

ARQUIVO TECNICO

MANUAL DE MÉTODOS DE AISLAMIENTO
Y IDENTIFICACIÓN DE VIBRIO CHOLERA
EN AGUAS

0203
Sa55m(RCET)
023052



14184



023052

COMPANHIA DE TECNOLOGIA DE SANEAMENTO AMBIENTAL



CETESB

COMPANHIA DE TECNOLOGIA DE SANEAMENTO AMBIENTAL

CETESB - CIA. DE TECNOLOGIA DE SANEAMENTO AMBIENTAL

BIBLIOTECA

AV. PROF. FREDERICO HERMANN JR., 345 CEP 05489 PINHEIROS

SÃO PAULO - BRASIL

MANUAL DE MÉTODOS DE AISLAMIENTO
Y IDENTIFICACIÓN DE VIBRIO CHOLERA
EN AGUAS

GOVERNO DO ESTADO DE SÃO PAULO

Luiz Antonio Fleury Filho

Governador

SECRETARIA DO MEIO AMBIENTE

Alaôr Caffé Alves

Secretário

CETESB

Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental

Walter Lazzarini

Diretor-Presidente

Carlos Pedro Jens

Diretor de Pesquisa e Desenvolvimento de Tecnologia

Lineu Rodriguês Alonso

Diretor de Controle da Poluição de Regiões Metropolitanas

Luiz Antonio Ercolin

Diretor de Treinamento e Transferência de Tecnologia

Paulo Cêsar de Sousa

Diretor de Normas e Padrões Ambientais

Ricardo Augusto Grecco Teixeira

Diretor Administrativo e Financeiro

Walter Godoy dos Santos

Diretor de Controle da Poluição do Interior

INSTITUTO MEXICANO DE LA TECNOLOGIA DEL AGUA (IMTA)
COMPANHIA DE TECNOLOGIA DE SANEAMENTO AMBIENTAL (CETESB)
ORGANIZACIÓN PANAMERICANA DE LA SALUD (OPAS)



MANUAL DE MÉTODOS DE AISLAMIENTO Y IDENTIFICACIÓN
DE VIBRIO CHOLERA EN AGUAS

Dr^a Petra S. Sanchez
Divisão de Microbiologia
CETESB - São Paulo - Brasil

*Curso organizado por el Instituto
Mexicano de la Tecnologia del Agua,
bajo el patrocinio de la Organiza-
ción Panamericana de la Salud (OPAS)
23 a 27 de septiembre de 1991
México, D.F., México*

CONTENIDO

	Página
1 - Introdução.....	1
2 - Considerações sobre a sobrevivência del <u>V.cholerae</u> en aguas.....	4
3 - Definições.....	7
4 - Aplicação de la investigación de V.cholerae en muestras de aguas.....	9
5 - Toma de Muestras.....	10
5.1 - Planeamento de las actividades de mues- treo.....	10
5.2 - Técnicas de muestreo para investigación de <u>V.cholerae</u>	15
5.2.1. Técnica de Moore - Hisopo de gaza..	16
5.2.2. Toma de muestras líquidas.....	18
6 - Métodos de concentración de <u>V.cholerae</u>	20
6.1. Procedimiento através de la Técnica de Mem- brana Filtrante.....	20
6.2. Técnica de Moore Modificada.....	21
7 - Procedimiento de Aislamiento y Identificación de <u>V.cholerae</u>	22
7.1. Enriquecimiento y Aislamiento.....	22
7.2. Pruebas Serológicas.....	26
7.3. Diferenciación entre vibrios.....	27
7.4. Clasificación de Heiberg.....	32
7.5. Diferenciación bioquímica de las especies del género vibrio.....	32
Esquema del Procedimiento.....	34
8 - Método de Quantificación de <u>V.cholerae</u>	35

8.1. Procedimiento.....	35
8.2. Cálculo y expresión de los resultados.....	37
Esquema de Procedimiento (NMP).....	39
9 - Medios de Cultivo.....	41
10- Equipamientos y Materiales.....	62
11- Referencias Bibliográficas.....	68
12- Anexos Tablas nºs 5 a 11.	

MÉTODOS DE AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE VIBRIO CHOLERAE EN AGUAS.

Petra Sanchez Sanchez
CETESB - São Paulo
BRASIL

1. INTRODUCCIÓN

El cólera es una enfermedad intestinal bacteriana aguda y grave, causada por el Vibrio cholerae 01, biotipo Clásico (cholerae) ó El Tor, que generalmente ~~ocurre~~ en ciertos brotes explosivos, y que se caracteriza por una diarrea acuosa abundante, de color blanquecino, como "água de arroz", vómitos ocasionales, deshidratación rápida, acidosis, calambres musculares y colapso respiratório, pudiendo llevar al paciente a la muerte en un período de 4 a 48 horas (casos no tratados).

Los efectos son debidos a la acción de una exotoxina (enterotoxina), producida por el V.cholerae que actúa en las células epiteliales de la mucosa intestinal haciendo que la misma se torne extremadamente permeable, provocando pérdida de grandes cantidades de líquidos y electrolitos.

Debido a la gran pérdida de líquidos, la sangre se torna viscosa, perjudicando el funcionamiento de varios órganos vitales, y la acidosis es debida a la pérdida rápida de bicarbonato, y a la depleción de potasio. La susceptibilidad y la inmunidad al cólera es muy variable, siendo que la aclorhidria gástrica, favorece la sobrevivencia de los vibrios en el estómago.

Comunmente afecta más a la población adulta y a niños mayores, de 2 años.

Las infecciones asintomáticas y las formas benignas (diarreas discretas) son más comunes que los casos graves y estos casos son epidemiologicamente importantes para la permanencia del bacio en la comunidad y en el medio ambiente.

La persistencia de la enfermedad en zonas endémicas es facilitada por los individuos infectados que eliminan el vibrio durante una a dos semanas, por la elevada proporción de infecciones asintomáticas y corta inmunidad pos-infecciosa, lo que posibili

ta frecuentes reinfecciones.

Durante siglos, el cólera estaba limitado, de forma endémica a la región de los Rios Ganges y Brahmaputra de la India y Bengala y en el período de 1817 a 1923, ocurrió una expansión de esta enfermedad por casi todo el mundo, constatándose la ocurrencia de 6 pandemias distintas, que afectaron a Europa, Asia, Norte de África y América. En la sexta pandemia ocurrida entre 1899 y 1923, el cólera no logró alcanzar América, siendo Isla de Madera y Serbia el punto mas afectado.

La séptima pandemia de cólera que afecto alrededor de 98 países, se debe al Vibrio cholerae, biotipo El Tor, y tuvo su inicio en 1961 en Celebes, en Indonesia habiendo sido responsable por cerca de 1.140.000 casos de cólera durante el período de 1970 a 1989.

Sin embargo, durante la década de 1980 el número de casos de cólera relacionados habían disminuido anualmente y el número de países afectados triplicado. En enero de 1991 la séptima pandemia llegó a América Latina a través de una epidemia de cólera de gran magnitud que se inició en ciudades de la costa de Perú, causado por el biotipo El Tor, serotipo Inaba, siendo reportados después casos en varios países de América del Sur (Chile, Ecuador, Colombia, Brasil, etc.) siendo la primera vez en este siglo en que esta enfermedad afecta al Brazil.

La rápida propagación de la enfermedad, en varios países se debe principalmente a las características del biotipo El Tor (que causa muchos casos de infecciones asintomáticas y diarrea blanda) : falta de una vacuna eficaz, rápidos medios de transporte, turismo, flujo migratorio procedentes de áreas endémicas, malas condiciones de saneamiento y principalmente falta de agua potable.

El cólera es una enfermedad de transmisión hídrica y ocurre primariamente a través de la ingestión de agua contaminada y además por alimentos contaminados con heces o vómitos de individuos infectados, manipuladores asintomáticos de alimentos, contacto directo con heces del paciente, o a través de vectores (moscas y cucarachas).

Considerando que el medio principal de propagación del cólera es

el agua, en épocas probables de surgimiento de epidemias, el monitoreo y control de los principales cursos de aguas superficiales (ríos, represas, lagos, etc.) y aguas subterráneas (pozos, manantiales, etc.) debe ser aumentado y merecen cuidadosas investigaciones para asegurar su protección y la adopción de medidas preventivas para evitar la propagación de la enfermedad. Por lo tanto deberá darse prioridad a la aplicación de principios fundamentales del saneamiento relacionadas con la disposición de las heces humanas, la higiene y la seguridad de los alimentos, y garantizar el agua potable para la comunidad.

El reservorio natural del Vibrio cholerae 01, no es aún bien conocido. Sin embargo se asume que es el hombre, mas recientes evidencias han sugerido que el ambiente acuático puede ser el reservorio natural de las bacterias y estaría asociado a la presencia de quitina presente en los carapachos de varios animales marinos y plantas acuáticas.

Como las autoridades de Salud Pública de México, están preparándose para enfrentar la amenaza del Cólera en el país es considerado que la vigilancia de Vibrio cholerae en el medio acuático es de suma importancia para localizar y tomar medidas de emergencias para eliminar focos de contaminación y realizar rastreos del origen de la contaminación en regiones vulnerables (pues es reconocido el papel de las aguas como la principal fuente de diseminación del agente del cólera). Somos de opinion que los profesionales de los Laboratórios de Microbiología Ambiental deben estar adecuadamente entrenados para realizar el diagnóstico laboratorial del V. cholerae en muestras de aguas, pues los servicios de laboratorio son muy importante para la vigilancia epidemiológica del cólera.

2. CONSIDERACIONES SOBRE LA SOBREVIVENCIA DEL VIBRIO CHOLERAE EN AGUAS

Entre la familia Vibrionaceae, que representa el genero Vibrión, la especie de V. cholerae con los serotipos 01 y no 01, por su alta relevancia en Salud Pública, ha merecido un gran enfoque en el ambiente marino, habiendo varios autores relatado la sobrevivencia de esas bacterias por largos períodos, en el ambiente marino (tabla 1), contrariamente a lo que sucede con las bacterias indicadoras de contaminación fecal, el coliforme, que decae rápidamente en aguas saladas.

La sobrevivencia del Vibrio cholerae en el medio acuático es de gran interés epidemiológico, una vez que el agua constituye la fuente principal de diseminación del cólera y la posible estancia de este agente etiológico en el medio ambiente.

La viabilidad del vibrio en el medio acuático es directamente influenciada por el pH, temperatura, luz solar, presión osmótica, sales, materias orgánicas, presencia de bacterias, pudiendo sobrevivir varios días y semanas.

Los estudios realizados en el CETESB (1983/1984), en convenio con la OMS, en las aguas del Estado de São Paulo, demostraron que la sobrevivencia de V. cholerae en agua de mar fue alrededor de 6 a 26 días, en agua dulce de 6 a 19 días, y de 5 a 12 días en aguas residuales. Se comprobó también en este estudio, que en agua contaminada su sobrevivencia fue menor y las temperaturas de 10°C a 25°C fueron las más favorables.

Dependiendo del tipo de agua, su período de sobrevivencia puede ser mayor, existiendo datos en la literatura internacional que citan hasta 60 días.

Trabajos recientes han demostrado que el Vibrio cholerae parece ser una especie autóctona del ambiente estuarino, siendo también aislados de aguas superficiales no contaminadas con materiales fecales, o en áreas donde ninguna infección humana fue declarada. V. cholerae 01 (Inaba) y V. cholerae no 01 han sido aislados en la Bahía de Chesapeake y en la costa Lousiana (Golfo del México), siendo que algunos de esos cultivos fueron capaces de producir toxina.

El V. cholerae no 01 ha sido encontrado asociado al zooplanc-

ton en aguas de la citada Bahía y en aguas superficiales de Bangladesh (Colwell et al., 1980).

PERSINGAN, (1965), estudiando la sobrevivencia del Vibrio cholerae El Tor en alimentos y agua, observó que la sobrevivencia, en el agua de mar (in natura), fué de 10 a 13 días a temperatura ambiente y 58 a 60 días a temperatura de refrigeración y de 10 a 11 días, cuando fueron expuestos a la luz solar.

MIYAKI y colab. (1967), relataron estudios sobre la viabilidad del Vibrio cholerae O1 El Tor en diferentes ambientes y observaron que el pH, temperatura y presión osmótica eran los factores principales. La bacteria no soportaba pH 5,0 ó inferior. En condiciones óptimas de pH, la presión osmótica óptima fué de 250 mOSm a 700 mOSm. Presión superior a 1200 mOSm fué desfavorable para el crecimiento de los microorganismos.

SINGLETON y colab. (1982), estudiaron, en "microcosmos" preparados en laboratorio, la influencia de la salinidad en concentraciones de nutrientes orgánicos la sobrevivencia y el crecimiento de una cepa de V.cholerae O1 enteropatogénica aislada de un paciente de Louisiana.

El medio para la preparación de los "microcosmos" fué agua de mar sintética, con varias concentraciones de sales, enriquecida con diferentes concentraciones de triptona, como fuente de carbono y verificaron que la salinidad óptima para el crecimiento era de 25‰. En salinidades inferiores a ésta y superiores al 35‰, hubo una disminución significativa en el número de bacterias.

Observaron también que, en salinidades por encima ó por debajo del óptimo el requerimiento de materia orgánica, fué superior a 500 g/L como triptona.

Esos datos son coincidentes en relación a estudios realizados nuevamente por **SINGLETON** y colab. (1982a), estudiando los efectos de temperatura y salinidad en el crecimiento de V.cholerae O1 aislados del medio ambiente y de material clínico. Los autores concluyeron que el V.cholerae tiene preferencia por salinidades moderadas entre 15‰ y 25‰, y pueden sobrevivir en bajas condiciones de temperatura y nutrición y serían autóctonas de aguas saladas y salobres.

COLWELL y colab. (1977) relataron el aislamiento del V.cholerae no 01 en varias partes de la Bahía de Chesapeake. La concentración de los vibriones aislados fué de más de 7/litros y el aislamiento fué hecho en lugares con salinidad entre 0,4 e 1,7‰. No hubo ninguna correlación entre V.cholerae y otras bacterias, coliformes, coliformes fecales ó salmonelas y en el sedimento u otros. En 1980, COLWELL aisló más de 46 vibriones/litro con salinidad de 0,3 a 1,7‰ y temperaturas de 28°C. Ya que la presencia de V.cholerae no está relacionada con contaminación fecal, se cree que V.cholerae sea una especie autóctona en ecosistemas estuarinos. La mayoría de las cepas aisladas de agua de mar, se ha demostrado que no son patógenas ni tóxicas. Algunas cepas de V.cholerae 01 y V.cholerae no 01 aisladas en la Bahía de Chesapeake mostraron evidencia de producción de toxina, por tanto, más estudios deben ser realizados para un mejor esclarecimiento del problema. En las tablas correspondientes (5 a 10), se resumen el tiempo de supervivencia del V. cholerae en diferentes tipos de alimentos, y la tabla 11 en superficies.

