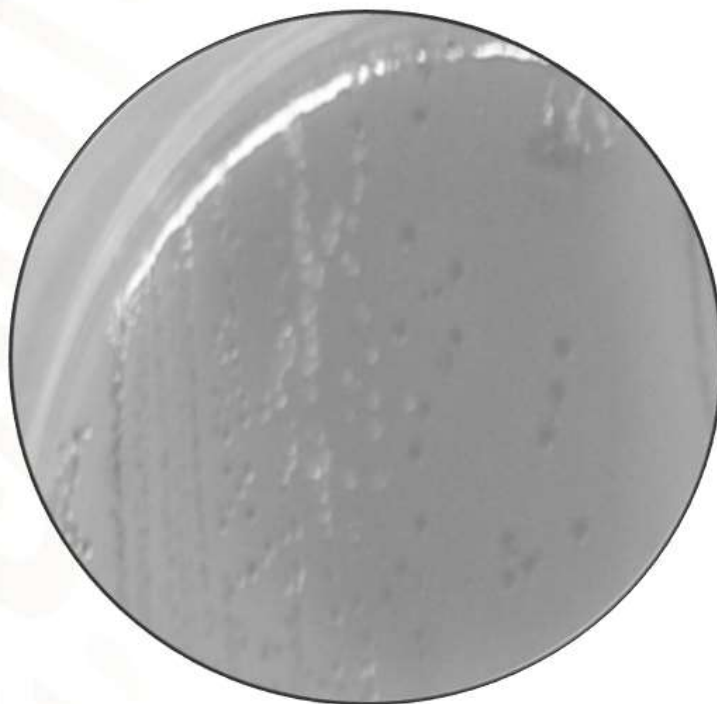




**SALUD**  
SECRETARÍA DE SALUD

Subsecretaría de Prevención y Promoción de la Salud  
Dirección General de Epidemiología

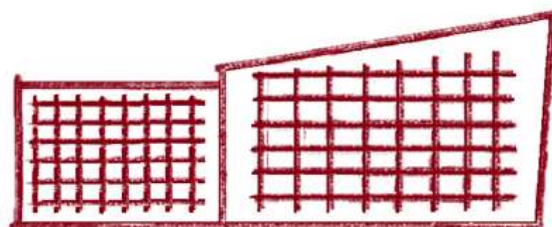
# Lineamientos para la Vigilancia por Laboratorio de la Enfermedad Diarreica Aguda Bacteriana



**80**

1939-2019  
ISET-InDRE

**InDRE**



Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos  
"Dr. Manuel Martínez Báez"



# LINEAMIENTOS PARA LA VIGILANCIA POR LABORATORIO DE LA ENFERMEDAD DIARREICA AGUDA BACTERIANA

Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos  
“Dr. Manuel Martínez Báez”

2018

PRIMERA EDICIÓN. 2018

INDRE

ESTE DOCUMENTO FUE AVALADO POR LOS REPRESENTANTES DE LAS INSTITUCIONES QUE CONFORMAN EL GRUPO TÉCNICO INTERINSTITUCIONAL DEL COMITÉ NACIONAL PARA LA VIGILANCIA EPIDEMIOLÓGICA (CONAVE).

TODOS LOS DERECHOS RESERVADOS CONFORME A LA LEY

© INDRE-SECRETARÍA DE SALUD

SE PERMITE LA REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL SI SE CITA LA FUENTE: "INSTITUTO DE DIAGNÓSTICO Y REFERENCIA EPIDEMIOLÓGICOS "DR. MANUEL MARTÍNEZ BÁEZ". LINEAMIENTOS PARA LA VIGILANCIA POR LABORATORIO DE LA ENFERMEDAD DIARREICA AGUDA BACTERIANA, INDRE. MÉXICO: SECRETARÍA DE SALUD; 2018"

COLECCIÓN PUBLICACIONES TÉCNICAS DEL INDRE

INSTITUTO DE DIAGNÓSTICO Y REFERENCIA EPIDEMIOLÓGICOS "DR. MANUEL MARTÍNEZ BÁEZ" FRANCISCO P MIRANDA 177, COL. LOMAS DE PLATEROS, D.T. ÁLVARO OBREGÓN, C. P. 01480, CIUDAD DE MÉXICO.

LA EDICIÓN ESTUVO A CARGO DE: DR. JOSÉ ALBERTO DÍAZ QUIÑÓNEZ

EL DISEÑO ESTUVO A CARGO DE: DR. JUAN FRANCISCO ROMÁN PEDROZA

IMPRESO EN MÉXICO. PRINTED IN MEXICO

PARA DUDAS SOBRE EL CONTENIDO DE ESTE LINEAMIENTO PONERSE EN CONTACTO CON LA COORDINACIÓN DE LA RED NACIONAL DE LABORATORIOS DE SALUD PÚBLICA PARA LA VIGILANCIA DE LA ENFERMEDAD DIARREICA AGUDA BACTERIANA A TRAVÉS DEL CORREO: [alma.buelna@salud.gob.mx](mailto:alma.buelna@salud.gob.mx) CON EL ASUNTO: REVISIÓN DE LINEAMIENTOS

# SECRETARÍA DE SALUD

## **Dr. Jorge Alcocer Varela**

SECRETARIO DE SALUD

## **Dra. Asa Cristina Laurell**

SUBSECRETARIA DE INTEGRACIÓN Y DESARROLLO DEL SECTOR SALUD

## **Dr. Hugo López-Gatell Ramírez**

SUBSECRETARIO DE PREVENCIÓN Y PROMOCIÓN DE LA SALUD

## **Dr. José Luis Alomía Zegarra**

DIRECTOR GENERAL DE EPIDEMIOLOGÍA

INSTITUTO DE DIAGNÓSTICO Y REFERENCIA EPIDEMIOLÓGICOS  
"DR. MANUEL MARTÍNEZ BÁEZ"  
INDRE

**Biól. Irma López Martínez**

DIRECTORA DE DIAGNÓSTICO Y REFERENCIA

**Mtra. Lucía Hernández Rivas**

DIRECTORA DE SERVICIOS Y APOYO TÉCNICO

**Lic. Adriana Castro Cabrera**

SUBDIRECTORA DE OPERACIÓN

**Biól. Norma Angélica Montes Colima**

JEFE DEL DEPARTAMENTO DE BACTERIOLOGÍA

**Mtra. Dalia Viviana Vallejo Jauffred**

JEFE DEL DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA MOLECULAR Y VALIDACIÓN DE TÉCNICAS

**Mtra. Judith Estévez Ramírez**

JEFE DEL DEPARTAMENTO DE CONTROL DE MUESTRAS Y SERVICIOS

**Mtro. Hiram Olivera Díaz**

JEFE DEL DEPARTAMENTO DE ENFERMEDADES EMERGENTES Y URGENCIAS

**Dra. Clara Gorodezky Lauferman**

JEFE DEL DEPARTAMENTO DE INMUNOLOGÍA

**Mtra. Mónica Salas García**

JEFE DEL DEPARTAMENTO DE VIROLOGÍA

**Dra. Gabriela Meneses Ruiz**

JEFE DEL DEPARTAMENTO DE PARASITOLOGÍA

## GRUPO DE TRABAJO

**Q.B. ALMA GUADALUPE BUELNA ROMERO**

JEFA DEL LABORATORIO DE CÓLERA Y ENTEROBACTERIAS  
COORDINADORA DE LA RED NACIONAL DE LABORATORIOS DE SALUD PÚBLICA PARA LA  
VIGILANCIA DEL CÓLERA Y ENTEROBACTERIAS

**Q.B.P. GUADALUPE ADRIANA GALICIA NICOLÁS**

JEFA DE LABORATORIO DE BACTERIOLOGÍA MOLECULAR

**Q.F.B. CATALINO DAMIÁN PERALTA**

JEFE DE LABORATORIO DE MEDIOS DE CULTIVO

**Q.B.P. IRMA HERNÁNDEZ MONROY**

APOYO TÉCNICO DE LA DIRECCIÓN GENERAL ADJUNTA DEL INDRE

**DR. JUAN FRANCISCO ROMÁN PEDROZA**

APOYO TÉCNICO DEL INDRE

## **AGRADECIMIENTOS**

### **LABORATORIO DE CÓLERA Y ENTEROBACTERIAS**

PABLO AGUILERA PÉREZ  
NORMA CECILIA CÁRDENAS NAVA  
MIRIAM CHANTES BENJUME  
MARÍA TERESA CRUZ GASPAR  
GUILLERMINA GUTIÉRREZ COGCO  
EDITH MONTIEL VÁZQUEZ  
RICARDO MORALES JIMÉNEZ  
GUADALUPE OLIVARES DELGADO  
AUSENCIO DAVID RAMOS HERNÁNDEZ  
DIEGO ALONSO SÁNCHEZ NIETO

### **LABORATORIO DE BACTERIOLOGÍA MOLECULAR**

EUSTOLIA ALEJANDRA MORENO ESCOBAR  
JUDITH GABRIELA RAMÍREZ BARRIOS  
MARÍA DOLORES TÉLLEZ SAUCEDO  
JESÚS MANUEL TENORIO LARA

### **LABORATORIO DE MEDIOS DE CULTIVO**

LEONOR BENÍTEZ VELÁZQUEZ  
PEDRO DORANTES RODRÍGUEZ  
JOSÉ LUIS ESCOBAR BÁRCENAS  
VÍCTOR MANUEL GONZÁLEZ CONTRERAS  
MARÍA GEORGINA JAIME ANZALDO  
MARÍA LOURDES MUÑOZ OSORIO  
ALEXIS ISRAEL OLMEDO GUILLÉN  
JAVIER DE JESÚS PIÑÓN ORTEGA  
IGNACIO RAMÍREZ BAUTISTA  
RUBÉN RAMOS BAILÓN  
ROGELIO RODRÍGUEZ ALCÁNTARA  
ARMANDO RODRÍGUEZ OLVERA  
AURORA SÁNCHEZ CABRERA



## CONTENIDO

CONTENIDO	9
INTRODUCCIÓN	11
ANTECEDENTES	12
Red Nacional de Laboratorios de Salud Pública	12
Red Nacional de Laboratorios de Salud Pública para la Vigilancia de la Enfermedad Diarreica Aguda Bacteriana	13
MARCO LEGAL	15
DEFINICIONES OPERACIONALES	18
OBJETIVOS	20
Objetivo General	20
Objetivos Específicos	20
RED NACIONAL DE LABORATORIOS DE SALUD PÚBLICA PARA LA VIGILANCIA DEL CÓLERA Y ENTEROBACTERIAS	21
Organización de la Red Nacional de Laboratorios de Salud Pública para la Vigilancia Cólera y Enterobacterias	21
FUNCIONES DE LOS INTEGRANTES DE LA RED NACIONAL DE LABORATORIOS DE SALUD PÚBLICA PARA LA VIGILANCIA DEL CÓLERA Y ENTEROBACTERIAS	21
Funciones de los laboratorios a nivel local o jurisdiccional	21
Funciones de los Laboratorios Estatales de Salud Pública	22
Funciones del Laboratorio Nacional de Referencia	24
TOMA, MANEJO Y ENVÍO DE MUESTRA	25
Toma de muestra	26
Conservación	26
Envío y transporte de la muestra	26

Recepción de muestras y cepas en el LESP	27
Recepción de cepas en el InDRE	28
Criterios de Aceptación y Rechazo para muestras o cepas:	28
ALGORITMO DE DIAGNÓSTICO	30
CALIDAD EN EL SERVICIO DIAGNÓSTICO	31
PROGRAMA DE EVALUACIÓN EXTERNA DEL DESEMPEÑO	33
CRITERIOS PARA LA LIBERACIÓN DE PRUEBAS DIAGNÓSTICAS EN LA RED NACIONAL DE LABORATORIOS DE SALUD PÚBLICA PARA LA VIGILANCIA DEL CÓLERA Y ENTEROBACTERIAS	35
BANCO DE MATERIAL BIOLÓGICO EN EL InDRE	36
ANEXOS	39
Anexo I: Bioseguridad	39
Anexo II: Técnica de Diagnóstico	40
Anexo III: Interpretación y resultados de las pruebas	60
Anexo IV: Resultados de pruebas de aglutinación	66
Anexo V: Preparación, Uso y Garantía de Calidad de los Medios de Cultivo	68
Anexo VI: Colección de cultivos bacterianos	80
Anexo VII: Apoyo a la Vigilancia Sanitaria del <i>V. cholerae</i> . <i>V. parahaemoliticus</i> y <i>Salmonella spp.</i>	105
Anexo VIII: Imágenes	¡Error! Marcador no definido.

# INTRODUCCIÓN

Las enfermedades diarreicas constituyen un problema de salud pública. Son una de las principales causas de mortalidad y morbilidad de la niñez en el mundo y generalmente son consecuencia de la exposición a alimentos y agua contaminados. En países industrializados, los niños menores de tres años presentan en promedio tres episodios de diarrea al año. Esta alta incidencia hace necesario que la población esté sujeta a vigilancia epidemiológica para identificar de forma oportuna eventos que signifiquen un riesgo a la salud de la población y con base en los hallazgos, tomar decisiones para las acciones de planeación, control y prevención de las enfermedades sujetas a vigilancia.

En México, las acciones del Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica (SiNaVE), cuentan con el apoyo de la Red Nacional de Laboratorios de Salud Pública (RNLSP) para llevar a cabo las actividades de vigilancia de manera oportuna y uniforme para el diagnóstico de cólera, salmonelosis, shigelosis y otras enfermedades bacterianas transmitidas por alimentos.

El presente documento establece los lineamientos de operación para la vigilancia basada en los hallazgos de laboratorio de la enfermedad diarreica aguda bacteriana incluyendo las funciones por niveles, la toma, manejo y envío de muestras, la metodología para el análisis de muestras (métodos tradicionales y métodos moleculares) y la evaluación del desempeño, así como, los estándares de calidad del laboratorio en la RNLSP.

## ANTECEDENTES

### Red Nacional de Laboratorios de Salud Pública

La Red Nacional de Laboratorios de Salud Pública (RNLSP) es el conjunto de laboratorios con objetivos específicos que permiten unificar métodos de diagnóstico, criterios de interpretación de resultados, transferencia tecnológica, generación de conocimiento y formación de recursos humanos que garanticen procedimientos técnico-administrativos que produzcan información de laboratorio útil para la vigilancia epidemiológica y la operación de los programas preventivos.

Es el soporte técnico-científico útil para la vigilancia epidemiológica, genera información de calidad para la toma oportuna de decisiones, a través de la confirmación mediante estudios de laboratorio en muestras biológicas.

La RNLSP está integrada por el Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos “Dr. Manuel Martínez Báez” (InDRE) como órgano rector de la red, los Laboratorios Estatales de Salud Pública (LESP) y los Laboratorios de Apoyo a la Vigilancia Epidemiológica (LAVE). Se encuentra estructurada en tres niveles: nacional, estatal y local o sus equivalentes para otras instituciones. El nivel nacional está representado por el InDRE como Laboratorio Nacional de Referencia (LNR).

Tiene fundamento legal en el reglamento Interior de la Secretaría de Salud y la Norma Oficial Mexicana NOM-017-SSA2-2012, para la vigilancia epidemiológica y se encuentra definida en los Criterios de Operación para la Red Nacional de Laboratorios de Salud Pública Componente Vigilancia Epidemiológica.

En la Red Nacional de Laboratorios de Salud Pública se cuenta con el diagnóstico de cólera y enterobacterias.

## Red Nacional de Laboratorios de Salud Pública para la Vigilancia de la Enfermedad Diarreica Aguda Bacteriana

En 1939 fue creado en México el Instituto de Salubridad y Enfermedades Tropicales (ISET) y al interior de éste el Centro de Salmonelas. Años más tarde, en 1971, se incorporan nuevos diagnósticos para dar origen al Laboratorio de Bacteriología Entérica como una necesidad para tener un sitio destinado al estudio de patógenos entéricos con fines de apoyo a la vigilancia epidemiológica. Este nuevo laboratorio inició su trabajo analítico con el aislamiento e identificación de *Shigella dysenteriae* tipo 1 y en 1972 tuvo una participación muy importante en el estudio de los brotes de tifoidea.

Debido a la inminente llegada al Continente Americano de la séptima pandemia de cólera que inició en 1961 en Indonesia, en 1990 se fundó en el entonces Instituto Nacional de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos (INDRE) el Laboratorio de Cólera para identificar al agente etiológico en los casos compatibles con este padecimiento.

A partir de junio de 1991, cuando se reportó el primer caso de cólera en México, se creó paulatinamente la Red Nacional de Laboratorios de Salud Pública en apoyo a la vigilancia epidemiológica y desde entonces, el Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos (InDRE) coordina a los laboratorios que realizan la búsqueda de patógenos entéricos como *Vibrio cholerae*, *Salmonella spp.* y *Shigella spp.* En 1992 se creó el Laboratorio de Bacteriología Entérica II y se dio inicio a la realización de estudios moleculares para *Escherichia coli* y posteriormente para *Vibrio cholerae*.

En la actualidad, el Laboratorio de Cólera y Enterobacterias del InDRE es el Laboratorio Nacional de Referencia (LNR) para la Red Nacional de Laboratorios de Salud Pública, en la Vigilancia del Cólera y Enterobacterias tales como *Vibrio cholerae*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Salmonella spp* y *Shigella spp.* Realiza pruebas diagnósticas, serológicas, de sensibilidad a los antimicrobianos y pruebas moleculares de referencia para la búsqueda de genes de toxigenicidad, determinación de patotipos o el análisis de clonas. Proporciona los reactivos para la caracterización de *Vibrio cholerae* y la identificación de grupo de *Salmonella spp* y *Shigella spp*, imparte cursos de capacitación y capacitaciones en servicio al personal del sector salud y lleva a cabo el aseguramiento de la calidad de la red a través de programas de evaluación del desempeño.

A partir del 2012, se inició con la transferencia de las pruebas moleculares para búsqueda de genes de toxigenicidad de *Vibrio cholerae* (*ctx*, *ace* y *zot*) y *Vibrio parahaemolyticus* (*tdh* y *trh*) a la Red Nacional de Laboratorios Estatales de Salud Pública (Figura 1)



PRUEBA	2012	2013	2014	2015	2016	META
<b>Aislamiento e identificación</b>	31 LESP	31 LESP	31 LESP	31 LESP + 1 LAVE	31 LESP + 1 LAVE	32 + CDMX
<b>Pruebas moleculares (PCR)</b>	0	0	2	5	6	32 + CDMX

**Figura 1.** Estados de la República que están liberados para la búsqueda de genes de toxigenicidad por PCR para *Vibrio cholerae* y *Vibrio parahaemolyticus* en color azul. Actualmente 31 LESP y 1 LAVE (LCE-IMSS) realizan el aislamiento y la identificación de agentes causantes de Enfermedad Diarreica Aguda Bacteriana (*Salmonella spp*, *Shigella spp*, *Vibrio cholerae* y *Vibrio parahaemolyticus*).

A nivel internacional, la Organización Mundial de la Salud (OMS) ha desarrollado una estrategia creando una red de vigilancia de las Enfermedades Transmitidas por Alimentos (ETA). El objetivo primario de esta

red es apoyar la vigilancia de los patógenos transmitidos por alimentos, con base en el orden de prioridades y de acuerdo al impacto y severidad de enfermedad que ocasiona cada uno de los patógenos asociados. Este proyecto es coordinado por la Organización Panamericana de Salud y la Organización Mundial de la Salud (OPS-OMS), la Administración Nacional de Laboratorios e Institutos de Salud (ANLIS) “Dr. Carlos G. Malbran” de Argentina a través del Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas y los Centros para el Control y Prevención de Enfermedad (*Centers for Disease Control and Prevention*: CDC, por sus siglas en inglés).

## MARCO LEGAL

### Constitución Política de los Estados Unidos Mexicanos

- Constitución Política de los Estados Unidos Mexicanos. Artículo 4. Diario Oficial de la Federación 05/02/1917, Última Reforma D.O.F. 15/02/2012.

### Leyes

- Ley General de Salud, México. Nueva Ley publicada en el Diario Oficial de la Federación el 7 de febrero de 1984. Última reforma publicada D.O.F. 07/06/2012.
- Ley Federal de Responsabilidades Administrativas de los Servidores Públicos. D.O.F. 13/03/2012. Última reforma en D.O.F. 28/05/2009.
- DECRETO por el que se expide la Ley General del Sistema Nacional Anticorrupción; la Ley General de Responsabilidades Administrativas, y la Ley Orgánica del Tribunal Federal de Justicia Administrativa. D.O.F. 18/07/2016.
- DECRETO por el que se expide la Ley General de Protección de Datos Personales en Posesión de Sujetos Obligados. D.O.F. 13/12/2016.

### Reglamentos

- Reglamento Interior de la Secretaría de Salud. México. Publicado en el D.O.F. 19/01/2004. Última reforma D.O.F. 10/01/2011.
- Reglamento Sanitario Internacional (2005) 2da edición. Ginebra Suiza 2008. Organización Mundial de la Salud.

