1. **OBJETIVO**

Establecer las actividades necesarias para determinar la presencia/ausencia de *Vibrio cholerae.,* en muestras de agua marina y/o estuarina, mediante la técnica de filtración por membrana empleando la metodología descrita en el Standard Methods for the examination of water and wastewater (SM) 9260H “modificado”.

1. **ALCANCE**

Este procedimiento es aplica para el análisis microbiológico de *Vibrio cholerae,* en aguas marinas y/o estuarinas.

1. **GLOSARIO**

**Cólera:** Enfermedad bacteriana intestinal agu­da de tipo secretor cuyo agente causal es *Vibrio cholerae* serotipo O1 u O139 toxigénico. Se caracteriza por comienzo repentino, generalmente sin fiebre. La enterotoxina producida por *Vibrio cholerae* O1 provoca el escape de enormes cantidades de líquido y electrolitos hacia la luz del intestino, lo cual produce rápidamente una di­arrea acuosa y profusa sin dolor, vómitos ocasionales, deshidratación rápida, acidosis, calambres y choque circulatorio. La deshidratación puede llevar a la muerte si los casos no son tratados oportunamente.

**Patógeno:** Entidad biológica capaz de producir una enfermedad infecciosa en un huésped (humano, animal, vegetal, etc.).

***Vibrio*:** Bacilo Gram negativo, anaerobio facultativo, con un solo flagelo polar, perteneciente a la familia *Vibrionaceae* que habita en agua marina, estuarina, en los intestinos de animales como peces, maricos, entre otros. Algunas especies de este género son patógenas.

1. **DOCUMENTOS DE REFERENCIA**

* APHA, AWWA, WEF. (2017) Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. 23th edition. 9260H.
* Brooks, Geo F., y I.Brooks, G. (2010). Jawetz, Melnick y Adelberg Microbiología médica. 25e. México: McGraw-Hill Interamericana.
* GUÍA PARA LA VIGILANCIA POR LABORATORIO DE *Vibrio cholerae.* Instituto Nacional de Salud. Gobierno de Colombia.
* Vigilancia y Análisis del Riesgo en Salud Pública. Protocolo de Vigilancia en Salud Pública CÓLERA. Instituto Nacional de Salud, 2017. Versión 02.
* M5-00-FOR-047 Control Consumo de Reactivos.
* M5-00-FOR-074 Control Medio de Cultivo.
* M5-00-FOR-088 Aseguramiento de la calidad de ensayos microbiológicos.
* M5-00-FOR-096 Confirmación de *Vibrio Cholerae spp*
* M5-00-FOR-097 Confirmación Bioquímica Cepas Presuntivas de *Vibrio Cholerae*
* M5-00-MAN-001 Sistema de Gestión de Laboratorios.
* M5-00-PRO-032 Evaluación de la Productividad y Selectividad de Medios de Cultivo.
* M5-00-PRO-074 Determinación de pH.

1. **CONDICIONES GENERALES**

**5.1. Generalidades**

Las especies del género *Vibrio* son bacilos gramnegativos que tienen una amplia distribución en la naturaleza. En ambientes marinos y estuarinos, los *Vibrios* se aíslan comúnmente del sedimento, la columna de agua, el plancton y los mariscos. Los mariscos que a menudo albergan especies de *Vibrio* incluyen mariscos bivalvos (ostras, almejas y mejillones), cangrejos, camarones y langostinos. Los *Vibrios* son bacilos aerobios curvos y móviles que poseen un flagelo polar. La mayor parte de las especies del género *Vibrio* son halotolerantes y el cloruro de sodio (NaCl) a menudo estimula su multiplicación. El género está constituido por más de 60 especies. Todas las especies son principalmente acuáticas y su distribución depende de la temperatura, la concentración de sodio Na+, el contenido de nutrientes del agua y de las plantas y animales presentes. Se ha encontrado que sólo once especies causan infecciones en humanos, provocando diarrea o infecciones extra-intestinales, pero algunas como *V. cholerae* pueden causar ambas. La mayoría de las infecciones están relacionadas con la exposición al agua o a través del consumo de peces y mariscos. Cualquier cepa de *V. cholerae* puede causar diarrea, pero solo los serogrupos *O1* y *O139* han causado pandemias de cólera.