3. DEFINICIONES

Epidemiología: Es el estudio de las condiciones de salud y de la ocurrencia de las enfermedades en las poblaciones buscando la interrelación de las causas que las determinan. De una forma general es la ciencia de como ocurre la enfermedad.

Endemia: Término usado para definir la incidencia de una enfermedad en una colectividad dentro de los límites habituales explicables por la acción casual de dos factores que favorecen o desfavorecen su ocurrencia. En otras palabras es la ocurrencia habitual de una enfermedad o de un agente infeccioso en determinada área geográfica.

Epidemia: Término usado para definir la ocurrencia de una enfermedad en una población en el número de casos que sobrepasa la incidencia esperada por las variaciones casuales. Cuando una área geográfica es restringida y el número de personas es pequeño, el término que se acostumbra a usar es surto.

Pandemia - (gr. pan:todo; demos: población): término usado para definir una epidemia que atinge gran número de personas en una vasta área geográfica (uno o más continentes).

Vibrio cholerae: Bacilos gram-negativos, ligeramente curvos con aproximadamente 0,5 a 0,8 μm de diámetro por 1,4 a 2,6 μm de longitud. Son aerobios o anaerobios facultativos, móviles por un flagelo polar, no producen H_2S y son oxidasa positivos. Fermentan la glucosa, sacarosa, manitol y maltosa sin producción de gas. Decarboxilan la lisina y ornitina y son arginina dihidrolasa negativa. Reducen nitrato a nitrito, producen gelatinasa, quitinasa e indol, crecen a 40°C y toleran la alcalinidad elevada (pH 9,2). No utilizan inositol, salicina, D-sorbitol, L-alanina, L-tirosina y putrescina y son sensibles al agente vibriostático O_{129} . No requieren el ión Na^+ para el crecimiento, mas son capaces de crecer en concentraciones de hasta 3% de NaCl. Según Smith (1979) el Vibrio cholerae puede ser subdividido en 72 serogrupos basado en las características serológicas del antígeno O, siendo el serogrupo O1 el responsable del cólera. El Vibrio cholerae O1 incluye los serotipos Ogawa e Inaba (y Hikojima) y puede ser dividido en biotipo Clásico (o Cholerae) y El Tor. La diferenciación de

los dos biotipos es basada en las pruebas de hemólisis de eritrocitos de carnero, hamaglutinación de eritrocitos de gallina, fermentación butilen-glucólica (VP), sensibilidad de la polimixina B (50V) y bacteriófagos específicos.

Cólera: Infección intestinal bacteriana aguda, que se caracteriza por el inicio brusco, diarrea abundante acuosa, de color blanquecino tipo agua de arroz, con olor a pescado, sin moco o sangre. En los casos típicos ocurren gran pérdida de agua y electrolitos, vómitos, rápidas deshidratación, acidosis, calambres musculares y colapso respiratorio. En casos graves el individuo puede perder en la diarrea de 1 a 2 litros de agua por hora, y la letalidad es elevada (50% o más) en los casos no tratados. En pacientes tratados es inferior al 1% . El período de incubación va de pocas horas a 5 días (generalmente de 1 a 3 días). La fiebre es baja y a veces puede no ocurrir. Son múltiples como manifestaciones comunes la gran deshidratación con disturbios metabólicos e hidroelectrolíticos (sed intensa, rápida pérdida de peso, pérdida de turgencia de la piel, los dedos se tornan arrugados y secos (manos de lavandera), ojos hundidos, postración y mirada vaga y perdida y voz débil.

La sintomatología del cólera es variable pudiendose verificar casos de cólera leves, clínicamente similares a otros tipos de diarreas y casos asintomáticos.

4. APLICACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN DE V.CHOLERA EN MUESTRAS DE AGUAS.

Una investigación de V.cholerae en muestras de aguas puede generar información que se aplica a diferentes finalidades específicas:

- . evaluar la calidad de cuerpos de aguas receptores de desechos industriales, domésticos y hospitalarios.
- . evaluar la eficiencia de procesos de tratamiento de agua de desechos y lixiviación de residuos sólidos a la remoción de este patógeno.
- . evaluar las posibles fuentes contaminantes y riesgos de contaminación por V.cholerae en caso de aguas utilizadas para fines recreativos, incluso aguas marinas.
- . evaluar la calidad de agua destinada a irrigación de hortalizas y plantas frutícolas, y la acuicultura de especies destinadas a la alimentación humana.
- . Localizar los focos de contaminación de Vibrio cholerae, especialmente en puntos críticos de entrada del agente, tales como puertos, aeropuertos, estaciones ferroviarias y de ómnibus, y otros.
- . Obtener datos más completos sobre determinadas fuentes de contaminación en áreas específicas y relacionar con las investigaciones epidemiológicas.

5. TOMA DE MUESTRAS

La toma de las muestras puede parecer una tarea relativamente simple, mas no es sólo introducir un garrafón en el agua para retirar una muestra, es necesario obtener una muestra representativa y estable del cuerpo de agua muestreado y de las condiciones locales que pueden interferir, tanto en la interpretación de los datos como en las propias determinaciones en el laboratorio. Así, para asegurar la representatividad y confiabilidad de las muestras y subsidiar la elaboración de informes sobre la calidad del agua, es indispensable la participación de técnicos adecuadamente entrenados y motivados. Estos técnicos precisan observar y anotar cualquiera de los fallos o anomalías que pueden interferir en las características de la muestra (color, olor, un aspecto extraño , presencia de algas, aceites, colorantes, material sobrenadante, peces y otros animales acuáticos). Deben todavía tener condiciones para establecer puntos de muestreo alternativos y otros parámetros complementarios para la caracterización de las aguas.

5.1 - Planeamiento de las Actividades de Muestreo

El planeamiento correcto de las actividades de campo es de importancia fundamental para el éxito de los trabajos y debe involucrar los siguientes aspectos:

- . Selección de rutas adecuadas, observándose los accesos y tiempo para la toma y conservación de las muestras en el plazo para el envío de las mismas a los laboratorios (obedeciendo a la validez y estabilidad de las mismas, y la capacidad y horario de atención de los laboratorios). Muchos programas necesitan de varios días para ser desarrollados, lo que exige remitir las muestras tomadas diariamente a los laboratorios por despachos a través de transporte por auto o aéreo, en estos casos debe planificarse las tomas calculando la localización y los horarios de los transportes.
- . Verificación de la existencia de características casuales en los puntos de muestreo que exigen equipos y cuidados especiales y que permitirá la adecuada selección y preparación. Esto es válido especialmente para el caso de muestreos en barcos, muestra

de sedimentos y peces y muestra en locales de acceso difícil, o con un alto riesgo de accidentes (ríos caudalosos, océanos, puentes de intenso tráfico, muestreo en industrias, etc.).

- . Preparación del listado conteniendo el tipo y la calidad de los equipos y materiales necesarios para los trabajos (frascos para el almacenamiento de las muestras, cajas para embalajes, frascos de colecta, cuerdas, barcos, motores, preservantes químicos, fechas de colecta, equipo de seguridad, etc.). Se recomienda preparar una lista para evitar la falta de alguno de ellos. Es conveniente llevar algunos frascos sobrantes para el caso de ser detectada alguna anormalidad que sea necesario una muestra adicional, o la pérdida de algun frasco.
- . Verificar la disponibilidad y funcionamiento adecuado del material necesario para la colecta y el envío de la programación de la toma de muestra y demanda de análisis a los laboratorios y certificación de que puedan atender al programa.

Sin embargo, parece obvio, pero es conveniente asegurarse que el personal involucrado en la toma de muestra deba ser debidamente entrenado en las técnicas específicas de muestreo y preservación de las muestras, medidas de seguridad, manejo de los equipos de campo y conocimiento de la localización exacta de los puntos de la toma. Un muestreador bien entrenado, consciente y observador es de importancia fundamental para el cumplimiento de los objetivos de los programas de caracterización de las aguas.

Recomendaciones Generales

La técnica adoptada para la toma de las muestras depende de la materia que va a ser muestreada (agua superficial, subterránea, de grifo, residual, sedimento del fondo, biota acuática) el tipo de muestra (muestra simple o compuesta) y también la naturaleza del examen a ser solicitado (análisis físico-químicos, microbiológicos, biológicos y radiológicos). Además, independiente de esas características los siguientes cuidados deben ser tomados:

- . para reducir la contaminación de la muestra conviene tomar la misma con la boca del frasco de muestreo contra la corriente.
- . tomar volumen suficiente de muestra para necesidades eventuales de ser repetido algun análisis en el laboratorio.

- .hacer todas las determinaciones de campo en alícuotas de muestras separadas de las que serán enviadas al laboratorio evitándose así el riesgo de contaminación.
- . verificar, también, la limpieza de los frascos y demás materiales de muestreo (balde, garrafones, pipetas, etc.).
- . la parte interna de los frascos y del material de muestreo, así como los batoques y tapas no pueden ser tocados con la mano, o quedar expuesto al polvo, humo y otras impurezas (gasolina, aceite y humo de combustión de vehículos pueden ser grandes fuentes de contaminación de las muestras). Cenizas e humo de cigarro pueden contaminar fuertemente las muestras con metales pesados y fosfatos, entre otras sustancias. Se recomienda por tanto que los muestreadores mantengan las manos limpias, o usen guantes plásticos y no fumen durante la toma de las muestras.
- . inmediatamente después de la toma de muestra y conservación colocar las mismas al abrigo de la luz solar, preferiblemente en cajas de isopor con hielo.
- . mantener el registro de todas las informaciones de campo, presentando una ficha de colecta por muestra, o un conjunto de muestras con la misma característica, conteniendo los siguientes datos:
 - número de identificación de la muestra;
 - identificación del punto de muestreo y su localización (profundidad);
 - fecha y hora de la toma de muestra;
 - tipo de muestra (efluente industrial, agua de río, mar, potable, etc.);
 - medidas de campo (temperatura ambiente/agua, pH, conductividad, etc.);
 - observaciones eventuales de campo;
 - condiciones meteorológicas de las últimas 24 horas que pudieran interferir en la calidad del agua (lluvias);
 - indicaciones de los parámetros a ser analizados en el laboratorio;
 - nombre del muestreador;
 - nombre del programa y del coordinador, con teléfono para su contacto.

Seguridad en los trabajos de campo

Los trabajos de campo se realizan en condiciones y locales muy variados, estos factores unidos a la toma de muestras propiamente dichas, ofrecen riesgos de accidentes. Para que esos riesgos puedan ser reducidos, se debe alertar y entrenar los técnicos involucrados, agenciando, además, los equipos de protección adecuados. Seguidamente están las actividades y sustancias que ofrecen mayores riesgos de accidentes y las recomendaciones para su reducción.

Transporte automotor

El desplazamiento del técnico y el equipo al lugar de la toma de muestras puede ofrecer riesgos. No son los inherentes al desplazamiento propiamente dicho, como los materiales que son transportados tales como barco, equipos especiales, frascos de vidrio y reactivos que preservan las muestras. Se recomienda almacenar adecuadamente los materiales, preferiblemente en los maleteros o en cajas adecuadas.

No se recomienda llevar materiales junto a los pasajeros, o cuando el vehículo ya tiene su capacidad máxima de peso y volúmen. Es importante el uso del cinto de seguridad mismo en los trayectos cortos. Los frascos de vidrio principalmente aquellos que son usados para condicionar los reactivos de conservación, precisan ser evitados, utilizándose preferiblemente frascos plásticos con tapas de rosca que impidan derramamientos, deben estar calzados y protegidos adecuadamente para que no se rompan durante el transporte.

Localización de los puntos de muestreo

Los lugares de difícil acceso y próximos a puentes, carreteras con movimiento y lugares de tráfico intenso de máquinas, etc., pueden provocar accidentes, muchas veces evitables. Un puente por ejemplo, puede construirse en un camino más fácil para alcanzarse en el medio de un río y retirar la muestra, por otro lado en su mayoría esos lugares son con mucho movi-

miento, hay estrechamiento de pista y pequeña faja de seguridad para caminantes, lo que dificulta la parada del carro de muestreo y ofrece riesgos a los técnicos que ejecutan la toma de muestras. El muestreo en puentes debe ser precedida de la colocación de un dispositivo de señalización adecuado que proporcione la protección contra vehículos en tránsito.

El acceso a los puntos de muestreo de ríos, reservorios, pozos y manantiales, muchas veces, a través de caminos o picadas, en regiones con mucha vegetación, ofrece riesgos de mordeduras de insectos y cobras u otros animales.

Utilización de embarcaciones

La utilización de embarcaciones para la toma de muestras marinas es muy frecuente. La verificación de las condiciones generales de las embarcaciones, de la carreta y de sus accesorios es importante para evitar los atrasos y accidentes durante los trabajos. Deben ser verificadas las condiciones de funcionamiento del motor de popa, del tanque y manguera de combustible, de las baterías, tapones, señalización nocturna del barco y carreta, más de accesorios indispensables como remos, chaleco salva-vidas en número suficiente para toda la tripulación, ancla, extintor de incendio, cuerdas, rueda extra para la carreta y pesas de mantenimiento básico (pinos, velas, caja de herramientas, aceite para barco, etc). La documentación del barco y de la carreta deberá estar actualizada, en caso de revisión por las autoridades del tránsito, así como la habilitación náutica de los operadores de las embarcaciones.

Cuando las embarcaciones necesitan operar lejos de la costa o de la base de operaciones se aconseja obtener informaciones previas sobre las condiciones meteorológicas de la región, principalmente en el caso de viajes de larga duración.

Aguas Tratadas - preparación de los frascos de muestreo

Para la toma de muestras de aguas tratadas, se debe adicionar el frasco de muestreo, antes de su esterilización, 0,1 mL de una solución de 1,8% de tiosulfato de sodio para cada 100 mL de muestra, para neutralizar la acción del cloro residual. Esa cantidad de tiosulfato de sodio es suficiente para neutralizar concentraciones de hasta 15 mg/L de cloro residual.