### Normas Oficiales Mexicanas

- Norma Oficial Mexicana NOM-017-SSA2-2012, Para la vigilancia epidemiológica, publicada en el Diario Oficial de la Federación el 19 de febrero de 2013.
- Norma Oficial Mexicana NOM-007-SSA3-2011. Para la organización y funcionamiento de los laboratorios clínicos. D.O.F. 27/03/2012
- Norma Oficial Mexicana NOM-035-SSA3-2012. En materia de información en salud
- Norma Oficial Mexicana NOM-016-SSA2-2012, Para la vigilancia, prevención, control, manejo y tratamiento del cólera. D.O.F. 17/06/2015.
- Norma Oficial Mexicana NOM-253-SSA1-2012, Para la disposición de sangre humana y sus componentes con fines terapéuticos. D.O.F. 26/10/2012.
- Norma Oficial Mexicana NOM-052-SEMARNAT-2005, que establece las características, el procedimiento de identificación, clasificación y los listados de los residuos peligrosos. D.O.F. 22/10/1993; Modificación D.O.F. 23/06/2006.
- Norma Oficial Mexicana NOM-018-STPS-2015, Sistema armonizado para la identificación y comunicación de peligros y riesgos por sustancias químicas peligrosas en los centros de trabajo. D.O.F. 09/10/2015
- Norma Oficial Mexicana NOM-065-SSA1-1993 Que establece las especificaciones sanitarias de los Medios de Cultivo.
- ISO 9000:2000 COPANT/ISO 9000:2000. NMX-CC-9000-IMNC-2000 Sistemas de gestión de la calidad – Fundamentos y vocabulario.
- NCh 3162.c2008 Microbiología de los alimentos para consumo humano y animal – Guía para la preparación y producción de medios de cultivo – Parte 1: Directrices generales para el aseguramiento de la calidad para la preparación de medios de cultivo en el laboratorio. Traducción al español de la norma ISO/TS 11133-1:2000 Microbiology of food and animal feeding stuffs – Guidelines on preparation and production of culture media – Part 1: General guidelines on quality assurance for the preparation of culture media in the laboratory.
- NCh 3162.c2008 Microbiología de los alimentos para consumo humano y animal – Guía para la preparación y producción de medios de cultivo – Parte 2: Guía práctica para los ensayos de rendimiento de medios de cultivo. Traducción al español de la norma ISO/TS 11133-2.c2008 Microbiology of food and animal feeding stuffs – Guidelines on preparation and production of culture media – Part 2: Practical guidelines on performance testing of culture media.

## Planes y Programas



- Plan Nacional de Desarrollo 2013-2018. Diario Oficial de la Federación, DOF: 20/05/2013.
- Programa Sectorial de Salud 2013-2018. Secretaría de Salud. Diario Oficial de la Federación DOF: 12/12/2013.
- Programa de Acción Específico 2013-2018. Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica México: Secretaría de Salud; 2013.
- Programa de Acción Específico: Prevención y Control de la Brucelosis 2013-2018. Centro Nacional para la Prevención y Control de Enfermedades. México: Secretaría de Salud; 2013.

## Lineamientos y Manuales

- Manual de Procedimientos Estandarizados para la Vigilancia Epidemiológica del Cólera; Dirección General de Epidemiología. México: Secretaría de Salud; 2012.
- Manual de Procedimientos Estandarizados para la Vigilancia Epidemiológica de la Enfermedad Diarreica Aguda mediante la Estrategia de Núcleos Trazadores (NuTraVE), Dirección General de Epidemiología. México: Secretaría de Salud 2012.
- Criterios de Operación para la Red Nacional de Laboratorios de Salud Pública Componente Vigilancia Epidemiológica; Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos “Dr. Manuel Martínez Báez”, InDRE. México: Secretaría de Salud; 2015.
- Lineamientos para programas de evaluación externa del desempeño de la Red Nacional de Laboratorios de Salud Pública; Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos “Dr. Manuel Martínez Báez”, InDRE. México: Secretaría de Salud; 2015.
- Lineamientos para la Gestión del Riesgo Biológico; Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos “Dr. Manuel Martínez Báez”, InDRE. México: Secretaría de Salud; 2015.
- Lineamientos para el reconocimiento a la competencia técnica de los laboratorios que apoyan a la vigilancia epidemiológica; Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos, “Dr. Manuel Martínez Báez”, InDRE. México: Secretaría de Salud; 2015.

- Manual para la toma, envío y recepción de muestras para diagnóstico; Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos “Dr. Manuel Martínez Báez”, InDRE. México: Secretaría de Salud; 2015

## DEFINICIONES OPERACIONALES

Para realizar las acciones de vigilancia epidemiológica de la Enfermedad diarreica aguda bacteriana y cólera se deben considerar las definiciones operacionales establecidas en el *Manual de Procedimientos Estandarizados para la Vigilancia Epidemiológica del Cólera* y el *Manual de Procedimientos Estandarizados para la Vigilancia Epidemiológica de la Enfermedad Diarreica Aguda por medio de la estrategia de Núcleos Trazadores de Vigilancia Epidemiológica (NuTraVE)*. Las definiciones operaciones de interés son:

- **Definición de caso EDA sin deshidratación:** Paciente que presenta menos de cuatro evacuaciones líquidas en 24 horas, con o sin presencia de vómito, sin pérdida de peso y sin signos clínicos de deshidratación.
- **Caso de EDA moderada:** Paciente de cualquier edad que demande atención médica por presentar cuadro diarreico con cinco o más evacuaciones en 24 horas, cuya evolución sea menor a cinco días y que presente datos de deshidratación moderada: Inquietud o irritabilidad, ojos hundidos (llanto sin lágrimas), mucosas secas, sed aumentada, polipnea o taquipnea, taquicardia, llenado capilar mayor a tres segundos y menor de cinco, oliguria.
- **Caso de EDA grave:** Paciente de cualquier edad que demande atención médica por presentar cuadro diarreico con cinco o más evacuaciones en 24 horas, cuya evolución sea menor a cinco días y que tenga dos o más de los siguientes signos o síntomas: Vómito de más de cinco en 24 horas, cuadro disentérico, temperatura mayor a 38 °C, datos de deshidratación moderada a grave; letargo o inconsciencia, incapacidad para beber, pulso débil o no perceptible, llenado capilar igual o mayor de cinco segundos.
- **Caso probable de cólera, a todo enfermo de diarrea que presente las siguientes características:**
  - En localidades donde no se ha demostrado (o se desconoce) la circulación de *V. cholerae* O1 o de *V. cholerae* O139 TOXIGÉNICOS

se considerará caso probable a todo enfermo de diarrea que tenga cinco años de edad o más, que presente cinco evacuaciones o más en 24 horas y cuyo cuadro clínico no sea mayor a cinco días de evolución (“regla de los cinco”).

- o Que En localidades donde se ha demostrado la circulación de *V. cholerae* O1 o de *V. cholerae* O139 TOXIGÉNICOS en los últimos 90 días o en las comunidades ubicadas dentro del área de los cercos epidemiológicos, se considerará como caso probable, a toda persona con diarrea de no más de cinco días de evolución, independientemente de su edad

- **Brote de cólera**, a la presencia de dos o más casos confirmados relacionados epidemiológicamente entre sí o la presencia de un caso en un área donde no se ha demostrado la existencia previa del padecimiento.
- **Caso confirmado de cólera**, a todo enfermo en el que se aísle, mediante cultivo bacteriológico, en materia fecal o contenido gastrointestinal, *Vibrio cholerae* O1 y/o O139 toxigénicos, así como los que por asociación epidemiológica se determinen.
- **Caso hospitalizado por cólera**, a toda persona a la que se brinde atención médica en un establecimiento de salud, fijo o móvil y que permanezca en el mismo 24 horas y en quien se aísle o demuestre *Vibrio cholerae* O1 y/o O139 toxigénicos, mediante cultivo bacteriológico.
- **Contacto**, a toda persona que en el hogar, lugar de trabajo o sitio de reunión haya compartido, preparado o manipulado alimentos, agua o hielo o que haya realizado cambio de pañal de los casos sospechosos o confirmados en los cinco días previos al inicio de la enfermedad.
- **Defunción por cólera**, al fallecimiento de un caso confirmado que ocurra hasta dos semanas posteriores al inicio de las manifestaciones clínicas y en cuyo certificado de defunción aparezcan como causa básica o asociada los siguientes términos: gastroenteritis o diarrea más deshidratación; gastroenteritis; diarrea más desequilibrio hidroelectrolítico.
- **Enfermedad del cólera**, la infección intestinal aguda causada por el *Vibrio cholerae* O1 y O139 toxigénicos que se transmite al hombre por la ingesta de agua y alimentos contaminados por este microorganismo.

- **Fuente de infección de cólera**, a todo alimento, agua, bebida, hielo, heces o vómito donde se aísle *Vibrio cholerae* O1 y/o *Vibrio cholerae* O139 toxigénicos.
- **Portador**, a la persona que alberga al agente infeccioso en ausencia de enfermedad clínica aparente y en quien se aísle *Vibrio cholerae* O1 y/o O139 toxigénicos en materia fecal o contenido gastrointestinal.

## OBJETIVOS

### Objetivo General

Establecer y dar a conocer a la Red Nacional de Laboratorios de Salud Pública para la Vigilancia del Cólera y Enterobacterias (RNLSP-CoEn), los procedimientos estandarizados de diagnóstico, control de calidad y referencia de las muestras, para un diagnóstico oportuno y de calidad, que garantice la confiabilidad diagnóstica.

### Objetivos Específicos

- Garantizar la calidad del diagnóstico del cólera y enterobacterias para:
  - Detectar la circulación de los principales agentes bacterianos causantes de enfermedad diarreica aguda.
  - Realizar la caracterización de los aislamientos de *Salmonella spp*, *Shigella spp*, *Vibrio cholerae* y *Vibrio parahaemolyticus*.
  - Mantener la vigilancia de la circulación de *Vibrio cholerae* O1 y *Vibrio cholerae* O139.
  - En situaciones de brote, realizar estudios de electroforesis de campos pulsados (PFGE) del agente bacteriano relacionado.
  - Ser el documento guía para el soporte técnico-científico de la Red Nacional de Laboratorios de Salud Pública para la Vigilancia del Cólera y enterobacterias.

### Ámbito de aplicación

El presente documento aplica a todos los laboratorios que forman parte de la Red Nacional de Laboratorios de Salud Pública para la Vigilancia del Cólera y Enterobacterias.

## RED NACIONAL DE LABORATORIOS DE SALUD PÚBLICA PARA LA VIGILANCIA DEL CÓLERA Y ENTEROBACTERIAS

Como LNR a nivel federal, es responsabilidad del Laboratorio de Cólera y Enterobacterias del InDRE la coordinación de la RNLSP-CoEn, siendo el órgano rector de la Red para el diagnóstico, referencia, capacitación, actualización y evaluación de la competencia técnica.

### Organización de la Red Nacional de Laboratorios de Salud Pública para la Vigilancia Cólera y Enterobacterias

La Red Nacional de Laboratorios de Salud Pública para la Vigilancia del Cólera y Enterobacterias está constituida actualmente por:

- El Laboratorio de Cólera y Enterobacterias como LNR, integrado al Departamento de Bacteriología del InDRE.
- Los Laboratorios Estatales de Salud Pública.
- 1 Laboratorio de Apoyo a la Vigilancia Epidemiológica: Laboratorio Central de Epidemiología del Instituto Mexicano del Seguro Social
  - Laboratorios locales para el diagnóstico en el caso de la vigilancia de la enfermedad diarreica aguda por medio de la estrategia de Núcleo Trazador para la Vigilancia Epidemiológica (NuTraVE-EDA).

## FUNCIONES DE LOS INTEGRANTES DE LA RED NACIONAL DE LABORATORIOS DE SALUD PÚBLICA PARA LA VIGILANCIA DEL CÓLERA Y ENTEROBACTERIAS

### Funciones de los laboratorios a nivel local o jurisdiccional

- Recepción e identificación de las muestras recibidas.
- Realizar los estudios analíticos para el diagnóstico de enfermedad diarreica aguda bacteriana de importancia en salud pública de acuerdo

con los lineamientos pre-establecidos: aislamiento e identificación de *Vibrio cholerae*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Salmonella spp* y *Shigellas pp*.

- Realizar la búsqueda de *Escherichia coli* sólo en situación de brote o cuando se trate de menores de cinco años que presenten evacuaciones con sangre y moco: enviar de 3 a 5 aislamientos de cada paciente al InDRE.
- Participar como mecanismo de apoyo técnico, proporcionando la información relacionada y requerida por el programa de Cólera y urgencias de su jurisdicción sanitaria.
- Reportar los casos encontrados diariamente a la instancia correspondiente.
- Aplicar las recomendaciones del nivel estatal.
- Cumplir con el programa de aseguramiento de calidad indirecto que establece el nivel estatal.
- Participar en la evaluación del desempeño que organice el nivel estatal.
- Recibir capacitación y asesoría del nivel estatal.

## Funciones de los Laboratorios Estatales de Salud Pública

### Para el diagnóstico

- Realizar los estudios analíticos básicos para el diagnóstico de enfermedad diarreica aguda bacteriana de importancia en salud pública: aislamiento e identificación de *Vibrio cholerae*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Salmonella spp* y *Shigella spp*.
- Realizar la búsqueda de *Escherichia coli* sólo en situación de brote o cuando se trate de menores de cinco años que presenten evacuaciones con sangre y moco: enviar de 3 a 5 aislamientos en cualquier caso, de cada paciente al InDRE.
- Asegurar la calidad del diagnóstico en el laboratorio de cólera y enterobacterias mediante el envío al InDRE para referencia de:
  - 100% de los aislamientos de *Vibrio cholerae* O1 aislados de seres humanos.
  - 100% de los aislamientos de *Vibrio parahaemolyticus* aislados de seres humanos.

- 100% de los aislamientos de *Salmonella spp* aisladas de seres humanos.
- 100% de los aislamientos de *Shigella spp.* aislados de seres humanos.
- 100% de los aislamientos de *Vibrio cholerae* NO O1 aislados de seres humanos.
- Emitir en tiempo y forma los resultados de los exámenes de laboratorio.
- Generar evidencia y notificar al órgano normativo estatal correspondiente los casos confirmados.
- Participar como mecanismo de apoyo técnico, proporcionando la información relacionada y requerida por el Programa de Cólera y Urgencias de su entidad federativa.

#### Para el monitoreo del desempeño

- Coordinar a los laboratorios locales que realicen el análisis de muestras para la vigilancia epidemiológica de EDA bacteriana.
- Asegurar que se lleven a cabo los procedimientos, métodos y técnicas estandarizadas.
- Seleccionar las muestras para referencia del área de influencia del LESP.
- Compilar las muestras de los laboratorios locales o jurisdiccionales y realizar el control de calidad indirecto de los mismos.
- Reportar inmediatamente las incongruencias encontradas.
- Realizar el análisis de la información generada.
- Recabar y analizar la información sobre la prestación de servicios de diagnóstico de los laboratorios locales para el aseguramiento de la calidad de la red.

#### Para el Programa de Evaluación Externa del Desempeño

- Participar en la evaluación del desempeño del InDRE, a través de los programas oficiales correspondientes.
- Realizar la evaluación del desempeño en los componentes de cólera y enterobacterias a los laboratorios locales.
- Generar la evidencia de la evaluación para la red y enviar copia de resultados al laboratorio evaluado y al InDRE.

- Organizar la información de estas actividades y proporcionarla cuando sea requerida por las instancias evaluadoras.

### Para capacitación

- Capacitar en el área de EDA Bacteriana al personal de los laboratorios locales y demás instituciones del Sector Salud que lo soliciten en su entidad de acuerdo con las necesidades detectadas para la participación en estrategias especiales de vigilancia como son los Núcleos Trazadores de Vigilancia Epidemiológica (NuTraVE) y Cólera.
- Detectar necesidades de capacitación de acuerdo a sus resultados en el Programa de Evaluación Externa del Desempeño, y solicitar al InDRE capacitación.

### Apoyo técnico

- Participar en las urgencias epidemiológicas en el área de su competencia.
- Colaborar y/o elaborar trabajos de investigación operativa que proporcione información prioritaria estatal, una vez que los protocolos sean aceptados por los comités de investigación.
- Apoyar con la preparación y/o evaluación de los reactivos que utilizan los integrantes de la red.

### Funciones del Laboratorio Nacional de Referencia

El laboratorio de Cólera y Enterobacterias del InDRE, como LNR es el órgano normativo para el diagnóstico del cólera y enterobacterias en México y entre sus funciones se encuentran:

- Realizar el análisis de muestras y confirmación inmediata de las cepas que por su naturaleza se consideren urgentes.
- Realizar la caracterización de los aislamientos de *Salmonella spp*, *Shigella spp*, *Vibrio cholerae* y *Vibrio parahaemolyticus* a través del estudio de características fenotípicas y genotípicas.
- Establecer los algoritmos de referencia y criterios de interpretación de resultados pre-establecidos.



- Realizar el aseguramiento de la calidad de la red mediante el Programa de Evaluación Externa del Desempeño a los laboratorios integrantes de la RNLSP-CoEn.
- Proveer capacitación en servicio para la formación de recursos humanos con base a las necesidades detectadas.
- Supervisar a los laboratorios integrantes de la RNLSP-CoEn.
- Proporcionar apoyo técnico a los laboratorios que lo requieran y lo soliciten.
- Realizar investigación operativa en apoyo a la vigilancia epidemiológica.
- Contribuir a la información de orden nacional en materia de diagnóstico, control de calidad, formación de recursos humanos e investigación en la vigilancia epidemiológica que coadyuve a la toma de decisiones en el control y prevención de la enfermedad en el marco del programa nacional de salud.

## TOMA, MANEJO Y ENVÍO DE MUESTRA

Las muestras de materia fecal se deben obtener en los primeros 5 días de cualquier enfermedad entérica a partir de la fecha de inicio de los síntomas, periodo en el que los agentes patógenos están en mayor número y con especial atención, antes de que se haya iniciado el tratamiento con antibiótico.

Una excepción a esta regla es el caso de las heces obtenidas de pacientes con enfermedad febril y se sospeche de fiebre tifoidea ya que el agente etiológico, *Salmonella typhi*, puede estar presente en las heces en mayor cantidad, entre la segunda y la tercera semana de la enfermedad por lo que si se sospecha de este padecimiento se debe tomar muestra para hemocultivo durante la primera semana de evolución.

### Precauciones universales

Todas las muestras para diagnóstico, confirmación o investigación en eventos de interés en salud pública serán consideradas potencialmente infecciosas, por lo que siempre se deben seguir las medidas de prevención de riesgos relacionados con la exposición a agentes biológicos, así como las recomendaciones del Manual de bioseguridad en el laboratorio de la Organización Mundial de la Salud (Ginebra, 2005).

Una muestra biológicamente adecuada se define como la muestra representativa del sitio de la lesión a investigar, en cantidad suficiente, colocada en un envase adecuado y limpio, identificada, conservada y transportada correctamente.

## Toma de muestra

El número de hisopos fecales o rectales que se tomen por paciente será igual al número de análisis que se realizarán.

Para la búsqueda de *Vibrio spp* se debe tomar un hisopo rectal y para enterobacterias se debe tomar otro, por lo que deberán enviarse dos hisopados fecales o rectales al laboratorio en medio de transporte de Cary Blair.

La toma de materia fecal se realiza con un hisopo estéril con punta de algodón, pudiendo ser hisopo fecal (obtenido a partir de una muestra directa de materia fecal), o bien mediante hisopo rectal, el cual se obtiene introduciendo el hisopo en el esfínter anal más de un centímetro y girando el hisopo, el cual debe salir manchado con materia fecal.

Cuando se trata de un cuadro característico de cólera, la muestra se toma directo de las heces en forma de agua de arroz. El hisopo se introduce en el tubo de Cary Blair, tapando bien el tubo e identificándolo al menos con el nombre del paciente y la fecha de la toma de la muestra.

## Conservación

Conservar las muestras a temperatura ambiente y ser remitidas al LESP o al InDRE en un periodo máximo de cinco días naturales. No congelar. Cuando la temperatura ambiente supere los 30 grados centígrados se recomienda mantener las muestras para su transporte en un ambiente fresco utilizando refrigerantes para asegurar la viabilidad en las muestras.

## Envío y transporte de la muestra

El transporte de las muestras diagnósticas y de agentes patógenos (cepas) se debe hacer en sistema básico de triple embalaje para reducir al mínimo el riesgo para los seres humanos, el medio ambiente y para proteger la viabilidad de los microorganismos. Las cepas deben ser enviadas en tubos herméticamente cerrados, con medio de cultivo Base de Agar Sangre (BAB) o algún otro medio apropiado que no contenga azúcares.

El sistema básico de triple embalaje se encuentra descrito en el *Manual para la toma, envío y recepción de muestras para diagnóstico*.

### Recepción de muestras y cepas en el LESP

Las muestras en medio de transporte Cary Blair y las cepas, en caso de haber sido registradas en alguna de las plataformas del Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica:

- EDA-NuTraVE o
- Cólera

Deben estar acompañadas con el formato de estudio de caso que se genera en la plataforma con todos los datos registrados.<sup>1</sup>

Las muestras en medio de transporte Cary Blair y las cepas, en caso de pertenecer al monitoreo del programa preventivo de Cólera, deben estar acompañadas del formato de estudio del programa.

Si la muestra no es recibida con alguno de estos formatos, debe estar acompañado de algún documento que contenga al menos los siguientes datos:

- Nombre del paciente,
- fecha de nacimiento,
- sexo,
- edad,
- CURP,
- nacionalidad,

---

<sup>1</sup> El registro de resultados en las plataformas del SINAVE se realizará únicamente cuando vengan acompañadas de dichos formatos. De lo contrario, el área de vigilancia epidemiológica deberá solicitar de manera oficial el registro del mismo en plataforma, especificando la ausencia del envío del formato junto con el envío de la muestra de manera inicial.

- dirección,
- fecha de inicio de síntomas,
- fecha de toma de muestra,
- fecha de envío de muestra,
- unidad notificante.

## Recepción de cepas en el InDRE

Las cepas enviadas al InDRE, en caso de haber sido registradas en alguna de las plataformas del Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica:

- EDA-NuTraVE o
- Cólera

Deben estar acompañadas con el formato de estudio de caso que se genera en la plataforma con todos los datos registrados<sup>2</sup>. Además deben estar acompañado del Formato único de envío de muestras biológicas al InDRE.

## Criterios de Aceptación y Rechazo para muestras o cepas:

### Aceptación:

- Las muestras o cepas deben estar perfectamente identificadas con el nombre del paciente o clave y con el formato de registro que se genera en las plataformas del Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica: EDA-NuTraVE y Cólera, cuando corresponden a un registro en dichas plataformas.
- En caso de pertenecer al monitoreo del programa preventivo de Cólera, deben estar acompañadas del *Formato único de envío de muestras biológicas* al InDRE disponible en *Manual para la Toma, Envío y Recepción de Muestras para Diagnóstico*
- Especificar el servicio de diagnóstico o referencia solicitado: NuTraVE-EDA, Cólera o el monitoreo del programa preventivo de Cólera.
- Las muestras deben enviarse en medio de transporte *Cary Blair*.