*V. cholerae*, produce colonias convexas, lisas y redondas que son opacas y granulosas bajo luz transmitida. *V. cholerae* y la mayor parte de los demás *Vibrios*, se multiplican bien a una temperatura de 37°C en muchas clases de medios que contienen sales minerales y asparagina como fuentes de carbono y nitrógeno. *V. cholerae* se multiplica bien en agar de tiosulfato-citrato-bilis-sacarosa (TCBS, thiosulfate citrate bile sucrose), produce colonias amarillas que son fácilmente visibles sobre el fondo verde oscuro del agar. Los *Vibrios* son oxidasa positivos, lo que los distingue de las bacterias gram negativas entéricas. Es característico que los *Vibrios* se multipliquen a un pH muy alto (8,5 a 9,5) y que rápidamente sean destruidos por ácido. Por tanto, los cultivos que contienen hidratos de carbono fermentables se vuelven estériles con rapidez.

Se han descrito cientos de métodos para el aislamiento e identificación de especies de *Vibrios*, se encuentra disponible una extensa lista de productos comerciales y sus fuentes. Los métodos más nuevos basados en sondas de ADN y PCR son extremadamente prometedores como procedimientos de investigación, pero tendrán una aplicación limitada para análisis de agua a menos que estén disponibles como un kit comercial listo para usar.

**5.2. Equipos**

* Cabina de bioseguridad clase II
* Incubadora 35 ± 2 ºC
* Unidad de filtración
* Bomba de vacío
* Mechero
* Balanza analítica
* Autoclave
* Refrigerador
* Congelador
* Transferopipetas 20µL a 200 µL y/o 100 a 1000 µL
* pHmetro
* Plancha de agitación y calentamiento

**5.3. Materiales**

* Puntas para micropipetas
* Cajas de petri pequeñas y grandes estériles
* Laminas porta-objeto
* Gradillas tubos de 10 mL
* Asa en argolla y recta
* Auxiliar de pipeteo
* Beaker (100, 200 y 1000mL)
* Cinta indicadora de esterilización
* Erlenmeyer con salida lateral
* Filtros de membrana estériles de acetato de celulosa con cuadricula y diámetro de poro de 0,45 µm
* Frascos schott (100, 250, 500 mL y 1L)
* Mecheros
* Papel Kraft
* Pinzas lisas de acero inoxidable
* Puntas para micropipetas
* Recipiente para material contaminado
* Probeta (100 mL)
* Tubos de conservación

**5.4 Reactivos**

* Agua de peptona alcalina
* Agar TCBS (Tiosulfato, Citrato, Sales biliares, Sacarosa)
* Agar BHI
* CromoAgar
* Desoxicolato sódico al 0,5%
* Tirillas de oxidasa (Bactident Oxidasa)
* NaCl
* Pruebas Bioquímicas APIE BIOMERIEUX
* Skin Milk
* Aceite mineral
* Cary Blair
* Ampolla de control biológico
* Agua destilada (estéril o no, según medio)
* Cepa *Vibrio cholerae* del Instituto Nacional de Salud
* Cepa control negativo *Escherichia coli ATCC* 25922

**Nota:** La cantidad de reactivos utilizados para la preparación de las soluciones se reportan en el formato de registro M5-00-FOR-047 Control Consumo de Reactivos.

**5.5. Recomendaciones**

* Esterilizar las pinzas por flameo o sumergir en alcohol al 96% (asegurar que no queden residuos de alcohol) cada vez que se tome un nuevo filtro de membrana bien sea para sacarlo del empaque y ubicarlo en la unidad de filtración o para retirarlo de esta y ubicarlo en la superficie del agar.
* El *Vibrio cholerae* es un agente de nivel de riesgo tipo II (riesgo moderado para el personal y el ambiente) por lo que debe ser manejado por personal técnicamente calificado, que debe utilizar sus elementos de protección personal, tales como guantes de nitrilo, usar delantal de bioseguridad o bata desechables sobre la bata de uso diario, gafas de bioseguridad y tapabocas. De igual manera, velar por la limpieza y desinfección del espacio y material utilizado para los ensayos y la disposición adecuada del material descartable.
* Siguiendo las buenas prácticas de laboratorio se deben asegurar las condiciones adecuadas de limpieza, desinfección y orden antes de realizar un ensayo empleando el desinfectante rutinario según el plan.
* Esterilizar la cabina de bioseguridad encendiendo la lámpara UV durante 15 minutos antes de ingresar material y dejar circular el aire por 5 minutos antes de empezar a trabajar.
* Una vez hecha la esterilización, ubicar todo el material dentro de la cabina (se recomienda no colocar más de 10 muestras, por tanto, reservar las muestras restantes en la nevera mientras procesa las que se encuentran dentro de la cabina) y marcar los materiales y cajas de Petri involucradas, de forma que incluya la codificación asignada a la muestra y parámetro.