Aguas Residuales con Metales - preparación de frasco de muestreo

Para la colecta de muestras de aguas poluídas (aguas residuales y cloacales) sospechosas de contener concentraciones superiores a 0,1 mg/L de metales pesados, tales como cobre, zinc, etc., se debe adicionar al frasco de muestreo antes de su utilización, 0,3 mL de una solución al 15% de EDTA, para cada 100 mL de muestra, además de tiosulfato de sodio (volúmenes de 0,1 mL de una solución al 10% para cada 100 mL de muestra). Una solución de EDTA puede ser adicionada al frasco de muestreo separadamente o ya combinada con la solución de tiosulfato de sodio antes de la autoclavación. El EDTA actúa como agente quelante, reduciendo la acción tóxica de metales, presentando una acción más amplia que el tiosulfato de sodio, el cual, en la concentración empleada, previene la acción bacteriana.

5.2 - TÉCNICAS DE MUESTREO PARA INVESTIGACIÓN DE V. CHOLERA

Las localizaciones de la toma de muestra deben ser establecidas en los puntos de las redes colectoras de aguas residuales, estaciones de tratamiento, y puntos y registros de residuales, que reciben desechos de partes representativas de la población, y las posibles vías de entrada del Vibrio cholerae, sobre todo puertos, aeropuertos, así como estaciones ferroviarias y de ómnibus; las corrientes y ríos, que reciben grandes cantidades de desechos domésticos y también el agua de abastecimiento, principalmente cuando hay sospecha de una contaminación que puede llevar a un brote epidémico.

Básicamente las muestras para investigación de Vibrio cholerae, pueden ser obtenidas de dos formas distintas, una de las cuales consiste en la toma de una porción líquida en cuanto a la otra, en la colocación de un hisopo de gaza en un local establecido, durante determinado intervalo de tiempo y retirada de él posteriormente.

5.2.1 - Toma de Muestra por la Técnica de MOORE modificada - Hisopo de gaza (Procedimiento)

La Técnica de Moore ha sido ampliamente utilizada para la investigación de Vibrio cholerae en muestras de residuales y aguas superficiales. La principal ventaja de este método consiste en la constante vigilancia del líquido a ser estudiado, ya que a medida en que se retira la mecha, se instala otra. Por otro lado, las muestras puntuales en que obtienen porciones de líquido permiten espacios vacíos entre una toma de muestra y otra, habiendo, de esta manera, una probabilidad menor de poder ser aislado el vibrión.

a) Preparación de la mecha

Usar atadura de crepé o gaza esterilizada. La atadura es doblada 5 veces en el sentido y sus dimensiones finales serán de 23 cm de largo x 36 cm de ancho. A partir de una base inferior de 23 cm, cortar 5 tiras de 4,5 cm de largo y 26 cm de ancho dejándose, por tanto, 10 cm en la parte superior sin cortar, donde será fijado el hilo de nylon (3m) para servir de soporte a la mecha. Envolver el papel "Kraft" y autoclavear a 121°C durante 15 minutos (Figura 1 y 2).

b) Colocación de la mecha

La mecha deberá ser instalada en los puntos de muestreo de forma que quede inmersa en el agua cloacal y el hilo de nylon que de firmemente atado en una estructura fija en el punto de muestreo.

c) Retirada de la mecha

Retirar la mecha en el período determinado (de 3 a 4 días), tomando las medidas de seguridad necesarias. Para ello proceder de la siguiente forma:

. identificar las muestras, anotando correctamente la fecha

- de la toma de muestra: número de muestra, fecha, local, lluvias, etc.;
- . retirar la mecha e introducirla en el recipiente de muestreo (saco plástico o frasco), conteniendo 300 mL del medio de transporte Cary&Blair (Fórmula y preparación ítem 8.3, pág.).
 - . cerrar el saco plástico o el recipiente de muestreo y acondicionar en caja apropiada para el transporte.

Observación: La persona indicada para la ejecución de ésta tarea deberá ser debidamente enterada y adecuadamente protegida de modo de evitar problema de contaminación. El uso de guantes, máscaras y botas debe ser obligatorio. Después de la toma de muestra retirar los guantes y colocar en solución desinfectante. Cuando se vaya a retapar un frasco o cerrar el plástico, no tocar con guantes sucios pues el material es altamente contaminado y puede causar riesgos a la salud del muestreador y al técnico de laboratorio durante la manipulación de la muestra.

d) Transporte y conservación de la muestra (mecha de gaza)

Las muestras colectados y transportadas en medio de Cary & Blair no necesitan de refrigeración, mientras que para municipios distantes donde el transporte es automotor, se recomienda refrigerar la caja de transporte para mantener una temperatura aproximada de 10°C a 20°C.

Las muestras conservada en medio de Cary&Blair deben ser procesadas preferencialmente dentro de un período de 24 a 72 horas después de la toma, salvo en condiciones y situaciones especiales.

e) Cuidados de seguridad

- a) Usar, para transporte dos sacos plásticos conteniendo las mechas cajas con tapa de material adecuado posible de ser autoclavado y sometido a un proceso de desinfección adecuado en el laboratorio.
- b) Después de colocado las mechas en sacos plásticos, colocarlas individualmente dentro de otro saco plástico autoclavado.

- c) Después del uso, la bata de mangas largas debe ser auto-clavado antes de ser llevada para lavar.

Obs.: Las batas utilizadas para el muestreo deben ser guardadas en armarios separados de pertenencias de uso personal.

- d) Durante la colocación de las mechas en los sacos plásticos si ocurren salpicaduras de residual en la ropa de protección del muestreador, usar un desinfectante adecuado (hipoclorito de sodio al 2% o similar).
- e) Después del muestreo, retirar la ropa de protección y colocarla en el saco plástico para posterior desinfección en el laboratorio.
- f) Después de quitarse los guantes, lavar y desinfectar las manos con un desinfectante adecuado.
- g) Antes de quitarse los guantes contaminados, después del manejo de la mecha, el muestreador no debe tocarse otras partes del cuerpo.

f) Materiales de seguridad necesarios

- a) Capucha con visor plástico, de tejido adecuado, descartable, para la protección de la cara de las salpicaduras de agua, en el momento de la retirada de la mecha y colocación en el saco plástico con el medio de transporte.
- b) Batas de mangas largas, de tejido de algodón o similar sobre el cual es colocado un delantal de tejido adecuado, descartable, longitud hasta abajo de las rodillas para protección de la parte anterior del cuerpo.
- c) Guantes descartables de tramo largo con elástico.
- d) Zapatillas descartables, o botas se necesario.

5.2.2 - Toma de Muestras Líquidas

La toma de muestras de agua debe ser realizada según Guía de Muestreo y Conservación de las muestras de agua (CETESB/SEMA-1988), considerando que para las muestras de agua dulce debe ser adicionado dos cucharaditas de té de cloruro de sodio (aproximadamente 10 g) por litro de muestra (concentración final de 1% de NaCl). La adición de cloruro de sodio proporcionará una mayor viabilidad de las células de V.cholerae.

Transporte y Conservación

Después del muestreo, las muestras de agua deben ser enviadas al laboratorio lo más rápido posible. El tiempo ideal entre el muestreo y el inicio de la prueba es de 6 a 8 horas, considerándose que el tiempo límite no debe exceder de 24 horas. Para las muestras que no pueden ser entregadas en el laboratorio dentro del período de 8 horas transcurridas entre la toma de muestra y el inicio de la prueba, se debe ajustar el pH a 9,0-9,2 con hidróxido de sodio 1N (NaOH) y adicionar telurito de potasio en una concentración final de 1:200.000 (0,005 g de telurito de potasio por litro de muestra). La finalidad de la adición de telurito es inhibir el desarrollo de otras bacterias que puedan interferir la detección de V.cholerae. Transportar en refrigeración (4 a 10°C).

Volumen de la Muestra

El volumen de la muestra para la pesquisa de V.cholerae debe ser concentrado, dependiendo del tipo y característica del agua a ser analizada, mientras tanto un volumen mínimo es recomendado:

Agua residual o cloacal.....	100 mL
Agua superficial.....	5 L
Agua de consumo humano.....	10 L

6. MÉTODOS DE CONCENTRACIÓN DE VIBRIO CHOLERAE

Los vibrios son excretados por las heces de pacientes infectados en gran número (10^8 - 10^9 bacterias/gramo de heces), entretanto ellas se diluyen en varios tipos de aguas, existiendo por tanto la necesidad de usar técnicas de concentración para obtener éxito en el aislamiento. Ese procedimiento es reforzado si consideramos los individuos asintomáticos y convalescientes que excretan los vibriones, en cantidades reducidas (10^2 - 10^3 bacterias/gramo de heces) y de forma intermitente, siendo necesario analizar grandes volúmenes de agua para la detección de Vibrio cholerae.

La concentración de Vibrio cholerae en muestras ambientales puede ser obtenida por diversas metodologías tales como: tierra de diatomáceas adsorción en hidróxido de aluminio, membrana filtrante, centrifugación, Técnica de MOORE, etc., y la selección del método adecuado va a depender del tipo de muestra a ser analizada y de la capacidad analítica del laboratorio.

Las técnicas más comúnmente utilizadas para el análisis del Vibrio cholerae son la técnica de membrana filtrante y la Técnica de MOORE modificada.

El método de concentración que utiliza la membrana filtrante tiene la ventaja de poder procesar grandes volúmenes de agua, principalmente para aguas con baja turbidez, aumentando la probabilidad de aislamiento del Vibrio. Por otro lado, la Técnica de MOORE, permite una vigilancia constante de la muestra, no existiendo espacios vacíos entre un muestreo y otro.

6.1 - Procedimiento através de la Técnica de Membrana Filtrante

Colocar sobre la meseta de trabajo el material necesario en la ejecución del análisis a saber:

- a) Frascos de presión, conectando la bomba de presión positiva;
- b) Porta filtro de 142 mm ó 293 mm de diámetro, previamente esterilizado y conectado al frasco de presión;

- c) Filtro de membrana estériles con 142 mm ó 293 mm de diámetro y 0,45 μ m de porosidad;
- d) Un erlenmeyer de 250 mL, conteniendo 100 mL de agua peptonada alcalina de doble concentración;
- e) Pinza y tenaza con las extremidades sumergidas en alcohol;
- f) Mechero de Bunsen.

Preparación del porta filtro

- a) Retirar la parte superior del porta-filtro y con una pinza flameada y enfriada, colocar una membrana filtrante estéril centralizándola sobre la parte inferior del porta-filtro;
- b) Acoplar la parte superior del porta-filtro, teniendo el cuidado para no dañar la membrana;

Filtración de la muestra

- a) Homogenizar la muestra y verter cuidadosamente el volumen que va a ser examinado en el frasco de presión (previamente descontaminado);
- b) Cerrar el frasco de presión, conectar una bomba de presión positiva y proceder a la filtración a una presión de 147,1 kPa;
- c) Desconectar la bomba al finalizar la operación. Abrir la válvula de seguridad del frasco de presión y del porta-filtro;
- d) Retirar la parte superior del porta-filtro, teniendo el cuidado para no dañar la membrana y transferir la membrana para 100 mL de agua peptonada alcalina de doble concentración (APA) e incubar a 35°C - 37°C, durante 6 a 8 horas.

6.2 - Técnica de MOORE modificada (ver item 5.2.1)

7. PROCEDIMIENTO DE AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE VIBRIO CHOLERAE

Antes de iniciar el trabajo, desinfectar la meseta del laboratorio, usando desinfectantes que no dejen residuos.

Colocar sobre la meseta el siguiente material:

- . Frascos y sacos plásticos del muestreo, conteniendo la muestra que va a ser analizada;
- . Erlenmeyers conteniendo agua peptonada alcalina de doble concentración, previamente identificados con el número de la muestra;
- . Asa de inoculación, mecheros de Bunsen, Placas de Petri conteniendo medio agar de TCBS, máscaras quirúrgicas y pipetas de 10 mL estériles.

Nota: Colocar máscara quirúrgica y guantes durante la manipulación de los sacos plásticos con la muestra de desecho.

7.1 - Enriquecimiento y Aislamiento

a) Procedimiento

- 1) Procedimiento con la muestra obtenida a través de la Técnica de MOORE.

Abrir cuidadosamente el saco plástico externo conteniendo la muestra. Con auxilio de una pipeta estéril unida a un pipeteador de seguridad ó pera de goma, perforar el saco interno, homogenizar bien la muestra y transferir 10 mL para un erlenmeyer de 125 mL, conteniendo 10 mL de agua peptonada alcalina (APA) de doble concentración. Incubar a 35°C - 37°C, durante 6 a 12 horas.

- 2) Procedimiento con la muestra obtenida a través de la técnica de membrana filtrante.

Transferir la membrana conteniendo la muestra para un erlenmeyer conteniendo 100 mL de agua peptonada alcalina (APA) de doble concentración. Incubar a 35°C - 37°C, durante 6 a 12 horas.

- 3) Procedimiento para la incubación directa

- . Inocular 900 mL de la muestra de agua en 100 mL de agua peptonada alcalina (APA) 10 veces concentrada ó 450 mL de

- agua en 50 mL de APA 10 veces concentrada. Incubar a 35°C - 37°C , durante 6 a 12 horas.
- . Después del período de incubación, retirar cuidadosamente el erlenmeyer de la incubadora, evitando la agitación.
 - . Con auxilio de un asa de inoculación debidamente flameada y enfriada, coger el material de la superficie del medio de enriquecimiento (APA) y sembrar en dos placas de agar TCBS conforme lo descrito abajo:
 - Depositar el inóculo en un punto de los bordes de la placa conteniendo el medio selectivo y diferencial TCBS, girar la placa e iniciar el esparcimiento del inóculo en la superficie del primer cuadrante, teniendo cuidado para que la parte curvada del asa toque apenas la superficie del medio evitando dañar el agar;
 - Girar nuevamente la placa, flamear el asa de inoculación, enfriar y continuar el esparcimiento en el 2º cuadrante a partir del inóculo del 1º cuadrante;
 - Proceder de esta manera hasta completar la siembra en toda la superficie del agar, con la finalidad de obtener aislamiento completo en el 4º cuadrante;
 - Cerrar e incubar las placas en posición invertida, a 35°C - 37°C durante 18 - 24 horas.
 - . Paralelamente a la siembra en las placas y con auxilio de una pipeta estéril unida a una pera de goma ó de un pipeteador de seguridad, transferir 1 a 2 mL del material de la superficie del medio de cultivo para 2 tubos de ensayo, conteniendo 10 mL de agua peptonada alcalina (APA) de simple concentración (2º enriquecimiento);
 - . Incubar los tubos de ensayo (APA) inoculado a 35°C - 37°C , durante 6 a 12 horas;
 - . A partir del crecimiento superficial del 2º enriquecimiento en APA sin agitar los tubos, inocular 2 placas de agar TCBS segun el item 6.1;
 - . Con todos los cuidados de asepsia y utilizando un asa de inoculación debidamente flameada y enfriada, seleccionar del agar TCBS, 10 colonias típica de V.cholerae amarillas(sacarosa positiva), con halo brillantes y convexas; y transferir para al medio de Rugai Lisina Motilidad (IAL) medio de "Kligler Iron Agar" ó TSI. La ino-

culación de los medios de selección es hecha por punción a profundidad y estrías en la superficie inclinada, y la incubación es realizada a 35°C - 37°C, durante 18 - 24 horas;

- . Después del período determinado de la incubación efectuar la lectura de los resultados;

Resultado en los medios de descarte:

sacarosa	+
glucosa	+ (ácido sin gas)
LDC	+ (lisina decarboxilasa)
Motilidad	+
H ₂ S	-
Indol	+ (86 %)
Lactosa	-
LTD	- (L-triptofano desaminasa)
Ureasa	-

- . Lectura de las características bioquímica del V.cholerae en el medio " Kligler Iron Agar ":

- . Ápice

- lactosa negativa: evidenciada por la coloración rosa en el ápice del medio;

- . Base

- glucosa positiva: evidenciada por la coloración amarilla en la base del medio;
- gas negativo: ausencia de burbujas en el medio;
- sulfuro de hidrógeno negativo: ausencia de la coloración negra en el medio;

- . Tapón de algodón con reactivo de indol

- indol positivo: coloración roja ó rosa en el tapón

- . Lectura de las características bioquímicas del V.cholerae en el medio IAL:

- . Fase inferior

- Motilidad positiva: crecimiento difuso a partir de la punción;
- Lisina-descarboxilasa positiva: color violeta (en las

Lisina-descarboxilasa positiva: color violeta (en las primeras horas de incubación el medio adquiere coloración amarilla, más después del período total previsto para la incubación el medio readquiere el color violeta inicial).