---

<sup>2</sup> El registro de resultados en las plataformas del SINAVE se realizará únicamente cuando vengan acompañadas de dichos formatos. De lo contrario, el LESP deberá solicitar de manera oficial el registro del mismo en plataforma, especificando la ausencia del envío del formato junto con el envío de la muestra de manera inicial.

- Las cepas deben enviarse en tubo de ensaye de 13 x 100 mm con tapón de rosca, en agar base sangre, sellados con parafilm y transportadas con el sistema básico de triple embalaje.
- Aquellas que se envíen al InDRE deben ir acompañadas del oficio de solicitud del servicio, dirigido a la Dirección General Adjunta del InDRE en atención al Laboratorio de Cólera y Enterobacterias especificando el servicio solicitado.

#### **Rechazo:**

- Muestras o cepas no identificadas con nombre del paciente o clave.
- Muestras o cepas mal identificadas donde el nombre del paciente o clave no coincidan con los listados en el oficio de solicitud del servicio o con los formatos antes mencionados.
- Muestras o cepas que no estén acompañadas de alguno de los formatos mencionados.
- Muestras o cepas donde el agar este seco, o que el tubo llegue roto, o mal sellados.
- O no cumplan con alguno de los criterios de aceptación antes mencionados.
- Muestras en medio de transporte Cary Blair caducado.
- Muestras congeladas.

#### **Muestras concesionadas**

Se considera muestra concesionada a aquella que se recibe en el laboratorio y que no cumple con alguno de los criterios de aceptación pero que por las características de evolución del paciente se considera una muestra de alto valor epidemiológico.

Cuando el laboratorio opta por procesar la muestra concesionada se debe asegurar que en el informe de resultados se indique la naturaleza del problema y se especifique que se requiere precaución cuando se interprete el resultado.

Para el diagnóstico por laboratorio de la cólera y enterobacterias se establece el algoritmo diagnóstico de la EDA bacteriana en la Figura 3.



Fig. 3. Algoritmo para el diagnóstico de EDA Bacteriana en la RNLSP-CoEn.

Clave de tabulador: 1B2547012, 1B25420020

## CALIDAD EN EL SERVICIO DIAGNÓSTICO

De acuerdo con la NOM-035-SSA3-2012, En materia de información en salud, el contar con información oportuna y de calidad permite coadyuvar a la planeación del Sistema Nacional de Salud para reforzar las acciones de atención a los problemas sanitarios y factores que condicionen y causen daño a la salud.

Para cumplir con los estándares de calidad en la RNLSP-CoEn es indispensable apegarse a los *Criterios de Operación para la Red Nacional de Laboratorios de Salud Pública* Componente Vigilancia Epidemiológica, implementar y mantener un *Sistema de Gestión de la Calidad* en apego a los requisitos de las normas ISO 9001:2015 Sistemas de Gestión de la Calidad e ISO 15189:2015 Requisitos de la calidad y competencia.

Además, alinearse a los requisitos establecidos en el *Manual Caminando a la Excelencia*, los criterios de liberación de pruebas diagnósticas y cumplir con los indicadores de calidad en el servicio diagnóstico establecidos para la RNLSP-CoEn.

**Fase pre-analítica:** Estos indicadores (Oportunidad en la toma, el envío y porcentaje de rechazo) comprenden actividades propias del área de vigilancia epidemiológica que inciden en la calidad de la muestra y el resultado.

- **Oportunidad en la Toma:** un máximo de 5 días naturales a partir de la fecha de inicio de síntomas.
- **Oportunidad en el envío:** un máximo de 5 días naturales para la recepción de la muestra en laboratorio a partir de la toma.
- **Porcentaje de rechazo:** La proporción de rechazos permitida es  $\leq 10\%$ . Cuando se registre un porcentaje mayor el laboratorio debe comunicar al área de vigilancia epidemiológica las oportunidades de mejora con la finalidad de que realicen las acciones conducentes.

Los indicadores de la fase analítica (estándar del servicio) competen a la RNLSP-CoEn e inciden en la obtención de un resultado confiable y oportuno.

- **Estándar del Servicio:** Se especifica el estándar del servicio de acuerdo a la estrategia de vigilancia epidemiológica

- **NuTraVE-EDA:** hasta 8 días hábiles para el diagnóstico a partir de la recepción de la muestra.
- **Cólera:** 5 días hábiles para el diagnóstico a partir de la recepción de la muestra.

El indicador de la fase post analítica (emisión del resultado) es responsabilidad del laboratorio que procesa la muestra y consiste en el tiempo transcurrido entre la obtención del resultado y el registro en las plataformas de los sistemas de vigilancia epidemiológica: NuTraVE-EDA y Cólera.

- **Emisión del resultado:** el tiempo transcurrido entre la emisión del resultado y la captura del mismo en las plataformas de información no debe exceder las 48hrs.

Con la finalidad de verificar el cumplimiento de los objetivos de la vigilancia por laboratorio de las diarreas agudas bacterianas se definen el grado de cumplimiento de los estándares (Cuadro 1)

Cuadro 1. Indicadores de evaluación de la calidad de la muestra y del envío de cepas al InDRE



Indicador	Estándar	Cálculo	Evaluación
Oportunidad en la toma de la muestra	>=90% de las muestras fueron tomadas dentro del tiempo óptimo.	Óptimo: (Muestras tomadas en los primeros 5 días a partir de la fecha de inicio de síntomas / total de muestras aceptadas) X 100	Mensual
		Aceptable: (Muestras tomadas en el día 6-7 a partir de la fecha de inicio de síntomas / total de muestras aceptadas) X 100	
		Crítico: (Muestras tomadas con más de 7 días a partir de la fecha de inicio de síntomas / total de muestras aceptadas) X 100	
Oportunidad en el envío de la muestra	>=90% de las muestras aceptadas se enviaron en un tiempo adecuado	Adecuado: (Muestras aceptadas hasta 5 días posteriores a su fecha de toma/total de muestras recibidas) X 100	Mensual
		Alarma: (Muestras aceptadas entre el día 6 y 8 posteriores a su fecha de toma/total de muestras recibidas) X 100	
		Crítico: (Muestras aceptadas entre el día 9 y 10 posteriores a su fecha de toma/total de muestras recibidas) X 100	
Porcentaje de rechazo	<=10% de las muestras recibidas	(Muestras rechazadas/muestras recibidas) X 100	Mensual
Estándar del servicio	>=95% muestras procesadas dentro del estándar del servicio	(Muestras que cumplieron con el estándar del servicio/Muestras procesadas) X 100	Mensual
Emisión del Resultado	>=90% de los resultados reportados en plataforma en el tiempo establecido	(Resultados reportados en plataforma en 48hrs o menos/Total de resultados en plataforma)/X100	Mensual
Nota: En caso de que el laboratorio acepte muestras consecionadas, debe indicarlo en el informe de resultados.			

El laboratorio debe hacer la captura de los resultados en las plataformas del Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica: EDA-NuTraVE y Cólera, mismas que se encuentran en <http://www.sinave.gob.mx/>

Para el estándar del servicio de referencia en el InDRE consultar los tiempos de entrega de servicios en la página del InDRE en la sección de *Manuales y documentación relevante*: [http://www.indre.salud.gob.mx/interior/intd\\_manuales.html](http://www.indre.salud.gob.mx/interior/intd_manuales.html)

## PROGRAMA DE EVALUACIÓN EXTERNA DEL DESEMPEÑO

Los laboratorios integrantes de la RNLSP-CoEn deben participar en el programa de evaluación externa del desempeño organizado por el LNR, con base al cronograma enviado por la Coordinación de la Red Nacional de Laboratorios de Salud Pública.

Los LESP son responsables de conducir programas de evaluación del desempeño dirigidos a los laboratorios que integran su red estatal para los diagnósticos bajo los lineamientos anteriormente descritos de cualquiera de los sistemas de vigilancia: Cólera y NuTraVE-EDA.

**Objetivo:** Evaluar el desempeño diagnóstico de los laboratorios de la red e identificar a aquellos con áreas de oportunidad por fallas técnicas u operativas para colaborar en su mejora continua.

**Procedimiento:**

- El InDRE envía a los LESP un panel de eficiencia con una serie de muestras cada 6 meses, el cual es procesado con la metodología y estándares establecidos en el laboratorio, por último, éste remite los resultados obtenidos al LNR.
- El LNR analiza los informes de resultados de la RNLSP-CoEn y elabora un informe con el resultado global y particular de los participantes.
- Con base en los resultados obtenidos, se evalúa el desempeño de cada uno y se definen las acciones a seguir. Éstas pueden ser desde reconocer el esfuerzo realizado y hasta, de ser necesario, establecer un plan de acciones correctivas o preventivas y evaluar si se requiere capacitación o si amerita una visita de supervisión. (Figura 4)



Figura. 4. Ciclo PEED en los componentes de cólera y enterobacterias. Actividades a realizar durante el ciclo anual del Programa de Evaluación Externa del Desempeño.

## CRITERIOS PARA LA LIBERACIÓN DE PRUEBAS DIAGNÓSTICAS EN LA RED NACIONAL DE LABORATORIOS DE SALUD PÚBLICA PARA LA VIGILANCIA DEL CÓLERA Y ENTEROBACTERIAS

La liberación de cada laboratorio de la RNLSP-CoEn representa la autonomía diagnóstica, es decir, la autorización de la metodología para realizar el diagnóstico. Esta se basará en el cumplimiento del siguiente criterio:

- La liberación del diagnóstico de enfermedad diarreica aguda bacteriana se realiza únicamente cuando el LESP obtiene más del 90% en el Programa de Evaluación Externa del desempeño. (Cuadro 3)
- Demostrar que se cuenta con los insumos necesarios para los siguientes 12 meses.
- Demostrar que se tiene el recurso humano capacitado en el área afín, y que cumple con el perfil técnico para la realización de la metodología.

Sin embargo, deben seguir enviando las cepas al InDRE para el servicio de referencia con la finalidad de que se realice la vigilancia de susceptibilidad a los antimicrobianos, la vigilancia de circulación de cepas de *Vibrio cholerae* O139 y la realización de pruebas moleculares para búsqueda de toxigenicidad, para el estudio de brotes y atención de urgencias nacionales e internacionales.

Cuadro 3. Estándar de la evaluación del desempeño en la RNLSP-CoEn

Indicador	Estándar	Cálculo	Evaluación
Evaluación del desempeño	Al menos 90% de cumplimiento en cada uno de los componentes (cólera y enterobacterias)	Se realiza con base en los criterios que se especifican en el informe del análisis de resultados	Semestral

Se retirará la liberación del diagnóstico en caso de que en tres paneles de eficiencia consecutivos obtenga un desempeño menor que 90%.

# BANCO DE MATERIAL BIOLÓGICO EN EL InDRE

El material biológico para resguardo se describe en el Anexo VI Colección de Cultivos Bacterianos.

## 1. BIBLIOGRAFIA

1. Aidara A, Koblavi S, Boye CS, Raphenon G, Gassama A, Girmoni E, Grimont PAD. Phenotypic and genotypic characterization of *Vibrio cholerae* isolates from a recent outbreak in Senegal: Comparison with isolates from Guinea-Bissau. *Am J Trop Med Hyg* 1988; 58: 163-7.
2. Albert M, Islam D, Nahar S, Qadri F, Falklind S, Weintraub A, 1997. Rapid Detection of *Vibrio cholerae* O139 Bengal from Stool Specimens by PCR. *J Clin Microbiol* 35: 1633-1635.
3. Antigenic Formulae Of The Salmonella Serovars, 2007, 9th edition WHO Collaborating Centre for Reference and Research on Salmonella Patrick A.D. Grimont, François-Xavier Weill, Institute Pasteur, 28 rue du Dr. Roux, 75724 Paris Cedex 15, France.
4. Cabrera-García ME, Vázquez-Salinas C, Quiñones-Ramírez EI, Serologic and Molecular Characterization of *Vibrio parahaemolyticus* Strains Isolated from Seawater and Fish Products of the Gulf of Mexico, 2004. *American Society for Microbiology* 70: 6401-6406.
5. Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades: Centro Nacional para las Enfermedades Infecciosas y Organización Mundial de la Salud, Enfermedades Transmisibles: Vigilancia y Respuesta. Manual de Laboratorio para la Identificación y Prueba de Susceptibilidad a los antimicrobianos de Patógenos Bacterianos de Importancia para la Salud Pública en el Mundo en Desarrollo. Atlanta, Georgia: CDC; 2004.
6. Chosewood C & Wilson DE. Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories – 5th ed. CDC-NIH; 2009.
7. Cryopreservation and Freeze-Drying Protocols. 2nd edition. Edited by John G. Day, Glyn N. Stacey. Humana Press Totowa New Jersey. 2010.
8. European Committee for Standardization. CWA 15793:2011 Laboratory biorisk management standard. Brussels: CEN; 2011.
9. Ewing, W.H, Edwards and Ewing's Identification of Enterobacteriaceae, 4th Edition. Elsevier Science Publishing Co., Inc., New York 1986:135-172.

10. Fields PI, Popovic T, Wachsmuth K, Olsvik O, 1992. Use of Polymerase Chain Reaction for Detection of Toxigenic *Vibrio cholerae* O1 strains from the Latin American cholera epidemic. *J Clin Microbiol* 30: 2118-2121.
11. Frank P. Simione. Cryopreservation Guide. Thermo Scientific Nalgene and Nunc. 2010.
12. Giono Cerezo S, Escobar Gutiérrez A, Valdespino Gómez JS, Diagnóstico de Laboratorio de Infecciones Gastrointestinales, 1994. InDRE, SSA, pp 310-315, Zinsser, Microbiología, 1998, 20ª edición, Edit. Panamericana, pp 771 A.
13. Guidelines for Assuring Quality of Food and Water Microbiological Culture Media. Australian Society for Microbiology 2004.
14. Guidelines for Biosafety Laboratory Competency. MMWR. Supplement / Vol. 60; 2011.
15. Hipólito V. Niño Ph. D. Garantía de calidad en el laboratorio clínico. Administración de drogas y alimentos, USA-Universidad de los Andes-Oficina sanitaria panamericana, PAHO. Colombia, 1993.
16. Ingrid Heitmann G. Manual de control de calidad en el laboratorio clínico. Instituto de Salud Pública de Chile. Ministerio de Salud, 1998.
17. L. Zulia Weng Alemán, Olvido Esther Díaz Rosa y Inalvis Álvarez Molina. Conservación de microorganismos: ¿qué debemos conocer? *Rev Cubana Hig Epidemiol* 2005; 43(3):1-4
18. M. A. Kiselev, P. Lesieur, A. M. Kisselev and M. Ollivon. Ice Formation in Model Biological Membranes in the Presence of Cryoprotectors. *Nuclear Instruments & Methods in Physics Research A* 448 (2000) 225-260
19. M.K. Chattopadhyay. Bacterial Cryoprotectants. *Resonance*. Nov. 2002:59-63
20. Miller MJ, et al. Guidelines for safe work practices in human and animal medical diagnostic laboratories. *MMWR Surveill Summ*. 6; 61:1-102; 2012.
21. OECD Best practice guidelines for biological resource centres, Working Party on Biotechnology. Organisation de Coopération et de Développement Economiques/Organisation for Economic Cooperation and Development. Directorate for Science Technology and Industry/Committee for Scientific and Technological Policy. 5-Apr-2007:50-73
22. Organización Panamericana de la Salud. Organización Mundial de la Salud. Manual de procedimientos para la serotipificación de *Salmonella* y *Shigella*. Washington, D. C. 2004.
23. Organización Panamericana de la Salud. Organización Mundial de la Salud. Manual de procedimientos para la serotipificación de *V. cholerae*. Washington, D. C. 2004.
24. Raja N, Nor-Shamsudin M, Somarny W, Rosli R, Rahim RA, Radu S, 2001. Detection and molecular characterization of the zot gene in *Vibrio cholerae*

- and *V. alginolyticus* isolates. Southeast Asian J Trop Med Public Health 32: 100-104.
25. Sarkar A, Nandy RN, Nair BG, Ghose AC, 2002. *Vibrio* Pathogenicity Island and Cholera Toxin Genetic Element-Associated Virulence Genes and Their Expression in Non-O1 Non-O139 Strain of *Vibrio cholera*. American Society for Microbiology 70: 4735-4742.
  26. Secretaría de Salud, Manual de recomendaciones generales para la preparación y control de calidad de medios de cultivo, Laboratorio Nacional de Salud Pública, México D.F., 1994.
  27. Tadaa J, Ohashia T, Nishimuraa N, Shirasakia Y, Ozakia H, Fukushima S, Takanoa J, Nishibuchib M, Takedab Y. Detection of the thermostable direct hemolysin gene (tdh) and the thermostable direct hemolysin-related hemolysin gene (trh) of *Vibrio parahaemolyticus* by polymerase chain reaction. Department of Microbiology, Faculty of Medicine, Kyoto University. 1992.
  28. Tsonka Uzunova-Doneva and Todor Donev. Anabiosis and conservation of microorganisms. Journal if culture collection. 2004-2005(4):17-28
  29. United Kingdom Accreditation Service. Use of culture media procured ready-to-use or partially completed in microbiological testing. 2000.
  30. Van P, Thevelein J. Determinants of freeze tolerance in microorganisms, physiological importance and biotechnological applications. Advances in Applied Microbiology. 2003;53: 129-176.
  31. *Vibrio cholera* and Cholera molecular to global perspectives, Edited by I. Kaye Wachsmuth, Paula Blake and Orjan Olsvik. ASM PRESS, Washington D.C. American Society for Microbiology, 1994.
  32. World Federation For Culture Collections. Guidelines for the establishment and operation of collections of cultures of microorganisms. Revised by the WFCC Executive Board. 2nd Edition, June 1999. U.K.
  33. World Health Organization. Guidance on regulations for the Transport of Infectious Substances 2013-2014; Geneva: WHO Press; 2012.
  34. World Health Organization. Laboratory Biosafety Manual – 3rd ed. Geneva: WHO Press; 2004.

# ANEXOS

## Anexo I: Bioseguridad

Una vez que la muestra se ha recibido en el laboratorio, es responsabilidad del personal asegurar que las actividades se realicen en un ambiente seguro y ordenado, lo cual se logra con recurso humano calificado y entrenado técnicamente en prácticas de bioseguridad que generan seguridad para su bienestar, el de sus colegas, la comunidad, el ambiente y los bienes.

Todas las muestras para el diagnóstico deben ser consideradas como potencialmente infecciosas y ser manipuladas de manera apropiada siguiendo las prácticas estandarizadas para laboratorios de nivel de bioseguridad 2 establecidas en los *Lineamientos para la gestión del riesgo biológico*:

1. Lavado frecuente de manos, especialmente después de quitarse los guantes y antes de salir del laboratorio.
2. No fumar, comer, beber, o almacenar alimentos en el laboratorio.
3. Cuidado para minimizar salpicaduras y acciones que pudieran crear aerosoles (gotas minúsculas).
4. Descontaminación de superficies de trabajo después de cada uso y ante algún derrame.
5. No usar la pipeta por medio de succión oral.
6. Tener precauciones al usar objetos punzocortantes, lo que incluye el uso de contenedores especiales para desecho de agujas y otros objetos punzocortantes.
7. Uso de equipo de protección personal (bata de laboratorio de manga larga y cerrada, guantes de látex o nitrilo y cubreboca)
8. Protección para los ojos, según sea necesario dependiendo del tipo de trabajo que se realice.
9. Tener políticas y procedimientos para restringir el acceso al laboratorio.
10. Colocar señales de advertencia de peligro biológico fuera del laboratorio.
11. Contar con manual de bioseguridad.
12. Contar con personal de supervisión con experiencia en el trabajo con agentes infecciosos y entrenamiento específico para personal que maneja estos agentes.

13. Realizar la disposición final de material contaminado con base la NOM-087-SEMARNAT-SSA1-2002

## Anexo II: Técnica de Diagnóstico

### 1. Aislamiento e identificación de *Vibrio cholerae* y *Vibrio parahaemolyticus*

#### 1.1. Principio del método

El método se fundamenta en la capacidad de *Vibrio spp* para crecer en medios alcalinos y de sus diferentes capacidades metabólicas para descarboxilar aminoácidos como la lisina, ornitina y arginina; fermentar azúcares como sacarosa, lactosa y glucosa; producir indol a partir del triptófano; de ser móvil y poseer la enzima citocromo oxidasa. La serotipificación de *Vibrio cholerae* se fundamenta en la detección de antígenos específicos del lipopolisacárido bacteriano a través de una reacción antígeno-anticuerpo.

#### 1.2. Sistema de muestra primaria

Muestra de materia fecal o cepas de *Vibrio spp*.

#### 1.3. Tipo de contenedor y aditivos

La muestra de materia fecal deberá recolectarse con hisopo de algodón (hisopo rectal o hisopo fecal) e introducirse en un tubo con medio de transporte de Cary Blair; las cepas de *Vibrio spp* deberán estar sembradas en un medio de cultivo de soporte (base de agar sangre).