1. **DESCRIPCIÓN DE ACTIVIDADES**

**6.1. Procedimiento**

### **6.1.1. Filtración de las muestras y enriquecimiento no selectivo**

* + Armar la unidad de filtración previamente estéril con la bomba de vacío (si no se encuentra estéril exponer a la luz de la lámpara UV por 10 minutos antes del uso en el procedimiento del ensayo).
  + Usando pinzas estériles, situar el filtro de membrana estéril (con la cuadricula hacia arriba) sobre la base de la unidad de filtración. Posteriormente, colocar el embudo y asegúrelo.
  + Homogenizar bien la muestra agitando vigorosamente (25 veces hacia arriba y hacia abajo) Si la botella de muestra no tiene suficiente espacio para una mezcla adecuada, vierta la muestra en un recipiente estéril más grande.
  + Adicione 100 mL de muestra en el embudo de filtración y aplique vacío con el fin de hacer pasar la muestra a través de la membrana con tamaño de poro de 0,45 µm (realice diluciones de ser necesario).
  + Si se presenta el caso en el que se se filtre menos o 10 mL de la muestra, añadir aproximadamente 10 mL de agua de dilución tamponada estéril o agua peptona estéril al 0,1% al embudo y luego añadir la muestra seguida de otros 25 a 50 mL de agua de dilución antes de filtrar.
  + Observar que todo el líquido haya atravesado el filtro de membrana. Luego, con el filtro aun en su lugar, enjuagar la superficie interior del embudo con 3 porciones adicionales de 20 - 30 mL de agua peptonada estéril 0,1% o agua tamponada de dilución estéril.
  + Una vez finalizado el proceso de enjuague y filtración, desbloquear y desacoplar el embudo de la unidad de filtración.
  + Retirar el filtro de membrana utilizando pinzas estériles y depositarlo en 50 o 100 mL de Agua Peptona Alcalina al 1% y agitar suavemente sin que el filtro quede adherido a las paredes del frasco.
  + Incubar por un periodo de 6 a 8 horas a 35 ± 2 ºC.
  + Realizar de la misma manera el procedimiento para las muestras restantes, si las hay. Se deben realizar enjuagues con agua destilada estéril entre cada serie de filtración así como la exposición de los embudos a luz UV por 10 minutos, para evitar la contaminación cruzada por arrastre (si se usa el mismo embudo para filtrar varias muestras).

**Nota:** Enriquecer una muestra de agua en un medio de crecimiento no inhibidor antes del enriquecimiento selectivo puede ser útil. Es posible que las células "lesionadas" o "estresadas" puedan revivirse mediante el enriquecimiento previo en medios especiales.

Se pueden usar varios medios de caldo no selectivos, incluyendo agua de peptona alcalina, agua de peptona, agua peptona tamponada, caldo BHI y caldo marino. En general, es aconsejable evitar los medios que contienen D-glucosa (como el caldo de soja tríptico) porque los productos finales ácidos de la fermentación de glucosa pueden reducir el pH a niveles muy bajos, lo que resulta en la muerte rápida de las especies de *Vibrio* deseadas.

### **6.1.2. Aislamiento selectivo**

* Pasado el tiempo de incubación, introducir un asa de aro de inoculación en el medio de enriquecimiento y sembrar por agotamiento sobre la superficie de Agar TCBS.
* Incubar las placas de Petri con Agar TCBS sembradas invertidas por 18 a 24 horas a 35 ± 2 °C.
* Pasado este tiempo, observar en el Agar TCBS las colonias presuntivas de *Vibrio spp* que se caracterizan por tener un tamaño de 2-3 mm de diámetro con textura lisa, amarillas (como resultado de la fermentación de la sacarosa) y ligeramente aplanadas, con el centro opaco y la periferia translucida.
* De las colonias con las características anteriormente mencionadas, tomar mínimo entre 3 - 10 colonias y sembrar individualmente en CromoAgar, incubar por 18 a 24 horas a 35 ± 2 °C. Seleccionar las colonias identificadas como típicas para *Vibrio cholerae*, las cuales se caracterizan por tener una coloración verde azulado a azul turquesa.
* Del paso anterior, tomar mínimo entre 3-10 colonias y sembrar individualmente en agar BHI, Tripticasa de Soja o Agar nutritivo con 0,5% de NaCl por agotamiento en estrías e incubar a 35 ± 2 ºC de 18 a 24 horas, con el fin de purificar los aislamientos presuntivos.

