

Procedimientos para la identificación de *Vibrio cholerae* en el laboratorio de microbiología 2010

Agradecimiento

Estos procedimientos fueron elaborados siguiendo un protocolo original del Programa de Formación para la Lucha contra el Cólera y las Enfermedades (PROCED ALA/93/25), en Quito, Ecuador. La Organización Panamericana de la Salud agradece a esta institución la disponibilidad de los mismos.

TOMA Y ENVIO DE MUESTRAS DE HECES PARA ESTUDIOS DIAGNOSTICOS DE *V. cholerae*

El objetivo principal es el de mantener la viabilidad de las bacterias que se encuentran en la muestra y de procurar el buen manejo de la misma.

PROCEDIMIENTO

1. Asegurarse de que la persona defaque en un recipiente aparte (bacinilla) cuidando que la muestra no se mezcle con orina.
2. Tomar una parte de la muestra en un recipiente estéril de boca ancha y tapa rosca.
3. Rotular el frasco colocando el nombre del paciente, edad y fecha de recolección.
4. Introducir la(s) muestra(s) en una funda plástica y cerrarla evitando que se derrame y se mezcle con otras muestras.
5. Colocarlas en una caja, rodeándolas de papel picado asegurando que los recipientes no se muevan durante el transporte.
6. Adjuntar los formularios en donde constará nombres y apellidos de los pacientes, procedencia, fecha de toma de la muestra, nombre y teléfono de la persona que hizo la toma.
7. Sellar la caja y colocar un rótulo a un costado indicando “Peligro, Muestra Biológica” y una flecha indicando la posición “Hacia Arriba”, de manera que el transporte se haga de esa forma.
8. Transportar las muestras rápidamente, antes de que transcurran 2 horas de su emisión. Luego de ese tiempo la muestra no será útil.

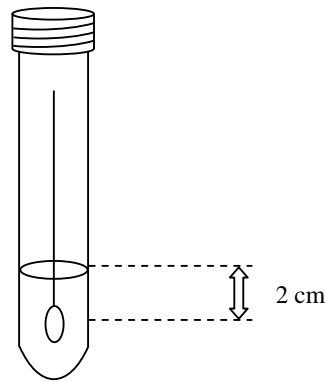


ENVIO DE MUESTRA EN MEDIO DE TRANSPORTE

Se utilizará en caso de que la muestra tarde más de 2 horas en llegar al laboratorio. Puede usarse para hisopados fecales (introduciendo el hisopo directamente en la muestra tomando una parte de ella) o para hisopados rectales (toma de la muestra introduciendo el hisopo a través del ano del paciente).

PROCEDIMIENTO:

1. Tomar con un hisopo estéril parte de la muestra.
2. Introducir el hisopo en el medio de transporte Cary Blair, cuidando de que el algodón quede 2 cm por debajo de la superficie y sin perforar el fondo del medio de transporte.
3. Romper la parte del mango que tocó nuestros dedos para evitar fuentes de contaminación externa.
4. Cerrar bien el tubo y rotularlo con el nombre del paciente.
5. Colocar el (los) tubo(s) en una caja, rodeándolos con papel picado para evitar que se rompan durante el transporte.
6. Adjuntar los formularios de pedido en donde constará los nombres y apellidos de los pacientes, procedencia, edad, procedencia y nombre de la persona que tomó la muestra.
7. Sellar la caja y rotularla con un papel que diga “Peligro Muestra Biológica” y una flecha indicando la posición en que debe viajar la caja.
8. No es necesario refrigerar las muestras. Enviarlas lo antes posible a su laboratorio de referencia.



BUSQUEDA DE *V. cholerae* POR LABORATORIO

En caso de muestra entera se trabaja directamente con ella; en caso de recibir un medio de transporte Cary-Blair se deberá proceder de la siguiente manera:

1. Sacar el hisopo del tubo de transporte tomando en cuenta las normas de bioseguridad para evitar el contagio del personal y/o contaminación de la muestra.
2. Introducir el hisopo en un tubo que contenga unos 2 ml de solución salina estéril.
3. Agitar el tubo para obtener una suspensión homogénea de la muestra contenida en el hisopo. Esta suspensión nos servirá para nuestra investigación
4. Sacar el hisopo y colocarlo en su tubo de transporte original.

Anotar las características macroscópicas de las heces en caso de recibir una muestra entera, posteriormente:

- Colocar una gota de la muestra entre porta y cubreobjetos para realizar el estado fresco verificando la motilidad en “vuelo de moscas”.
- Realizar la coloración Gram (bacilos gramnegativos en forma de “coma”).

A partir de la muestra entera (líquida) o de la suspensión sembrar un agar T.C.B.S. y una gelosa alcalina (ver preparación en anexos) e incubar las cajas durante 18 h a 37°C.