#### 1.4. Equipos

- Incubadora a  $36\pm 1^{\circ}\text{C}$
- Refrigerador de 4 a  $8^{\circ}\text{C}$
- Lámpara de luz blanca
- Termómetro de -5 a  $15^{\circ}\text{C}$
- Termómetro de 20 a  $50^{\circ}\text{C}$

#### 1.5. Materiales



- Mechero Bunsen
- Manguera de látex para la conexión del gas al mechero
- Asas de nicromel con punta recta
- Placa Petri de 100 x 15 mm
- Tubo de 16 x150 mm con tapón de rosca de baquelita
- Tubo de 13 x 100 mm con tapón de rosca de baquelita
- Gradillas para 72 tubos
- Pipetas graduadas de vidrio de 5 mL
- Portaobjetos 12 x 75 x 0.8 mm
- Aplicadores de madera sin algodón
- Jeringa desechable para tuberculina de 1 mL
- Bulbo de seguridad de tres vías o pipeteador automático
- Gasa simple
- Pinzas de disección de acero inoxidable, de 12.7 cm.
- Pizeta con solución desinfectante de hipoclorito de sodio dilución 1:100 (1%)
- Frasco con solución salina formalinizada 0.6%

#### 1.6.Reactivos y material biológico

- Agar tiosulfato citrato bilis sacarosa (TCBS), 30 mL en placa Petri. **(Nota: Almacenar a 4°C hasta 1 semana.)**
- Base de agar sangre (BAB), 4.0 mL de medio inclinado en tubo de 13 x 100 mm con tapón de hule o de rosca.
- Base de agar sangre (BAB), 30 mL de medio en placa Petri.
- Medio de movilidad indol ornitina (MIO), 4.0 mL de medio sin inclinar en tubo de 13 x 100 mm con tapón de rosca.
- Agar de hierro y triple azúcar (TSI), 4.0 mL de medio inclinado en tubo de 13 x 100 mm con tapón de rosca.
- Agar de hierro y lisina (LIA), 4.0 mL de medio inclinado en tubo de 13 x 100 mm con tapón de rosca.
- Peptona de caseína, cloruro de sodio, para preparar agua peptonada alcalina pH 9 (APA) 10 mL en tubo de 16x150 mm con tapón de rosca.
- Peptona de caseína, cloruro de sodio, para preparar caldo peptonado (CP), 4.0 mL en tubo de 13x100 mm con tapón de rosca.
- Base descarboxilasa de Möeller, L-arginina, para preparar caldo arginina 4.0 mL en tubo de 13x100 mm con tapón de rosca.
- Reactivo de Kovac
- Reactivo de oxidasa
- Vaselina líquida.

- Cloruro de sodio
- Formaldehído
- Hipoclorito de sodio.
- Agua destilada.
- Todos los medios de cultivo se deben preparar siguiendo las especificaciones del fabricante.
- Suero polivalente *Vibrio cholerae* O1.
- Suero monovalente *Vibrio cholerae* Inaba.
- Suero monovalente *Vibrio cholerae* Ogawa.

## 1.7. Pasos del método

### Aislamiento

La muestra de materia fecal debe ser fresca y estar en medio de transporte de Cary-Blair y deberá ser procesada lo antes posible una vez que llega al laboratorio.

Depositar el hisopo del Cary-Blair en tubo de 16x150 mm con 10 mL de Agua Peptonada Alcalina (APA), pH 9.0 e incubar a  $36 \pm 1^\circ\text{C}$  durante 6-8 h.

Con una asa redonda previamente quemada y enfriada en el agar depositar 3 asadas de la superficie del APA en una placa de agar TCBS, sembrar por estría cruzada sin quemar el asa entre cuadrantes. Incubar a  $36 \pm 1^\circ\text{C}$  durante 18 a 24 h.

Las cepas de origen clínico, alimentos o ambientales para aseguramiento de la calidad se siembran directo en agar TCBS por estría cruzada quemando el asa entre el primer o segundo cuadrante. Incubar a  $36 \pm 1^\circ\text{C}$  durante 18 a 24 h.

### Identificación

Seleccionar del agar TCBS colonias, sacarosa positivas (colonias amarillas, planas de 2 mm, generalmente pegajosas) y/o sacarosas negativas (colonias verdes, de 2 mm, generalmente pegajosas).

Quemar una asa en punta y enfriar en un extremo de la placa donde no haya crecimiento, tomar la colonia sin extender en el agar (con esta única colonia se siembran todas las pruebas bioquímicas), inocular en tubo de caldo arginina (CA) y caldo peptonado (CP), depositando el inóculo, MIO picadura hasta el fondo, TSI, LIA y tubo de BAB, picadura hasta el fondo y estría en la superficie (las bioquímicas que se utilicen para identificar las colonias verdes

se deben adicionar con 1% de cloruro de sodio; adicionalmente se deben sembrar caldos nutritivos con 0%, 1%, 3%, 6%, 8% y 10% de cloruro de sodio).

Sellar con vaselina líquida estéril el caldo arginina; sembrar también una placa de BAB por estría cerrada. Incubar a  $36\pm 1^{\circ}\text{C}$  durante 18 a 24 h.

De la placa de BAB hacer la prueba de oxidasa, depositar un inóculo con asa desechable o aplicador de madera en la zona reactiva de la tira o en el papel impregnado con el reactivo, leer el resultado en un tiempo máximo de 10 segundos.

Antes de leer las pruebas bioquímicas agregar aproximadamente 0.5 mL de reactivo de Ehrlich o Kovac en el caldo peptonado, interpretar los resultados de las pruebas bioquímicas utilizando el cuadro 1, e identificar el patrón bioquímico de *V. cholerae* o *V. parahaemolyticus* con el cuadro 2.

### Serotipificación

Si bioquímicamente se identificó *Vibrio cholerae*, realizar la serotipificación a partir de la placa de BAB.

En un portaobjetos limpio y desengrasado depositar 4 gotas de solución salina formalinizada en el extremo superior del portaobjetos, separadas lo suficiente para evitar que se mezclen. En el extremo inferior colocar una gota de solución salina (testigo negativo), una gota de suero polivalente *Vibrio cholerae* O1, una gota de suero monovalente *Vibrio cholerae* O1 Ogawa y una gota de suero monovalente *Vibrio cholerae* O1 Inaba

Con un asa estéril o aplicador de madera tomar crecimiento de la placa de BAB y depositar en cada una de las gotas de solución salina formalinizada, mezclar las gotas de suspensión con cada antisuero, agitar por 1 minuto e interpretar. Registrar los resultados.

### 1.8. Interpretación por laboratorio

Para emitir un resultado positivo a *Vibrio cholerae* O1 (Ogawa o Inaba), *Vibrio cholerae* no O1 de una muestra procesada, se considera la identificación

bioquímica que debe corresponder al patrón bioquímico de dicha especie, así como los resultados de serotipificación del antígeno somático.

Para emitir un resultado positivo a *Vibrio parahaemolyticus* de una muestra procesada, se considera la identificación bioquímica que debe corresponder al patrón bioquímico de dicha especie.

Un resultado negativo corresponde a la ausencia de *Vibrio cholerae* y *Vibrio parahaemolyticus* en la muestra fecal recibida.

## 1.9. Medidas de bioseguridad

- Apegarse a lo establecido en el Anexo I. Medidas de Bioseguridad

## 2. PCR punto final para la detección de cepas toxigénicas de *Vibrio cholerae*

### 2.1. Principio del método

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es una técnica mediante la cual se replican de forma exponencial miles de copias de un gen o segmento de ADN específico. Esta técnica molecular utiliza dos iniciadores (oligonucleótidos) específicos y complementarios a la secuencia buscada en la bacteria y consiste en separar con calor ambas cadenas de ADN, posteriormente cada iniciador se hibrida complementariamente a una cadena de ADN, interviniendo en ese momento la ADN polimerasa que utiliza los desoxiligonucleótidos (dNTPs) presentes para sintetizar a su vez dos cadenas complementarias a las del molde. Este proceso se repite varias veces, hasta obtener cantidades detectables y visibles del ADN presente originalmente en las muestras.

### 2.2. Sistema de muestra primaria

Cultivo puro de *Vibrio cholerae* O1 o *Vibrio cholerae* O139.

### 2.3. Tipo de contenedor y aditivos

Las cepas deben estar sembradas por aislamiento en medio de Agar Base Sangre sin aditivos.

### 2.4. Equipo

- Termociclador-PCR
- Gabinete de bioseguridad tipo II clase 2A
- Cabina para PCR
- Cámara de electroforesis horizontal
- Fotodocumentador
- Fuente de poder
- Congelador vertical
- Refrigerador vertical
- Termoagitador
- Sistema de purificación de agua
- Balanza analítica
- Aire acondicionado

## 2.5. Materiales

- Micropipetas de: 1-10, 2-20, 20-200 y 100-1000  $\mu\text{L}$
- Guantes de nitrilo
- Tubos tipo eppendorf de: 0.2, 0.5 y 1.5 mL
- Puntas para micropipeta de: 10, 200 y 1000  $\mu\text{L}$
- Tubos para centrífuga de: 50 mL
- Pipetas desechables de 5.0 y 10 mL
- Marcadores indelebles
- Gradillas para tubos tipo eppendorf
- Bolsas de polipropileno
- Contenedores para desecho de puntas
- Gasas

## 2.6. Reactivos y material biológico

Reactivos y materiales biológicos	
dNTP's (A, T, C, G) 100 $\mu\text{M}$	
Taq polimerasa 5U/ $\mu\text{L}$	
CTX2	5' CGG GCA GAT TCT AGA CCT CCT G 3' <sup>(1,2)</sup>
CTX3	5' CGA TGA TCT TGG AGC ATT CCC AC 3' <sup>(1,2)</sup>
CTX7	5' GGT TGC TTC TCA TCA TCG AAC CAC 3' <sup>(5)</sup>
CTX9	5' GAT ACA CAT AAT AGA ATT AAG GAT 3' <sup>(5)</sup>
ACE1	5' -TAA GGA TGT GCT TAT GAT GGA CAC CC 3' <sup>(1)</sup>
ACE2	5' -CGT GAT GAA TAA AGA TAC TCA TAG-3' <sup>(1)</sup>
ZOT1	5' TGG CTT CGT CTG CTG CCG GCG ATT 3' <sup>(1,4)</sup>
ZOT2	5' CAC TTC TAC CGA CAG CGC TTG CG 3' <sup>(1,4)</sup>
1-39Vc	5' GCG TTA TAG GTA TCA TCA AGA GA 3' <sup>(3)</sup>
2-39Vc	5' GTC ATT ATT AAA ACT GCT CCA TT 3' <sup>(3)</sup>

MgCl <sub>2</sub> , 25mM
Regulador 10 X
Solución amortiguadora TBE
Agarosa
Bromuro de etidio
Agua destilada y desionizada
Marcador de peso molecular
Naranja de acridina
Alcohol etílico al 70%

## 2.7. Pasos del método

Re-suspender una colonia de una cepa aislada y caracterizada como *Vibrio cholerae* en 200 µL de agua destilada para obtener el ADN molde.

Hervir la suspensión durante 15 minutos e inmediatamente colocar en baño de hielo.

### Consideraciones antes de iniciar la PCR

- Antes de empezar a trabajar descontaminar el gabinete de bioseguridad.
- Usar el equipo de seguridad.
- Mantener las suspensiones de las muestras en hielo listas para PCR.
- Descongelar previamente los reactivos para PCR.
- Rotular los tubos de acuerdo al número y tipo de muestra a trabajar.

### Preparación de la mezcla de reacción.

La mezcla de reacción se prepara en el ÁREA BLANCA del laboratorio.

El volumen de los reactivos se calculará de acuerdo al número de muestras a analizar, siguiendo el formato de trabajo para PCR. Una vez preparada la mezcla de reacción, homogenizar suavemente con pipeta aproximadamente 30 veces (aspirando y expulsando con ayuda de la pipeta), finalmente adicionar 22 µL de esta mezcla en el fondo de cada tubo.

En el área de templados, adicionar 3.0 µL del ADN extraído de cada muestra en el tubo correspondiente.

Formato de trabajo para PCR	
REACTIVOS	VOLUMEN (µL)
H <sub>2</sub> O	9.35
Reg 10X	2.5
MgCl <sub>2</sub> 25mM	4.0
dNTP´s 1µM	4.0
Iniciador 1 (ctx 2, ctx 7, ace 1, zot 1, 1-39Vc)	1.0
Iniciador 2 (ctx 3, ctx 9, ace 2, zot 2, 2-39Vc)	1.0
Taq 5U/µL ROCHE	0.15
ADN	3.0

Programa	
1 ciclo	94°C-1min
35 ciclos	94°C-30s
	55°C-30s
	72°C-1min
1 ciclo	72°C-2min

#### Controles

En el área de controles adicionar 3.0 µL de control positivo y negativo respectivamente.

Control negativo: Colocar una muestra de ADN confirmada como negativa a *V. cholerae*.

Control positivo: Colocar ADN extraído de una cepa caracterizada como *V. cholerae* O139 toxigénica bajo el resguardo del InDRE.

Control de reactivos: utilizar 3.0 µL de agua inyectable o calidad Milli-Q.

NOTA: Asegurarse de que todos los tubos queden bien tapados para evitar que el contenido se evapore.

Colocar los tubos en el termociclador, seleccionar el programa para *Vibrio cholerae* y dar inicio a la corrida. Los productos de ADN obtenidos se someten a 120V por 30 minutos a electroforesis en un gel de agarosa al 2% en regulador Tris-EDTA-ácido acético. Finalizada la electroforesis evidenciar la presencia de las bandas (productos) con luz UV.

## 2.8. Interpretación por laboratorio

Presencia de una banda de aproximadamente 564pb indica la presencia del gen de la subunidad A de la toxina colérica.

Presencia de una banda de aproximadamente 460pb indica la presencia del gen de la subunidad B de la toxina colérica.

Presencia de una banda de aproximadamente 314pb indica la presencia del gen de la toxina accesoria ace.

Presencia de una banda de aproximadamente 1083pb indica la presencia del gen de la toxina accesoria zot.

## 2.9. Medidas de bioseguridad específicas

- Todas las muestras y controles deben manejarse como potencialmente infecciosos y analizarse en un laboratorio de bioseguridad Nivel 2 (BSL-2) dentro de un gabinete de bioseguridad tipo II 2A.
- El analista debe usar equipo de protección personal, bata (una para cada área del proceso), guantes desechables (un par para cada proceso) y lentes de seguridad.
- Disponer de los contenedores y bolsas correspondientes para los desechos de Residuos Peligrosos Biológico-Infecciosos (RPBI) en cada área.
- Descontaminar las micropipetas, gabinetes y cabinas antes y después de trabajar con etanol al 70% o benzal-metanol 1:1 v/v.
- Todo el material a utilizar deberá ser estéril.
- El personal que realice la electroforesis no podrá hacer mezcla para PCR en la misma jornada.
- El área limpia o área blanca está libre de toda contaminación por ADN por lo que solo podrán manejarse reactivos.
- El área de templados será la única en donde se podrán abrir los tubos que contienen el ADN de las muestras.
- El área de controles será la única permitida para la colocación del ADN control.
- Solo en el área sucia o de electroforesis se podrán abrir los tubos con cADN y cargarse en los geles.
- Cada área deberá estar separada físicamente para evitar contaminaciones.



- Es muy importante que cada área cuente con su propio material (puntas, guantes, agua, etc.), y éste no deberá compartirse entre áreas.
- Los equipos deberán descontaminarse antes de una reparación, mantenimiento o antes de ser removidos del laboratorio.
- El analista debe lavar sus manos antes y después de trabajar.
- La prueba se realizará en un laboratorio entre 18-25°C. Las diferentes áreas deberán estar separadas y selladas para evitar el paso de aire con polvo y evitar así la contaminación.

### 3. PCR punto final para la detección de genes de patogenicidad en cepas de *Vibrio parahaemolyticus*

#### 3.1. Principio del método

Como ya se mencionó, la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es una técnica mediante la cual se replican de forma exponencial miles de copias de un gen o segmento de ADN específico. Esta técnica molecular utiliza dos iniciadores (oligonucleótidos) específicos y complementarios a la secuencia buscada en la bacteria y consiste en separar con calor ambas cadenas de ADN, posteriormente cada iniciador se hibrida complementariamente a una cadena de ADN, interviniendo en ese momento la ADN polimerasa que utiliza los desoxioligonucleótidos (dNTPs) presentes para sintetizar a su vez dos cadenas complementarias a las del molde. Este proceso se repite varias veces, hasta obtener cantidades detectables y visibles del ADN presente originalmente en las muestras.

#### 3.2. Sistema de muestra primaria

Cultivo puro de *Vibrio parahaemolyticus*

#### 3.3. Tipo de contenedor y aditivos

Las cepas deben estar sembradas por aislamiento en medio de Agar Base Sangre sin aditivos.

#### 3.4. Equipo

- Termociclador
- Gabinete de bioseguridad tipo II clase 2A
- Cabina para PCR
- Cámara de electroforesis horizontal

- Fotodocumentador
- Fuente de poder
- Congelador vertical
- Refrigerador vertical
- Sistema de purificación de agua
- Balanza analítica
- Aire acondicionado
- Horno de microondas

### 3.5. Materiales

- Micropipetas de: 1-10, 2-20, 20-200 y 100-1000  $\mu\text{L}$
- Guantes desechables
- Tubos tipo eppendorf de: 0.2, 0.5 y 1.5 mL
- Puntas para micropipeta de: 10, 200 y 1000  $\mu\text{L}$
- Tubos para centrífuga de 50 mL
- Pipetas desechables de 5 y 10 mL
- Marcadores indelebles
- Gradillas para tubos tipo eppendorf
- Bolsas de polipropileno
- Contenedores para desecho de puntas
- Gasas

### 3.6. Reactivos y material biológico

Reactivos y Materiales biológicos	
dNTP´s (A, T, C, G) 100 $\mu\text{M}$	
Taq polimerasa 5U/ $\mu\text{L}$	
Tdh1	5'-GGT ACT AAA TGG CTG ACA TC-3' <sup>(1,2)</sup>
Tdh2	5'-CCA CTA CCA CTC TCA TAT GC-3' <sup>(1,2)</sup>
Trh1	5'-GGC TCA AAA TGG TTA AGC G-3' <sup>(1,2)</sup>
Trh2	5'-CAT TTC CGC TCT CAT ATG C-3' <sup>(1,2)</sup>
MgCl <sub>2</sub> , 25mM	
Regulador 10 X	
Solución amortiguadora TBE	
Agarosa	
Bromuro de etidio	
Agua destilada y desionizada	
Marcador de peso molecular	
Naranja G	

Alcohol etílico al 70%
------------------------

### 3.7. Pasos del método

Resuspender una colonia de la cepa aislada y caracterizada como *Vibrio parahaemolyticus* en 200 µL de agua destilada.

Hervir 15 minutos la suspensión e inmediatamente colocar en baño de hielo.

#### Consideraciones antes de iniciar la PCR

- Antes de empezar a trabajar descontaminar el gabinete de bioseguridad utilizando el sanitizante asignado.
- Colocarse el equipo de seguridad.
- Mantener las suspensiones de las muestras en hielo listas para la PCR.
- Descongelar previamente los reactivos para la PCR.
- Rotular los tubos de acuerdo al número y tipo de muestra a trabajar.

#### Preparación de la mezcla de reacción

- Esta se hará en el área blanca del laboratorio.
- El volumen de los reactivos se calculará de acuerdo al número de muestras a diagnosticar, siguiendo el formato de trabajo para PCR. Una vez preparada la mezcla de reacción homogenizar suavemente con la pipeta (aspirando y expulsando con ayuda de la pipeta) aproximadamente 30 veces, finalmente adicionar 22 µL de esta mezcla en el fondo de cada tubo.
- En el área de templados, adicionar 3.0 µL del ADN extraído de cada muestra en el tubo correspondiente.

Formato de trabajo para PCR de <i>Vibrio parahaemolyticus</i>			
Reactivos	Volumen (µL)	Reactivos	Volumen (µL)
H <sub>2</sub> O	4.35	H <sub>2</sub> O	12.35
Reg 10X	2.5	Reg 10X	2.5

MgCl <sub>2</sub> 25mM	10	MgCl <sub>2</sub> 25mM	2
dNTP's 1μM	3	dNTP's 1μM	3
tdh 11:80	1	trh 11:80	1
tdh 2 1:80	1	trh 2 1:80	1
Taq 5U/μL	0.15	Taq 5U/μL	0.15L
ADN	3	ADN	3

Programa	
1 ciclo	94°C-1min
25 ciclos	94°C-20 s
	55°C-20s
	72°C-30s
1 ciclo	72°C-2min

#### Controles

En el área de controles, adicionar 3.0 μL de control positivo y negativo respectivamente en el tubo que corresponda.

Control negativo para tdh: Colocar una muestra de ADN confirmada como *V. parahaemolyticus* trh positivo.

Control negativo para trh: Colocar una muestra de ADN confirmada como *V. parahaemolyticus* tdh positivo.

Control positivo para tdh: Colocar una muestra de ADN confirmada como *V. parahaemolyticus* tdh positivo.

Control positivo para trh: Colocar una muestra de ADN confirmada como *V. parahaemolyticus* trh positivo.

Control de reactivos: utilizar 3.0 μL de agua inyectable o agua calidad Milli-Q.

NOTA: Asegurarse de que todos los tubos queden bien tapados, para evitar que el contenido se evapore.

Colocar los tubos en el termociclador, seleccionar el programa para *Vibrio parahaemolyticus* y dar inicio a la corrida.

Los productos de ADN obtenidos se someten a 120V por 30 minutos a electroforesis en un gel de agarosa al 2% en regulador Tris-EDTA-ácido acético.

Finalizada la electroforesis evidenciar la presencia de las bandas (productos) con luz UV.

### 3.8. Interpretación por laboratorio

Positivo:

Presencia de una banda de aproximadamente 251pb indica la presencia del gen tdh que codifica para la hemolisina termoestable directa.

Presencia de una banda de aproximadamente 250pb indica la presencia del gen trh que codifica para la termolisina relacionada a la directa.

Negativo:

Ausencia de los genes que codifican para las termolisinas, ausencia de bandas tdh (251pb) y trh (250pb).

### 3.9. Medidas de bioseguridad específicas

Todas las muestras y controles deben manejarse como potencialmente infecciosos y trabajarse en un Laboratorio de Bioseguridad Nivel 2 (BSL-2) dentro de un gabinete de bioseguridad tipo II 2A.

- El analista debe usar su equipo de protección personal, bata (una para cada área del proceso), guantes desechables (un par para cada proceso) y lentes de seguridad.
- Disponer de los contenedores y bolsas correspondientes para los desechos RPBI en cada área.
- Descontaminar las micropipetas, gabinetes y cabinas antes y después de trabajar con etanol al 70% o benzal-metanol 1:1 v/v.
- Todo el material a utilizar deberá estar estéril.
- El personal que realice la electroforesis no podrá hacer mezcla para PCR en la misma jornada.
- El área limpia o área blanca está libre de toda contaminación por ADN por lo que solo podrán manejarse reactivos.
- El área de templados será la única en donde se podrán abrir los tubos que contienen el ADN de las muestras.
- El área de controles será la única permitida para la colocación del ADN control.