### **6.1.3. Diagnóstico rápido y presuntivo cepas presuntivas *Vibrio cholerae***

* A partir del Agar BHI, Tripticasa de Soja o Agar nutritivo con 0,5% de NaCl realizar la prueba de oxidasa:
  + Si dispone de goteros con reactivo oxidasa, en una placa de vidrio adicionar 3 a 4 gotas y con un asa plástica pequeña, tomar una colonia y mezclar con el reactivo. La prueba es positiva si el color de la mezcla es azul violeta o púrpura.
  + Si dispone de tirillas con reactivo oxidasa, tomar una colonia y ponerla en la tirilla que contiene el reactivo de oxidasa y observar la reacción de 10 a 30 segundos. Si se observa una coloración de purpura a azul en la tirilla, la reacción se considera positiva. *Vibrio cholerae*, se caracteriza por ser oxidasa positivo.
* Para el mismo cultivo realizar la prueba de la cuerda con desoxicolato de sodio al 0,5%. Tomar una colonia emulsificarla sobre una lámina portaobjeto con ayuda de un asa en una gota de suspensión de desoxicolato de sodio 0.5%. La prueba es positiva cuando se forme una cuerda mucoide al introducir lentamente el asa de inoculación en la suspensión. La actividad lítica del ácido desoxicólico sobre la pared de los *Vibrios* favorece la liberación del ADN que al contacto con el ácido forma una suspensión adherente o mucoide.

**Nota**: Si el laboratorio cuenta con kits comerciales para la identificación bioquímica de cepas presuntivas de *Vibrio cholerae*, continuar con el paso 6.1.5. En caso contrario, saltar al paso 6.1.6.

### **6.1.4. Pruebas bioquímicas de identificación mediante kits comerciales**

* Las pruebas bioquímicas que se realizaran corresponden pruebas bioquímicas estandarizadas y miniaturizadas (API 20E BIOMERIEUX).
* Inicialmente realizar la suspensión de una colonia pura tomada del agar BHI en solución salina al 0,85%, hasta lograr una turbidez entre 0,800 a 1,00 de absorbancia (teniendo en cuenta la escala de McFarland tubo 3).
* Tomar una de las galerías de API 20E e iniciar la inoculación de los pozos y cúpulas con la muestra de la siguiente manera:
* ADH, LDC, ODC, URE y H2S: llenar el tubo con la muestra y la cúpula con aceite mineral.
* CIT, VP y GEL: llenar tubo y cúpula con la muestra.
* Las pruebas restantes llenar únicamente el pozo.
* Incubar a 35+/-2ºC por 18 a 24 horas.
* Pasado el tiempo de incubación, adicionar los reactivos de lectura correspondientes según indicaciones del fabricante y realizar la lectura de cada prueba.
* La lectura se registra en el formulario que traen las pruebas de fábrica. Inicialmente se diligenciará con prueba negativa o positiva, seguido una valoración numérica la cual arrojará un perfil numérico que resulta de la suma de los valores positivos de las pruebas bioquímicas.
* Este perfil numérico se ingresa en el software APILAB (Bio-mériux) el cual indicara género y especie.

Se registra en el formato M5-00-FOR-097 Confirmación Bioquímica Cepas Presuntivas de *Vibrio Cholerae*. A continuación, se relacionan las pruebas bioquímicas realizadas y su resultado positivo o negativo.

Tabla 1.

