



## MÉTODO ANALÍTICO DE DETERMINACIÓN DE *Vibrio cholerae* EN MUESTRAS DE AGUA, SM 9260 H.

Corporación para el Desarrollo Sostenible del Urabá

Código: D-7.2-05

Versión: 05

Revisó: Subdirector de Planeación y O.T.

Aprobó: Director General (E).

Fecha: 09 de Julio de 2025

Fecha: 09 de Julio de 2025

Resolución: 100-03-10-23-1338-2025

Páginas: 1 de 8

### 1. DESCRIPCIÓN

El *Vibrio cholerae* se presenta en forma de un bastoncito de 1,5 µm a 2,5 µm de largo y 0,2–0,4 µm de ancho, ligeramente encorvado. En ocasiones este encorvamiento es mínimo apareciendo entonces como verdaderos bacilos; También se les denomina bacilos en coma; este microorganismo es móvil, por un flagelo polar, y es considerado como el más móvil de todas las especies patógenas. Son aerobios o anaerobios facultativos, gram negativos, fermentan carbohidratos sin producción de gas, no producen hidrógeno sulfurado y son oxidasa, manitol, indol, lisina descarboxilasa positivas. Es un germen relativamente poco resistente a los agentes exteriores, dependiendo su vida de los factores físicos y químicos que influyen sobre él y de los factores biológicos que presentan las otras especies microbianas.

El *V. cholerae* es el agente causal del cólera, infección diarreica aguda causada por la ingestión de alimentos o agua contaminados con el bacilo *Vibrio cholerae*. Se calcula que cada año se producen entre 1,3 millones y 4 millones de casos de cólera y entre 21.000 y 143.000 defunciones. El breve periodo de incubación, que fluctúa entre dos horas y cinco días, acrecienta el carácter potencialmente explosivo de los brotes epidémicos.

La transmisión del cólera está estrechamente ligada a una mala gestión ambiental. De manera característica, las zonas de riesgo son las barriadas periurbanas, donde no hay infraestructura básica, así como los campos para personas desplazadas o refugiadas, donde no se cumplen los requisitos mínimos de agua limpia y saneamiento.

### 2. ALCANCE

El método analítico de determinación de *Vibrio cholerae* es aplicable a muestras de agua marina y superficial principalmente.

### 3. FUNDAMENTOS DEL MÉTODO

#### 3.1 Principio

El método consiste en tomar con el hisopo de Moore una muestra de agua en campo, luego el hisopo es llevado al laboratorio y sumergido en un frasco con agua peptonada alcalina (pH 8,5 a 9). Posteriormente, se incuba el frasco con el hisopo de Moore a 36°C por 6 a 8 horas.

Cumplido este tiempo, utilizando un asa, se toma de la porción superior del caldo, y se siembra en agar TCBS (medio selectivo) en estríя. De la misma forma se siembra en agar gelatina con 1% de NaCl (medio no selectivo para pruebas preliminares), se incuban ambos medios de 18-24 horas a una temperatura entre 35 y 37°C.

#### 3.2 Interferencias

La interferencia para el aislamiento de este microorganismo son las enterobacterias, pero quedan anuladas debido a las propiedades del medio de cultivo que inhiben su crecimiento. Esta inhibición en el medio se debe a las altas concentraciones de tiosulfato y citrato, la presencia de sales biliares y un pH fuertemente alcalino.

#### 4. TOMA DE MUESTRA Y ALMACENAMIENTO

##### 4.1 Elaboración del hisopo de Moore

Cortar tiras de gasa de 60 cm de largo por 45 cm de ancho.



Doblar la gasa varias veces longitudinalmente, y tres veces seguidas a lo ancho cortando en cada costado.



Obtener tiras de aproximadamente 5 cm de ancho y 30 cm de largo, que se atan del extremo superior.



Atar firmemente con una pita calibre 12.



#### **4.2 Toma de muestra utilizando el hisopo de Moore**

Colocar el hisopo en el lugar seleccionado a una profundidad de 20-30 cm en el sitio representativo. El largo de la pita que sujetta el hisopo debe ser de 1 metro lineal, con el fin de facilitar su manipulación.

