voges Proskauer positivo, Lisina Hiero Agar (LIA) y Ornitina descarboxilasa (ODC) positivo. Desarrolla entre 16° y 42°C, y a pH de 6,4 a 9,6. Pero se lisa cuando el pH es menor de 4.

Al observarlas en el microscopio es posible encontrarlas unidas en sus orillas, por lo que forman agregados espirales o en forma de S. Las infecciones originadas por *Vibrio cholerae* se han asociado a una amplia variedad de productos marinos: pescado, mariscos, ostras, almejas, moluscos y calamares consumidos crudos o semicrudos.

Versión	Elaboración	Revisión Técnica	Revisión de Calidad
0	Ayde López Sánchez Sandra Isabel Bohórquez	Vianey Portilla	Alejandra Galvis Vargas

 <p>República de Colombia GOBIERNO DE SANTANDER</p>	<p>MANUAL DE DETERMINACIÓN VIBRIO CHOLERAЕ SEGÚN LA ISO 21872-1:2017 LABORATORIO DEPARTAMENTAL DE SALUD PÚBLICA</p>	CÓDIGO	MI-GS-MA-68
		VERSIÓN	0
		FECHA DE APROBACIÓN	02/06/2023
		PÁGINA	5 de 18

En agar sangre forma colonias grandes, lisas, iridiscentes y algunas cepas producen hemólisis beta. Dan positiva la prueba de la cuerda.

Desarrolla dando colonias amarillas en caldo TCBS por fermentación de la sacarosa (tiosulfato, citrato, bilis, sacarosa) y en superficie en agua peptonada alcalina a las 6 horas.

***Vibrio spp* potencialmente enteropatógeno:** microorganismo que forma colonias típicas en medios selectivos sólidos y que posee las características bioquímicas o moleculares descritas cuando la prueba se realiza de acuerdo con este documento.

Detección de *Vibrio spp* potencialmente enteropatógeno: determinación de presencia o ausencia de *Vibrio spp* potencialmente enteropatógeno en una determinada cantidad de producto, cuando la prueba se realiza de acuerdo con este documento.

5. CONDICIONES GENERALES

- Las muestras se deben analizar en cuarto de siembra y en cabina de seguridad biológica (CSB).
- El personal debe realizar el lavado de las manos antes y después de la actividad laboral.
- Utilizar los elementos de protección personal (EPPs) requeridos según el riesgo de exposición en el área, tales como: Bata de laboratorio desechable, Cubrebocas, Guantes de nitrilo, Gorro desechable, Gafas de bioseguridad. Los EPPs se pueden contaminar durante la actividad, por lo tanto, se debe restringir el uso al área de trabajo para evitar la propagación de microorganismos hacia áreas ajenas al laboratorio, la verificación de los EPPs podrá realizarse en cualquier instante y se registrará en el formato de verificación de uso de elementos de protección personal MI-GS-RG-378.
- El uso de esta prueba es para control microbiológico exclusivamente, se deben cumplir con las normas de bioseguridad. Los medios de cultivo utilizados para esta prueba son Irritantes para los ojos, piel y el sistema respiratorio.
- Para salvaguardar la salud del personal de laboratorio, es esencial que las pruebas para la detección de *Vibrio spp.*, y particularmente toxigénico *Vibrio cholerae*, se lleve a cabo únicamente en laboratorios equipados para este fin y bajo la supervisión de un microbiólogo experimentado, y que se ejerza gran cuidado en la eliminación del material contaminado.

Versión	Elaboración	Revisión Técnica	Revisión de Calidad
0	Ayde López Sánchez Sandra Isabel Bohórquez	Vianey Portilla	Alejandra Galvis Vargas

 <p>República de Colombia GOBIERNO DE SANTANDER</p>	<p>MANUAL DE DETERMINACIÓN VIBRIO CHOLERAЕ SEGÚN LA ISO 21872-1:2017 LABORATORIO DEPARTAMENTAL DE SALUD PÚBLICA</p>	CÓDIGO	MI-GS-MA-68
		VERSIÓN	0
		FECHA DE APROBACIÓN	02/06/2023
		PÁGINA	6 de 18

6. FUNDAMENTO DEL MÉTODO DE ENSAYO

Agua de Peptona Alcalina Salina: se utiliza para el enriquecimiento selectivo de *Vibrio spp* para la detección de *Vibrio cholerae*, entre otras especies de este género que son potencialmente enteropatógenos en muestras de alimentos.