Fase superior: (superficie y profundidad)

- triptofano desaminasa negativa: no se verifica el color casta
ño en la superficie inclinada;
- sacarosa positiva: coloración amarilla en la superficie de la fase superior (ápice);
- glucosa positiva: evidenciada por la coloración amarilla en la profundidad de la fase superior;
- gas negativo: ausencia de burbujas en la profundidad y fase su
perior;
- sulfuro de hidrógeno (H_2S) negativo: ausencia de la coloración negra en el medio.

Tapón de algodón con reactivo de indol:

- indol positivo: coloración roja ó rosa.

- 1) Realizar la prueba de oxidasa apenas con los cultivos que presentasen reacciones características de V. cholerae en el medio de IAL y Kligler Iron Agar y descartar los tubos restantes.

Nota: La prueba de la oxidasa no debe ser realizada directamente del medio IAL siendo necesario repicar los cultivos previamente para el agar de conservación ó agar gelatina con 1% NaCl.

- m) Prueba de la oxidasa: con un asa de inoculación de platino, debidamente flameada y enfriada, retirar del medio de Kligler ó preferiblemente del agar de conservación ó agar gela
tina con 1% NaCl un pequeño inóculo del cultivo de 18-24 ho-

ras y tocar el filtro embebido en solución de clorhidrato de N, N, N, N' tetrametil-p-fenilendíamina al 1% la reacción positiva es evidenciada por el desarrollo de una coloración púrpura intensa en aproximadamente 30 segundos si ninguna reacción discreta se desarrolla en el período de dos minutos de observación se considera la prueba como negativa.

- n) Proseguir con los cultivos que presentaron reacción de oxidasa positiva y descartar los restantes. Repicar las colonias oxidasa positivas para el agar de conservación ó agar gelatina 1% NaCl y realizar las pruebas serológicas a partir del medio de Kligler Iron Agar ó IAL.

7.2 - Pruebas Serológicas

Para realizar la prueba de sueroaglutinación polivalente con antisuero 01 proceder como se describe abajo:

- a) Introducir en cada tubo de Kligler ó IAL con un cultivo en prueba, una pequeña cantidad de algodón hidrófilo. Para seguir utilizando una pipeta Pasteur, adicionar a los tubos cerca de 5 gotas de solución fisiológica.
- b) Con la punta de la pipeta Pasteur, pasar suavemente el algodón en la superficie del medio de cultivo desprendiendo el crecimiento bacteriano y obteniendo una suspensión densa del cultivo en la solución fisiológica.
- c) Con ayuda de la pipeta Pasteur, escoger un inóculo de la suspensión del cultivo y distribuir una gota en cada una de dos cuadrados de una placa de vidrio con cuadrículado en su superficie de 2 cm x 2cm, adaptada a una caja de Huddleson.
- d) Adicionar a una de las gotas de suspensión una gota de suero polivalente anti - V. cholerae 01 y a la otra una gota de solución fisiológica.
- e) Efectuar una homogenización del suero ó de la solución fisiológica con una suspensión bacteriana usando pequeños pali-

llos de vidrio, asa de inoculación ó palillos de madera estériles y haciendo movimientos circulares durante 2 a 3 minutos.

- f) Proceder a la lectura, comprobando si ocurre ó no aglutinación si la bacteria en prueba fuera V. cholerae 01 ocurrirá reacción antígeno-anticuerpo que será visualizada por la aglutinación del cultivo en el cuadrante con suero y ausencia de aglutinación en el cuadrante con solución salina a 0,85%. Si el cultivo en prueba fuera rugoso, habrá aglutinación con el suero y con la salina en este caso un cultivo deberá ser enviado a un laboratorio de referencia para exámenes específicos.
- g) Los cultivos de V. cholerae 01, deben ser sometidos a pruebas serológicas para la determinación de los serotipos Inaba y Ogawa y pruebas complementarias para la determinación del biotipo (El Tor y clásico) (Tabla 1), los cuales son comúnmente realizados por los laboratorios de referencia de Vibrio a nivel Estatal y Federal.

7.3 - Diferenciación entre vibrios y otros organismos oxidasa positiva (Tabla 2)

- a) Prueba de la cuerda (String test): con un asa de inoculación debidamente flameada y enfriada transferir un pequeño inóculo del crecimiento en el agar nutriente inclinado a una lámina conteniendo una gota de solución acuosa al 5% de desoxicopolato de sodio y mezclar.
 - reacción positiva: la suspensión pierde la turbidez y se forma un hilo mucoso cuando se levanta lentamente el asa.
 - reacción negativa: ausencia de la formación del hilo después de 2 minutos. El resultado de la prueba de la cuerda no interfiere en el seguimiento de la investigación sirviendo apenas para ayudar al diagnóstico.

b) Prueba para comprobar la actividad de las descarboxilasas (Base de Descarboxilación según Moeller)

Con un asa de inoculación debidamente flameada y enfriada, retirar una pequeña cantidad del crecimiento del agar nutriente inclinado de 18 - 24 horas e inocular en un tubo con medio para la prueba de descarboxilación de la lisina, un tubo para la descarboxilación de la ornitina, otro tubo con el medio para la prueba de la hidrólisis de la arginina y un cuarto tubo conteniendo la base sin ningún aminoácido, funcionando como control de la prueba. Adicionar a cada uno de los tubos algunas gotas de parafina líquida estéril, a fin de formar una fina capa en la superficie. Incubar a 35 - 37°C y observar diariamente durante 4 días.

Efectuar a lectura considerando:

- descarboxilación de la lisina: coloración púrpura (alcalinización del medio) prueba positiva.
- descarboxilación de la ornitina: coloración púrpura (alcalinización del medio) prueba positiva.
- hidrólisis de la arginina: coloración amarilla (acidificación del medio) prueba negativa.
- control: coloración amarilla (acidificación del medio) fermentación de la glucosa.

Nota: El tubo control deberá permanecer siempre ácido (amarillo) en todo el período de observación.

Tabla 1 - Diferenciación entre V. cholerae biotipo cholerae (clásico) y El Tor.

Pruebas de Laboratorio	<u>V. cholerae</u> Biotipo El Tor	<u>V. cholerae</u> Biotipo cholerae	Observaciones
Hemólisis de eritrocitos de carnero - Agar sangre 5%	(+)	(-)	- Existen biotipo El Tor (-)
Hemaglutinación (1 gota de suspensión espesa de bacterias + 1 gota de suspensión a 0,25% de eritrocitos de gallina)	(+)	(-)	- Cultivos viejos de biotipo <u>cholerae</u> pueden ser positivos. - Existen biotipo El Tor que no son hemaglutinantes.
Prueba de Voges-Proskauer (VP) (en medio de MRVP de 18 - 24 horas)	(+)	(-)	- Puede ser variable principalmente para el biotipo El Tor.
Sensibilidad al sulfato de Polimixina B (discos con 50 unidades)	(-) resistente	(+) sensible	- Mejor medio para la prueba Mueller - Hinton.
Sensibilidad al fuego Clásico IV	(-) resistente	(+) sensible	-
El Tor 5	(+) Sensible	(-) resistente	-

Tabla 2 - Diferencias entre vibrios y otros géneros oxidasa positiva^a

Característica	Propiedades del género			
	Vibrio	Aeromonas	Pseudomonas	Plesiomonas
Oxidasa	+	+	+	+
Glucosa (Oxidación)	+	+	+	+
Glucosa (Fermentación) ácido	+	+	-	+
gas	-	V ^b	-	-
Lisina decarboxilasa	+	V ^b	V ^b	+
Ornitina decarboxilosa	+	-	V ^b	+
Arginina dehidrolasa	-	+	V ^b	+
Manitol	+	+	V ^b	-
Inositol	-	-	V ^b	+
Sensibilidad al agente Vibriostático 0129	+	-	-	+
Prueba de la cuerda	+	V ^b	-	-

a - Estas características se aplican a la mayoría de las especies del género, más existen excepciones.

b - Variable.

c) Prueba para verificar la fermentación de carbohidratos

Para las pruebas de fermentación, los tubos conteniendo el medio de Hugh & Leifson (OF) con glucosa, manitol e inositol (1%) son previamente colocados en baño de maría durante aproximadamente 10 minutos para la remoción del oxígeno existente en su interior y enfriados rápidamente antes de su uso. Inocular el cultivo de la prueba por el procedimiento de punción o profundidad. Luego, de la inoculación, adicionar algunas gotas de aceite o parafina líquida estéril a fin de formar una capa de aproximadamente 5 mm sobre la superficie del medio. Incubar a 35°C y observar diariamente durante 14 días. Efectuar la lectura considerando:

- a) coloración amarilla: fermentación del azúcar.
- b) coloración verde: ausencia de fermentación.

d) Prueba de Oxidación de la Glucosa según Hugh & Leifson (OF)

Para la prueba de oxidación se inocula el medio de Hugh & Leifson con glucosa por el procedimiento de punción con una profundidad de 2 a 3 mm. Incubar a 35°C y observar diariamente durante 4 días.

Efectuar la lectura considerando:

- a) coloración amarilla: oxidación del azúcar.
- b) coloración verde: ausencia de oxidación.

e) Prueba de la sensibilidad al agente Vibriostático O/129

Para la prueba de sensibilidad al agente O/129 (2,4 - diamino - 6,7 - diisopropyl pteridina fosfato), preparar los caldos de cultivo para la prueba en BHI de 14 a 16 horas a 35°C, e inocular por "spots" las placas de agar nutriente conteniendo O/129 en concentración de 150 mg/mL. Paralelamente realizar placas controles sin el agente vibriostático. Los cultivos que presentaran crecimiento en la placa control y ausencia de crecimiento en la placa conteniendo O/129, son considerados sensibles al agente vibriostático.

f) Sensibilidad al Sulfato de Polimixina

Para esta prueba, se puede usar discos impregnados con 50 mg de polimixina B o incorporar 15 µg/mL de antibiótico al medio de Mueller Hinton.

A partir del cultivo de prueba (en caldo nutriente con 2 a 4 horas de incubación), inocular placas medio de Mueller - Hinton, con ayuda de una espátula estéril. Se deben hacer siempre placas contral con cultivos conocidos de V. cholerae biotipo cholerae (clásico) y V. cholerae biotipo Eltor. Colocar los discos de polimixina haciendo una leve presión sobre el medio de

cultivo y dejarlos durante aproximadamente 1 hora a 4°C. Después, incubar a 35°C durante 18 horas. El V. cholerae biotipo cholerae (clásico) es sensible a esta concentración de polimixina presentando un halo de inhibición alrededor del disco. El biotipo Eltor es resistente al antibiótico en esa concentración y no presenta ninguna zona de inhibición alrededor del disco.

g) Prueba de Voges- Proskauer

Inocular un tubo con el medio de MRVP con el cultivo a probar e incubar a 35°C durante 24 horas. Transferir 1 mL del cultivo para un tubo de ensayo. Adicionar 0,6 mL de una solución de alfa naftol y 0,2 mL de una solución de hidróxido de potasio al 40%, agitándose después de cada adición. Las reacciones positivas ocurren inmediatamente en alrededor 5 minutos y es indicada por la aparición de una color rojo. El desarrollo de una coloración anaranjada o amarilla en algunas pruebas se considera una reacción negativa.

7.4 - Clasificación de Heiberg

El V. cholerae según el patrón de fermentación de manosa, arabinosa y sacarosa, puede ser clasificado en 8 grupos de Heiberg diferentes (Tabla 3). Los grupos I y II son los más comúnmente asociados con las epidemias del cólera.

Nota: Para la prueba de fermentación utilizar al medio de OF con manosa (1%), sacarosa (1%) y arabinosa (1%).