El hisopo debe permanecer sumergido de 24 a 48 horas. Al retirar el hisopo, este debe colocarse en un recipiente hermético estéril de boca ancha que contenga 300 ml de agua peptonada alcalina (pH entre 8,5– 9).

Identificar la muestra con fecha, hora de iniciado el muestreo, hora de finalización del muestreo, lugar del muestreo, origen de la fuente y responsable del muestreo (para cada toma diligenciar un formato sobre los datos de la muestra).

Empacar adecuadamente el recipiente hermético para evitar ruptura ó pérdida de muestra durante el transporte.

Llevar al laboratorio lo más pronto posible, manteniendo la muestra refrigerada, en un lapso de tiempo no superior a 6 horas.

#### **5. INSTRUMENTAL Y EQUIPOS**

- Asa.
- Frascos de boca ancha.
- Gasa.
- Tijeras.
- Cinta métrica.
- Pita calibre 12.
- Papel kraft.
- Autoclave.

## 6. REACTIVOS

- Agua peptonada alcalina (pH 8,5 a 9).
- Agar TCBS.
- Agar gelatina.
- NaCl.
- Agar Sangre.
- Caldo nutritivo.
- Agar nutritivo.

## 7. PREPARACIÓN DE REACTIVOS

**Agar gelatina:** La gelatina es un material proteínico utilizado para la solidificación de los medios de cultivo y para la detección y diferenciación de ciertas bacterias proteolíticas. Preparación: Una solución al 15% puede autoclavarse 15 minutos a 121°C y formar un gel satisfactorio al enfriar.

**Agar TCBS CHOLERA MEDUIM:** Añadir 88 gramos a un litro de agua destilada. Llevar a ebullición a disolución completa. NO AUTOCLAVAR. Verter en placas sin volver a calentar el medio y secar su superficie antes de usarlas.

**Caldo Nutritivo 0% NaCl:** Caldo de enriquecimiento. Preparación: Pesar 8 gramos de caldo en 1 litro de agua y esterilizar en autoclave durante 15 minutos a 121°C.

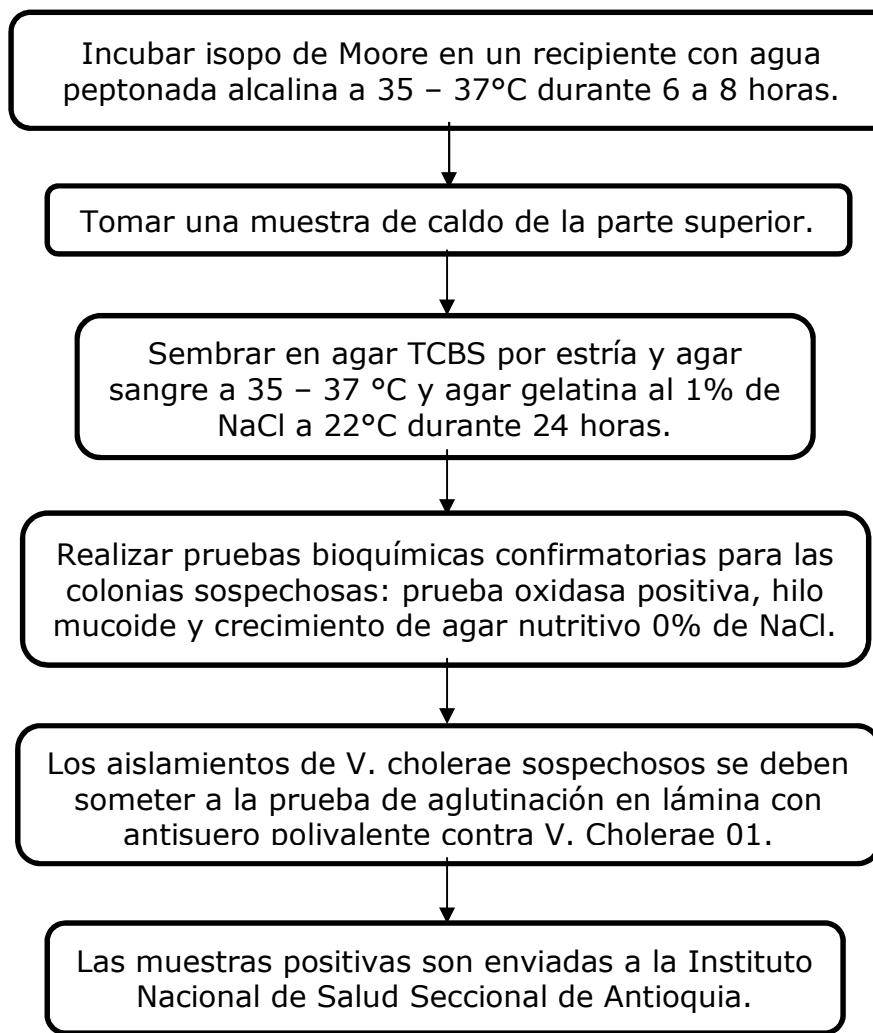
**Agar Nutritivo:** Medio de enriquecimiento. Preparación: pesar 20g por 1L de agua destilada y esterilizar en autoclave por 15 minutos a 121 °C.