La peptona proporciona nitrógeno, vitaminas, minerales y aminoácidos para el crecimiento. El cloruro de sodio promueve el crecimiento ya que *Vibrio* crece bien en medios salinos.

Debido al pH alcalino que posee, inhibe la flora acompañante favoreciendo su recuperación.

Agar TCBS: es un medio altamente selectivo para *Vibrio spp.*, el extracto de levadura y la peptona proporcionan el nitrógeno y las vitaminas. El citrato sódico, el tiosulfato sódico, la bilis de buey y el colato son agentes selectivos que proporcionan un pH alcalino para inhibir los organismos gram positivos y suprimir los organismos coliformes. El pH del medio se incrementa para favorecer el crecimiento de *Vibrio cholerae* porque este organismo es sensible a los entornos ácidos. La alta concentración de sodio favorece el crecimiento de *Vibrio cholerae* que es halotolerante y de otras especies de *Vibrio*, cuya mayoría es halofílica. La sacarosa es un carbohidrato fermentable, y el cloruro sódico estimula el crecimiento. El tiosulfato sódico es una fuente de azufre y actúa con el citrato férrico como indicador para detectar la producción de ácido sulfhídrico. El azul de bromotimol y el azul de timol son indicadores de pH.

7. LIMITACIONES E INTERFERENCIAS

Vibrio cholerae puede estar presente en pequeñas cantidades y a menudo acompañado de un número mayor de otros microorganismos pertenecientes a la familia *Vibrionaceae* o a otras familias.

Este método ha sido validado para muestras de hasta 25 gr o 25 ml. Se puede utilizar una porción de muestra más pequeña siempre que se mantenga la misma relación entre el caldo (pre) enriquecimiento y la porción de muestra. Se puede utilizar una porción de muestra más grande si un estudio de validación ha demostrado que no hay efectos adversos en la detección de *Vibrio spp.*

Versión	Elaboración	Revisión Técnica	Revisión de Calidad
0	Ayde López Sánchez Sandra Isabel Bohórquez	Vianey Portilla	Alejandra Galvis Vargas

	MANUAL DE DETERMINACIÓN VIBRIO CHOLERA E SEGÚN LA ISO 21872-1:2017 LABORATORIO DEPARTAMENTAL DE SALUD PÚBLICA	CÓDIGO	MI-GS-MA-68
		VERSIÓN	0
		FECHA DE APROBACIÓN	02/06/2023
		PÁGINA	7 de 18

8. RECOLECCIÓN E IDENTIFICACIÓN DE LA MUESTRA

Ver manual de toma y recepción de muestras de alimentos y bebidas alcohólicas laboratorio de salud pública de Santander MI-GS-MA-08, inciso 3: Toma de muestras de alimentos, Tabla 2: Método de recolección de muestras de alimentos y materias primas sólidas, líquidas, deshidratadas y congeladas e inciso 6.2 Entrega de muestras al laboratorio.

9. CONSERVACIÓN DE LA MUESTRA

Es importante que el laboratorio reciba una muestra verdaderamente representativa y que no haya sido dañada o modificada durante el transporte y almacenamiento. La muestra se conserva de acuerdo a la naturaleza del producto manteniendo las temperaturas de almacenamiento correspondientes. Ver manual de procedimientos para toma, remisión, transporte, almacenamiento y conservación de muestras, unidad de vigilancia de factores de riesgo del ambiente y el consumo salud pública de Santander MI-GS-MA-58 Cuadro 2. LABORATORIO DE ALIMENTOS: Obtención, envío y conservación de muestras para análisis Microbiológico y Físicoquímico de alimentos

10. EQUIPOS, REACTIVOS, CONTROLES Y MATERIAL DE REFERENCIA

10.1 Equipos

Refrigerador a $5^{\circ} \text{C} \pm 3^{\circ} \text{C}$
 Incubadora a $37^{\circ} \text{C} \pm 1^{\circ} \text{C}$
 Incubadora a $41,5^{\circ} \text{C} \pm 1^{\circ} \text{C}$
 Congelador a $<-15^{\circ} \text{C}$
 Vortex
 Pipetas y puntas para volúmenes entre 1 μL y 1000 μL

10.2 Reactivos

Agua de peptona alcalina salina
 Agar nutritivo salino
 Medio de agar tiosulfato, citrato, bilis y sacarosa (TCBS)
 Oxidasa
 Medio salino L-lisina descarboxilasa
 Medio salino de arginina dihidrolasa
 Reactivo para la detección de β -galactosidasa