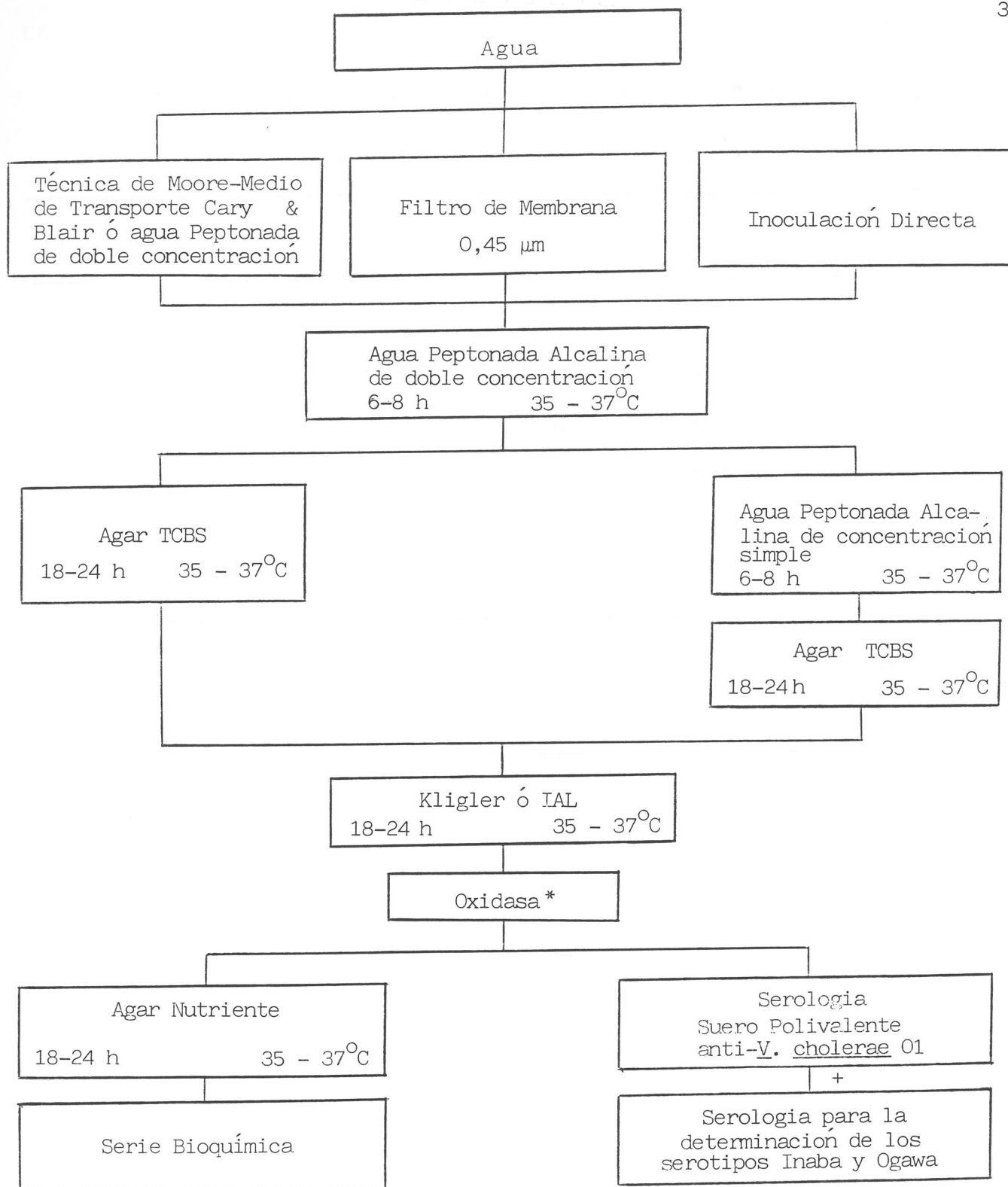
7.5 - Diferenciación bioquímica de las especies del género Vibrio

En determinados circunstancias se hace necesario una identificación bioquímica más completa, para la diferenciación de V. cholerae de las demás especies del género Vibrio, siendo en este caso utilizada las pruebas bioquímicas recomendadas por Colwell, R.R. (1984).

Tabla 3 - Vibrio cholerae - Grupos Bioquímicos de Heiberg

Grupo	Manosa	Sacarosa	Arabinosa
I	+	+	-
II	-	+	-
III	+	+	+
IV	-	+	+
V	+	-	-
VI	-	-	-
VII ^a	+	-	+
VIII ^a	-	-	+

a) Smith & Goodner (1965).



* El prueba de oxidasa no debe ser realizada directamente del medio IAL.

Figura 3 - Esquema del Procedimiento

- . Determinación de Vibrio cholerae en muestras de agua por la técnica de tubos múltiples (NMP)

La cuantificación de Vibrio cholerae en una muestra dada puede ser efectuada por la determinación del número más probable, a través de la técnica de los tubos múltiples. Esta técnica consiste en la inoculación de volúmenes en disminución de la muestra en medios de cultivo adecuado para el crecimiento de los organismos investigados, siendo cada volumen inoculado en cada serie de tubos. A través de sucesivas diluciones de la muestra, son obtenidos inóculos, cuya siembra ofrece resultados negativos en por lo menos un tubo de la serie en que los mismos fueron inoculados y la combinación de resultados positivos y negativos permite una estimación de la densidad original de las bacterias investigadas (NMP), a través de la aplicación de cálculos de probabilidad.

Para la determinación del número más probable de Vibrio cholerae en muestras de aguas los volúmenes inoculados son normalmente superiores a los utilizados para los indicadores de contaminación bacteriológico ya que el Vibrio cholerae se encuentra en menores densidades en estas muestras. (ver ítem 5). Los volúmenes más comúnmente utilizados para aguas superficiales son 1000, 100 y 10 mL, en serie de 3, debido al alto costo de los medios necesarios para análisis de Vibrio cholerae. Los volúmenes de 1000 y 100 mL son concentrados en membrana filtrante para inocularlos en medios de enriquecimiento (APA).

8.1 - Procedimiento del Método

- a) Preparar el material necesario para realización de cada muestra y disponerlo en la meseta en orden:
 - . 3 erlenmeyers de 300 mL conteniendo 100 mL de agua peptonada alcalina para volúmenes de 1000 mL de muestra.
 - . 3 erlenmeyers de 250 mL conteniendo 50 mL de agua peptonada alcalina para volúmenes de 100 mL de muestra.
 - . 3 tubos de 18x180 mm conteniendo 10 mL de agua peptonada alcalina de doble concentración para volúmenes de 10 mL de muestra.

- b) Proceder a marcar dos erlermeyers, anotando el número de la muestra, el volúmen seleccionado de la muestra a ser inoculada, la fecha y las posiciones que cada uno de los dos erlermeyers ocupar en la serie de 3, con los letras A, B y C (ver figura 4).
- c) Para la serie de 1000 mL: homogenizar la muestra, medir un volumen de 3 litros y verter cuidadosamente en el frasco de vacío, ya conectado a la bomba de vacío y al porta filtro de 142 mm, conteniendo membrana filtrante de $0,45\ \mu\text{m}$ de porosidad. Conectar la bomba de vacío y proceder a la filtración. Después, desconectar la bomba y retirar cuidadosamente la parte superior del porta-filtro y con ayuda de una pinza y una tenaza, cuyos extremos fueron flameadas, doblar la membrana al medio y cortarla en 3 partes iguales. Colocar cada una de las partes (concentración correspondiente al volumen de 1000 mL) en los erlermeyers conteniendo 100 mL de APA, cortando cada pedazo en tiras bien pequeñas. Homogenizar bien para el desprendimiento del material de la superficie de la membrana.
- d) Para serie de 100 mL: homogenizar la muestra, medir un volumen de 100 mL y proceder a la filtración en el porta filtro de 47 mm y membrana de $0,45\ \mu\text{m}$ de porosidad como sigue:
- . Retirar la parte superior del porta-filtro y con una pinza flameada y enfriada, colocar en la base el soporte del filtro, una membrana estéril de $0,45\ \mu\text{m}$ de diámetro.
 - . Volver a colocar la parte superior del porta-filtro, teniendo cuidado para no dañar la membrana. Ajustar y enroscar bien.
 - . Verter cuidadosamente al porta filtro 100 mL de la muestra, evitando que el agua resbale.
 - . Conectar la bomba de vacío y proceder a la filtración.
 - . Después de la filtración de la muestra, enjuagar el porta filtro tres veces, con porciones de 20-30 mL de agua de dilución estéril.

- . Desconectar la bomba de vacío al finalizar la operación. Evit^{ar} que la membrana esté excesivamente seca.
 - . Retirar la parte superior del porta-filtro y con auxilio de una pinza flameada y enfriada, retirarla membrana y colocar la en un erlenmeyer conteniendo 50 mL de APA, cortando en tiras pequeñas.
 - . Volver a colocar la parte superior del porta-filtro y lavar con 20 a 30 mL de agua de dilución estéril y proceder a la filtración de los volúmenes más de 100 mL.
- e) Para la serie de 10 mL: Homogenizar la muestra y transferir 10 mL para cada uno de los 3 tubos conteniendo 10 mL de agua peptonada de concentración doble.
- f) Después de la inoculación de todos los volúmenes de la muestra (1000, 100 y 10 mL) incubar los erlenmeyers y tubos a 35° 37°C por 18/24 horas.
- g) Para continuar, proceder según los ítems 6.1c a 6.2g.

8.2 - Cálculo y Expresión de los Resultados

La densidad de Vibrio cholerae se expresa como el NMP de Vibrio cholerae por 100 mL, el cual es obtenido a través de la tabla específica, en que son dados los límites de confianza de 95% para cada valor de NMP determinado.

La tabla 4 presenta el NMP para varias combinaciones de resultados positivos y negativos, cuando son inoculados 3 porciones de 10 mL, 3 porciones de 1 mL y 3 porciones de 0,1 mL de la muestra. Mientras tanto, esta tabla también puede ser utilizada cuando volúmenes mayores y menores de la muestra son inoculados. En este caso, se procesa un código formado por los números de erlenmeyers y tubos con resultados positivo para Vibrio cholerae obtenido en los tres series consecutivas inoculadas, verificandose el valor de NMP correspondiente a él. El NMP/100 mL será dado a través de la siguiente fórmula:

MMP correspondiente al código x $\frac{10}{\text{mayor volumen inoculado}}$

Si se consideran los siguientes ejemplos:

Volúmenes decimales inoculados	Serie			Código	Número del código	Cálculo del MMP	MMP/ 100 mL
	A	B	C				
1000 mL	+	+	+	3	-	-	-
100 mL	+	-	+	2	93	$93 \times \frac{10}{1000}$	0,93
10 mL	-	-	-	0	-	-	-

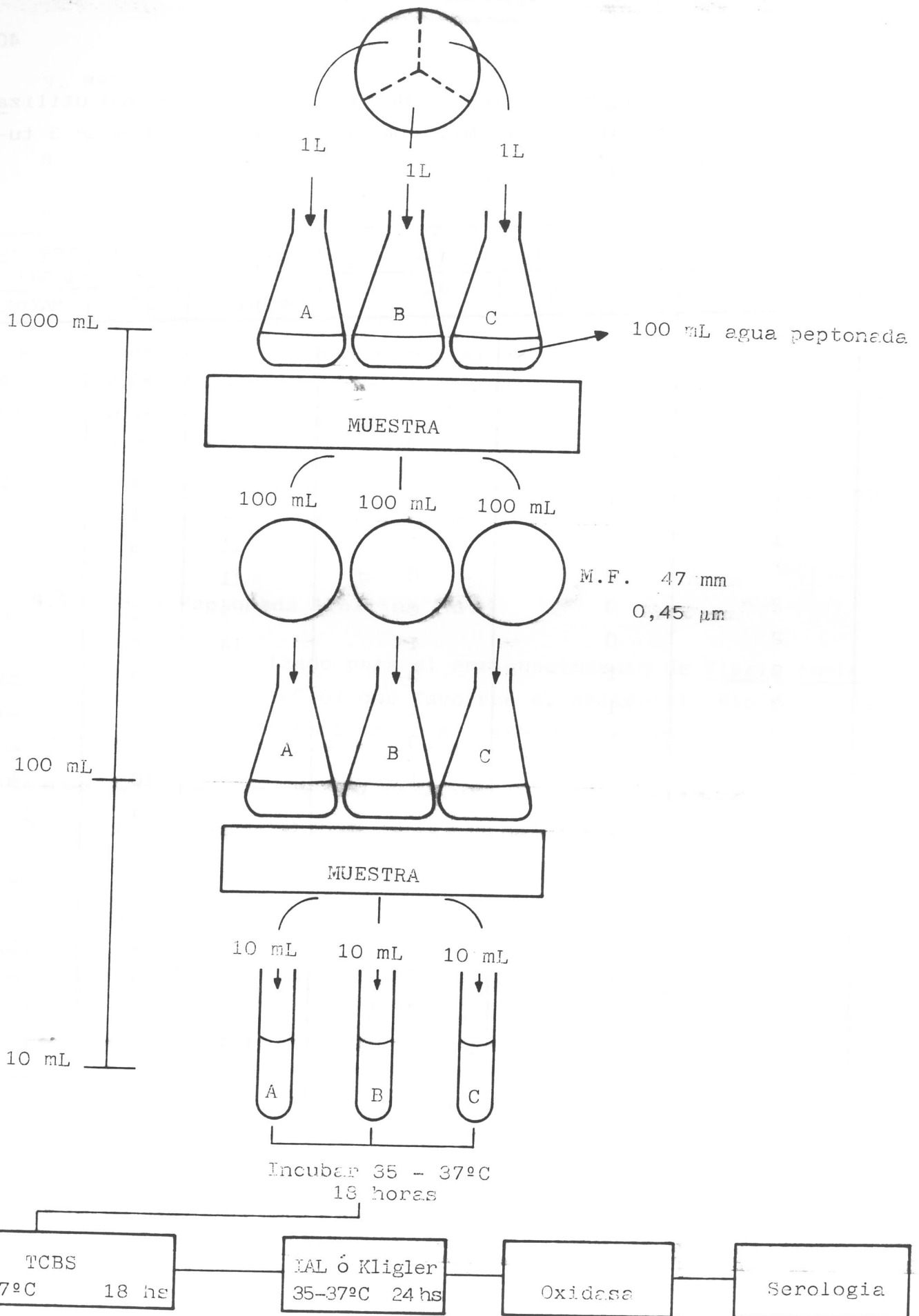


Figura 4 - Esquema de procedimiento (NMP)

Tabla 4 - Índice de NMP y límites de confianza de 95% son utilizados inóculos de 10 mL, 1 mL y 0,1 mL en series de 3 tubos.

Nº DE TUBOS CON REACCIÓN POSITIVA DE:			ÍNDICE DE NMP/100 mL	95% DE LÍMITE DE CONFIABILIDAD	
3 de 10 mL	3 de 1 mL	3 de 0,1 mL		MÍNIMO	MÁXIMO
0	0	0	<3	-	-
0	0	1	3	<0,5	9
0	1	0	3	<0,5	13
1	0	0	4	<0,5	20
1	0	1	7	1	21
1	1	0	7	1	23
1	1	1	11	3	36
1	2	0	11	3	36
2	0	0	9	1	36
2	0	1	14	3	37
2	1	0	15	3	44
2	1	1	20	7	89
2	2	0	21	4	47
2	2	1	28	10	150
3	0	0	23	4	120
3	0	1	39	7	130
3	0	2	64	15	380
3	1	0	43	7	210
3	1	1	75	14	230
3	1	2	120	30	380
3	2	0	93	15	380
3	2	1	150	30	440
3	1	2	210	35	470
3	3	0	240	36	1,300
3	3	1	460	71	2,400
3	3	2	1,100	150	4,800
3	3	3	≥2,400	-	-

9. Medios de Cultivo

9.1 - Medio de Transporte Cary - Blair

Medio semisólido para conservación de muestras fecales. El pH alcalino y la presencia de cloruro de sódio favorecen la supervivencia de V. cholerae que puede permanecer viable hasta 22 días en este medio. El tioglicolato de sódio actúa como agente reductor, manteniendo un bajo potencial de oxidación-reducción, previniendo la formación de peróxidos en el medio, que normalmente son letales para los microorganismos.