Pruebas bioquímicas

| **PRUEBA** | **SUSTRATO** | **RESULTADO** | |
| --- | --- | --- | --- |
| **POSITIVO** | **NEGATIVO** |
| ONG | Ortonitrofenol-βgalactósido | Incoloro | Amarillo |
| ADH | Arginina | Amarillo | Rojo/naranja |
| LDC | Lisina | Amarillo | Naranja |
| ODC | Ornitina | Amarillo | Rojo/naranja |
| CIT | Citrato sódico | Amarillo/Verde pálido | Azul-verde/verde |
| H2S | Tiosulfato sódico | Incoloro/grisáceo | Depósito negro |
| URE | Urea | Amarillo | Rojo/naranja |
| TDA | Triptófano | Amarillo | Marrón oscuro |
| IND | Indol | Amarillo | Anillo rojo |
| VP | Piruvato sódico | Incoloro | Rosado/rojo |
| GEL | Gelatina de Kohn | No ha difusión de pigmento negro | Difusión de pigmento negro |
| GLU | Glucosa | Azul/azul-verdoso | Amarillo |
| MAN | Manitol | Azul/azul-verdoso | Amarillo |
| INO | Inositol | Azul/azul-verdoso | Amarillo |
| SOR | Sorbitol | Azul/azul-verdoso | Amarillo |
| RHA | Ramnosa | Azul/azul-verdoso | Amarillo |
| SAC | Sacarosa | Azul/azul-verdoso | Amarillo |
| MEL | Melibiosa | Azul/azul-verdoso | Amarillo |
| AMY | Amigdalina | Azul/azul-verdoso | Amarillo |
| ARA | Arabinosa | Azul/azul-verdoso | Amarillo |

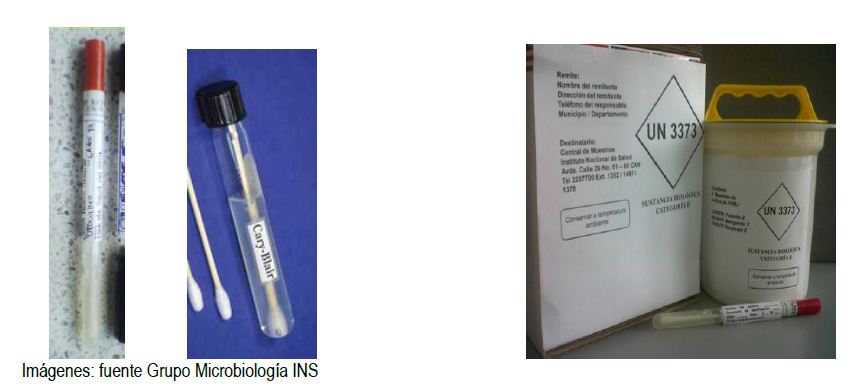
### **6.1.5. Confirmación e identificación de *Vibrio cholerae* para serotipos O1 y O139 por pruebas moleculares.**

* Una vez identificadas las cepas presuntivas de *Vibrio cholerae* por técnicas fenotípicas y pruebas bioquímicas enviar las muestras al laboratorio del Instituto Nacional de Salud (INS) para confirmar por técnica molecular PCR, tal como se indica en el paso 6.1.7.

### **6.1.6. Envío cepas presuntivas de *Vibrio cholerae* al Instituto Nacional de Salud**

Luego del procesamiento de muestras, obtención de aislamientos presuntivos de *Vibrio cholerae*., y antes de 48 h, se realiza él envió de los aislamientos al Instituto Nacional de Salud-INS en Bogotá, así:

* Realizar una siembra masiva del aislamiento presuntivo en un medio no selectivo (Agar BHI o Agar Tripticasa soya) e incubar de 18 a 24 horas a 35 ± 2 ºC.
* Recoger con el escobillón que viene en el paquete el crecimiento bacteriano (Medio de transporte Cary Blair).
* Insertar el escobillón en el medio y cerrar el tubo herméticamente.
* Rotular el tubo con la identificación del aislamiento y enviar al Laboratorio del INS junto con la ficha de envío.
* Enviar en sistema triple embalaje de acuerdo a las normas IATA.
* Las muestras y aislamientos enviados al Grupo de Microbiología del INS son: Sustancias Infecciosas Categoría B, “muestra para diagnóstico”.



**Figura 1.** Envío cepas presuntivas de *Vibrio cholerae* al Instituto Nacional de Salud

**Nota:** Todo aislamiento presuntivo de *Vibrio cholerae*., debe ser enviado con la Carta de solicitud del ensayo y la Ficha de envío de aislamientos Programas EDA del INS, vigente y debidamente diligenciado.