Versión	Elaboración	Revisión Técnica	Revisión de Calidad
0	Ayde López Sánchez Sandra Isabel Bohórquez	Vianey Portilla	Alejandra Galvis Vargas

	MANUAL DE DETERMINACIÓN VIBRIO CHOLERAЕ SEGÚN LA ISO 21872-1:2017 LABORATORIO DEPARTAMENTAL DE SALUD PÚBLICA	CÓDIGO	MI-GS-MA-68
		VERSIÓN	0
		FECHA DE APROBACIÓN	02/06/2023
		PÁGINA	8 de 18

Medio salino para la detección de indol

Agua peptona salina

Solución de cloruro de sodio

10.3 Controles (no aplica)

10.4 Material de referencia (si aplica)

E. coli ATCC 25922

Vibrio parahaemolyticus ATCC 17802

11. DESCRIPCIÓN DEL PROCEDIMIENTO

La detección de *Vibrio cholerae* requiere de cuatro fases sucesivas: 1. Enriquecimiento primario en un medio selectivo líquido. 2. Enriquecimiento secundario en un medio selectivo líquido. 3. Aislamiento e identificación. 4. Confirmación.

11.1 Enriquecimiento primario en un medio selectivo líquido

Para la preparación de la suspensión inicial, usar el primer medio de enriquecimiento agua peptonada alcalina (ASPW). Tomar 25 gr o 25 ml de la muestra y homogeneizar en 225 ml de ASPW a temperatura ambiente. Llevarlo a incubación a $41,5^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ durante 6 ± 1 hora en productos frescos, y/o $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ durante 6 horas ± 1 hora en productos congelados, secos o salados.

Nota: en el caso de utilizar grandes cantidades, es decir, más de 25 gr o 25 ml, se debe calentar el primer medio de enriquecimiento (ASPW) a $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ antes de la inoculación con la muestra.

Los recuentos de células de *Vibrio spp.* pueden disminuir significativamente en el almacenamiento a temperaturas de refrigeración. El almacenamiento de las muestras y, en menor medida, de las suspensiones a tales temperaturas debe evitarse siempre que sea posible y, de lo contrario, debe mantenerse al mínimo.

11.2 Enriquecimiento secundario en un medio selectivo líquido

Versión	Elaboración	Revisión Técnica	Revisión de Calidad
0	Ayde López Sánchez Sandra Isabel Bohórquez	Vianey Portilla	Alejandra Galvis Vargas

 <p>República de Colombia GOBIERNO DE SANTANDER</p>	MANUAL DE DETERMINACIÓN VIBRIO CHOLERAЕ SEGÚN LA ISO 21872-1:2017 LABORATORIO DEPARTAMENTAL DE SALUD PÚBLICA	CÓDIGO	MI-GS-MA-68
		VERSIÓN	0
		FECHA DE APROBACIÓN	02/06/2023
		PÁGINA	9 de 18

Transferir 1ml (tomado de la superficie) de los cultivos obtenidos en el enriquecimiento primario y secundario a un tubo que contenga 10 ml de ASPW. Se recomienda no agitar la muestra antes de tomar la alícuota.

Incubar los tubos a $41,5^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ durante 18 horas \pm 1 hora.

11.3 Aislamiento e identificación

A partir de los cultivos obtenidos en el ASPW en el enriquecimiento primario y secundario, inocular con un asa de 1 μ L en la superficie de una caja Petri con agar TCBS, para permitir el desarrollo de colonias bien aisladas.

Invertir las placas e incubar: para las placas con agar TCBS incubar a $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ durante 24 horas \pm 3 horas.

Después de la incubación, examinar el agar TCBS para detectar la presencia de colonias típicas de *Vibrio cholerae*. Las colonias típicas de *Vibrio cholerae* son lisas, amarillas (sacarosa negativa) y de 2 mm a 3 mm de diámetro.

Nota: el reconocimiento de las colonias de *Vibrio spp.* es en gran medida una cuestión de experiencia y su apariencia a veces puede variar, no solo de una especie a otra, sino también de un lote de medio de cultivo a otro.

12. CONTROL DE CALIDAD ANÁLITICO

Los ensayos se realizarán de acuerdo con el procedimiento de aseguramiento de la calidad de técnicas y medios de cultivo, preparación, esterilización y control de calidad de medios de cultivo MI-GS-GI-79, registrar los datos de preparación en el formato control de medios de cultivo preparados MI-GS-RG-113.

Verificar el crecimiento en el control positivo (*Vibrio parahaemolyticus* ATCC 17802), observando que el crecimiento sea adecuado y las colonias color amarillas.