**Agar Sangre:** Disolver 4g/L del medio deshidratado, esterilizar en autoclave (15 minutos a 121°C), dejar enfriar a 45-50°C, incorporar 5 a 8% de sangre desfibrinada y verter en placa. pH 6,8±0,2.

## 8. PROCEDIMIENTO

- El recipiente con el agua peptonada alcalina que contiene el hisopo de Moore, se incuba a una temperatura de 36°C durante 6-8 horas.
- Luego de la incubación, y evitando mezclar el recipiente, utilizando un asa, se toma de la porción superior del caldo (Esto con el fin de garantizar una mayor recuperación del microorganismo *Vibrio cholerae* ya que este, tiene tendencia a ubicarse en el menisco del líquido), y se siembra en agar TCBS (medio selectivo) por estría. De igual forma, se realiza la siembra en un agar gelatina con 1% de NaCl (medio no selectivo para pruebas preliminares), también se realiza la siembra en por estría en agar sangre.
- Incubar el agar TCBS, el agar sangres y agar gelatina con 1% de NaCl de 18-24 horas a una temperatura de 36°C.
- Observar las colonias características de *V. cholerae* en cada medio de cultivo, así: **Agar TCBS:** colonias amarillas brillantes, pegajosas con centro opaco y periferia translúcida, lisas de 2-3 mm de diámetro. **Agar gelatina con 1% de NaCl:** colonias translúcidas de bordes regulares de 2-3 mm de diámetro. **Agar sangre:** colonias α hemolíticas.
- Tomar una colonia característica del agar gelatina con 1% de NaCl para realizar la prueba de oxidasa que debe dar POSITIVA y la prueba del hilo mucoide o cuerda, que debe dar como resultado la FORMACIÓN DEL HILO MUCOIDE. Verificar igualmente el crecimiento en caldo nutritivo al 0% de NaCl.
- Los aislamientos de *V. cholerae* sospechosos se deben someter a la prueba de aglutinación en lámina con antisuero polivalente *V. cholerae* O1.
- Las muestras positivas son enviadas a la Instituto Nacional de Salud -Seccional Antioquia.

## 9. ALGORITMO



## 10. CÁLCULOS Y RESULTADOS

Colonias planas 2-3 mm de diámetro amarillas: *V. cholerae*

Colonias pequeñas con el centro verde azulado: *Vibrio parahaemolyticus*. Los

resultados son reportados como presencia o ausencia de *V. cholerae*.

## **11. SEGUIMIENTO Y CONTROL DE CALIDAD**

**Control Negativo:** Con el fin de descartar cualquier contaminación externa, se realizará un control negativo que garantice una correcta esterilidad en el proceso de preparación y montaje del método. En el caso de los caldos nutritivos, estos serán dejados 24 horas en una incubadora, con el fin de analizar que no haya crecimiento de microorganismos antes de su inoculación. Mientras que agares sin inocular serán incubados a 36°C para descartar posibles contaminaciones.

### **Control Positivo:**

El control de calidad para Agar TCBS se realiza mediante cepas ATCC

***Escherichia coli* ATCC 25922;** CRECIMIENTO NULO.

***Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853** CRECIMIENTO NULO O LIGERO.

***Vibrio parahaemolyticus* ATCC 17802:** Colonias pequeñas con el centro verde azulado.

Los ensayos se realizarán como mínimo por duplicado de cada muestra, con el fin de garantizar la veracidad de los mismos.