Los resultados obtenidos, se registran en el M5-00-FOR-096 Confirmación de *Vibrio Cholerae spp.*

### **6.1.7. Control de calidad**

El presente procedimiento involucra el seguimiento de parámetros que no invaliden los resultados o indiquen falsos positivos. Por lo anterior, el laboratorio asegura la calidad a través de procedimientos e instructivos específicos como:

* M5-00-PRO-015 Mantenimiento de las Condiciones Ambientales y Requisitos Técnicos del Laboratorio.
* M5-00-PRO-016 Limpieza y Desinfección de la Planta Física del Laboratorio.
* M5-00-PRO-021 Lavado especial de material.
* M5-00-PRO-022 Trazabilidad y Aseguramiento de la Calidad de los Resultados de Ensayo y Calibración.
* M5-00-PRO-030 Recepción, Resuspensión, Transferencia, Manejo y Disposición de Cepas de Referencia.
* M5-00-PRO-031 Preparación de Medios de Cultivo y Reactivos.
* M5-00-PRO-032 Evaluación de la Productividad y Selectividad de Medios de Medios de Cultivo.

Adicional a los procedimientos e instructivos mencionados, se realizan los siguientes controles de calidad propios del ensayo de *Vibrio cholerae*. Los resultados obtenidos se registran en el M5-00-FOR-096 Confirmación de *Vibrio Cholerae spp*.

* **Esterilidad del medio de cultivo Agua Peptona Alcalina, Agar TCBS, CromoAgar y Agar BHI, Tripticasa de Soja o Agar nutritivo con 0,5% de NaCl:** Una vez preparado y servido el medio de cultivo estéril en frascos, Erlenmeyer o cajas de Petri, incubar el 10% del lote preparado de acuerdo a las condiciones y especificaciones de las muestras. Posterior a la incubación se realiza lectura esperando ausencia de crecimiento y demostrando la correcta preparación y esterilidad del medio de cultivo.
* **Esterilidad del Agua Peptona 0.1%:** Proceder a filtrar 100 mL de agua peptona 0.1% estéril a través de un filtro de membrana. Al finalizar la filtración retirar con pinza estéril el filtro de membrana y tratarlo como a una muestra. Realizar la lectura del filtro de membrana cuyo resultado adecuado debería ser la ausencia de crecimiento demostrando las condiciones de esterilidad.
* **Esterilidad del filtro de membrana:** Retirar un filtro de membrana con pinza estéril y depositar en 50 o 100 mL de Agua Peptona Estéril al 1% y tratar como una muestra. Incubar de acuerdo a las condiciones y especificaciones de las muestras. Terminado el periodo de incubación proceder a realizar la lectura del filtro de membrana cuyo resultado adecuado debería ser la ausencia de crecimiento que demuestre las condiciones de esterilidad del filtro de membrana.
* **Control Positivo:** Realice una dilución de la cepa control positivo de manera que el crecimiento por membrana este presente. Filtrar la dilución y tratar como una muestra. Realizar la lectura evidenciando el crecimiento de colonias típicas y confirmando bioquímicamente.
* **Controles negativos**: Realice una dilución de la cepa control negativo *Escherichia coli ATCC* 25922 de manera que el rango de crecimiento por membrana sea de 20 - 60 UFC”. Filtrar la dilución y tratar como una muestra. Realizar la lectura evidenciando el crecimiento de colonias atípicas.
* **Condiciones ambientales**: Durante el desarrollo del análisis y procesamiento de las muestras, se registran los datos de temperatura y humedad que evidencian en el momento, llevar registro en el M5-00-FOR-088 Aseguramiento de Calidad Ensayos Microbiológicos. Así mismo, se llevan a cabo los controles de aire por exposición en placa de agar Plate Count y OGYE.
* **Temperatura de incubación**: Se debe llevar control de la temperatura de incubación del ensayo registrándola 2 veces al día, en el formato M5-00-FOR-037 Carta de Control Temperatura de Equipos.

Los resultados obtenidos se registran en elFormato M5-00-FOR-088 Aseguramiento de Calidad Ensayos Microbiológicos.

**6.2. Cálculos**

Los resultados de confirmación de las cepas serán enviados por el Instituto Nacional de Salud en el marco del Convenio Interadministrativo celebrado entre el ministerio de Defensa Nacional – Dirección General Marítima y el Instituto Nacional de Salud y serán incorporados al informe de ensayo del Laboratorio de la Dimar.

**6.3. Flujograma y descripción de actividades**

Tabla 2.