- Solo en el área sucia o de electroforesis se podrán abrir los tubos con cADN y cargarse en los geles.
- Cada área deberá estar separada físicamente para evitar contaminaciones.
- Es muy importante que cada área cuente con su propio material (puntas, guantes, agua, etc.) y éste no deberá compartirse entre áreas.
- Los equipos deberán descontaminarse antes de una reparación, mantenimiento o antes de ser removidos del laboratorio.
- El analista debe lavar sus manos antes y después de trabajar.
- La prueba se realizará en un laboratorio entre 18-25°C. Las diferentes áreas deberán estar separadas y selladas para evitar el paso de aire con polvo y evitar así la contaminación.

#### 4. Detección por ELISA de la toxina colérica

En toda cepa aislada de *Vibrio cholerae* O1 se determina su capacidad para producir toxina colérica a través de la técnica de ELISA descrita en el Manual de Técnicas de Laboratorio Vol. I, 1995 del InDRE. Se preparan placas sensibilizadas con el receptor GM1 y se agrega el sobrenadante del cultivo donde podría estar la toxina. La presencia de interacción receptor-toxina se determina agregando un anticuerpo de conejo antitoxina. La reacción se pone en evidencia al adicionar anticuerpos contra las inmunoglobulinas de conejo conjugados a una enzima. Al agregar el sustrato específico el desarrollo de color significa que el cultivo de prueba es productor de toxina colérica.

#### 5. Diferenciación de *Vibrio cholerae* O1 en biotipos Clásico o el Tor

Después de identificar el grupo y el serotipo, se procede a la caracterización del biotipo (Clásico o El Tor). Se siembra la cepa en BAB y se incuba 24 h a  $36 \pm 1^\circ\text{C}$ . Se realizan las pruebas siguientes que se interpretan de acuerdo con lo que se indica.

Reacción				
Biotipo	Vp (modificado con 1% NaCl)	Inhibición de crecimiento polimixina b (50 u)	Hemólisis	Aglutinación de eritrocitos de pollo o carnero
Classical	N	P	N	N

El tor	P	N	P	P
--------	---	---	---	---

## 6. Aislamiento, identificación y serotipificación de *Salmonella* spp y *Shigella* spp.

### 6.1. Principio del método

El método se fundamenta en el uso de técnicas bacteriológicas de aislamiento e identificación de las propiedades fenotípicas de *Salmonella* y *Shigella*, así como en la técnica inmunológica de aglutinación en placa para ambos géneros y aglutinación en tubo para *Salmonella*.

### 6.2. Sistema de muestra primaria

Muestra de materia fecal o cepas de *Salmonella* spp y *Shigella* spp.

### 6.3. Tipo de contenedor y aditivos

La muestra de materia fecal deberá recolectarse con hisopo de algodón (hisopo rectal o hisopo fecal) e introducirse en un tubo con medio de transporte de Cary Blair. Las cepas de *Salmonella* spp y *Shigella* spp deben sembrarse en un medio de cultivo de soporte.

### 6.4. Equipo

- Incubadora a  $36 \pm 1^\circ\text{C}$
- Refrigerador a 4 a  $8^\circ\text{C}$
- Agitador vortex
- Lámpara de luz blanca
- Baño María a  $50 \pm 1^\circ\text{C}$
- Termómetro de  $-10$  a  $100^\circ\text{C}$
- Termómetro de  $-5$  a  $15^\circ\text{C}$
- Termómetro de  $15$  a  $50^\circ\text{C}$

### 6.5. Materiales

- Mechero Bunsen
- Manguera de látex para la conexión del gas al mechero
- Asas de nicromel con punta redonda
- Asas de nicromel con punta recta
- Placa Petri de 100 x 15 mm

- Tubo de 16 x150 mm, con tapón de rosca de baquelita
- Tubo de 13 x 100 mm, con tapón de rosca de baquelita
- Gradillas para 72 tubos cuadro
- Pipetas graduadas de vidrio de 5.0mL
- Portaobjetos de 25 x75 x0.8 mm
- Aplicadores de madera
- Placa Petri de 60x15 mm
- Jeringa desechable para tuberculina de 1.0mL
- Unidad de filtración tipo pirinola para jeringa desechable con membrana de acetato de celulosa de 0.22 micras
- Contenedor para RPBI punzocortantes de 3.70 a 4.75 L
- Bulbo de seguridad de tres vías
- Gasa simple para limpieza de mesas
- Pinzas de disección de acero inoxidable de 12.7 cm
- Contenedor plástico con solución desinfectante de hipoclorito de sodio dilución 1:10 (10%)
- Pizeta con solución desinfectante de hipoclorito de sodio dilución 1:100 (1%)

## 6.6. Reactivos y material biológico

### Reactivos

- Base de agar sangre (BAB), 4.0 mL de medio inclinado en tubo de 13 x 100 mm con tapón de hule.
- Base de agar sangre (BAB), 30 mL de medio en placa Petri.
- Agar MacConkey, 30 mL de medio en placa Petri.
- Agar verde brillante, 30 mL de medio en placa Petri.
- Agar sulfito de bismuto, 30 mL de medio en placa Petri. **(Nota: Utilizar el mismo día de su preparación.)**
- Medio de movilidad indol ornitina (MIO), 4.0 mL de medio sin inclinar en tubo de 13 x 100 mm con tapón de rosca.
- Agar de hierro y triple azúcar (TSI), 4.0 mL de medio inclinado en tubo de 13 x 100 mm con tapón de rosca.
- Agar de hierro y lisina (LIA), 4.0 mL de medio inclinado en tubo de 13 x 100 mm con tapón de rosca.
- Ácido mícico, peptona de caseína y azul de bromotimol, para preparar caldo mucato 4.0 mL de medio en tubo de 13 x 100 mm con tapón de rosca.
- L-sorbitol, peptona de caseína, 4.0 mL de medio en tubo de 13 x 100 mm con tapón de rosca.
- Base rojo de fenol
- Cloruro de sodio, 4.0 mL de medio en tubo de 13 x 100 mm con tapón de rosca.



- Caldo malonato, 4.0 mL de medio en tubo de 13 x 100 mm con tapón de rosca.
- Base agar urea de Christensen, agar, para preparar 4.0 mL de medio inclinado en tubo de 13 x 100 mm con tapón de rosca.
- Agar citrato de Simmons, 4.0 mL de medio inclinado en tubo de 13 x 100 mm con tapón de rosca.
- Base caldo tetracionato, 5.0 mL de medio en tubo de 16 x 150 mm con tapón de rosca.
- Reactivo de Kovac
- Yodo metálico
- Yoduro de potasio
- Hipoclorito de sodio.
- Agua destilada.

Todos los medios de cultivo se deben preparar siguiendo las indicaciones del fabricante.

Material biológico:

- Antisueros somáticos para *Salmonella* (Polivalente A al I, B, C<sub>1</sub>, O:6, O:8, O:20, D<sub>1</sub>, E polivalente [Epol], G<sub>1-2</sub>, H, I).
- Antisuero somático polivalente *Shigella dysenteriae* (A1-7).
- Antisuero somático polivalente *Shigella flexneri* (B1-6).
- Antisuero somático polivalente *Shigella boydii* (A1-7).
- Antisuero somático *Shigella sonnei*.
- Todos los antisueros son hidratados y diluidos como se indica en los marbetes de los viales y se conservan a temperatura de refrigeración de 4 a 8 °C.

## 6.7. Pasos del método

### Aislamiento

La muestra de materia fecal deberá ser procesada lo antes posible una vez recibida en el laboratorio.

Si la muestra de materia fecal viene en envase estéril, tomar un poco de heces con un hisopo de algodón estéril y hacer una impronta en un cuadrante del medio de baja selectividad (agar Mac Conkey), si la muestra está en medio de transporte de Cary-Blair, extraer el hisopo y hacer una impronta en un

cuadrante del medio de baja selectividad. Sembrar por estría cruzada, quemar y enfriar el asa entre el segundo y el tercer cuadrante.

El hisopo con el que se inoculó la placa de medio de baja selectividad se introduce en un tubo con caldo de enriquecimiento para *Salmonella* (caldo tetracionato, caldo selenito). Incubar la placa y el tubo a  $36 \pm 1^\circ\text{C}$  de 18 a 24 h.

Las cepas de *Salmonella* y *Shigella* para referencia o aseguramiento de la calidad se siembran en medio de baja selectividad por estría cruzada. Incubar las placas a  $36 \pm 1^\circ\text{C}$  de 18 a 24 h.

Tomar el hisopo del caldo de enriquecimiento y hacer una descarga en un extremo de al menos dos medios de alta selectividad (agar verde brillante y agar sulfito de bismuto).

La placa de verde brillante se siembra con asa redonda por estría cruzada, quemar y enfriar el asa entre el segundo y el tercer cuadrante. La placa de sulfito de bismuto se siembra con una asa redonda por estría cruzada sin quemar el asa entre cuadrantes. El agar verde brillante se incuba de 18 a 24 h y el agar sulfito de bismuto se incuba durante 48 h, ambos a  $36 \pm 1^\circ\text{C}$ .

#### Identificación bioquímica

- De la placa de baja selectividad, seleccionar colonias lactosa negativas (colonias incoloras, probables *Salmonella* o *Shigella*), quemar una asa en punta y enfriar en un extremo de la placa donde no haya crecimiento, tomar una colonia sin extender en el agar y sembrar los siguientes medios: Caldo sorbitol y caldo mucato, depositar inóculo; medio MIO, introducir el asa hasta el fondo en posición vertical; TSI y LIA, picadura hasta el fondo y estriar la superficie; citrato y urea, estriar en la superficie; BAB, picadura hasta el fondo y estriar la superficie del agar.
- Incubar los tubos a  $36 \pm 1^\circ\text{C}$  de 18 a 24 h.
- Antes de leer las pruebas bioquímicas adicionar al medio MIO aproximadamente 0.5 mL de reactivo de Ehrlich o Kovac, interpretar los resultados de las pruebas bioquímicas utilizando el cuadro 1 e identificar los patrones bioquímicos de *Salmonella* y *Shigella* con los cuadros 3-5, registrar los resultados.
- Del agar verde brillante seleccionar colonias lactosa negativas (colonias rojas). Quemar un asa en punta y enfriar en un extremo de la placa donde no haya crecimiento, tomar una colonia sin extender en el agar y sembrar las pruebas bioquímicas como se indicó previamente.

- De la placa de agar de sulfito de bismuto hacer una selección de colonias características a *Salmonella*, las cuales se observan negras con halo y brillo metálico, tomar una colonia sin extender en el agar y sembrar las pruebas bioquímicas como se indicó previamente.

#### Serotipificación del antígeno somático "O" de *Shigella*

- Si la cepa se identifica bioquímicamente como *Shigella*, conservar los tubos de TSI y BAB; a partir del crecimiento bacteriano del tubo de TSI sembrar en condiciones de esterilidad una placa de BAB por estría cerrada e incubar de 18 a 24 horas a  $36 \pm 1^\circ\text{C}$ .
- En un portaobjetos limpio y desengrasado colocar 6 gotas de solución salina formalinizada (SSF) en el extremo superior separándolas lo suficiente para evitar que las gotas se mezclen; en el extremo inferior del portaobjetos colocar en forma correspondiente una gota de SSF y una gota de cada uno de los siguientes antisueros de *Shigella* A (1-7), B (1-6), C (1-7) y D.
- Con un asa desechable o aplicador de madera tomar crecimiento de la placa de BAB e ir depositando en cada una de las gotas superiores de SSF para tener una suspensión bacteriana, mezclar cada gota de suspensión con la gota inferior correspondiente utilizando asa desechable o aplicador de madera y evitando contaminación cruzada.
- Rotar suavemente el portaobjeto y observar a contra luz una reacción de aglutinación utilizando una lámpara de luz blanca, la observación se hace durante un minuto; después de ese tiempo la prueba se invalida. Interpretar el resultado usando el cuadro 6.
- Si la cepa no aglutina con ninguno de los antisueros polivalentes o monovalentes en existencia, se reportará como *Shigella spp*.
- Cualquiera que sea el resultado de las pruebas serológicas, éste deberá ser registrado.

#### Serotipificación del antígeno somático "O" de *Salmonella*

Si se identifica bioquímicamente una cepa como *Salmonella*, separar los tubos de TSI y BAB; tomar crecimiento del tubo de TSI con un asa de punta estéril y sembrar en placa de BAB por estría cerrada para obtener un crecimiento masivo, incubar de 18 a 24 horas a  $36 \pm 1^\circ\text{C}$ .

En un portaobjetos limpio y desengrasado colocar 6 gotas de solución salina formalinizada en el extremo superior separándolas lo suficiente para evitar que se mezclen, en el extremo inferior colocar en forma correspondiente a las

gotas superiores una gota de SSF y una gota de cada uno de los antisueros somáticos de *Salmonella* B, C<sub>1</sub>, O: 8, D y E pol.

Con un asa desechable o aplicador de madera tomar crecimiento de la placa de BAB e ir depositando en cada una de las gotas superiores de SSF para tener una suspensión bacteriana, mezclar cada gota de suspensión con la gota inferior correspondiente utilizando un asa desechable o aplicador de madera evitando contaminación cruzada. Rotar suavemente el portaobjeto y observar a contra luz una reacción de aglutinación utilizando una lámpara de luz blanca, la observación se hace durante un minuto. Interpretar el resultado utilizando el cuadro 6 y reportarlo.

#### 6.8. Interpretación por laboratorio

Para emitir un resultado positivo a *Salmonella* o *Shigella* de una muestra procesada, se considera la identificación bioquímica que debe corresponder a los patrones bioquímicos de dichos géneros, así como a los resultados de serotipificación de los antígenos somáticos para ambos géneros bacterianos.

Un resultado negativo corresponde a la ausencia de *Salmonella spp* y *Shigella spp* en la muestra fecal.

#### 6.9. Medidas de bioseguridad

- Apegarse a lo establecido en el Anexo I. Medidas de Bioseguridad

### Anexo III: Interpretación y resultados de las pruebas

Cuadro 1. INTERPRETACIÓN DE PRUEBAS BIOQUÍMICAS			
MIO	PRUEBA POSITIVA	PRUEBA NEGATIVA	INDICADOR DE pH
Movilidad	Medio turbio, crecimiento en todo el medio	Crecimiento sólo a lo largo de la picadura	Púrpura de bromocresol
Producción de indol	El reactivo de Ehrlich o Kovac toma una coloración roja	No cambia la coloración del reactivo	pH neutro = morado pH alcalino = K = púrpura = descarboxilación positiva

Descarboxilación de ornitina	Color púrpura en el fondo del medio	Color amarillo en el fondo del medio	pH ácido = amarillo = descarboxilación negativa
TSI	PRUEBA POSITIVA	PRUEBA NEGATIVA	INDICADOR DE pH
Fermentación de glucosa	Fondo del medio amarillo (A)	Fondo del medio sin cambio	Rojo de fenol pH neutro = naranja
Fermentación de lactosa y sacarosa	Inclinación del medio amarillo (A)	Inclinación del medio roja (K)	pH alcalino = K = rojo pH ácido = A = amarillo
Producción de gas	Burbujas o rompimiento del medio	Sin formación de burbujas ni ruptura del medio	Gas = producto de la fermentación de la glucosa
Producción de H <sub>2</sub> S	Precipitado negro en el fondo o en todo el medio	Sin precipitado negro	H <sub>2</sub> S = reacción enzimática con el tiosulfato de sodio y citrato férrico para formar un precipitado negro
LIA	PRUEBA POSITIVA	PRUEBA NEGATIVA	INDICADOR DE pH
Descarboxilación de lisina	Fondo del medio color púrpura	Fondo del medio color amarillo	Púrpura de bromocresol pH neutro = morado pH alcalino = K = púrpura = descarboxilación positiva pH = ácido = A = amarillo = descarboxilación negativa
Desaminación de lisina	Inclinación del medio color rojo o vino	Inclinación del medio color morado	Púrpura de bromocresol pH neutro = morado pH alcalino= R = rojo = desaminación positiva pH ácido = A = amarillo = desaminación negativa

Producción de gas	Burbujas o rompimiento del medio	Ausencia de burbujas o rompimiento del medio	Gas = producto de la fermentación de la glucosa
Producción de H <sub>2</sub> S	Precipitado negro en el fondo o en todo el medio	Ausencia de precipitado en el fondo o en todo el medio	
CALDO ARGININA	PRUEBA POSITIVA	PRUEBA NEGATIVA	INDICADOR DE pH
Descarboxilación de la arginina	Color del medio púrpura	Color del medio amarillo	Púrpura de bromocresol pH = neutro = ámbar pH = alcalino = púrpura = descarboxilación (+) pH = ácido = amarillo
CALDO PEPTONADO	PRUEBA POSITIVA	PRUEBA NEGATIVA	INDICADOR DE pH
Producción de indol	El reactivo toma una coloración roja	No cambia la coloración del reactivo	
Oxidasa	Color azul en la tira reactiva	Ausencia de coloración	Presencia de la enzima citocromo oxidasa
UREA DE CHRISTENSEN	PRUEBA POSITIVA	PRUEBA NEGATIVA	INDICADOR DE pH
Hidrólisis de la urea	Inclinación del medio color rosa	Inclinación del medio sin cambio de color o amarillo	Rojo de fenol pH neutro = amarillo o ligeramente rosa pH alcalino = rosa = hidrólisis de la urea positiva pH ácido = amarillo o sin cambio = hidrólisis de la urea negativa

CITRATO DE SIMMONS	PRUEBA POSITIVA	PRUEBA NEGATIVA	INDICADOR DE pH
Utilización del citrato como única fuente de carbono	Inclinación del medio color azul	Inclinación del medio color verde	Azul de bromotimol pH neutro = verde pH alcalino = azul = utilización del citrato como única fuente de carbono
CALDO SORBITOL	PRUEBA POSITIVA	PRUEBA NEGATIVA	INDICADOR DE pH
Fermentación del sorbitol	Color amarillo	Color rojo o sin cambio	Rojo de fenol pH neutro = anaranjado pH ácido = amarillo pH alcalino = anaranjado
CALDO MUCATO	PRUEBA POSITIVA	PRUEBA NEGATIVA	INDICADOR DE pH
Utilización del mucato	Color amarillo	Sin cambio o verdoso	Azul de bromotimol pH neutro = azul menta pH ácido = amarillo pH alcalino = azul menta verdoso
CALDO MALONATO	PRUEBA POSITIVA	PRUEBA NEGATIVA	INDICADOR DE pH
Utilización del malonato	Azul	Verde	Azul de bromocresol

**Cuadro 2. IDENTIFICACIÓN DE DIFERENTES ESPECIES DEL GÉNERO *VIBRIO***

MICROORGANISMO	COLONIA	TSI	LIA	M	I	O	CALDO PEPTONADO	ARGININA	ROJO DE METILO	V.P	OXIDASA	CALDO NUTRITIVO CON NaCl (%)							GAS
												0	1	3	6	8	10	12	
<i>Vibrio cholerae</i>	Amarilla	A (K)/A	K/K	+	+	+	+	-	+/-	+	+	+	+	+	V	-	-	-	-
<i>Vibrio alginolyticus</i>	Amarilla	A/A	K/K	+	+/-	V	+	-	+	+/-	+	-	+	+	+	+	+/-	-/+	-
<i>Vibrio charchariae</i>		A (K)/A	K/K	-	+	-	+	-	V	+	+	-	+	+	+	-	-	-	-
<i>Vibrio cincinnatiensis</i>	Amarilla	A (K)/A	K/K (A)	+	-	-	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+/-	-	-	-
<i>Vibrio damsella</i> **	Amarilla	K/A	K/K (A)	-/+	-	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-	-	-
<i>Vibrio fluvialis</i>	Amarilla	A/A	K/A	+	-/+	-	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+/-	-	-	-
<i>Vibrio furnissi</i>	Amarilla	A (K)/A	K/A	+	-/+	-	-/+	+	-	+	+	-	+	+	+	+/-	-	-	+
<i>Vibrio hollisae</i>	Verde	K/A	K/A	-	+	-	+	-	-	-	+	-	+	+	+	-	-	-	-
<i>Vibrio metschnikovii</i>	Amarilla	A/A	K/A	+	-/+	-	+	+/-	+	+	-	-	+	+	+	V	-	-	-
<i>Vibrio mimicus</i>	Verde	A (K)/A	K/K	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	V	-	-	-	-
<i>Vibrio parahaemolyticus</i> *	Azul-verde	K/A	K/K	+	+	+	+	-	-	+	+	-	+	+	+	+	-	-	-
<i>Vibrio vulnificus</i>	Azul-verde	A (K)/A	K/K	+	+	V	+	-	-	+	+	-	+	+	+/-	-	-	-	-