El control negativo (*E. coli* ATCC 25922) no debe presentar crecimiento.

La prueba de esterilidad de los medios utilizados no debe presentar crecimiento de ningún tipo.

Versión	Elaboración	Revisión Técnica	Revisión de Calidad
0	Ayde López Sánchez Sandra Isabel Bohórquez	Vianey Portilla	Alejandra Galvis Vargas

	MANUAL DE DETERMINACIÓN VIBRIO CHOLERAЕ SEGÚN LA ISO 21872-1:2017 LABORATORIO DEPARTAMENTAL DE SALUD PÚBLICA	CÓDIGO	MI-GS-MA-68
		VERSIÓN	0
		FECHA DE APROBACIÓN	02/06/2023
		PÁGINA	10 de 18

13. ANÁLISIS Y EXPRESIÓN DE RESULTADOS

Registre en la hoja de datos primarios MI-GS-RG-157 la presencia o ausencia de vibrio spp. Teniendo en cuenta:

Bacterias fermentadoras de sacarosa: colonias amarillas (Presencia)

Bacterias no fermentadoras de sacarosa: colonias del color del medio, con centro verde.(ausencia)

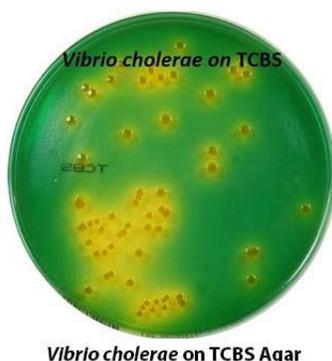


Figura 1. Crecimiento de *Vibrio cholerae* en Agar TCBS.

Prosiga con las pruebas confirmatorias para su confirmación y posterior informe.

14. EMISIÓN DEL INFORME DE RESULTADOS

Para la emisión del informe de resultados se debe especificar lo siguiente:

- La referencia de la norma ISO, es decir, 21872:1.
- Toda la información necesaria para la identificación completa de la muestra.
- El método de muestreo utilizado, si se conoce.
- Cualquier desviación con respecto al medio de enriquecimiento o de las condiciones de incubación utilizadas.
- Detalles de cualquier incidente que pueda haber influido en los resultados.
- Los resultados obtenidos, y en particular si se confirman los marcadores de patogenicidad de las cepas aisladas.
- Si se ha obtenido un resultado positivo al utilizar algún medio de aislamiento no especificado anteriormente.

Los resultados se emiten en la plantilla que contiene información general del punto de toma, información de la muestra recibida y los análisis realizados. Ver guía para

Versión	Elaboración	Revisión Técnica	Revisión de Calidad
0	Ayde López Sánchez Sandra Isabel Bohórquez	Vianey Portilla	Alejandra Galvis Vargas

	MANUAL DE DETERMINACIÓN VIBRIO CHOLERAЕ SEGÚN LA ISO 21872-1:2017 LABORATORIO DEPARTAMENTAL DE SALUD PÚBLICA	CÓDIGO	MI-GS-MA-68
		VERSIÓN	0
		FECHA DE APROBACIÓN	02/06/2023
		PÁGINA	11 de 18

el reporte de los resultados emitidos por el laboratorio de salud pública de Santander MI-GS-GI-31 en el inciso 5.3 Informe de resultados área atención al ambiente alimentos.

Teniendo en cuenta las pruebas confirmatorias se informará:

Ausencia o presencia de *Vibrio cholerae* /25 g o ml

15. EXÁMENES COMPLEMENTARIOS

Vibrio cholerae puede ser confirmado por PCR molecular y/o pruebas bioquímicas. Las pruebas bioquímicas pueden identificar siempre que se inoculen con una suspensión de la bacteria para ser identificadas en un medio suficientemente salino o fluido de dilución.

15.1 Selección de colonias para la confirmación y preparación de cultivos puros.

Para confirmar, el subcultivo de cada medio selectivo, escoger al menos una colonia bien aislada que se considera típica o similar a *Vibrio cholerae*. Si el resultado de la primera colonia aislada probada es negativo, se deben probar otras cuatro bien aisladas.

Inocular las colonias seleccionadas en la superficie de las placas de agar de nutrientes salinas (SNA) o el medio adecuado de la elección del laboratorio para obtener colonias aisladas. Incubar a 37° C ± 1° C durante 24 horas ± 3 horas.