Flujograma y descripción de actividades para el aislamiento e identificación de cepas presuntivas de *Vibrio cholerae.*

| **No** | **FLUJOGRAMA** | **DESCRIPCIÓN** | **RESPONSABLE** | **REGISTRO** |
| --- | --- | --- | --- | --- |
|  | INICIO | INICIO |  |  |
| 1 | Filtrar | Filtrar 100mL de muestra a través de membrana con tamaño de poro de 0,45 µm. | Analista de laboratorio | M5-00-FOR-042 |
| 2 | Retirar | Retirar el filtro y depositarlo en 100 mL de agua peptonada alcalina. | Analista de laboratorio | No aplica |
|  | A |  |  |  |
|  | A |  |  |  |
| 3 | Incubar | Incubar a 35 ± 2 °C por un periodo de 6 a 8 horas. | Analista de laboratorio | No aplica |
| 4 | Incubar | Realizar siembra en Agar TCBS e incubar a 35 ± 2 °C de 18 a 24 h. | Analista de laboratorio | No aplica |
| 5 | NO  1  ¿Colonias amarillas?  SI | ¿Presencia de colonias amarillas? | Analista de laboratorio | No aplica |
| 6 | Observar | Observar crecimiento, seleccionar típicas y sembrar en CromoAgar e incubar a 35 ± 2 °C de 18 a 24 h. | Analista de laboratorio | M5-00-FOR-096 |
| 7 | Sembrar | Realizar siembra en uno de los siguientes medios: Agar BHI, Tripticasa de Soja, Agar nutritivo con 0,5% de NaCl. Incubar a 35 ± 2 ºC de 18 a 24 h. | Analista de laboratorio | No aplica |
| 8 | Observar | Observar características de crecimiento en los medios empleados para confirmación. | Analista de laboratorio | M5-00-FOR-096 |
| 9 | Confirmar | Realizar prueba de oxidasa y cuerda | Analista de laboratorio | M5-00-FOR-097 |
| 10 | Confirmar | Realizar pruebas bioquímicas kits comerciales | Analista de laboratorio | M5-00-FOR-097 |
| 11 | Enviar INS | Sembrar en medio de transporte Cary Blair las cepas presuntivas-confirmadas y enviar al INS | Analista de laboratorio | Carta de solicitud del ensayo y la Ficha de envío de aislamientos Programas EDA del INS |
| 12 | 1  Reportar | Generar el informe de resultados de la prueba y entregarlo al usuario. | Analista de laboratorio | Informe |
|  | FIN | FIN |  |  |

1. **FACTORES DEL AMBIENTE, LA SEGURIDAD Y SALUD EN EL TRABAJO**

Toda actividad rutinaria y no rutinaria, interna o externa, en todas las áreas y unidades de trabajo; que se desarrolle dentro del cumplimiento de la misión de la Dimar, debe realizarse teniendo en cuenta el cuidado al medio ambiente y las personas, es por esto que se analizaron cada una de las actividades de la entidad y se determinaron los aspectos e impactos ambientales que se generan; los peligros y riesgos asociados; y las necesidades para establecer los controles, desde la gestión ambiental y de la seguridad y salud en el trabajo.

Por tal razón, en desarrollo de cada actividad se debe tener en cuenta la identificación de peligros, evaluación, valoración de riesgos y determinación de controles, los aspectos e impactos ambientales, el contexto normativo que se debe cumplir, los programas de gestión y procedimientos seguros de trabajo, para lograr mejorar las condiciones de trabajo, minimizar cualquier riesgo en el desarrollo de las actividades y realizar un adecuado manejo y optimización de los recursos, para prevenir, mitigar, controlar y compensar de ser necesario el impacto generado por la actividad realizada.

**7.1. Factores del ambiente**

La Dimar identificó los aspectos ambientales relacionados a las actividades, y sus impactos ambientales asociados, como resultado total o parcial de los aspectos ambientales, en todas sus dependencias; lo cual se observa en la ***Matriz de Identificación de Aspectos e Impactos Ambientales*** para una consulta del nivel de detalle requerido y determinar el programa ambiental que lo minimiza.

**7.2. Factores de la seguridad y salud en el trabajo**

La Dimar identificó, evalúo y valoró los factores de riesgos presentes en los procesos de la Entidad, para establecer mecanismos que los eliminen o mitiguen a los límites tolerables en todas sus dependencias; lo cual se observa en la ***Matriz de Identificación de Peligros, Evaluación, Valoración de Riesgos*** y determinación de controles por dependencia para una consulta del nivel de detalle requerido, detallando las medidas de intervención que lo minimice.

1. **Anexos**

No aplica para este procedimiento