OBS.: Las muestras que son transportadas en medio Cary Blair no necesitan de refrigeración.

9.2 - Agua Peptonada Alcalina (APA)

Medio líquido utilizado para el enriquecimiento de Vibrio cholerae de pH alcalino (8,6) que favorece el desarrollo rápido de Vibrio e inhibe el crecimiento de otras bacterias.

El período de incubación no debe ser largo (8 a 12 horas), para que no haya predominio de otros microorganismos.

9.3 - Agar TCBS (agar tiosulfato citrato sacarosa sales biliares)

Medio selectivo diferencial mayormente utilizado para el aislamiento de Vibrio cholerae y otros vibrios patógenos. El Vibrio cholerae utiliza la sacarosa, acidificando el medio y produciendo colonias amarillas, debido al cambio de los indicadores de pH, azul de timol y bromotimol.

Las sales biliares incorporadas al medio actúan en la inhibición del crecimiento de la mayoría de las bacterias gram positivas. El citrato de sodio retarda el desarrollo de los microorganismos gram positivos y sirve para restringir algunos organismos gram negativos que son incapaces de utilizar citrato de sodio como

fuelle de carbono. El tiosulfato de sodio y el citrato férrico, permiten la diferenciación de los vibrios de las bacterias productoras de sulfuro de hidrógeno (H_2S).

9.4 - Agar Kligler con Hierro (Kligler Iron Agar)

Glucosa (dextrosa) - El V. cholerae fermenta la glucosa, con producción de ácido, el que determina la aparición de una coloración amarilla al medio, según el cambio del indicador de pH. En la superficie del medio, la proliferación es muy abundante y la acidez resultante de la fermentación de la glucosa es neutralizada por los productos del metabolismo protéico, lo que determina la aparición del color rojo. En la base del medio, donde el crecimiento es menor en relación a la superficie, los productos del metabolismo protéico no son suficientes para neutralizar la acidez permaneciendo la coloración amarilla del medio.

Lactosa - El V. cholerae no fermenta la lactosa, permaneciendo inalterable el ápice del medio (coloración roja).

Sulfuro de hidrógeno (H_2S) - El V. cholerae es incapaz de reducir el tiosulfato a sulfuro de hidrógeno, por tanto, no habrá formación de sulfato férrico, resultante de la combinación del ión hierro presente en el sulfato ferroso amoniacal con el sulfato de hidrógeno, responsable del ennegrecimiento del medio.

Gas - El V. cholerae no produce gas, por tanto no presentará ninguna formación de burbujas en el medio.

Indol - El V. cholerae produce una enzima triptofanasa, siendo por tanto, capaz de degradar el aminoácido heterocíclico triptofano y formar el indol. La formación de indol es verificada por la presencia de color rojo en los tapones del medio de Kligler que contiene el reactivo para dimetilaminobenzaldehído.

9.5 - Medio de Rugai y Lisina-Motilidad (IAL) según PESSOA & SILVA

a) Fase inferior: lisina y motilidad

Lisina - El V. cholerae descarboxila este aminoácido a través de la enzima L-lisina descarboxilasa, dando formación de la amina respectiva cadaverina. La amina formada neutraliza la acidez del medio proveniente de la fermentación de la glucosa y lo alcaliza lo suficiente para hacer que el indicador púrpura de bromocresol vire a color violeta con este pH.

Motilidad - El V. cholerae posee flagelo, presentando, por tanto, crecimiento difuso en agar semisólido.

b) Fase superior: Rugai

- glucosa (dextrosa) - (ver ítem 7.4).
- gas (ver ítem 7.4).
- sulfuro de hidrógeno - (ver ítem 7.4).
- indol - (ver ítem 7.4)
- L-triptofano desaminasa (LTD) - el V. cholerae no posee el L-triptofano desaminasa, siendo incapaz de desaminar el Triptofano y producir el ácido indol pirúvico, por tanto, el ápice de IAL se presentará azul.

Ureasa - El V. cholerae es ureasa negativa, por lo tanto no degrada la urea en amonio (NH_2) y dióxido de carbono (CO_2), no presentando color azul en la parte inferior, característica de las bacterias ureasa positiva.

Sacarosa - El V. cholerae fermenta la sacarosa; por lo tanto, la parte profunda del IAL se observará de color amarillo.

9.6 - Oxidasa

El V. cholerae tiene citocromo-oxidasa, enzima que oxida el citocromo-c en la cadena respiratoria, de acuerdo a la siguiente

En la preparación de medios de cultivo, se utilizan de preferência medios deshidratados, de la mejor calidad posible . No obstante pueden ser preparados en el laboratorio, cuidando que los ingredientes utilizados deban ser de grado bacteriológico, el color, olor y consistencia deben mantenerse inalterables y sin presentar sustancias bactericidas ni bacteriostáticos inespecíficos u otros carbohidratos fermentables que no sean los requeridos para el ensayo y proveer los nutrientes necesario para asegurar el crescimiento de los microorganismos en estudio.

9.7 - Medios de Cultivo Deshidratados

- . Agar Kligler con Hierro ("Kligler Iron Agar")
- . Agar TCBS ("TCBS Agar")
- . Base de Moeller para la descarboxilasa ("Descarboxylase base Moeller")
- . Medio basal para oxidación y fermentación ("OF Basal Medium")
- . Medio para la prueba de Voges-Proskauer ("MR-VP Medium")
- . Medio de transporte Cary y Blair ("Cary and Blair Transport Medium")
- . Medio de Mueller Hinton (Mueller Hinton Medium)

9.8 - Sueros

- . Antisuero polivalente para V. cholerae 01
- . Antisuero V. cholerae Ogawa
- . Antisuero V. cholerae Inaba

9.9 - Preparación de Medios de Cultivo

Medio de transporte "Cary y Blair"

Fórmula:

Tioglicolato de sodio	1,5 g
Fosfato dibásico de sodio anhidro (Na_2HPO_4)	1,1 g
Cloruro de sodio (NaCl)	5,0 g
Agar	5,0 g
Agua destilada	991,0 mL
pH final después de esterilización: $8,4 \pm 0,2$	

Preparación:

Pesar 12,6 de medio deshidratado "Cary and Blair Transport Medium" y agregar 991 mL de agua destilada fría dejándolo en reposo durante aproximadamente 15 minutos. Calentar, agitando frecuentemente hasta disolverlo completamente y sin llegar a la temperatura de ebullición. Estabilizar en baño-maría a 50°C . Agregar asepticamente 9 mL de una solución de cloruro de calcio al 1% (estéril). Homogenizar y esterilizar el medio en vapor fluente durante 15 minutos o en baño-maría, dejando el recipiente medio abierto, cerrándolo inmediatamente después de esterilizado. Distribuir asepticamente 300 mL en bolsas plásticas de 20 litros. Sellar y almacenar en la oscuridad a una temperatura de 2 a 8°C .

Obs.: Este medio de transporte puede ser utilizado por un largo tiempo después de preparado (18 meses o más) preservándolo de manera adecuada.

Agua Peptonada Alcalina (APA) (concentración simple)Fórmula:

Peptona	10,0 g
Cloruro de sodio (NaCl)	10,0 g
Agua destilada	1000,0 mL

pH final: $8,8 \pm 0,2$ a 25°C

Preparación:

Pesar la peptona y el cloruro de sodio y agregar 1000 mL de agua destilada dejándolos en reposo aproximadamente 15 minutos. Calentar agitando frecuentemente hasta que el medio se disuelva completamente, sin alcanzar la temperatura de ebullición. Distribuir volúmenes de 10 mL en tubos de ensayo de (16x150) mm. Taponar y esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 minutos.

Agua Peptonada Alcalina (APA) (concentración doble)Fórmula:

Peptona	20,0 g
Cloruro de sodio (NaCl)	20,0 g
Agua destilada	1000,0 mL

pH final: $8,8 \pm 0,2$ a 25°C

Preparación:

Pesar la peptona, el cloruro de sodio y agregar 100 mL de agua destilada fría, dejando en reposo aproximadamente 15 minutos. Calentar agitando frecuentemente hasta la completa disolución del medio, sin alcanzar la temperatura de ebullición. Distribuir volúmenes de 10 mL en tubos de ensayo de (18X180) mm. Ajustar el pH y esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 minutos. Al momento de usar asepticamente colocar el contenido de cada tubo (10 mL) en erlenmeyers estériles de 125 mL.

Obs.: Ajustar el pH con NaOH (1N) antes de autoclavar (40g de NaOH para 1000 mL de agua destilada).

Agar TCBS (Agar tiosulfato, citrato, sales biliares y sacarosa)

Fórmula:

Extrato de levadura	5,0 g
Peptona proteasa (o Peptona)	10,0 g
Citrato de sodio ($\text{Na}_3 \text{C}_6 \text{H}_5 \text{O}_7$)	10,0 g
Tiosulfato de sodio ($\text{Na}_2 \text{S}_2 \text{O}_3$)	10,0 g
Bilis de buey deshidratada	8,0 g
Sacarosa	20,0 g
Cloruro de sodio (NaCl)	10,0 g
Citrato férrico	1,0 g
Azul de bromotimol	0,04g
Azul de timol	0,04g
Agar	15,0 g
Agua destilada	1000,0 mL

pH final: $8,6 \pm 0,2$ a 25°C

"No autoclavar".

Preparación

Pesar 89,0g de medio deshidratado "TCBS Agar" y agregar 1000 mL de agua destilada fría, dejando en reposo durante aproximadamente 15 minutos. Calentar, agitándolo frecuentemente hasta su completa disolución, sin alcanzar la temperatura de ebullición. Distribuir 12 a 15 mL en placas Petri de (15x100) mm, previamente esterilizadas. Las placas con agar TCBS deben mantenerse refrigeradas (2 a 8°C) .

El medio TCBS no debe autoclavarse.

Agar Kligler con Hierro

Fórmula:

Extracto de carne	3,0	g
Extracto de levadura	3,0	g
Peptona	15,0	g
Peptona Proteasa	5,0	g
Lactosa	10,0	g
Glucosa	1,0	g
Sulfato ferroso FeSO_4)	5,0	g
Tiosulfato de sodio ($\text{Na}_2 \text{S}_2 \text{O}_3$)	0,3	g
Rojo fenol	0,024	g
Agar	12,0	g
Agua destilada	1000,0	mL

pH final: $7,4 \pm 0,2$ a 25°C

Preparación:

Pesar 55,0 g de medio deshidratado "Kligler Iron Agar" y agregar 1000 mL de agua destilada fría, dejándolo en reposo aproximadamente 15 minutos. Calentar agitando frecuentemente hasta disolverlo completamente, sin alcanzar la temperatura de ebullición. Distribuir volúmenes de 6 a 7 mL en tubos de ensayo (12x120) mm. Taponar con algodón hidrófilo y esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 minutos. Después de esterilizado y aún caliente, impregnar el tapón con reactivo para indol. Dejar enfriar, inclinando de tal manera que la base sea aproximadamente de 1/3 de altura del fondo del tubo. Mantener refrigerado (2 a 8°C).

Agar nutriente modificado (agar manutención)

Fórmula:

Extracto de carne	4,0 g
Peptona	10,0 g
Cloruro de sodio (NaCl)	5,0 g
Agar	15,0 g
Agua destilada	1000,0 mL

pH final: $7,4 \pm 0,2$ a 25°C

Preparación:

Pesar los ingredientes y agregar 1000 ml de agua destilada fría, dejando en reposo durante 15 minutos aproximadamente. Calentar, agitando frecuentemente hasta la completa disolución del medio, cuidando de no alcanzar la temperatura de ebullición. Distribuir volúmenes de 6 a 7 mL en tubos de (12X120)mm. Ajustar y esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 minutos. Después de esterilizar el medio aún caliente, colocar los tubos en posición inclinada hasta que el medio se solidifique.

Medio para detectar la actividad de decarboxilasa (base de Mueller para descarboxilasa)

Fórmula:

Peptona	5,0	g
Extracto de carne	5,0	g
Glucosa	0,5	g
Púrpura de bromocresol	0,01	g
Rojo cresol	0,005	g
Piridoxal	0,005	g
Agua destilada	1000,0	mL

pH final: $6,0 \pm 0,2$ a 25°C

Preparación:

Pesar 10,5 g de medio deshidratado "Descarboxylase Base Moeller" y agregar 1000 mL de agua destilada fría, dejando en reposo aproximadamente por 15 minutos. Calentar agitando frecuentemente hasta la completa disolución del medio, cuidando de no alcanzar la temperatura de incubación. Dividir el medio en tres partes de 300 mL y una cuarta parte de 100 mL. A la primera parte agregar 3,0 de L-lisina. A la segunda porción 3,0 g de L-arginina y a la tercera parte 3,0 g de L-ornitina (concentración final de los aminoácidos 1%). La cuarta parte será el control, por lo tanto no llevará ningún aminoácido. No es necesario el ajuste del pH para la lisina y la arginina. Para la ornitina, que es altamente ácida, ajustar el pH $6,0 \pm 0,2$ con solución normal de hidróxido de sodio (NaOH-1N).

Distribuir volúmenes de 3 mL en tubos de ensayo de (12x120) mm. Taponar y esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 minutos. Mantener en refrigeración ($2-8^{\circ}\text{C}$).

Medio OF oxidación y fermentaciónFórmula:

Triptona	2,0 g
Cloruro de sodio (NaCl)	5,0 g
Fosfato dibásico de potasio (K_2HPO_4)	0,3 g
Azul de bromotimol	0,08 g
Agar	2,0 g
Agua destilada	1000,0 mL

pH final: $6,8 \pm 0,2$ a 25°C

Preparación:

Pesar 9,4 g de medio deshidratado "OF Basal Medium" y agregar 1000 mL de agua destilada fría, dejando en reposo durante 15 minutos aproximadamente. Calentar agitando frecuentemente hasta la completa disolución del medio, cuidando de no alcanzar la temperatu

ra de ebullición. Distribuir volúmenes de 100 mL en matraces de 250 mL y esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 minutos. Estabilizar a la temperatura de 50°C y adicionar para 100 mL de medio estéril, 10 mL de una solución del azúcar a ensayar al 10%. Homogenizar y distribuir volúmenes de 3 a 4 mL en tubos de ensayo de (12x120) mm estériles, tamponados con algodón cardado. Mantener los tubos en posición vertical hasta que el medio solifique.