Nota: Los alimentos, especialmente los mariscos, pueden contener un gran número de bacterias, incluido *Vibrio spp.* no patógeno, que pueden crecer a través del proceso de cultivo selectivo. El subcultivo de un pequeño número de colonias puede dar a lugar a que se pierdan especies potencialmente patógenas. Esto es particularmente crítico con el uso de agar TBCS en el que las colonias pueden ser morfológicamente similares a especies enteropatógenas.

15.2 Pruebas de identificación presuntiva

15.2.1 Prueba de oxidasa

Versión	Elaboración	Revisión Técnica	Revisión de Calidad
0	Ayde López Sánchez Sandra Isabel Bohórquez	Vianey Portilla	Alejandra Galvis Vargas

 <i>República de Colombia</i> <i>Gobernación de Santander</i>	MANUAL DE DETERMINACIÓN VIBRIO CHOLERA E SEGÚN LA ISO 21872-1:2017 LABORATORIO DEPARTAMENTAL DE SALUD PÚBLICA	CÓDIGO	MI-GS-MA-68
		VERSIÓN	0
		FECHA DE APROBACIÓN	02/06/2023
		PÁGINA	12 de 18

Usando un asa de alambre recto de platino-irridio o varilla de vidrio, tomar una parte del cultivo puro del agar nutritivo salino (SNA) rayar el papel filtro humedecido con el reactivo de oxidasa. Si se observa un cambio de color púrpura/violeta, quiere decir que la prueba es positiva, mientras que, si no se observa un cambio de color al contacto con la cepa aislada, quiere decir que la prueba es negativa.

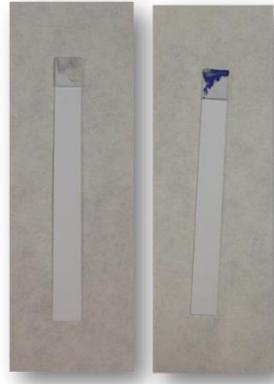


Figura 2. Tira derecha (positivo), tira izquierda (negativo).

15.2.2 Examinación microscópica

Para cada cultivo puro obtenido en el punto 11.4 realizar las pruebas de acuerdo con el punto a y b a continuación.

- a) Preparar una lámina portaobjeto para realizar la tinción de Gram. Después de realizar la tinción, examinar la morfología y la reacción de Gram con un microscopio, registrar resultados. (se debe observar bacilos curvos Gram negativos)
- b) Inocular un tubo ASPW, incubar a $37^{\circ} \text{C} \pm 1^{\circ} \text{C}$ durante 1 a 6 horas. Depositar una gota del cultivo en una lámina portaobjeto limpio, cubra la lámina con un cubreobjeto y examine la motilidad bajo el microscopio. Tenga una cuenta los cultivos que muestras un resultado positivo para la motilidad.

15.2.3 Selección de cultivos

Versión	Elaboración	Revisión Técnica	Revisión de Calidad
0	Ayde López Sánchez Sandra Isabel Bohórquez	Vianey Portilla	Alejandra Galvis Vargas

	MANUAL DE DETERMINACIÓN VIBRIO CHOLERAЕ SEGÚN LA ISO 21872-1:2017 LABORATORIO DEPARTAMENTAL DE SALUD PÚBLICA	CÓDIGO	MI-GS-MA-68
		VERSIÓN	0
		FECHA DE APROBACIÓN	02/06/2023
		PÁGINA	13 de 18

Para confirmar, conservar las colonias oxidasa positiva y las colonias Gram negativas que hayan arrojado un resultado positivo en la prueba de motilidad.

15.2.4 Confirmación bioquímica

15.2.4.1 Prueba de hilo mucoide (prueba de la cuerda)

La prueba se puede realizar en un portaobjetos o en una caja de Petri plástico, donde se suspenden colonias (obtenidas por cultivo durante 18 a 24 horas en agar infusión de corazón u otro medio no inhibitorio) en una gota de solución acuosa de desoxicolato de sodio al 0,5%. Si el resultado es positivo, las células bacterianas se lisan por efecto del desoxicolato, con lo cual la suspensión perderá turbidez y el DNA liberado de las células lisadas ocasionará que la mezcla se haga viscosa. Al retirar lentamente de la suspensión el asa, se forma un “hilo” mucoide.

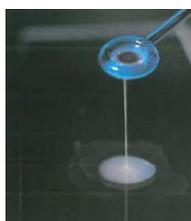


Figura 6. Prueba de hilo mucoide (prueba de la cuerda) positiva.

15.2.4.2 Montaje en VITEK®2 Compact

Las pruebas bioquímicas que se realizan para la identificación de *Vibrio cholerae* pueden montarse en el equipo VITEK®2 Compact utilizando las tarjetas GN para bacilos Gram-negativos.

