

Procedimientos para la búsqueda de *Vibrio cholerae* en muestras ambientales 2010

Agradecimiento

Estos procedimientos fueron elaborados siguiendo un documento original del Laboratorio de Bromatología, Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social de El Salvador. La Organización Panamericana de la Salud agradece a esta institución la disponibilidad de los mismos.

FORMA DE TOMAR LAS MUESTRAS DE AGUA PARA DETERMINAR *VIBRIO CHOLERA*

El frasco de un litro contiene 100ml de solución peptonada salina a pH 8.8

- 1- Se tomaran muestras de aguas no tratadas, que se tiene la sospecha de haber sido contaminadas con residuos fecales con *Vibrio cholerae*.
- 2- Llenar el frasco hasta la línea haciendo un volumen de aproximadamente un litro, cuidad de no botar la solución peptonada.
- 3- Llenar el formulario de envío correctamente indicando la hora de toma de muestra, de ese momento se inicia el periodo de incubación, lo mismo se rotulará el frasco con lápiz que no se despinte.
- 4- Evitar que a las muestras les de el sol
- 5- Las muestras serán transportadas al laboratorio, no deben de pasar más de cuatro horas después de haberlas tomado.

Procedimientos para la búsqueda de *Vibrio cholerae* en muestras ambientales 2010

METODO DEL HISOPO DE MOORE PARA LA BUSQUEDA DE *V. CHOLERA*

Este método es útil para buscar *Vibrio cholerae* en aguas residuales (domiciliarias, hospitalarias, industriales, de puertos, aeropuertos, plantas de tratamiento de aguas residuales, terminales de buses, etc.) y de aguas superficiales de ríos.

- 1- Preparación del hisopo de Moore. Se corta un trozo de gasa de 90 cm. de ancho x 180 cm. de largo. La gasa se dobla 5 veces en sentido longitudinal obteniéndose las siguientes dimensiones: 30 cm. de ancho por 36 cm. de largo. A partir de la base de inferior de 30 cm. se cortan 6 tiras de 5 cm. de ancho y 26 cm. de largo dejándose 10 cm. en la parte superior sin cortar. En este sitio se amarra con una cinta de nylon o de otro material fuerte. Se coloca en papel kraft y se autoclava a 121 C durante 15 minutos.
- 2- En el lugar de recolección de la muestra, abrir el paquete que contiene el hisopo y atar una cinta de nylon (o de otro material fuerte) a la zona ligada del hisopo. Luego sumergir completamente el hisopo en el curso de agua que se va a muestrear y amarrar el extremo de la cinta en un lugar seguro. Controle que el hisopo quede bien sumergido. Procure colocar los hisopos en sitios seguros para evitar que personas ajenas lo retiren de su sitio.
- 3- Dejar el hisopo en el sitio a muestrear durante 24-48 horas.
- 4- Retirar el hisopo y colocarlo con cuidado en un frasco que contenga 300 ml de agua peptonada alcalina (APA, con pH 8.4 a 8.6). Evite que el agua residual tome contacto con la parte exterior del frasco. De ser posible use guantes. **En caso de que sus manos y el frasco se manche externamente desinfecte con agua e hipoclorito de calcio a 50 mg/l u otro desinfectante.**
- 5- Las muestras deben de ser identificadas y toda la información sobre las mismas deben de ser completada:
 - número de muestra,
 - fecha y hora de toma,
 - tipo de agua,
 - funcionario que tomó la muestra, para que los resultados puedan ser interpretados correctamente.
- 6- Registre en el frasco la fecha y hora de muestreo y remita inmediatamente sin refrigeración al laboratorio.
- 7- A su llegada al laboratorio incubar el frasco de agua peptonada alcalina durante 6 8 y 18 H a 35-37 C.

Procedimientos para la búsqueda de *Vibrio cholerae* en muestras ambientales 2010

- 8- A las 6 a 8 H efectuar el primer aislamiento en agar (Tibs) e en 24H. Reincubar el frasco de APA.
- 9- A las 18H efectuar un segundo aislamiento del caldo APA en –placas de TCBS.
- 10- En agar TCBS las colonias de *V. cholerae* aparecen amarillas (fermentadores de sacarosa) con bordes lisos.
- 11- Continuar con las colonias sospechosas efectuando pruebas bioquímicas y serológicas correspondiente a *V. cholerae*.

Procedimientos para la búsqueda de *Vibrio cholerae* en muestras ambientales 2010

METODO DE FILTRACION DE AGUA A TRAVES DE GASA PARA LA BUSQUEDA DE *V. CHOLERA*

Este método es de utilidad para la búsqueda del microorganismo en agua de mar, de pozos y en aguas estancadas. Permite la filtración de 10 litros de agua.

- 1- Se toman frascos plásticos (capacidad 1 litro) de boca ancha. Si realiza un orificio de 2 cm. de diámetro en la base del frasco. Se desinfecta el interior de los frascos y la tapadera sumergiéndolos 15 minutos en agua oxigenada al 3%. Luego se enjuaga el interior con agua destilada estéril. Dejar escurrir hasta secado.
- 2- Colocar, en forma aséptica, dentro de cada frasco un trozo de gasa estéril de aproximadamente 30 cm. de ancho X 2. de largo de manera tal que ocupe las 2/3 partes del volumen del frasco. –
Se coloca toda la unidad de filtración en una bolsa de primer uso y se cierra.
- 3- En el momento de tomar la muestra, retirar la unidad de filtración de la bola; luego retirar la tapadera del frasco a través de la gasa 10 litros de agua con la ayuda de un embudo.
- 4- Colocar, en forma aséptica, la gasa en un frasco que contenga 300 ml de agua peptonada alcalina (APA) (PH 8, 4-8,6).
- 5- Registrar el sitio de toma de la muestra, la fecha, la hora y el responsable.
- 6- Transportar la muestra al laboratorio lo mas rápidamente. Posible sin refrigeración.
- 7- A su llegada al laboratorio incubar el frasco de APA durante 6 a 8h y 18 Ha 35 C-37 C
- 8- A las 6 a 8 h efectuar el primer aislamiento en agar TCBS e incubar a 35 CX por 18-24 H. Reincubar el frasco de APA.
- 9- A las 18h efectuar un segundo aislamiento del caldo APA en placas de TCBS
- 10- En agar TCBS las colonias de *V. cholerae* aparecen Amarillas (fermentadoras de sacarosa) con bordes lisos.
- 11- Continuar con las colonias sospechosas efectuando pruebas bioquímicas y serológicas correspondientes a *V. cholerae*.