Nota: La solución de azúcar debe esterilizarse por filtración por membrana de 0,22 μ m estéril.

Medio de Voges-Proskauer (VP)

Fórmula:

Peptona	7,0 g
Fosfato de potasio dibásico (K_2HPO_4)	5,0 g
Glucosa	5,0 g
Agua destilada	1000,0 mL

pH final después de la esterilización: $6,9 \pm 0,2$ a 25°C

Preparación:

Pesar 17,0g de medio deshidratado "M R-V P Medium" y agregar 1000 mL de agua destilada dejando en reposo durante 15 minutos aproximadamente. Calentar agitando frecuentemente hasta la completa disolución del medio cuidando de no alcanzar la temperatura de ebullición. Distribuir volúmenes en autoclave a 121°C durante 15 minutos. Mantener en refrigeración (2-8°C).

Medio de Mueller HintonFórmula:

Infusión de carne	300,0 g
Hidrolisado de caseína	17,5 g
Almidón	1,5 g
Agar	17,0 g
Agua destilada	1000,0 mL

pH final después de la esterilización: $7,4 \pm 0,1$ a 25°C

Preparación :

Pesar 38,0 g de medio deshidratado "Mueller Hinton Medium" y agregar 1000 mL de agua destilada fría, dejando en reposo durante aproximadamente 15 minutos. Calentar, agitando frecuentemente, hasta la completa disolución del medio, cuidando de no alcanzar la temperatura de ebullición. Si es necesario ajustar el pH en 7,4 con solución normal de hidróxido de sodio (NaOH - 1N). Esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 minutos. Después de esterilizado, distribuir asepticamente volúmenes de 15 mL en placas de Petri de (15x100) mm.

Agar nutriente para agente vibriostático 0129 (150 $\mu\text{g/mL}$)Fórmula:

Caldo nutriente nº 2 (Oxoid)	25,0 g
Cloruro de sodio (NaCl)	15,0 g
Agar.....	15,0 g
Solução 0129 (17,5 mg/mL.....	20 mL
Agua destilada.....	1000,0 mL

Preparación:

Pesar los componentes del medio y agregar 1000 mL de agua destilada fría, dejando en reposo durante aproximadamente 15 minutos. Calentar, agitando frecuentemente, hasta la completa disolución del medio cuidando de no alcanzar la temperatura de ebullición. Este

rilizar en autoclave a 121°C durante 15 minutos. Estabilizar el medio a 50°C y agregar asepticamente 20 mL de una solución de 17,5 mg/mL del agente vibriostático 0129. Homogenizar y distribuir asepticamente volúmenes de 15 ml en placas de Petri de (15x100) mm.

Medio de Rugai y Lisina-motilidad (IAL), según PESSOA & SILVA

El medio de cultivo completo está constituido de cuatro fases:

- a) interfase (vascar)
- b) fase inferior (lisina-motilidad)
- c) fase superior (medio de Rugai & Araújo)
- d) tapón (con reativo para indol) (ver item 8.4)

Interfase (vascar, vaselina-carnaúba)

Fórmula:

Vaselina líquida	90,0 mL
Cera de carnaúba	18,0 g

Preparación:

Pesar 18,0 g de cera de carnaúba y agregar 90 mL de vaselina líquida. Calentar ~~hasta la~~ completa fusión de la cera. Retirar del fuego y vaciar sobre una placa de acrílico perforada. Dejar enfriar, retirar el exceso de cera sobre la placa de acrílico con la punta de una espátula. Guardar a temperatura ambiente. Al momento de uso, dejar la placa en el refrigerador durante 30 minutos. Con ayuda de una barilha de vidrio, retirar la cera de los orificios y colocar en tubos de ensayo de (12X120) mm para que se forme un anillo vedatório de aproximadamente 1 mm de espesura.

Fase inferior - Medio de ensayo para decarboxilación de lisina y motilidad

Fórmula:

Extracto de levadura	3,0 g
Dextrosa	0,5 g
Nitrato de potasio (KNO_3)	0,5 g
L-lisina	5,0 g
Solución alcohólica de púrpura de bromocresol 0,2% ..	10,0 mL
Agar	4,0 g
Agua destilada	1000,0 mL

pH final después de esterilización: 6,4 a 25°C

Preparación:

Pesar el extrato de levadura, la dextrosa, el nitrato de potasio y el agar. Agregar 1000 mL de agua destilada fría, dejar en reposo durante aproximadamente 15 minutos. Calentar agitando frecuentemente, hasta la completa disolución del medio, cuidando de no alcanzar la temperatura de ebullición. Agregar L-lisina. Homogenizar y ajustar el pH a 6,4 con solución de hidróxido de sodio 1N. Agregar 10 mL de solución alcohólica de púrpura de bromocresol al 0,2%. Homogenizar y distribuir volúmenes de 1,5 mL en tubos de ensayo de (12x120) mm, en los cuales fue colocado el vascar (interfase). Taponar con algodón hidrófilo y esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 minutos. Después de autoclaveado las tubos con medio de cultivo deben conservarse en posición vertical para ver la posición de un anillo en la interfase, guardar en bolass plásticas en refrigeración (2-8°C) durante un período maximo de 4 semanas.

Superior - (medio de Rugai & Araújo)

Fórmula:

Solución 1 (base)	800,0 mL
Solución 2 (solución de indicador de sustratos)	14,0 mL

Preparación:

Este medio debe ser preparado como sigue:

- preparar la solución 1 (base), con la siguiente composición:

Triptona	10,0 g
Extracto de carne	2,0 g
Cloruro de sodio (NaCl)	5,0 g
Fosfato de sodio dibásico penta-hidratado ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$)	2,0 g
L-triptofano	1,0 g
Solución alcohólica de azul de bromotimol 1,5%	2,0 mL
Agar	11,0 g
Agua destilada	1000,0 mL

pH final después de esterilizado: 7,4 a 25°C

Preparación:

Pesar los reactivos, con excepción de la solución de azul de bromotimol y agregar 1000 mL de agua destilada fría, dejar en reposo aproximadamente 15 minutos. Calentar, agitando frecuentemente hasta la disolución completa del medio, cuidando de no alcanzar la temperatura de ebullición. Ajustar el pH a 7,4 con solución de hidróxido de sodio 1N. Agregar 2 mL de solución alcohólica el 1,5% de azul de bromotimol. Distribuir en matraces. Taponar y esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 minutos. Mantener en refrigeración (2-8°C) en la oscuridad.

- preparación de la solución 2 (solución de indicador de sustratos), con la siguiente composición.

Citrato de Hierro amoniacal (verde)	2,0 g
Tiosulfato de sodio penta-hidrato ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$)	2,0 g
Sacarosa	80,0 g
Dextrosa	10,0 g
Urea	40,0 g
Agua destilada	85,0 mL

Preparación:

Pesar todos los reactivos, colocarlos en un frasco esterilizado de 150 mL y agregar 85 ml de agua destilada estéril. Taponar con tapa de rosca o tapón de corcho. Calentar en baño-maría a 65°C, agitando frecuentement hasta que todos los reactivos se disuelvan. Pasteurizar sumirgiendo frasco hasta el cuello en baño-maría a 65°C durante 1 hora.

Mantener en refrigeración (2 a 8°C), en la oscuridad.

Colorantes utilizados en la preparación del IAL

a) Azul de bromotimol (solución alcohólica al 1,5%)

Fórmula:

Azul de bromotimol	1,5 g
Alcohol etílico absoluto q.s.p	100,0 mL

Preparación:

Pesar 1,5 g de azul de bromotimol, colocar en un matraz aforado y completar a un volúmen de 100 mL con alcohol etílico absoluto. Guardar la solución en un frasco con trapa de rosca en la oscuridad.

b) Púrpura de bromocresol (solución alcohólica al 0,2%)

Fórmula:

Solución normal de hidróxido de sódio (NaOH-1N)	1,0 mL
Agua destilada	49,0 mL
Púrpura de bromocresol	0,2 g
Alcohol etílico absoluto q.s.p	100,0 mL

Preparación:

Colocar en un matríz aferido 1 mL de una solución normal de hidróxido de sodio (NaOH-1N) a 49 mL de agua destilada. Esperar media hora para estabilizar. En seguida disolver 0,2 g de púrpura de bromocresol en la solución estabilizada. Una vez disuelto, completar a 100 mL con alcohol etílico absoluto. Guardar la solución en frasco con tapa de rosca en la oscuridad.

Preparación del medio IAL

Fundir la base del medio Rugai, Araújo en baño-maría y estabilizar a 60-65  C. Adicionar, asépticamente una solución de indicador de substratos. Homogenizar. Distribuir alícuotas de aproximadamente 3 mL en tubos de (12x120) mm que contienen lisina y o vascar, impregnar el tapón con reactivo para indol. Dejar enfriar, inclinando las tubos en un ángulo de 45  C. Controlar la esterilidad, incubando a 35  C por 24 horas.

9.10 - Soluciones

Reativo para indolF  rmula:

p-dimetilamino benzaldehído	1,0 g
Acido ortofosfórico	20,0 g
Alcohol etílico absoluto	50,0 mL
Agua destilada q.s.p	100,0 mL

Preparación:

Pesar o p-dimetilamino benzaldehído y agregar 50 mL de alcohol etílico absoluto. Agregar el acido ortofosfórico al agua y adicional el p- dimetilamino benzaldehído, disuelto en alcohol. Colocar en frasco con tapa esmerilada o de rosca.

Para la aplicación del reactivo para indol en el tapón de algodón deben seguirse los siguientes pasos:

- a) Colocar aproximadamente 10 mL de reactivo en una placa de Petri estéril, mantenida en posición inclinada, con papel de filtro estérilizado en el fondo;
- b) No embeber el tapón de algodón directamente en el reactivo, tocando levemente en el papel filtro.
- c) Trabajar rápidamente, con asepsia, de preferencia en ambiente estéril.

Reactivo para ensayo de oxidasa

Fórmula:

Clorhidrato de N, N', N', -tetrametil-p-fenilendiamina ...	1,0 g
Agua destilada	100 mL

Preparación:

Pesar 1,0 g de clorhidrato de N, N, N' N' - tetrametil-p-fenilendiamina agregar 100 mL de agua recién-distilada, homogenizando bien hasta la completa disolución de los reactivos. guardar la solución en frascos ambar (oscuro), en refrigeración (2 a 8°C), máximo 2 días.

Nota: La adición de ácido ascórbico a esa solución (en la concentración de 0,1%) retarda la auto-oxidación del reactivo.

Solución de cloruro de calcio al 1%

Fórmula:

Cloruro de calcio	1,0 g
Agua destilada	100,0 mL

Preparación:

Pesar 1,0 g de cloruro de calcio y disolver en 100 mL de agua destilada. Almacenar en frascos herméticos, previamente esterilizados.

Solución fisiológica o solución salina

Fórmula:

Cloruro de sodio (NaCl)	8,5 g
Agua destilada	1000, 0 mL

Preparación:

Pesar 8,5 g de cloruro de sodio y disolver en 1000 mL de agua destilada. Homogenizar **bién** hasta la completa disolución del cloruro de sodio. Distribuir volúmenes de 50 mL aproximadamente en frascos de borosilicato o vidrio neutro. Esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 minutos. Guardar a temperatura ambiente.

Solución normal de hidróxido de sódio (NaOH 1N)

Formula:

Hidróxido de sodio (NaOH)	40,0 g
Agua destilada	1000,0 mL

Preparación:

Pesar 40,0 g de hidróxido de sodio. Colocar en un matraz aforado y adicionar 500 mL de agua destilada. Homogenizar **hasta** la completa disolución del hidróxido de sodio y completar para 1000 mL con agua destilada. Guardar en frasco hermético en la oscuridad.

Reactivos para el ensayo VP

Solución de alfa-naftol al 5%

Fórmula:

Alfa-naftol	5,0 g
Alcohol etílico absoluto	100,0 mL

Preparación:

Pesar 5,0 g de alfa-naftol y diluir en 100 mL de alcohol etílico absoluto. Preparar la solución al momento de usar.

Solución de hidróxido de potasio al 40%Fórmula:

Hidróxido de potasio (KOH)	40,0 g
Agua destilada	100,0 mL

Preparación:

Pesar 40,0 g de hidróxido de potasio y diluir en 100 mL de agua destilada. Guardar en frasco hermético en la oscuridad.

Solución 0129 (7,5 mg/mL)Fórmula:

0129 (2,4 diamino-6,7-disopropyl pteridine phosphate)	0,75 g
Agua destilada estéril	100,0 mL

Preparación:

Disolver el reactivo 0129 en 100 mL de agua destilada y esterilizar en membrana filtrante 0,22 μ m. Almacenar en el refrigerador por un período inferior a 30 días (2 a 8°C).

Solución de deoxicolato de sodio al 0,5%

Deoxicolato de sodio ($C_{24}H_{39}NaO_4$)	0,5 g
Agua destilada	100 mL

Preparación:

Pesar 0,5 g de deoxicolato de sodio y disolver en 100 mL de agua destilada. Guardar en un frasco cuenta gotas.

Solución de tiosulfato de sodio al 1,8%

Fórmula:

Tiosulfato de sodio anhidro ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$)	18,0 g
Agua destilada	1000,0 mL

Preparación:

Pesar 18 g de tiosulfato de sodio y disolver en 1000 mL de agua destilada. Guardar en frasco con tapón de rosca.

Solución de EDTA al 15%

Fórmula:

EDTA (ácido etilendiamenotetraacético)	150,0 g
Agua destilada	1000,0 mL

Preparación:

Pesar 150,0 g de EDTA y disolver en 1000 mL de agua destilada. Ajustar el pH 6,5. Guardar en frasco con tapón de rosca.

10. EQUIPAMIENTOS Y MATERIALES

Balanzas

Con sensibilidad en un mínimo de 0,1 g al peso de 150 g.

Baño-maría

Equipado con termostato para temperatura de 55°C, con capacidad adecuada para recipientes que contienen medios de cultivo, cuya temperatura debe ser estabilizada antes de su distribución en placas de Petri.