Sin embargo, se podrán usar las siguientes pruebas bioquímicas

15.2.4.3 Medio de Solución Salina L-lisina descarboxilasa

1. Inocular el medio líquido justo debajo de la superficie. Agregue aproximadamente 1 ml de aceite mineral estéril en la parte superior del medio.
2. Incubar a $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ durante 24 horas \pm 3 horas.

Versión	Elaboración	Revisión Técnica	Revisión de Calidad
0	Ayde López Sánchez Sandra Isabel Bohórquez	Vianey Portilla	Alejandra Galvis Vargas

	MANUAL DE DETERMINACIÓN VIBRIO CHOLERAЕ SEGÚN LA ISO 21872-1:2017 LABORATORIO DEPARTAMENTAL DE SALUD PÚBLICA	CÓDIGO	MI-GS-MA-68
		VERSIÓN	0
		FECHA DE APROBACIÓN	02/06/2023
		PÁGINA	14 de 18

- La turbidez y un color violeta después de la incubación indican una reacción positiva (crecimiento bacteriano y descarboxilación de la L-lisina). Un color amarillo indica una reacción negativa.



Figura 3. Prueba de la descarboxilación de L-lisina.

15.2.4.4 Medio de Solución Salina Arginina Dihidrolasa

- Inocular el medio líquido justo debajo de la superficie. Agregue aproximadamente 1 ml de aceite mineral estéril en la parte superior del medio.
- Incubar a $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ durante 24 horas \pm 3 horas.
- La turbidez y un color violeta después de la incubación indican una reacción positiva (crecimiento bacteriano y dihidrolatación de la arginina). Un color amarillo indica una reacción negativa.

15.2.4.5 Detección de β -galactosidasa

- Inocular la colonia presuntiva en un tubo que contenga 0,25 ml de solución de cloruro de sodio.
- Añadir una gota de tolueno y agitar el tubo.
- Colocar el tubo en la incubadora a $37^{\circ}\text{C} \pm 1$, fijado durante aproximadamente 5 minutos.
- Luego de la incubación, añadir 0,25 ml del reactivo para la detección de β -galactosidasa y mezclar.
- Colocar el tubo en baño de agua a $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, fijado durante 24 horas \pm 3 horas, examinándolo de vez en cuando.
- Un color amarillo indica una reacción positiva (presencia de β -galactosidasa). A menudo la reacción suele ser visible después de los 30 minutos. La ausencia de color después de la incubación durante 24 horas indica una reacción negativa.

Versión	Elaboración	Revisión Técnica	Revisión de Calidad
0	Ayde López Sánchez Sandra Isabel Bohórquez	Vianey Portilla	Alejandra Galvis Vargas

	MANUAL DE DETERMINACIÓN VIBRIO CHOLERAЕ SEGÚN LA ISO 21872-1:2017 LABORATORIO DEPARTAMENTAL DE SALUD PÚBLICA	CÓDIGO	MI-GS-MA-68
		VERSIÓN	0
		FECHA DE APROBACIÓN	02/06/2023
		PÁGINA	15 de 18

Nota: si se utilizan discos de papel listos para usar, seguir las instrucciones del fabricante.

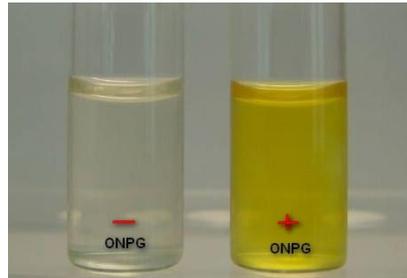


Figura 4. Prueba de β -galactosidasa

15.2.4.6 Detección de Indol

1. Inocular un tubo que contenga 5 ml del medio salino de triptófano con la colonia presuntiva.
2. Incubar a $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ durante 24 horas \pm 3 horas. Después de la incubación, añadir 1 ml del reactivo de Kovacs.
3. La formación de un anillo rojo indica una reacción positiva (formación de indol). La formación de un anillo amarillo-marrón indica una reacción negativa.