Verificar la presencia de colonias sospechosas en T.C.B.S. (amarillas, cremosas, brillantes, de bordes regulares). En la gelosa alcalina las colonias se presentan redondas, transparentes, de bordes regulares.

Realizar la prueba de oxidasa a partir de la gelosa alcalina (posibilidad de resultados falsos negativos si se la realiza a partir del TCBS).

En caso de epidemias se puede realizar la prueba con los antisueros directamente a partir de la gelosa alcalina. Utilizando para ello el antisuero polivalente O:1 y el antisuero O:139 en caso de negatividad del primero. Realizar las pruebas bioquímicas para descartar posibles reacciones cruzadas.

Si nos encontramos en período endémico, con las colonias oxidasa positivas realizar una galería bioquímica convencional a partir de las colonias de la gelosa alcalina. O en caso de disponer del recurso, utilizar las galerías comerciales.

En caso de requerirse un enriquecimiento se procederá a sembrar con la muestra entera un tubo de agua peptonada alcalina (preparación ver en anexos) e incubarlo por 6 horas. Luego de este tiempo y sin agitar el tubo, tomar una muestra del tercio superior del medio y sembrar un TCBS, una gelosa alcalina y un nuevo tubo de agua peptonada

**Procedimientos para la identificación de *Vibrio cholerae* en el laboratorio de microbiología
2010**

alcalina. Estos pasos se pueden repetir hasta por 3 ocasiones (3 fases de enriquecimiento) y proceder de igual manera con las colonias sospechosas.

Realizar un antibiograma de acuerdo a la plantilla para *Vibrio cholerae*.

Congelar la cepa utilizando en medio T1N1 (Ver anexo).

METODO DE CONSERVACION DE VIBRIO CHOLERAЕ

MEDIO T1 N1

1g Tripticasa

1g Cloruro de Sodio

Ajustar el pH a 7,4 con NaOH

15ml Glicerol

qsp 100 ml de agua destilada

Repartir 1.5 ml en los criotubos y esterilizar durante 15' a 120°C con las tapas semiajustadas durante 15 minutos. Esperar a que los tubos se enfríen y ajustar las tapas. (Si se cierran mientras están calientes al momento de usar entrará aire al medio y existe la posibilidad de contaminación).

- 1.- Repicar la cepa en un medio que contenga cloruro de sodio (gelosa alcalina por ejemplo) e incubar a 37°C durante 18 h.
- 2.- Verificar la pureza del aislamiento. Realizar una prueba de oxidasa.
- 3.- Tomar una sola colonia y sembrar el criotubo con el medio T1N1
- 4.- Incubar el tubo a 37°C durante 18 h.
- 5.- Colocar el tubo en el congelador -80°C.
- 6.- Como medida de seguridad y antes de desechar la cepa de inicio, al cabo de una semana se puede repicar la cepa del criotubo y de esta manera comprobar que la conservación tuvo éxito

Nota: Para repicar las muestras a partir del criotubo es indispensable preparar el material y realizar todos los pasos previos necesarios con anticipación (cajas Petri, numeración, etc.) para de esta manera evitar que los criotubos permanezcan por mucho tiempo fuera del congelador.

El repicaje se lo realiza raspando la parte superior de la muestra con una asa estéril (**sin dejar que se descongele el medio**), de esta manera una cantidad pequeña de la muestra se encontrará en el asa y la estriamos en un agar (generalmente Mueller Hinton). Este criotubo se lo vuelve a guardar rápidamente en la congeladora.

PREPARACION DE MEDIOS DE CULTIVO

Agar T.C.B.S.

- 1.- Disolver 89 g de agar T.C.B.S. en 1 litro de agua destilada estéril.
- 2.- Llevar a ebullición hasta completar la disolución.
- 3.- No se debe pasar el medio por el autoclave.
- 4.- Esperar a que alcance una temperatura de 60°C.
- 5.- Distribuir en cajas Petri 10 x 100 mm.

Gelosa Alcalina

- 1.- La preparación inicial es la siguiente:
 - 20 g de Peptona
 - 15 g de Agar-agar
 - 5 g de Cloruro de Sodio
- 2.- Colocar agua destilada hasta completar 1000 ml
- 3.- Llevar a ebullición hasta asegurar la disolución completa.
- 4.- Verificar el pH del medio que debe ser de 8,4 caso contrario ajustarlo con una solución de NaOH al 30%.
- 5.- Esterilizar en autoclave durante 15' a 120°C.
- 6.- Esperar hasta que alcance una temperatura de 60°C aproximadamente.
- 7.- Distribuir en cajas Petri de 10 x 100 mm.

Procedimientos para la identificación de *Vibrio cholerae* en el laboratorio de microbiología
2010

Agua Peptonada Alcalina Hipersalina

- 1.- Peptona 30 g
- 2.- NaCl 30 g
- 3.- Agua destilada Completar a 1000 ml

Ajustar el pH a 8,6 con una solución de NaOH.
Repartir en tubos y esterilizar 20 minutos a 120°C.