1. Las balanzas deben ser colocadas en locales adecuados, protegidas de vibraciones, humedad y cambios bruscos de temperatura, deben ser mantenidas limpias y usadas por personal que conozcan su funcionamiento.
2. Deben hacerse registros continuos y periódicos de temperatura y los termómetros usados deben ser graduados con intervalos de escala de $0,1^{\circ}\text{C}$. Los envases que se coloquen en baño-maria deben ser de acero inoxidable o acero galvanizado.

Destilador de agua o deionizador

Debe obtenerse agua no tóxica, libre de sustancias que impidan o interfieran la multiplicación bacteriana. La conductividad debe ser inferior a 2 umhos/cm² a 25°C y el pH entre 5,5 a 7,5.

Nota: La densidad de bacterias heterotróficas en el agua recién destilada debe ser inferior a 1000 unidades formadoras de colonias por mL (UFC/mL) y a 10.000 UFC/mL en el agua destilada almacenada. Este control debe hacerse por lo menos, una vez al mes.

Equipos de esterilización

Autoclave

Funciona a una presión de 103 393 Pa ($1,05 \text{ kgf/cm}^2$ o $15 \text{ lb}_3\text{pol}^2$) produciendo en su interior una temperatura de $121,6^{\circ}\text{C}$ al nivel del mar. El recambio del ~~aire~~ de vapor debe durar un máximo de una hora, siendo recomendable que la temperatura de esterilización sea alcanzada antes de 30 minutos.

Estufa de esterilización

Debe mantener una temperatura de $(170 \pm 10^{\circ}\text{C})$ durante el período de esterilización (mínimo de 2 horas).

Equipamiento para la concentración en membrana filtrante

. Bomba de presión.

De acero inoxidable con capacidad para 5 a 10 litros.

. Porta filtro

De acero inoxidable, con un diámetro de 142 mm o 293 mm.

. Mangueras de goma

Con buena resistencia a la presión.

. Bomba de vacío y presión

Bomba de vacío y presión u otro dispositivo adecuado para producir una presión de 147,1 Kpa.

Estufa de cultivo termostatzada

Debe mantener una temperatura en el rango de $35 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ y la humedad relativa entre 75 a 85%.

3. La verificación de la temperatura debe ser hecha periódicamente (Mínimo 2 veces al día) con termómetros (sumergidos en agua, glicerina o aceite mineral) colocados en puntas representativas de la incubadora, es conveniente también la colocación de un termómetro de máxima y mínima en la parte central de la estufa. Es conveniente el uso de un circulador de aire para homogenizar la temperatura.

pH metro

Debe tener una exactitud mínima de 0,1 unidades de pH y debe ser calibrado, por lo menos dos veces al día, con menos dos soluciones tampones patrón (pH = 4,0; pH = 6,86; ó pH = 9,18).

Refrigerador

Debe mantener la temperatura en un rango de 2 a 10°C .

Material de vidrio

Matraces

De borosilicato ("Pyrex") o vidrio neutro, adecuados para la preparación de medios de cultivo.

Matraces erlenmeyer

De borosilicato ("Pyrex") o vidrio neutro, con capacidad de 125mL.

Frascos para la colección de la muestras

De vidrio neutro o plástico autoclavable, atóxico, con capacidad mínima de 5 litros, boca ancha y tapa .

Frascos para la solución fisiológica

De borosilicato ("Pyrex") o vidrio neutro, con tapa de rosca que permitan buen sellaje y estén libres de sustancias tóxicas solubles.

Pipetas

Deben ser de borosilicato tipo Mohr, para 5 mL y 10 mL con graduación de 1/10 y un error de calibración inferior a 2,5%, con tapón de algodón.

Pipetas Pasteur

Placas de Petri (de vidrio)

Deben ~~ser de~~ borosilicato ("pyrex") o vidrio neutro, de buena calidad, de 100 mm de diametro y 15 mm de altura.

Tubos de ensayo

De borosilicato ("pyrex") o vidrio neutro, con capacidad adecuada.

Nota: Generalmente se usan tubos de ensayo de (18x180) mm, (16x150) mm y de (12x120)mm.

Asas de inoculación

Alambre de níquel-cromo, platina-iridio o platino, de 0,5 mm de diámetro y 7 a 8 cm de largo, con una circunferencia de 3 mm diámetro en un extremo, el otro unido a un mango metálico (cabo de Kollé).

Mechero de Bunsen o similar

Debe funcionar adecuadamente para producir combustión completa.

Caja de acero inoxidable

Para esterilización de materiales.

Caja de Huddlenson

Para el ensayo de aglutinación rápida, caja de madera pintada de color negro, excepto un lado que está pintada de blanco, provista de una ampollita y una placa de vidrio cuadriculado.

Gradilhas

De tamaño adecuado para colocar los tubos de ensayo utilizados.

Recipiente para pipetas ó porta pipetas

Para colocar y esterilizar las pipetas, de aluminio o acero inoxidable de tamaño adecuado. Ocasionalmente, las pipetas pueden ser encrueltas individualmente en papel Kraft para la esterilización.

Hilo de nylon o alambre

Para la fijación del plumero de gasa en el lugar de muestras.

Guantes quirúrgicos o descartables.

Máscaras quirúrgicas asépticas.

Membranas de éster de celulosa

Mezcla de nitrato Y acetato de celulosa con porosidadde 0,22 μm y 0,45 μm (previamente estériles ó autocla. Deben ser de buena cualidad, repretando una retención total de las bacterias una velocidad de filtración adecuada.

Rollo de gasa o atadura de crepé (hospitalar)

Debe tener aproximadamente 23 cm de ancho.

Bolsa plástica

Debe ser de plástico transparente, grueso e resistente, con capacidad de 20 litros (usado en la toma de muestra con plumero de gasa).

Bolsa plástica autoclavable

Con capacidad de 20 litros.

Papel aluminioPapel "Kraft"Pinzas

De acero inoxidable con puntas romas.

Propipeta e pera de succiónRejilha de amiantoTermómetrosTijeras

De acero inoxidable de punta fina

Trípode

11. BIBLIOGRAFIA

AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION. Microbiological examination of water. In: Standard Methods for the Examination of water and wastewater, 17^a ed., Washington, APHA, AWWA, WPCF, 1989, parte 9000.

BARUA, D. & BURROWS, W. - Cholera - William B. Saunders Company. Philadelphia, 1974.

BAUMANN, P.; FURNISS, A.L. & LEE, J.V. Genus I Vibrio. In: BRIEG, N.R. & HOLT J.G. (eds.). Bergey's Manual of Systematic Bacteriology Vol. 1, Baltimore, Williams & Wilkins, 1984, p. 518-538.

BIER, O.: Bacteriologia e Imunologia, 22^a ed., São Paulo, Melhoramentos, 1982, p. 535 - 542.

BOLETIM EPIDEMIOLÓGICO - Cólera em 1970. Ministério da Saúde - Centro de Investigações Epidemiológicas. Vol. (ANO) III, Nº 18, semanas nºs. 35 e 36, 1971.

BOLETIM EPIDEMIOLÓGICO - A cólera e outras vibrioses. Ministério da Saúde - Fundação SESP - Divisão de Epidemiologia Estatística e Informação. Vol. (ANO) VI 15 - semanas 29 e 30, 1974.

BOLETIM EPIDEMIOLÓGICO - La situación del cólera en las Américas. Organización Panamericana de Saúde, 12 (1), 1991, 24 p.

CETESB - Prova de adequabilidade biológica da água destilada para fins microbiológicos. São Paulo, 1985 (Norma Técnica L5.215, 1^a revisão).

CETESB - Lavagem, preparo e esterilização de materiais em laboratório de microbiologia. São Paulo, 1986 (Norma Técnica M1.001, 1^a revisão).

CETESB - Controle de qualidade de meios de cultura. São Paulo, 1987. (Norma Técnica L5.216).

CETESB - Guia de Coleta e Preservação de Amostras de Água. São Paulo, 1988, 150 p.

COLWELL, R.R.; WEST, P.A.; MANEVAL, D.; REMMERS, E.F.; ELLIOT, E.L.; CARLSON, N.E. Ecology of pathogenic vibrios in Chesapeake Bay. In: VIBRIOS in the enviroment. Ed. R. R. Colwell, New York, John Wiley, 1984, p 367-387.

DIFCO LABORATORIES. Difco manual: dehydrated culture media and reagents for microbiology, 10 ed. Detroit, 1984, 1155 p.

FARMER III, J.J.; MICKMANN-BRENNER, F.W. & KELLY, M.T. Vibrio. In: LENNETTE, E.H. et alli (eds). Manual of Clinical Microbiology, 4^a ed, Washington D.C., American Society for Microbiology, 1985, p. 282-301.

FEACHEM, R.G.; BRADLEY, D.J.; GARELICK, H. & MARA, D.D.: Sanitation and Disease - Health Aspects of Excreta and Wastewater Management, Chichester, John Wiley & Sons, 1983, p. 297-325.

FELSENFELD, O. - A review of recent trends in cholerae research and control. BWHO., 34: 161 - 195, 1966.

GUIDELINES FOR CHOLERAЕ CONTROL - Genebra, WHO, (1974 - 1975) notas p. 98, 123 e 222.

HOFER, E. Métodos de isolamento e identificação de Vibrio cholerae. Rio de Janeiro, Fundação Instituto Oswaldo Cruz, 1974.

MARTINS, M.T. Ecologia de Vibrio cholerae no ecossistema aquático. Tese de Livre Docência. Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, São Paulo, 1988, 222p.

MARTINS, M.T. et alii. Occurrence of V. cholerae O:1 non toxigenic in Wastewaters from São Paulo, Brazil. Wat. Sci. Tech., 363-366, 1991.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria nacional de Vigilância Sanitária. Comissão Nacional de Controle da Cólera. Cólera, 1991, 3ª edição, 30 p.

World Health Organization - Cholera - The epidemic in Peru Part.I. Weekly Epidemiological Record, nº 9, 01 march 1991.

World Health Organization - Cholera - The epidemic in Peru Part II. Weekly Epidemiological Record, nº 10, 08 March 1991.

AGRADECIMIENTOS

Nuestros agradecimientos a Marina Tereza Torres Rodrigues, Maria Isabel González e Maria Angelica Mondaca, por la colaboración en la traducción para el español, y a Seleida Barbosa Estevam e Lucimara Gomes de Souza, por el excelente trabajo de datilografía.

ANEXO

TABLA 5 A 11

TABLA 5

SOBREVIVÊNCIA DE *V.cholerae* EM ALIMENTOS Frutas e Vegetais

ALIMENTO	T.A. ^a	4° C
Abacaxi	2-3 d	1 s
Banana	3-5 d	1-2 s
Laranja	1 d	1-14 d
Pepino	5-7 d	1-2 s
Tomate	1-2 d	5-16 d
Batata cozida	5-7 d	2 s
Brócoli cozido	1-2 d	2-3 d
Cenoura cozida	1 s	2-3 s
Feijão preto cozido	2-3 d	5-7 d
Milho cozido	1 d	1 d
Tapioca cozida	5-7 d	2-3 s

a: 28-30 °C / 65-70 % U.R.

TABLA 6

SOBREVIVÊNCIA DE *V.cholerae* EM ALIMENTOS

Carnes e Pescados

ALIMENTO	T.A. ^a	4° C
Carne crua	1-2 d	5-7 d
Carne cozida	3-7 d	1-2 s
Salsicha	1 d	1 d
Camarão	1-2 d	1-3 d
Peixes e Moluscos	2-4 d	4-9 d

a: 28-30 °C / 65-70 % U.R.



TABLA 7

SOBREVIVÊNCIA DE *V.cholerae* EM ALIMENTOS

Leite e Derivados

ALIMENTO	T.A. ^a	4°C
Leite cru	1-3 s	3-4 s
Manteiga	1 s	1-2 s
Queijo	1 s	1-2 s
Sorvete	5-7 d	3-4 s

a: 28-30 °C / 65-70 % U.R.

Feachem *et al* - Sanitation and Disease, 1983

TABLA 8
SOBREVIVÊNCIA DE *V.cholerae* EM BEBIDAS

BEBIDA	T.A. ^a	4°C
Café	1 d	1-2 d
Chá	2-3 d	1 s
Cerveja	1 h	1 h
Coca-cola	4 h-1 d	2 d
Limonada	5-7 d	2-3 s
Gelo	-	4-5 s

a: 28-30 °C / 65-70 % U.R.

TABLA 9

SOBREVIVÊNCIA DE *V.cholerae* EM ÁGUAS

AUTOR(ES)/ANO	TIPO DE ÁGUA	SOBREVIVÊNCIA(DIAS)
Felsenfeld/ 1965	poço raso	7,5 (clássico) 19,3 (el tor)
Neogy/ 1965	água (pH=6,4-6,6)	1 a 8
Panditt et al/ 1967	poço	18 a 51
Pesigan et al/ 1967	mar poço profundo	10 a 13 13
Konchady et al/ 1969	poço, rio e lagoa	5
Lemar et al/ 1979	pântano	3 a 48

TABLA Nº 10

SOBREVIVÊNCIA DE Vibrio cholerae EN ÁGUA DE MAR (IN NATURA)

<u>Vibrio cholerae</u>	Água de Mar	Temperatura	sobrevivência
El Tor $1,5 \times 10^5$	agua costeras próximos a la fuente de agua dulce	21-31°C	6 dias
El Tor 10^5	Sema y Col. (1979)	4°C 30°C 32°C a luz do sol	>58 dias >58 dias 5 dias
El Tor 10^6	Persigan y col. (1967)	5-10°C 30-32°C luz do sol	58-60 dias 10-13 dias 10-11 dias
Clássico	Pollitzer (1959) revisión de vários es- tudios realizados en tre 1885 y 1920	Verão Inverno - 4°C Temp. amb. 37°C	7-17 dias 47 dias 7-47 dias 9-27 dias 7-41 dias 3-12 dias

FONTE: FEACHEM, R.G. et alii. Sanitation and Disease health
Aspects of Excreta and Wastewater Management. John Wiley &
Sons, 1983.

SOBREVIVÊNCIA DE *V.cholerae* EM SUPERFÍCIES

AUTOR(ES)/ANO	TIPO DE MATERIAL	SOBREVIVÊNCIA (DIAS)
Gohar & Makkawi/ 1948	algodão e roupas	5 a 7
Shousha/ 1948	dinheiro	3
Fesenfeld/ 1965	papel utensílios de metal	2 a 3 1 a 2
Pesignan et al/ 1967	copos de vidro faca doméstica	0,17 (4 horas) 2

CETESB - CIA. DE TECNOLOGIA E SANEAMENTO AMBIENTAL
BIBLIOTECA