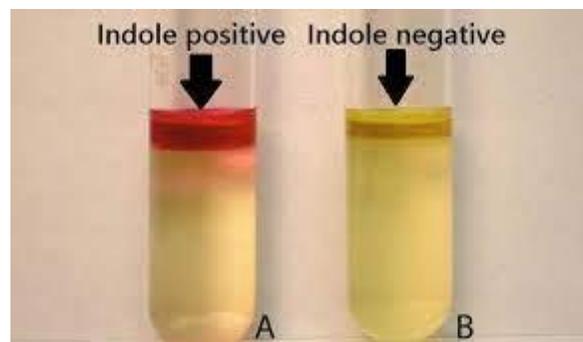


Figura 5. Prueba de indol

15.2.4.7 Prueba de Halotolerancia

1. Producir una serie de aguas de peptona salinas con una concentración de sal creciente: 0%, 6% y 10%.

Versión	Elaboración	Revisión Técnica	Revisión de Calidad
0	Ayde López Sánchez Sandra Isabel Bohórquez	Vianey Portilla	Alejandra Galvis Vargas

	MANUAL DE DETERMINACIÓN VIBRIO CHOLERAЕ SEGÚN LA ISO 21872-1:2017 LABORATORIO DEPARTAMENTAL DE SALUD PÚBLICA	CÓDIGO	MI-GS-MA-68
		VERSIÓN	0
		FECHA DE APROBACIÓN	02/06/2023
		PÁGINA	16 de 18

2. Inocular cada uno de los tubos con la colonia presuntiva.
3. Incubar a 37°C ± 1°C durante 24 horas ± 3 horas.
4. La observación de la turbidez indica que la bacteria puede crecer a la concentración de cloruro de sodio presente en el tubo del agua de peptona salina.

15.2.4.8 Interpretación de pruebas bioquímicas

Vibrio cholerae generalmente dan las reacciones indicadas en la siguiente tabla.

Prueba bioquímica	Reacción
Oxidasa	Positivo
Descarboxilación de L-lisina	Positivo
Dihidroxilación de Arginina	Negativo
Hidrólisis de ONPG	Positivo
Producción de indol	Positivo
Crecimiento en agua de peptona salina con	
NaCl 0%	Positivo
NaCl 6%	Negativo
NaCl 10%	Negativo

Tabla 1. Resultados pruebas químicas para *V. cholerae*

Nota 1: las reacciones dadas en la tabla anterior son una guía para la identificación de *Vibrio cholerae*. Se pueden requerir pruebas fenotípicas adicionales para distinguir completamente la especie para diferenciarla de *Vibrio spp.* no patógenas.

Nota 2: Es preferible realizar serología para *Vibrio cholerae* (al menos para determinar si son serogrupos 01 o 0139) o una prueba apropiada basada en PCR para determinar las cepas toxigénicas, como las que llevan el gen de la toxina del cólera ctx.

16. DOCUMENTOS DE REFERENCIA

- Norma ISO 6887-1:2017, Microbiología de la cadena alimentaria. Preparación de muestras de ensayo, suspensión inicial y diluciones decimales para el examen microbiológico. Parte 1: Normas generales para la preparación de la suspensión inicial y las diluciones decimales.
- ISO 6887-3, Microbiología de la cadena alimentaria. Preparación de muestras de ensayo, suspensión inicial y diluciones decimales para el examen microbiológico. Parte 3: Normas específicas para la preparación de pescado y productos pesqueros.

Versión	Elaboración	Revisión Técnica	Revisión de Calidad
0	Ayde López Sánchez Sandra Isabel Bohórquez	Vianey Portilla	Alejandra Galvis Vargas

	MANUAL DE DETERMINACIÓN VIBRIO CHOLERA E SEGÚN LA ISO 21872-1:2017 LABORATORIO DEPARTAMENTAL DE SALUD PÚBLICA	CÓDIGO	MI-GS-MA-68
		VERSIÓN	0
		FECHA DE APROBACIÓN	02/06/2023
		PÁGINA	17 de 18

- ISO 7218, Microbiología de alimentos y alimentos para animales. Requisitos generales y orientación para los exámenes microbiológicos.
- ISO 11133, Microbiología de alimentos, alimentos para animales y agua. Preparación, producción, almacenamiento y pruebas de rendimiento de medios de cultivo.
- ISO 22118, Microbiología de alimentos para consumo humano y animal. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para la detección y cuantificación de patógenos transmitidos por los alimentos. Características de rendimiento.
- ISO 22119, Microbiología de alimentos para consumo humano y animal. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en tiempo real para la detección de patógenos transmitidos por los alimentos. Requisitos generales y definiciones.
- ISO 22174, Microbiología de alimentos para consumo humano y animal. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para la detección de patógenos transmitidos por los alimentos. Requisitos generales y definiciones.