**Análisis de Efecto matriz:** se realiza mediante el cálculo del porcentaje de recuperación de una muestra de agua añadida con una concentración de 10-100 bacterias/mL de *Vibrio parahaemolyticus* ATCC 17802.

$$\%R = (\bar{x} \text{ muestra inoculada}) / (\bar{x} \text{ cepa} + \bar{x} \text{ muestra}) \times 100$$

Dónde:

%R = Porcentaje de recuperación

$\bar{x}$ = Promedio de la concentración

El efecto matriz es analizado cada vez que ingresa una matriz diferente de agua Marina.

Todo el control de calidad realizado se registra en el formato “R-7.4-24 captura de datos Vibrio cholera” en orden cronológico.

## **12. MANTENIMIENTO**

El mantenimiento de las incubadoras se realiza entre 12 a 18 meses de acuerdo a lo evaluado por el laboratorio.

## 13. BIBLIOGRAFÍA

- American Public Health Association, American Water Works Association, Water Environment Federation. In: Lipps Wc, Braunt-Howland Eb, Baxter Te. Eds. Standard Methods For The Examination Of Water And Wastewater, 24th Ed. Washington Dc: APHA PRESS;2023.
- OMS, Organización Mundial de la Salud. 2014. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs107/es/>. 27 de Julio de 2014.
- Instituto nacional de Salud. 2011. PROTOCOLO TOMA Y ANÁLISIS DE MUESTRAS DE AGUA PARA DETERMINACIÓN DE *Vibrio cholerae*, [www.ins.gov.co/temas-de-interes/SiteAssets/Paginas/colera/Anexo%20a%20protocolo%20Colera%20toma%20muestras%20aguas.pdf](http://www.ins.gov.co/temas-de-interes/SiteAssets/Paginas/colera/Anexo%20a%20protocolo%20Colera%20toma%20muestras%20aguas.pdf). 27 de julio de 2014.
- MERCK. 1994. Manual de medios de cultivo. Agar TCBS, agar gelatina. Pág 104,174.

## 14. CONTROL DE CAMBIOS

Fecha	Resolución	Versión	Detalle
12/12/2014	300-03-10-23-1864	01	Aprobación inicial con código y nombre D-5.4-05: MÉTODO ANALÍTICO DE DETERMINACIÓN DE VIBRIO CHOLERAES EN MUESTRAS DE AGUA, SM 9260 H.
05/10/2016	300-03-10-23-1303	02	Se actualiza el logo corporativo.
15/08/2018	300-03-10-23-1436	03	De acuerdo al Standard Methods Ed.23 de 2017 se especifican los siguientes cambios: En la sección de DESCRIPCIÓN se actualiza el dato de casos y defunciones causadas por cólera. En la sección REACTIVOS se adiciona: Agar sangre, Caldo nutritivo y Agar nutritivo, como elemento de trabajo en el ensayo. De acuerdo a lo anterior se incluye en la sección de PREPARACIÓN DE REACTIVOS la preparación del Agar sangre. En el ítem de observación de colonias del PROCEDIMIENTO se agrega <b>Agar sangre</b> : colonias $\alpha$ hemolíticas. Se ajusta el SEGUIMIENTO Y CONTROL especificando Control negativo, Control positivo, duplicado de cada muestra y Análisis de efecto matriz, de acuerdo a lo indicado en el SM.
19/11/2019	300-03-10-23-1429	04	Se elimina la subsección 3.2 - Definición y se unifica con el criterio de descripción de la sección 1. Por otro lado, se adiciona dentro de la estructura del método la sección 2 – ALCANCE, así: “El método analítico de determinación de <i>Vibrio cholerae</i> es aplicable a muestras de agua marina y superficial principalmente”. También se incluye la sección 12 - MANTENIMIENTO relacionado con el método. Se cambia la codificación del documento pasando de D-5.4-05 a D-7.2-05 de acuerdo a la nueva versión de la Norma – ISO/IEC 17025:2017, así como también se modifica el respectivo formato de captura de datos referenciado en éste.
09/07/2025	100-03-10-23-1338	05	Se actualizó el ítem 13 Bibliografía, edición 24 th de Standard Methods (2023).

Última línea-----última línea-----última línea