\*: Ureasa positivo

- : 0 a 10 % de positividad

-/+ : 11 a 39 % de positividad

V : 40 a 60 % de positividad

+/- : 61 a 90 % de positividad

+ : 91 a 100 % de positividad



RESULTADOS DE PRUEBAS BIOQUÍMICAS DE ENTEROBACTERIAS QUE DAN PRUEBA DE INDOL NEGATIVO										
MICROORGANISMO	CITRATO	UREA	LIA	H <sub>2</sub> S	TSI	M	I	O	MUCATO	SORBITOL
<i>Salmonella spp</i>	+(95)	-99	K/K (98)	+(95)	K/A(99)	+(95)	-(99)	+(97)	+(90)	+(95)
<i>Shigella A,B,C</i>	-(100)	-(100)	K/A(100)	-(100)	K/A(100)	-(100)	-(50)	-(99)	-(100)	-(70)
<i>Shigella D</i>	-(100)	-(100)	K/A(100)	-(100)	K/A(98)	-(100)	-(100)	+(98)	-(90)	-(98)
<i>Citrobacter freundii</i>	+(78)	-(56)	K/A(100)	+(78)	K/A(78)	+(89)	-(77)	-(100)	+(100)	+(100)
<i>Proteus mirabilia</i>	+(65)	+(98)	R/A(100)	+(98)	K/A(98)	+(95)	-(98)	+(99)	-(100)	-(100)
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	+(98)	+(95)	K/K(98)	-(100)	A/A(98)	-(100)	-(100)	-(100)	+(90)	+(99)
<i>Klebsiella rhinoscleromatis</i>	-(100)	-(100)	K/A(100)	-(100)	K/A(100)	-(100)	-(100)	-(100)	-(100)	+(100)
<i>Enterobacter aerogenes</i>	+(95)	-(98)	K/K(98)	-(100)	A/A(95)	+(97)	-(100)	+(98)	+(90)	+(100)
<i>Enterobacter cloacae</i>	+(100)	+(65)	K/A(100)	-(100)	A/A(93)	+(95)	-(100)	+(96)	+(75)	+(95)
<i>Enterobacter zakasakii</i>	+(99)	-(99)	K/A(100)	-(100)	A/A(99)	+(96)	-(88)	+(91)	-(99)	-(100)
<i>Pantoea agglomerans</i>	+(50)	-(80)	K/A(100)	-(100)	K/A(60)	+(85)	-(80)	-(100)	-(60)	-(70)
<i>Serratia marcescens</i>	+(98)	-(85)	K/K(99)	-(100)	K/A(98)	+(96)	-(99)	+(99)	-(100)	+(99)
<i>Providencia helmabachae</i>	-(100)	-(100)	R/A	-(100)	K/A(100)	-(54)	-(100)	-(100)	-(100)	-(100)
<i>Hafnia alvei</i>	-(100)	-(96)	K/K(100)	-(100)	K/A(95)	+(85)	-(100)	+(98)	-(100)	-(100)
Las cifras dentro de los parentesis, equivalen al mayor porcentaje de cepas que dan prueba positiva o negativa según corresponda										

MICROORGANISMO	CITRATO	UREA	LIA	H <sub>2</sub> S	TSI	M	I	O	MUCATO	SORBITOL
<i>E. coli</i>	-(99)	-(99)	K/K (90)	-(99)	A/A (95)	+(95)	+(98)	+(65)	+(95)	+(94)
<i>E. coli (inactiva)</i>	-(99)	-(99)	K/A(60)	-(99)	K/A(75)	-(95)	+(80)	-(80)	-(70)	-(75)
<i>Klebsiella oxytoca</i>	+(95)	+(90)	K/K(99)	-(100)	A/A(100)	-(100)	+(99)	-(100)	+(93)	+(99)
<i>Citrobacter diversus</i>	+(99)	+(75)	K/A(100)	-(100)	K/A o A/A(50)	+(95)	+(99)	+(99)	+(95)	+(99)
<i>Citrobacter amalonaticus</i>	+(95)	+(85)	K/A(100)	-(95)	K/A(65)	+(95)	+(100)	+(95)	+(96)	+(99)
<i>Morganella morganii</i>	-(100)	+(95)	R/A(99)	-(80)	K/A(99)	+(95)	+(95)	+(95)	-(100)	-(100)
<i>Morganella morganii biogrupo 1</i>	-(100)	+(100)	K/K(100)	-(85)	K/A(100)	-(100)	+(100)	+(80)	-(100)	-(100)
<i>Edwarsiella tarda</i>	-(99)	-(100)	K/K(100)	+(100)	K/A(100)	+(98)	+(99)	+(100)	-(100)	-(100)
<i>Edwarsiella tarda</i>	-(100)	-(100)	K/K(100)	-(100)	K/A(100)	+(100)	+(99)	+(100)	-(100)	-(100)
<i>Proteus vulgaris</i>	-(85)	+(95)	R/A(100)	+(95)	K/A(98)	+(95)	+(98)	-(100)	-(100)	-(100)
<i>Providencia rettgeri</i>	+(95)	+(98)	R/A	-(100)	K/A(95)	+(94)	+(99)	-(100)	-(100)	-(99)
Las cifras dentro de los parentesis, equivalen al mayor porcentaje de cepas que dan prueba positiva o negativa según corresponda										

### IDENTIFICACIÓN BIOQUÍMICA DE SEROTIPOS ATÍPICOS DE *Salmonella*

SEROTIPO	CITRATO	UREA	LIA	H <sub>2</sub> S	TSI	M	I	O	MUCATO	SORBITOL	GAS	MALONATO
<i>Salmonella</i> spp	+	-	K/K	+	K/A	+	-	+	+	+	+	-
<i>S. Typhi</i>	-	-	K/K	“+”	K/A	+	-	-	-	+	-	-
<i>S. Choleraesuis</i>	(+/-)	-	K/K	[-/+]	K/A	+	-	+	-	+	+	-
<i>S. Paratyphi A</i>	-	-	K/A	-	K/A	+	-	+	-	+	+	-
<i>S. Gallinarum</i>	-	-	K/K	+	K/A	-	-	-	[+/-]	-	-	-
<i>S. Pollorum</i>	-	-	K/K	+	K/A	-	-	+	-	-	+	-

“ ” en poca cantidad

(+/-) 75% (-) y 25% (-)

[+/-] 50% (+) y 50% (-)

### Anexo IV: Resultados de pruebas de aglutinación

Cuadro 6. Prueba de aglutinación en portaobjetos		
PRUEBA POSITIVA	PRUEBA NEGATIVA	CONTROL NEGATIVO
Formación de grumos	Suspensión homogénea	Suspensión homogénea

Cuadro 7. Lista de antisueros para la prueba de aglutinación flagelar de <i>Salmonella</i> en tubo		
Grupo somático		Antisuero flagelar
O:2	(A)	a, g, m, p, v, 5
O:4	(B)	f, g, s, h, r, i, 2, v, m, t, 7, z <sub>4</sub> , z <sub>23</sub> , b, 5, d, enx, x, z <sub>15</sub>
O:7	(C <sub>1</sub> )	b, g, m, s, t, r, w, 5, z <sub>10</sub> , d, h, k, z <sub>29</sub> , enx, x, z <sub>15</sub>
O:8	(C <sub>2</sub> )	d, h, r, 2, z <sub>4</sub> , z <sub>24</sub> , k, 5, enx, z <sub>10</sub> , i, z <sub>6</sub> ,
O:9	(D <sub>1</sub> )	g, d, m, v, q, s, t, 5, 2, p, z <sub>28</sub>
O:3,10	(E <sub>1</sub> -E <sub>3</sub> )	h, v, 5, 6, 7, w, z <sub>10</sub> , z <sub>6</sub> , r, y
O:3,19	(E <sub>4</sub> )	g, s, t, i, 2

O:11	(F)	a, r, 5, enx, Z <sub>28</sub> , Z <sub>13</sub> , X, Z <sub>15</sub> , Z <sub>29</sub>
O:13,22	(G <sub>1</sub> )	z, 6
O:13,23	(G <sub>2</sub> )	f, g, z, w, b, 5, 6, s
O:6,14	(H)	7, d, y
O:16	(I)	c, 5, y
O:17	(J)	d, 5
O:18	(K)	Z <sub>23</sub> , Z <sub>4</sub>
O:21	(L)	b, enx, y
O:28	(M)	7, y
O:30	(N)	b, enx
O: 35	(O)	f, g, Z <sub>4</sub> , Z <sub>23</sub>
O:40		b, enx, x, Z <sub>15</sub>
O:44		7, c, Z <sub>10</sub> , enx, x, Z <sub>15</sub>
O:47		i, enx, x, Z <sub>15</sub>

**Cuadro 8. Prueba de aglutinación en tubo**

PRUEBA POSITIVA	PRUEBA NEGATIVA	CONTROL NEGATIVO
Formación de grumos	Suspensión homogénea	Suspensión homogénea

**Cuadro 9. DETERMINACIÓN DE ANTÍGENOS SOMÁTICOS DE *Vibrio cholerae* POR AGLUTINACIÓN EN PORTAOBJETOS**

Control negativo	Polivalente O1	O1 Inaba	O1 Ogawa	O:139	Interpretación del resultado
-	+	+	-	-	<i>V. cholerae</i> O1 Inaba
-	+	-	+	-	<i>V. cholerae</i> O1 Ogawa

-	-	-	-	-	<i>V. cholerae</i> NO O1 Neg a O:139
-	-	-	-	+	<i>V. cholerae</i> NO O1 Pos a O:139
+	+	+	+	+	<i>V. cholerae</i> NO O1 Neg a O:139
-	+	-	-	-	<i>V. cholerae</i> NO O1 Neg a O:139
-	-	+	-	-	<i>V. cholerae</i> NO O1 Neg a O:139
-	+	+	+	-	<i>V. cholerae</i> O1 Ogawa débil

## Anexo V: Preparación, Uso y Garantía de Calidad de los Medios de Cultivo

### 1. OBJETIVO

Establecer las directrices para la preparación, uso y garantía de calidad de los medios de cultivo.

### 2. DEFINICIONES

Agares inclinados: Son los medios de cultivo sólidos vertidos en tubos que se mantienen en posiciones inclinadas mientras se solidifican.

Cepa de referencia: Microorganismo definido al menos a nivel de género y especie, catalogado y descrito según sus características y preferiblemente indicando su origen.

Control de la calidad: Parte de la gestión de la calidad orientada al cumplimiento de los requisitos de la calidad.

Esterilización: Es un método físico o químico cuya finalidad es eliminar toda forma de vida.

Lote de los medios de cultivo: Unidad que permite una trazabilidad completa referida a una cantidad definida de producto a granel, producto semiterminado o producto final, que es coherente en tipo y calidad y que ha cumplido con los requisitos de los ensayos de producción (control durante el proceso) y de garantía de la calidad, y que ha sido preparado durante un

período de producción definido al que se le ha asignado el mismo número de lote.

Medio de cultivo: Formulación de sustancias en forma líquida, semisólida o sólida, que contienen constituyentes naturales y/o sintéticos destinados a facilitar la multiplicación o a mantener la viabilidad de los microorganismos.

Medio de cultivo líquido: Medio de cultivo que consiste en una solución acuosa de uno o más constituyentes (por ejemplo, agua peptonada, caldo nutritivo), también se le denomina caldo.

Medio de cultivo sólido y medio de cultivo semisólido: Medio de cultivo líquido que contiene materiales solidificantes (por ejemplo agar-agar, gelatina, etc.) en diferentes concentraciones.

Medio diferencial: Medio de cultivo que permite el estudio de una o más características fisiológicas/bioquímicas de los microorganismos para su identificación.

Medio de enriquecimiento: Medio de cultivo generalmente líquido, que debido a su composición, proporciona unas condiciones particularmente favorables para la multiplicación de los microorganismos.

Medios selectivos: Son medios que contienen sustancias que impiden el desarrollo de algunos microorganismos, pero en una flora mixta permiten el aislamiento y recuperación del germen o grupo de gérmenes de interés.

Medios selectivos de enriquecimiento: Son medios líquidos que estimulan la multiplicación de algún germen determinado e impiden o inhiben la reproducción de otros.

pH: Es el grado de acidez o de alcalinidad de un medio y es la medida de la concentración de iones hidronio u oxhidrilo.

Placas: Medios de cultivo sólidos vertidos en placas de Petri.

Selectividad: Se refiere a la supresión selectiva del crecimiento de un microorganismo.

### 3. DESCRIPCION DE LA ACTIVIDAD

### Recepción

- Reciba los medios de cultivo deshidratados y los reactivos solo si la fecha de caducidad está vigente.
- Cuando los medios de cultivo ingresen al laboratorio, regístrelos.
- Almacene los medios de cultivo deshidratados como lo indica la etiqueta.
- Evitar que los medios de cultivo se almacenen cerca de equipos o aparatos generadores de calor o humedad.

### Apertura

- Observe que el aspecto físico del medio de cultivo corresponda a lo esperado (color, olor, polvo fino o granular).
- No utilice medios hidratados.
- Si es un frasco nuevo coloque de inmediato la fecha de apertura.
- No mezcle diferentes lotes.
- No utilice medios caducados (en caso de hacerlo por alguna razón bien justificada, este se evaluara previamente con las pruebas de funcionamiento correspondientes).

### Cálculos

- Siga las especificaciones de uso que indica la etiqueta del medio de cultivo deshidratado.
- Para la preparación de medios de cultivo a partir de ingredientes, consultar las fichas técnicas correspondientes.
- Registre las cantidades de medios de cultivo o ingredientes utilizados en la bitácora de preparación de medios de cultivo.

### Pesada

- Pese el medio de cultivo o sus ingredientes en ausencia de corrientes de aire y de vibraciones, con rapidez y exactitud.
- Utilice charolas desechables, vasos de precipitados con capacidad conveniente o cajas de Petri limpios y secos.
- Pese los ingredientes por separado, evitar formar polvo y procurar no inhalarlos (especialmente cuando el medio contiene sustancias tóxicas). Utilice balanzas calibradas y verificadas.
- Utilice una espátula limpia para tomar la cantidad del medio que se requiera. Debe emplear una espátula diferente para cada ingrediente con el fin de evitar contaminación.
- Cerrar el frasco de inmediato para evitar la hidratación y contaminación del medio.
- Registre los datos de la pesada en la bitácora de la balanza utilizada.

#### Rehidratación.

- Utilice agua destilada con pH 5.5 a 7.5
- Mida el volumen requerido con una probeta de capacidad apropiada.
- Use recipientes de vidrio de borosilicato duro o de acero inoxidable que estén libres de residuos de grasa y detergentes.
- Para los medios preparados a partir de sus componentes así como para los de formulación comercial: agregue los ingredientes en la mitad del agua del volumen requerido y el resto del agua agréguelo tratando de arrastrar el polvo del medio de cultivo adherido a las paredes del recipiente tratando de evitar la formación de grumos; deje reposar durante 10 a 15 minutos para una mejor hidratación.
- Para los medios de cultivo que contienen agar: calentar con agitación constante y deje hervir durante un minuto; para los medios líquidos disolver el polvo y si no es completa la disolución calentar ligeramente.

#### Medición y ajuste de pH

- Utilice potenciómetro calibrado con soluciones buffer de referencia de pH 4, 7 y 10.
- Tome una muestra de 10 a 20 mL del medio de cultivo y dejar enfriar o en su caso solidificar.
- Determinar el pH a temperatura ambiente. Si es un medio líquido determinar el pH directamente en el recipiente que contiene el medio, siempre y cuando esté a temperatura ambiente.
- Si el pH no cumple con el valor especificado en la formulación, ajustarlo agregando algunas gotas de las soluciones de HCl al 20% o NaOH al 20 % con agitación constante para homogenizar el medio; cuidar de no agregar volúmenes grandes de estas soluciones durante el ajuste porque se puede alterar la composición del medio de cultivo. El pH final requiere estar dentro del rango de variabilidad de + 0.2 unidades.
- Registre la lectura en las bitácoras correspondientes como pH inicial.
- Una vez concluido el ciclo de esterilización determinar el pH final del medio de cultivo y registrar la lectura como pH final.

#### Esterilización, preparación y envasado.

La esterilización de los medios de cultivo y otros reactivos se puede realizar empleando calor húmedo o filtración, dependiendo de la naturaleza de la sustancia utilizada (consulte el Anexo 1).

Cuando el medio requiera del agregado de algún suplemento siga las instrucciones del fabricante, las medidas de bioseguridad y precauciones necesarias para la correcta manipulación del reactivo.

- Medios de cultivo en tubo sin ingredientes termolábiles: Envase en tubos de 13 x 100 mm, 16 x 150 mm o de otra medida, según se requiera, cierre sin apretar antes de esterilizarlos por calor húmedo; después del ciclo de esterilización incline los agares en tubo y mantenga los líquidos y semisólidos en posición vertical.
- Medios de cultivo en tubo con ingredientes termolábiles: Esterilice la base del medio por calor húmedo y el ingrediente termolábil por filtración o como indique el fabricante. Agregue el ingrediente termolábil estabilizado a temperatura ambiente a la base (esta requiere estar a una temperatura entre 45°C y 50°C) y homogenice sin que se forme espuma, dosifique en tubos estériles y cierre bien la tapa. Incline los agares en tubo que así lo requieran y mantenga los líquidos en posición vertical.
- Medios de cultivo en tubo desechable: Envase en matraz Erlenmeyer con tapón de rosca de baquelita o en botella de vidrio de borosilicato duro a no más de tres cuartas partes de su capacidad y esterilice por calor húmedo, deje enfriar a una temperatura cercana a los 45°C o 50°C, dosifique en tubos con jeringa semiautomática previamente esterilizada en condiciones asépticas y cierre bien la tapa. Incline los agares en tubo que así lo requieran y mantenga los líquidos en posición vertical.
- Medios de cultivo líquidos en tubo desechable con ingredientes termolábiles: Mezcle los ingredientes del medio de cultivo a temperatura ambiente y esterilice por filtración, dosifique en tubos con jeringa semiautomática, previamente esterilizada, en condiciones asépticas y cierre bien la tapa. Manténgalos en posición vertical.
- Medios de cultivo en placa sin ingredientes termolábiles: Envase en matraz Erlenmeyer con tapón de rosca de baquelita o en botella de vidrio de borosilicato duro a no más de tres cuartas partes de su capacidad y esterilice por calor húmedo, deje enfriar a una temperatura cercana a los 45°C o 50°C, vierta en cajas de Petri en gabinete de flujo laminar o en condiciones de esterilidad. Si se requieren placas con un grosor específico de agar, vierta el medio con jeringa o dispensador semiautomático en condiciones de esterilidad.
- Medios de cultivo en placa con ingredientes termolábiles: Esterilice la base del medio por calor húmedo y obtenga el ingrediente termolábil en condiciones de esterilidad o, esterilice por filtración. Agregue el ingrediente (cuidando que esté estabilizado a temperatura ambiente) a la base que deberá estar a una temperatura aproximada entre 45°C y 50°C para no deteriorar las propiedades del suplemento termolábil, homogenice sin formar espuma, vierta en cajas de Petri usando gabinete de flujo laminar o en condiciones de esterilidad. Si se



requieren placas con un grosor específico de agar, verter el medio con jeringa o dispensador semiautomático en condiciones de esterilidad.

- Medios de cultivo en bote, frasco o matraz: Envase en el recipiente requerido y cierre sin apretar antes de esterilizarlos por calor húmedo; después del ciclo de esterilización inclínelos o déjelos en posición vertical de acuerdo a lo solicitado.

Verifique la eficacia del proceso de esterilización utilizando emuladores químicos, tubos indicadores o termómetros de máximas ya que es posible interpretar los resultados de inmediato cuando el proceso así lo requiera o indicadores biológicos con una incubación mínima de 48 horas para la interpretación de los resultados.

Después del ciclo de esterilización y después de agregar cualquier suplemento determine el pH final y registre el resultado en la bitácora de uso del potenciómetro y en la bitácora de preparación de medios de cultivo.

Todos los medios de cultivo requieren ser etiquetados con Claves de Identificación de Medios de Cultivo.

Garantía de calidad del producto terminado.

- Control de esterilidad. Incube la totalidad de los medios de cultivo o el 10% del lote a  $36^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  durante 24 a 48 horas para detectar la presencia de bacterias y posteriormente 48 horas más a temperatura ambiente para detectar crecimiento de hongos o ajústese a lo indicado en la siguiente tabla:

Condiciones ideales para efectuar pruebas de esterilidad

Temperatura de incubación	Período mínimo de incubación para prueba de esterilidad
4-8°C	10-14 días
20-25°C	2-5 días
35-37°C	48-72 hrs

Si el 10% del lote presenta evidencia de desarrollo microbiano descartar todo el lote.

- Características físicas y químicas: Inspeccione por atributos o características físicas y químicas a la totalidad de unidades del lote recién preparado.

pH: El pH final requiere estar dentro del rango de variabilidad de  $\pm 0.2$  unidades con respecto al especificado en la etiqueta o formulación y se determina a una temperatura de 25°C.

Color: No debe ser distinto al habitual, en medios con sangre no debe haber hemólisis.

Turbidez: Los caldos no deben presentar indicios de turbidez.

Tanto los medios líquidos como los sólidos no deberán mostrar ningún tipo de precipitados (excepto caldo tetratiónato), o la presencia de algún defecto óptico (pelusa, hilos de gasa, burbujas, o cualquier otro artefacto).

Dosificación: Verifique la uniformidad en el nivel del medio dispensado en el tubo o la placa de acuerdo a lo solicitado.

Inclinación: En los tubos de 13 x 100 mm el pico en flauta deberá tener una longitud de 3 a 4 cm.

Profundidad: Para agares en tubo la columna debe ser de 2 a 3 cm, para cajas de Petri el grosor debe ser de 4 a 5 mm, a menos que en la solicitud el usuario indique una especificación diferente. Las placas con agar Mueller Hinton y HTM requieren tener 4 mm de espesor.

Consistencia del gel: Verifique la consistencia del medio así como la humedad y el grado de adhesión del agar a la placa o tubo que lo contiene.

Presencia de agua de condensación: Debe estar ausente.

Para detalles referentes a los posibles defectos que puedan presentarse durante la preparación de los medios de cultivo consulte el anexo 2.

- Promoción de crecimiento.  
Realice la actividad de acuerdo al procedimiento de Evaluación biológica de los Medios de Cultivo cada vez que se cambie de lote del medio de cultivo deshidratado, cuando se prepare un lote de medio de cultivo de uso esporádico y siempre que el aspecto o pH del medio no corresponda al esperado.

Verifique los siguientes parámetros: La formación y el aspecto de las colonias en los medios sólidos, el desarrollo de pequeños inóculos en los medios nutritivos, aparición de reacciones deseadas en los medios

para pruebas bioquímicas, crecimiento de organismos típicos en los medios diferenciales, el crecimiento de organismos deseados y la inhibición de los no deseados en los medios selectivos, la mayor recuperación en los medios de pre-enriquecimiento y de enriquecimiento.