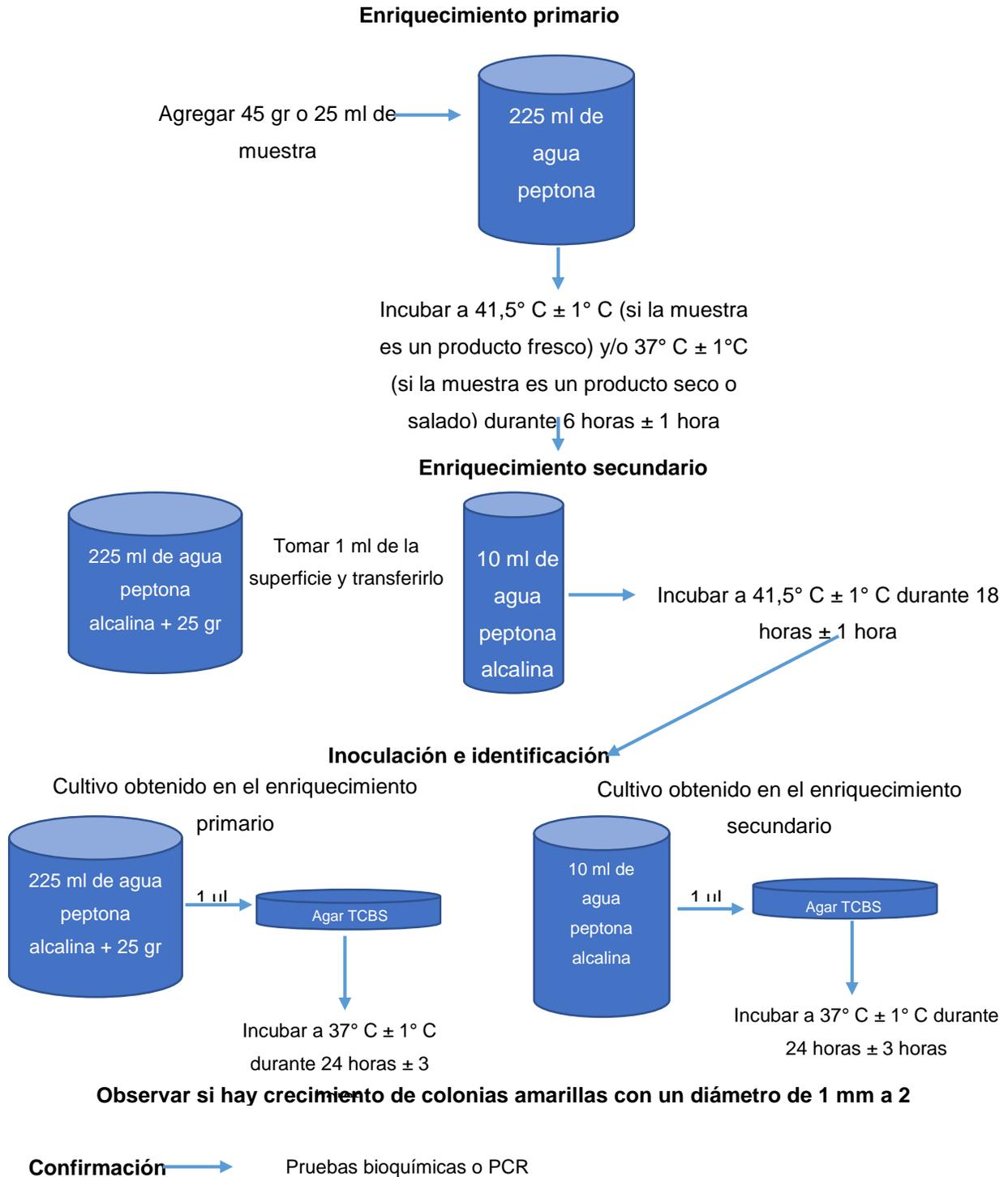
17. CONTROL DE CAMBIOS

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	Ayde López Sánchez Sandra Isabel Bohórquez	Vianey Portilla	Alejandra Galvis Vargas

	MANUAL DE DETERMINACIÓN VIBRIO CHOLERAE SEGÚN LA ISO 21872-1:2017 LABORATORIO DEPARTAMENTAL DE SALUD PÚBLICA	CÓDIGO	MI-GS-MA-68
		VERSIÓN	0
		FECHA DE APROBACIÓN	02/06/2023
		PÁGINA	18 de 18

18. ANEXOS



Versión	Elaboración	Revisión Técnica	Revisión de Calidad
0	Ayde López Sánchez Sandra Isabel Bohórquez	Vianey Portilla	Alejandra Galvis Vargas