Nota: la concentración en cloruro de sodio puede variar del 1 al 10%, según las necesidades.

Medio de transporte de Cary Blair

- 1.- Tioglicolato de Sodio 1,5 g
- 2.- Na₂HPO₄ 1,1 g
- 3.- NaCl 5 g
- 4.- Agar 5 g
- 5.- Agua destilada Completar a 1000 ml

Preparación:

Disolver los ingredientes en agua calentada a baño-maría; hervir hasta que la solución se vuelva transparente. Dejar enfriar a 50°C; agregar 9 ml de cloruro de calcio al 1% recién preparado y luego ajustar el pH a 8,4 con una solución de NaOH. Repartir en frascos con tapa de rosca y esterilizar durante 20 minutos a 120°C.

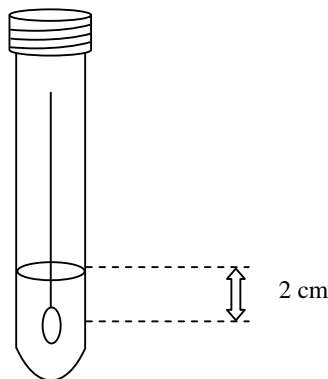
BIBLIOGRAFIA

- 1.- Dodin A., Fournier J.M.. 1992. Méthodes de Laboratoire pour le diagnostic du Vibrión cholérique et des autres Vibrións. Institut Pasteur – Méthodes de Laboratoire, Paris.
- 2.- Hojas informativas sobre seguridad en el laboratorio y derrame de sustancias infecciosas. OPS/OMS, Ecuador.
- 3.- Mc Laughlin J. 1995. Vibrio, p.465-476. En Murray P. et al (ed.), Manual of Clinical Microbiology, 6° ed. American Society for Microbiology, Washington D.C.
- 4.- Hansen W. 1994. Vibrio, p. 1245-1270. En Freney J. et al. Manuel de Bactériologie Clinique, 2° ed. Elsevier, Paris.
- 5.- Envío de muestras de heces fecales. En Manual de Técnicas Básicas para un Laboratorio de Salud. Organización Panamericana de la Salud, Publicación científica N° 439, Washington D.C.

PASOS PARA EL DIAGNOSTICO DE COLERA

1. Tomar la muestra:
 - a: Muestra entera (frasco de heces).
 - b: Hisopado rectal.
 - c: Hisopado fecal.
2. Rotular e identificar la muestra:
Nombre, fecha, código de identificación.
3. Pedir los datos del paciente (hoja de datos):
Nombre y apellidos completos.
Fecha de nacimiento o edad.
Procedencia.
Dirección exacta.
Teléfono.
Fecha y hora de toma de muestra.
Signos y síntomas principales.
Recibió o no tratamiento? y cuál?
4. Anotar las características macroscópicas de las heces:
Color, aspecto.
5. Observación microscópica:
 - a: Estado fresco (objetivos x10 y x40)
Identificar la presencia de bacterias de gran motilidad (“vuelo de moscas”).
Reportar la presencia o ausencia de picocitos, hematíes, parásitos...
 - b: Tinción de Gram (lente de inmersión, objetivo x100 con una gota de aceite)
Identificar la importancia de la flora.
Anotar la variabilidad o el aspecto monomorfo de la flora.
Buscar la presencia de bacilos Gram negativos en forma de “coma”
6. Sembrar el medio de transpote Cary-Blair.
7. Rotular e identificar el Cary Blair.
8. Enviar el Cary-Blair y el resultado al laboratorio INH de inmediato:

9. Entregar el resultado al médico solicitante.
10. Avisar y notificar al Epidemiólogo de su área.



Nota: en caso de recibir un hisopado fecal o rectal en lugar de la muestra entera, enriquecer 3-4 horas a temperatura ambiente en agua peptonada y procesar a partir del líquido superficial (1 cm) como lo indicado a partir del párrafo #5.

BUSQUEDA DE VIBRIO CHOLERAE

NIVEL 1

GRAM
Bacilos Gram (-)
Semejantes a una "coma"

Muestra entera o Hisopo

EXAMEN FRESCO
Motilidad semejante a
"vuelo de moscas"

Cary-Blair

0 Horas

NIVEL 2

Siembra directa y siembra
después de enriquecimiento durante 3h en APHA*

Colonias translúcidas
de bordes regulares de
2-3 mm de diámetro

Gelosa Alcalina

Colonias amarillas
brillantes, lisas de
2-3 mm de diámetro

T.C.B.S.**

18 Horas

OXIDASA +

BIOQUIMICA

En caso
de alerta

NIVEL 3

SEROLOGIA

36 Horas

Polivalente O:1

O:139

* A.P.H.A: Agua peptonada alcalina hipersalina
** T.C.B.S: Tiosulfato Citrato Bilis Sucrosa