Para evaluar la efectividad de los medios diferenciales y selectivos utilice, cuando menos, 2 cepas de microorganismos: Una debe dar la característica esperada y la otra debe dar características fácilmente diferenciales, en los medios selectivos una de las cepas no debe desarrollarse o tener crecimiento pobre.

El laboratorio habrá de contar con cepas de referencia, de preferencia de la colección American Type Culture Collection (ATCC®) u otras colecciones microbianas.

Control de caducidad y almacenamiento de los medios.

- Rotule en forma visible las placas y las gradillas, la etiqueta de identificación incluye día y mes en que se prepara, clave del medio y las iniciales de quien lo preparó.
- Almacene los medios preparados en condiciones que eviten cualquier modificación de su composición o propiedades antes de ser entregados al usuario, manténgalos en refrigeración en un rango de temperatura de 4°C a 8°C y protegidos de la luz, en condiciones que eviten cualquier tipo de contaminación microbiana.
- Ajuste bien las tapas de los medios preparados en tubo o en otro tipo de envase para evitar su deshidratación o contaminación.
- Colocar las placas en el refrigerador cuidando que las tapas de las mismas queden hacia abajo.
- A partir de la fecha de preparación verificar que el medio de cultivo esté vigente.
- El período de caducidad del medio está determinado y validado con base en los ingredientes, las características propias del medio, las condiciones de almacenamiento o por los cambios visibles en el color, textura, volumen u otras características más tales como pérdida de sensibilidad o deshidratación.

Disposición final de los medios fuera de especificación.

Los medios de cultivo que no cumplan con las especificaciones requeridas para el uso en laboratorio tales como:

- Crecimiento (+) en el control biológico del ciclo de esterilizado o ausencia de vire en el emulador.
- pH final fuera de especificación.
- Contaminación por hongos o bacterias.
- Color que no corresponde a lo esperado o presencia de hemólisis.
- Presencia de artefactos.
- Variación importante en el volumen dispensado, grosor irregular de la capa de agar o incumplimiento en los requisitos esperados para un medio inclinado (inclinación, profundidad o espuma).
- Serán desechados de acuerdo a la normativa vigente de Residuos Peligrosos Biológico Infecciosos (RPBI)

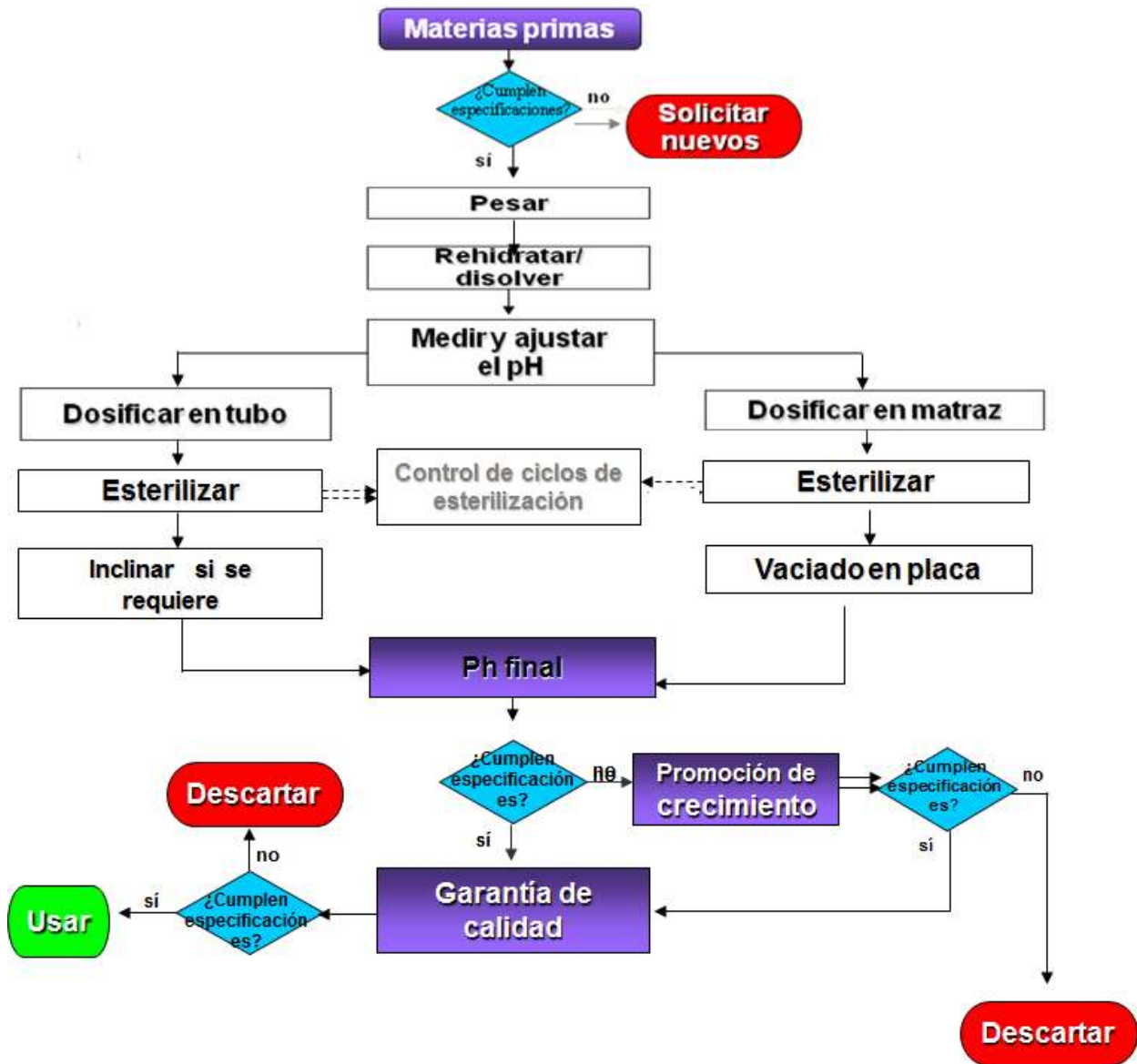


Figura AV.1 Algoritmo del proceso general de preparación de medios de cultivo. Métodos de esterilización.

Algunos medios no necesitan esterilización por autoclave u otro método sino que se pueden usar después de haber sido llevados a ebullición, pues son particularmente sensibles al calor y a la luz. En todos casos seguir las indicaciones del fabricante.

La esterilización mediante calor húmedo se realiza en autoclave, generalmente se sigue un ciclo de 15 min a 121°C, sin embargo, si se esterilizan volúmenes grandes de medio se corre el riesgo de dañarlo por sobrecalentamiento, por tanto, se recomienda que el recipiente en donde se coloque el medio para esterilizarlo no contenga más de 1000 ml para que el proceso sea eficaz.

Siempre se controlará la eficacia del proceso de esterilización utilizando los mecanismos adecuados (emuladores químicos, indicadores biológicos, termómetros de máxima, etc).

La esterilización por filtración se utiliza cuando el reactivo, medio, suplemento, etc; es de naturaleza termolábil, es decir, la exposición de este a altas temperaturas daña sus propiedades y algunas otras de sus características y no puede ser empleado ya para el fin que se requiere.

Este procedimiento se puede realizar por vacío o aplicando presión. Generalmente se utilizan unidades de filtración o filtros tipo pirinola desechables con membrana de acetato de celulosa con diámetros de poro de 0.22  $\mu\text{m}$  esterilizados por radiaciones gamma o pueden emplearse portafiltros reutilizables a los cuales se les coloca la membrana y se esterilizan en autoclave.

### **Anomalías o imperfecciones en producto terminado.**

En producto terminado es posible identificar características tanto físicas como químicas que pueden impactar en el rendimiento o funcionalidad de un medio de cultivo, ya sea en tubo, en placa o en otro tipo de envase.

- a) Imperfecciones físicas: Se les denomina así a todos aquellos datos que pueden observarse a simple vista y pueden ser significativos en el desempeño del medio y que incluyen:
  - Distribución poco uniforme del medio en una placa: Esto puede afectar en el tamaño de las colonias que se obtengan, en la definición de la zona de hemólisis, etc.
  - Color del medio.
  - Variación en el volumen del medio en tubo, placa o en otras presentaciones: Por ejemplo, un volumen menor de medio puede afectar el tiempo de vida media de este.
  - Deformación de la superficie del medio.

- Consistencia y estabilidad de los geles o agares.
- b) Imperfecciones químicas: Son aquellas que son causadas en lo particular por errores en la medición del pH.
- El pH del medio debe medirse utilizando un potenciómetro apropiado el cual debe estar previamente calibrado utilizando soluciones buffer de referencia.
  - La temperatura de las mediciones es otro punto crítico a tomar. Las lecturas deben ser tomadas a 25°C o la que indique el fabricante.
  - En el caso de los agares estos deben estar lo suficientemente solidificados y a temperatura ambiente, al igual que los caldos, para obtener una lectura confiable.
  - La lectura del pH de un medio que esté demasiado frío o demasiado caliente es una fuente de error importante.
  - Cuando realice un ajuste de pH, asegúrese que el medio esté bien homogenizado antes de tomar la muestra para hacer la determinación.
  - Use recipientes de cristalería limpios para obtener la muestra y asegúrese que el electrodo esté limpio para evitar contaminar el medio o la muestra y generar datos erróneos.

ANOMALIAS EN PRODUCTO TERMINADO	
Defecto/Anomalía/Imperfección	Causa más probable
El agar no se solidifica.	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Sobrecalentamiento del medio durante su preparación.</li> <li>2. pH bajo, que produce hidrólisis ácida del medio.</li> <li>3. Disolución incorrecta del agar.</li> <li>4. Mala mezcla de los ingredientes.</li> </ol>
pH fuera de rango	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Sobrecalentamiento del medio durante su preparación.</li> <li>2. Mala calidad del agua.</li> </ol>

	<ol style="list-style-type: none"> <li>3. Contaminación química externa.</li> <li>4. Medición del pH a temperatura inadecuada.</li> <li>5. Calibración incorrecta del potenciómetro.</li> <li>6. Mala calidad del medio deshidratado.</li> </ol>
Color anormal	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Sobrecalentamiento del medio durante su preparación.</li> <li>2. Mala calidad del agua.</li> <li>3. Mala calidad del medio deshidratado.</li> <li>4. pH incorrecto.</li> <li>5. Contaminación externa.</li> </ol>
Formación de precipitados	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Sobrecalentamiento del medio durante su preparación.</li> <li>2. Mala calidad del agua.</li> <li>3. Mala calidad del medio deshidratado.</li> <li>4. Control inadecuado del pH.</li> </ol>
Baja productividad/ Medio inhibidor poco eficiente	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Sobrecalentamiento del medio durante su preparación.</li> <li>2. Mala calidad del medio deshidratado.</li> <li>3. Mala calidad del agua.</li> <li>4. Uso de una formulación incorrecta, por ejemplo, ingredientes que no se han pesado correctamente, suplementos adicionados a una concentración errónea.</li> </ol>
Selectividad débil	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Sobrecalentamiento del medio durante su preparación.</li> <li>2. Mala calidad del medio deshidratado.</li> <li>3. Uso de una formulación incorrecta.</li> <li>4. Suplementos mal adicionados, por ejemplo: se agregaron cuando el medio estaba demasiado caliente o se adicionaron a una concentración errónea</li> </ol>

## Anexo VI: Colección de cultivos bacterianos

### Introducción

A lo largo de la historia, los microorganismos han sido utilizados como materiales esenciales de trabajo para la obtención de medicamentos (antibióticos, vitaminas y aminoácidos), elaboración de alimentos (pan, queso, bebidas y licores) y la fabricación de solventes y reactivos, entre otras aplicaciones. El uso creciente de materiales biológicos en la biotecnología y la protección medioambiental han fortalecido la necesidad de mantener los



cultivos microbianos de manera que las propiedades que los hacen importantes permanezcan estables.

El conocimiento de las peculiaridades de las disímiles técnicas de preservación existentes para su correcta aplicación, así como el seguimiento de las propiedades de los cultivos, propician su empleo como inóculo confiable en la industria, la docencia y la investigación.

Generalmente, la elección de la técnica más adecuada para conservar cultivos microbianos resulta difícil, pues deben tomarse en consideración los criterios de viabilidad y pureza de las cepas, cambios poblacionales y genéticos, número y valor de los cultivos, costo, suministro y transporte de cepas, así como la frecuencia de uso de los cultivos.

El método de conservación que se elija debe garantizar la supervivencia de las células por un período considerable de tiempo, de tal forma que conserve las propiedades de importancia de los cultivos y minimice la ocurrencia de mutaciones genéticas.

En relación con el número y valor de los cultivos, debe considerarse el tiempo a emplear en la preservación inicial, manipulación y control periódico de las cepas, el espacio de almacenamiento disponible y su importancia, al ser empleadas en su mayoría como materiales de referencia en el aseguramiento de la calidad microbiológica.

Con respecto al costo de la conservación de cepas, se incluyen los costos de personal, equipos y su mantenimiento, materiales e instalaciones generales (almacenamiento y poder de abastecimiento). Adicionalmente se le suma la distribución, para la cual se necesitarán réplicas conservadas y empaquetadas convenientemente que permitan la llegada al lugar de destino en las mejores condiciones. La distribución y manipulación de los microorganismos está regulada en el ámbito nacional e internacional y para su transportación es necesario el uso del sistema de “triple empaque” para asegurar que todo el personal involucrado en este proceso esté protegido de la exposición a cualquier agente contenido en el envase. Son varias las técnicas que se encuentran disponibles para la conservación de microorganismos y en cuanto a la organización de la colección de cultivos debe considerarse lo recomendado por la Federación Mundial de Colecciones de Cultivos (WFCC, siglas en inglés), en sus guías generales.

## **Métodos de conservación**

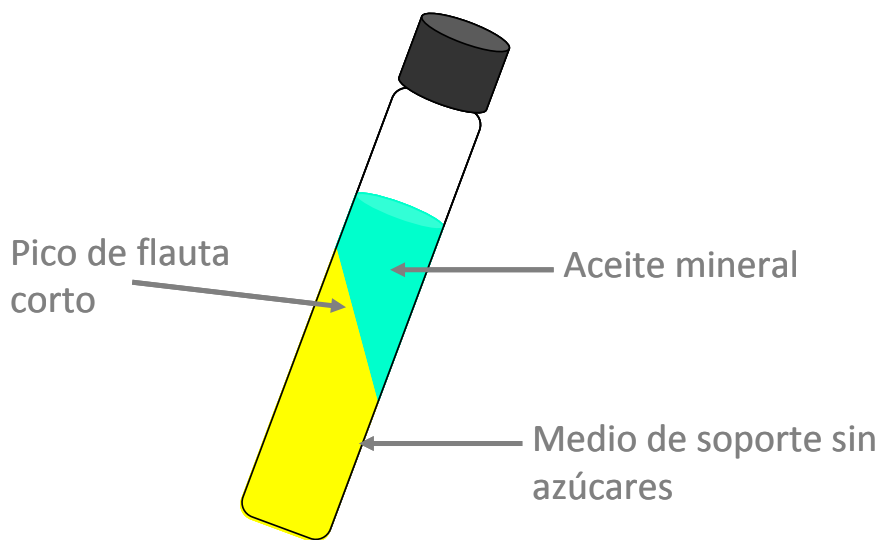
Los métodos de conservación de microorganismos se clasifican en los metabólicamente activos y metabólicamente inactivos.

Dentro del primer grupo se encuentran el subcultivo seriado y el subcultivo seriado cubierto con aceite mineral.

En el subcultivo seriado (Cuadro 1) no se requiere equipo de refrigeración especial, es un método rápido y fácil de realizar. Se considera que es un buen método de conservación a corto plazo para el análisis microbiano y para el transporte de algunas cepas pero se incrementa la posibilidad de mutación con cada transferencia y la pérdida de las características originales del microorganismo pero existe mayor riesgo de contaminación. No es un método rentable para la conservación a largo plazo ni para la conservación de demasiados aislamientos. En el cuadro 1 se mencionan algunos microorganismos que se pueden conservar por este método.

CUADRO 1. SUBCULTIVO SERIADO (CONSERVACIÓN DE CEPAS A CORTO PLAZO)			
BACTERIA	MEDIO CULTIVO	TEMPERATURA	SUBCULTIVO
<i>Haemophilus influenzae</i>	Gelosa Fildes Agar sangre enriquecido	Temperatura ambiente	Cada semana
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	Agar sangre	4 a 8 °C	Cada tres días
<i>Escherichia coli</i> <i>Staphylococcus aureus</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Enterococcus faecalis</i>	Agar soya tripticasa	4 a 8 °C	1 a 3 meses

El subcultivo seriado cubierto con aceite mineral (Figura 1.) consiste en cubrir completamente el cultivo en la fase exponencial de su desarrollo en medio sólido con una capa de aceite mineral. Los cultivos se pueden conservar viables a temperatura ambiente por períodos de varios años. Es un método sencillo y rápido. En estas condiciones los microorganismos pueden continuar reproduciéndose con posibilidades de mutación pero sólo es útil para algunos grupos bacterianos como las enterobacterias y los vibrios.



Fuente: InDRE/COLENT

Figura 1. Subcultivo seriado con aceite mineral.

Dentro del segundo grupo que comprende los métodos de conservación metabólicamente inactivos se encuentran la desecación, la liofilización y la ultracongelación.

En la desecación las células están deshidratadas y se almacenan a temperatura ambiente o en refrigeración. Se pueden conservar esporas de hongos en soportes sólidos como tierra, silica gel, perlas de porcelana, etc. El soporte se lava y se coloca en tubos con tapón, se esteriliza y se seca, posteriormente se agrega una suspensión y se permite que se absorba en el soporte, después se agita y se deja secar a temperatura ambiente. Finalmente los tubos se sellan y se almacenan en contenedores con agentes desecantes.

En la liofilización involucra el congelamiento de un cultivo seguido por un secado bajo vacío, lo cual resulta en la sublimación de agua de la suspensión celular. A continuación se indican las indicaciones generales a seguir.

- El cultivo debe estar en fase estacionaria.
- Resuspender el cultivo en medio de soporte con crioprotector.
- Transferir alícuotas de la suspensión en viales apropiados.
- Congelar el vial aproximadamente hasta  $-40^{\circ}\text{C}$  y deshidratar mediante una sublimación en vacío.
- Continuar con el secado hasta llegar a valores de humedad del orden del 1%.
- Sellar el vial bajo vacío.

Las ventajas de este método de conservación es que la mayoría de los microorganismos sobreviven al secado, los cultivos se pueden mantener a temperatura ambiente sin pérdida significativa de viabilidad y representa una buena alternativa para el envío de cepas.

La crioconservación consiste en congelar y mantener las células a temperaturas bajo  $0^{\circ}\text{C}$ ; por este método se pueden conservar microorganismos, líneas celulares, pequeños organismos pluricelulares y organismos complejos como los embriones. Se deben emplear agentes crioprotectores. Es un método simple y efectivo para la conservación a largo plazo. Se debe usar un sistema como el "SEED LOT SYSTEM" para asegurar que el cultivo esté siempre en condiciones adecuadas y producir series de trabajo.

## Crioconservación

El proceso de estabilización de materiales biológicos a temperaturas criogénicas es llamado crioconservación, una aplicación práctica de la criobiología o el estudio de la vida a bajas temperaturas. Los avances en la tecnología de la crioconservación ha permitido llegar a métodos que permiten el mantenimiento de tejidos, líneas celulares y materiales subcelulares a bajas temperaturas. Las técnicas se pueden emplear para la conservación de microorganismos, tejidos, células madre, líneas celulares, pequeños organismos multicelulares, estructuras celulares complejas tales como embriones, así como ácidos nucleicos y proteínas. El proceso de congelación involucra fenómenos complejos, que incluso después de décadas de investigación no han sido completamente entendidas.

Los estudios criobiológicos han permitido especular acerca de lo que ocurre durante la congelación de las células vivas y como se pueden prevenir fenómenos adversos.

## **Congelación bacteriana**

La congelación bacteriana es un método físico químico que permite conservar microorganismos viables por un tiempo sin sufrir cambios genotípicos. En este proceso se involucra el agua como microambiente y es ella la que cambia su estado de líquido a sólido; por otro lado, la bacteria inmersa en este medio debe adaptarse a las condiciones de este nuevo ambiente, transformar la velocidad de su metabolismo, conservar su viabilidad y evitar que los cristales de hielo formados por el cambio de temperatura del agua le ocasione algún daño. En el proceso de adaptación bacteriana inducido por la congelación, es significativa la reducción en la velocidad metabólica, a tal punto que su metabolismo se hace imperceptible, pero suficiente para mantener el microorganismo vivo. Algunas de estas adaptaciones son: la producción de enzimas resistentes al frío, sistemas de transporte adaptados a bajas temperaturas, el aumento de la concentración de ácidos grasos en la cadena de fosfolípidos de la membrana celular, esta última, para que continúe el estado semifluído de la membrana y evitar la congelación.

## **Factores relacionados con la adaptación bacteriana al proceso de congelación**

**Microambiente:** En la naturaleza se encuentran una gran diversidad de ambientes que no cumplen con condiciones óptimas para el desarrollo de organismos superiores, sin embargo, encontramos organismos microscópicos perfectamente adaptados. El tamaño se constituye en una ventaja ya que por ser organismos tan pequeños, su ambiente también lo es, y por lo tanto esto le otorga versatilidad para que en espacios y tiempos muy reducidos las condiciones físico-químicas cambien y les permite adaptarse y desarrollarse. El ambiente que rodea a un ser vivo es un mundo complejo que incluye componentes bióticos (otros organismos vivos) y abióticos (compuestos no vivos); este espacio para los microorganismos bacterianos ha sido denominado microambiente; la interacción que surge en estos espacios es muy dinámica, la mayoría de las comunidades vivas que lo componen establecen relaciones de cooperación pero también de antagonismo que

conlleva a cambios permanentes en los procesos de adaptación de las poblaciones bacterianas.

La bacteria se relaciona con el microambiente que la rodea a través de movimientos, si se rodea de una sustancia química, la sustancia atrae la bacteria si es favorable para ella; si no le es favorable, la respuesta es alejarse. Estos movimientos dirigidos hacia una molécula señal se denominan taxias y están controlados por mecanismos moleculares. Esto le permite reconocer sus espacios favorables, modificarlos si puede, adaptarse o alejarse de ellos. La capacidad que tienen los microorganismos de transformar las propiedades físicas, químicas y biológicas del ambiente en que se encuentran en cualquier condición, se acentúa aún más en condiciones no favorables en las cuales se ven abocados a originar cambios significativos y rápidos en sus actividades metabólicas.

**Membrana Citoplasmática:** En la criopreservación bacteriana, es indispensable considerar el papel que juega la membrana citoplasmática, ya que actúa como barrera esencial y separa el interior del exterior celular. Asimismo, es necesario tener en cuenta que en situaciones, medios y ambientes hostiles y adversos no logra por si sola defender su estructura y conservar su arquitectura, papel que es asumido por la pared. La composición de la membrana bacteriana es una bicapa lipídica hidrofóbica compuesta por ácidos grasos, así como unidades hidrofílicas como el glicerol hacia el exterior, posee un gran contenido de proteínas que se mueven libremente a través de la bicapa; de esta forma la membrana expresa dos cualidades, la elasticidad y la permeabilidad. La estructura multifuncional que posee la membrana le permite llevar a cabo procesos metabólicos esenciales para la preservación de la viabilidad microbiana, razón por la cual, en los procesos de congelación pese a que la célula es sometida a cambios biofísicos y químicos del ambiente, logra adaptarse; una hipótesis de lo que sucede en este proceso, está relacionada directamente con el transporte pasivo que la célula hace con el agua, donde la no utilización de protectores llevaría a la salida de agua del interior de la célula para compensar el aumento de las concentraciones de soluto en el exterior a consecuencia de la formación de núcleos de hielo.

Otro aspecto importante para considerar es el relacionado con el tamaño de las células procariotas, en términos generales el hecho de que sean células tan pequeñas les ofrece una serie de ventajas biológicas. "A menor tamaño, mayor velocidad y eficiencia en el intercambio de nutrientes. Una de estas ventajas es la relacionada con el ritmo con el que los nutrientes y las sustancias de desecho pasan del interior al exterior de las células y viceversa, el cual es

generalmente inversamente proporcional al tamaño de la célula, por lo tanto este flujo afecta los ritmos metabólicos y de crecimiento”. Por lo tanto la velocidad de transporte es directamente proporcional a la superficie de la membrana celular, situación que explica porque las células procariotas alcanzan mayores tamaños de población en espacios cortos de tiempo, debido por supuesto a las mayores tasas de crecimiento. “Estas tasas de crecimiento y los tamaños de población alcanzados permiten causar cambios en la fisicoquímica de su ecosistema en tiempos relativamente cortos”.

Claro está, todo este recambio se realiza a través de la membrana plasmática la cual a pesar de su alta permeabilidad actúa a la vez como filtro seguro en el cumplimiento de todas las funciones fisicoquímicas, nutricionales, desintoxicantes y de adaptación al medio ambiente impidiendo así el paso libre de los compuestos polares, compuestos pequeños no polares y sustancias solubles en fases hidrofóbicas, sustancias polares que son capaces de atravesar la barrera libremente gracias a la solubilidad en la fase lipídica. Si esta se rompe, sencillamente la viabilidad de la célula finaliza.

**Estrés bacteriano:** El estrés es una situación que condiciona cambios de adaptación en la bacteria, normalmente este es un estado transitorio que le permite tener condiciones de resistencia a la hostilidad, situación que finaliza cuando las condiciones de estrés se eliminan. Uno de los mayores problemas a los que puede llevar este estrés es generarle cambios que pueden ser transitorios o permanentes en su actividad enzimática, capacidad antigénica o viabilidad. Se ha visto que los procesos de enfriamiento, así sea natural, para las bacterias que tienen que soportar cambios bruscos de temperatura en las zonas polares y templadas; o provocado, como es el caso de congelación *ex situ*, generan una adaptación que incluye entrar en un periodo de latencia, donde la actividad enzimática disminuye notablemente e incluso podría decirse que se detiene. Al respecto, algunos autores han denominado este proceso estado “transitorio no cultivable” (*transiently non-culturable state*) en el cual se presume que el microorganismo utiliza una estrategia especial de supervivencia en la cual suceden cambios morfológicos, fisiológicos y genéticos, por activación de reguladores transcripcionales o postranscripcionales. La finalización del estado de no culturabilidad ha sido denominada resucitación. Algunos autores han establecido nuevos conceptos en torno al estrés que produce la congelación. Uno de ellos es el de *starvation survival* o estado de hambre, es el término que se le ha dado a los microorganismos en estado de congelación en el cual la bacteria conserva una

alta actividad metabólica que le permite soportar el metabolismo del núcleo y continuar con los mecanismos de reparación celular, de tal forma que permanece la capacidad de culturabilidad, una vez que cese el estado de estrés. Igualmente sostienen que en condiciones de estrés, se activan varios sistemas, uno de ellos, el de guanosin tetrafosfato el cual le confiere a la célula la posibilidad de aumentar la vida media de su RNA mensajero; el almacenamiento de reservas de energía y fosfato.

### **La actividad biológica bacteriana y las reacciones al frío**

La diversidad estructural y funcional que se observa en las bacterias representa un conjunto de éxitos evolutivos adquiridos a través del proceso de la selección natural confiriendo así un valor de supervivencia y adaptabilidad muy alto a las bacterias de hoy, sin embargo, no todos los microorganismos toleran de la misma forma un determinado cambio ambiental. Esto puede generar diversas reacciones, unas bacterias sufren efectos nocivos, para otras es indiferente y algunas se verán beneficiadas.

Algunas hipótesis propuestas por investigadores sobre los fenómenos celulares que ocurren en las células bacterianas al ser sometidas, permiten exponer los siguientes planteamientos:

Uno de los cambios físico-químicos que afecta la actividad biológica bacteriana es la temperatura, incidiendo directamente sobre la velocidad de crecimiento. Investigadores han observado que las bajas temperaturas tienen un efecto directo sobre la fluidez de la membrana provocándose por ello la detención de los procesos de transporte a través de la membrana y por lo tanto el recambio de protones. Otro efecto visualizado por las bajas temperaturas es el aumento en la viscosidad del citoplasma generando dificultad en el intercambio metabólico de los procesos vitales del microorganismo. Esta viscosidad esta dada por el aumento en la concentración de sales en el citoplasma, lo cual se explica por la salida de agua intracelular para compensar la congelación del agua extracelular y los efectos que ello produce en la estructura de la membrana por los cambios de presión osmótica. Este fenómeno puede llegar a un punto donde la concentración es tan alta que propicia la formación de precipitados. Simultáneamente a este proceso, si el enfriamiento es rápido se promueve la formación de cristales de hielo. Se observa además que el frío debilita los enlaces hidrofóbicos de las proteínas, situación que está determinada por los cambios físicos que suceden en la estructura del agua que compone el citosol y que actúa como solvente. A su



vez, este fenómeno genera la inactivación de las enzimas alostéricas y de la actividad funcional de los ribosomas. Estos cambios, que en organismos muy desarrollados puede significar un daño irreparable para su supervivencia, constituye para los microorganismos bacterianos un reto y muchos de ellos logran una adaptación que se traduce en fabricación de enzimas resistentes al frío, sistemas de transporte adaptados a bajas temperaturas e incluso una transformación en la membrana aumentando la proporción de fosfolípidos de membrana, específicamente en la cantidad de ácidos grasos insaturados o poli insaturados lo que le permite mantener el estado semifluido de la membrana y evitar la congelación.

**Velocidad de congelación:** La velocidad de congelación tiene un efecto dramático en este fenómeno (figura 2). La congelación rápida minimiza los efectos de la concentración de solutos debido a que el hielo se forma de manera uniforme, pero conduce a la formación de más hielo intracelular. Por otro lado, la congelación lenta resulta en una pérdida más rápida de agua del interior de la célula y se forma menos hielo intracelular, pero resulta en un incremento de los efectos de solución. La permeabilidad celular afecta la velocidad de la pérdida de agua; las células más permeables toleran mejor la congelación rápida que las células menos permeables.

Mazur y cols., postularon que la formación de cristales de hielo y los efectos de solución juegan un papel muy importante en el daño celular, y que una velocidad de congelación óptima minimiza el efecto de cada uno. Con pocas excepciones, es recomendable una velocidad de enfriamiento de 1°C por minuto.

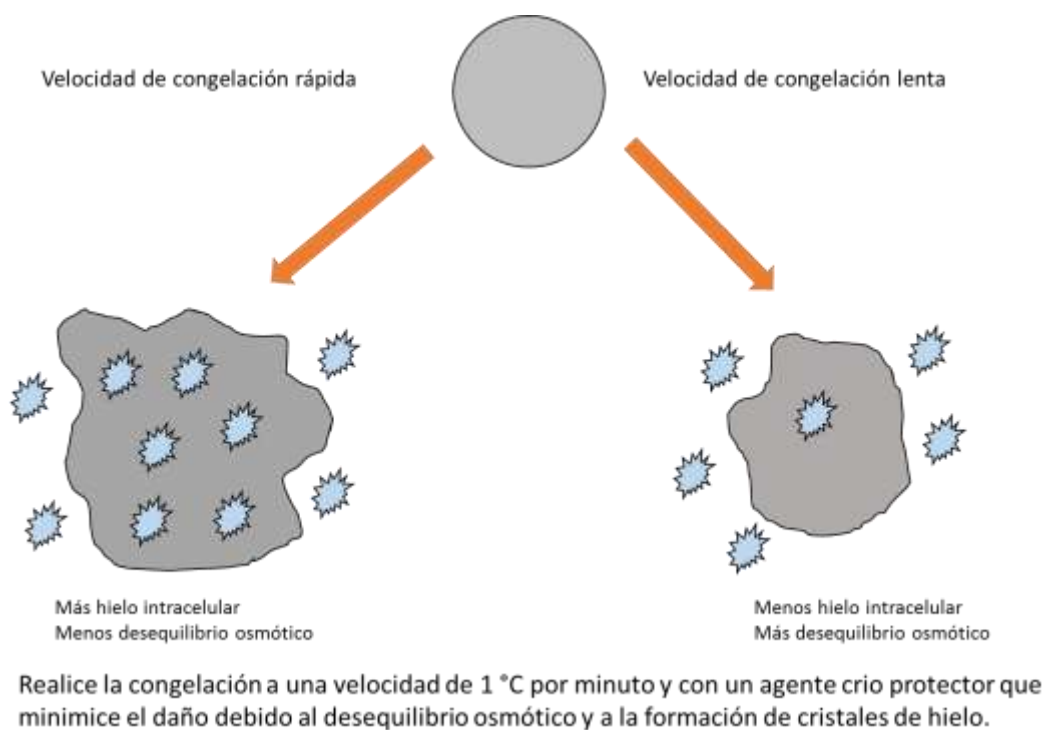


Figura 2.- Velocidad de congelación

### Agentes crioprotectores

Las sustancias denominadas crioprotectores impiden por interacción molecular con el agua, la acción destructiva del congelamiento sobre las células, es decir, protegen de la formación de cristales de hielo con un grado bajo de toxicidad para las células vivas. Una de las hipótesis en las cuales se basa el efecto de los crioprotectores es en que las características físico-químicas de estas sustancias le confieren afinidad por el agua molecular y de esa forma atrapar la molécula de agua en su interior, lo que impide que el agua forme cristales geométricos ordenados; en consecuencia, la solidificación del medio se establece con una distribución molecular desordenada del agua y la sustancia toma el carácter de sustancia vítrea protectora.

Las sustancias más utilizadas en la conservación bacteriana a bajas temperaturas se encuentran:

- Sustancias no ionizables de bajo peso molecular que provocan solidificación amorfa y vítrea en lugar de cristalización para evitar la formación de zonas intracelulares con alta concentración de sales para

evitar la deshidratación celular: glicerol, sacarosa, lactosa, DMSO (dimetilsulfóxido), entre otros.

- Sustancias ricas en proteína como la leche, suero, extracto de carne.
- Proteínas purificadas como la albúmina.
- Macromoléculas no proteicas como PVP (polivinilpirrolidona) y dextranos.

Algunos de los crioprotectores presentan toxicidad para la célula viva a temperatura ambiente, por lo tanto en los procesos de congelación y descongelación se debe tener en cuenta los tiempos de exposición de las células a estas sustancias. En el cuadro 2 se hace referencia a algunos crioprotectores útiles con la concentración de uso recomendada.

CUADRO 2			
CRIOPROTECTORES, GUÍA DE REFERENCIA RÁPIDA			
TIPO DE CÉLULA	CONCENTRACIÓN	CRIOPROTECTOR	TEMPERATURA MÍNIMA DE ALMACENAMIENTO
Bacterias	$10^7$ ufc/mL	Glicerol DMSO	-70 °C
Bacteriófagos	$10^8$ ufp/mL	Glicerol	-70 °C
Hongos			
Hifas	---	Glicerol	-146 °C
Esporas	$10^6$ ufc/mL	Glicerol	-70 °C

Protozoarios	$10^5$ - $10^7$ cel/mL	Glicerol DMSO	-146 °C
Modificado de: <i>Thermo Scientific Nalgene and Nunc. Cryopreservation Guide. 2010</i>			

Otros agentes crioprotectores que han sido utilizados ocasionalmente, solos o en combinación, incluyen polietilenglicol, propilenglicol, polivinilpirrolidona, sorbitol y trehalosa. La necesidad de preservar tejidos y órganos completos ha conducido al desarrollo de metodologías de conservación novedosas que también son aplicables a mejorar la recuperación de células y organismos congelados. Estas incluyen variaciones en la concentración de los crioprotectores y aditivos que protegen a las células contra la apoptosis o la muerte celular programada.

El uso de agentes crioprotectores que protejan a las células durante la congelación también minimiza el daño debido al incremento de la concentración de solutos y la formación de cristales de hielo. Los agentes crioprotectores de uso más común son el dimetilsulfóxido (DMSO) y el glicerol, aunque se han usado muchos otros aditivos para propósitos específicos.

Adicionalmente, el mantenimiento de las células congeladas a temperatura de almacenamiento apropiada y empleando una velocidad de calentamiento apropiada también contribuyen a minimizar el daño de las células y tejidos congelados. Un elemento clave de un buen programa de crioconservación es la estandarización de los procesos empleados. Esto se debe a la complejidad del proceso de crioconservación ya que pequeñas variaciones en el mismo y el almacenamiento pueden conducir a cambios sutiles en los materiales biológicos. La estandarización de la metodología asegura que los resultados de la investigación sean consistentes y comparables. Por lo tanto, una vez que se tiene un régimen de crioconservación exitoso, se debe documentar la metodología de manera apropiada y cuidadosa.

### **Sistema “Seed Lot System”**

Con la finalidad de mantener la estabilidad genética de las células, la frecuencia de subcultivos a partir del cultivo original debe ser mínima. Cuando se han congelado las células, se recomienda el uso de un sistema para

asegurar que siempre se tenga disponible un pase joven del material para producir nuevos cultivos de trabajo. Un método para preservar pases jóvenes del material es el uso del sistema “Seed Lot System” (Figura 3.).

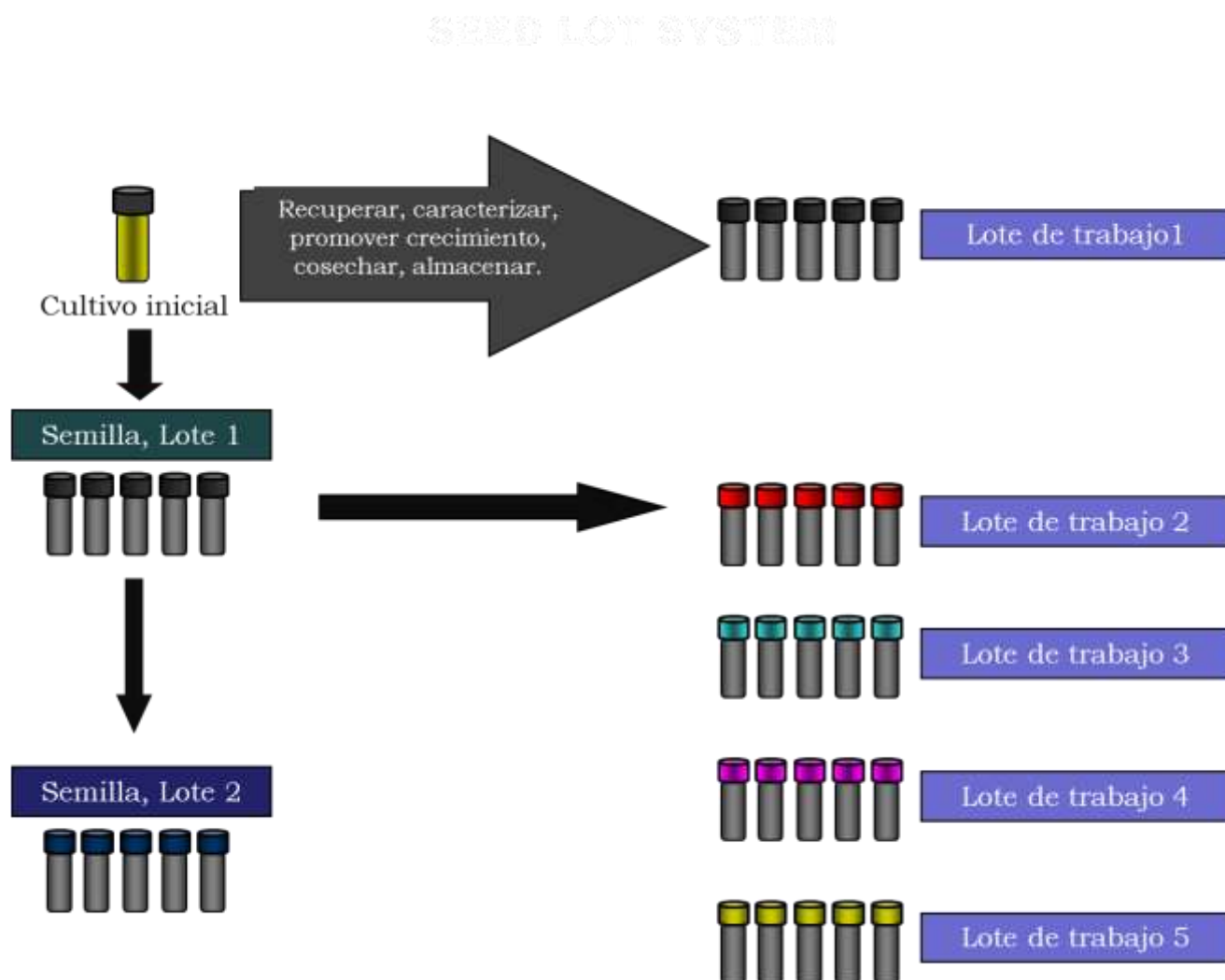


Figura AV. 3.- Seed Lot System

Cuando se prepara el primer lote congelado del cultivo, se deja una porción del lote y se identifica como “material semilla”. Los viales designados como material semilla se mantienen separados de los viales de trabajo para asegurar que no serán usados durante las actividades de recuperación (figura 3).

Cuando el primer lote de trabajo se agote, se retira un vial del lote semilla y a partir de éste se prepara un segundo lote de trabajo. Esta secuencia es continua con todos los viales semilla, excepto para el último. El último vial del primer lote semilla se utiliza para preparar un segundo lote semilla. El segundo lote semilla será el primero o segundo pase del material original, pero podría ser conservado por mucho tiempo si se preparan lotes de tamaño apropiado.

## **Preparación del material biológico**

La manera como se prepare el material biológico para la congelación puede tener un efecto sobre el resultado del proceso de conservación. Para materiales que no se replican tales como los tejidos, ácidos nucleicos y proteínas; la preparación consiste en asegurar que el material está en la solución de congelación apropiada con la finalidad de maximizar el uso del material cuando sea recuperado. Sin embargo, la estabilidad y la recuperabilidad de células vivas y de los organismos son afectados por las condiciones de crecimiento y el proceso de pre-congelación. Cuando se preparen células para la crioconservación se deben tomar en cuenta diferentes factores que incluye el tipo de célula, la viabilidad celular, las condiciones de crecimiento, el estado fisiológico de las células, la concentración celular y la forma que se manejan las células. Cuando se prepara un lote de trabajo de una línea celular o un aislamiento, el cultivo se debe analizar para verificar la identidad y la pureza. Este análisis se debe repetir después de la conservación y cada vez que se prepare un nuevo lote.

## **Microorganismos**

Las células microbianas, particularmente las bacterias y las levaduras, crecen bajo condiciones aerobias y exhiben más resistencia a los efectos de daño debidos al enfriamiento y congelación que las células anaerobias. T. Nei y cols., demostraron que la permeabilidad celular es mayor en cultivos aerobios, y que la deshidratación de las células aerobias es más rápida durante la congelación que en las células anaerobias. Las células cosechadas en la fase de crecimiento logarítmica tardía o en la fase estacionaria temprana también demuestran mayor resistencia al proceso de congelación que las células más jóvenes o más viejas.

Generalmente, la concentración bacteriana inicial es mayor que la concentración de células posterior al proceso de congelación. Es deseable que la concentración inicial de células sea de  $10^7$  UFC/mL. Para esta concentración es conveniente realiza la cosecha a partir de tubos de agar inclinado o de placas de agar; en caso de requerir mayor concentración celular, puede promoverse el crecimiento en caldo apropiado y hacer la cosecha por centrifugación. En cualquiera de los casos, las células se resuspende en medio de crecimiento fresco conteniendo el agente crioprotector. Los protistas también se pueden concentrar por centrifugación pero con frecuencia son suspendidos en el medio usado y se diluyen añadiendo un volumen igual de medio de crecimiento fresco que contenga el agente crioprotector. En la figura 4 se esquematiza la secuencia de actividades durante el proceso de crioconservación.

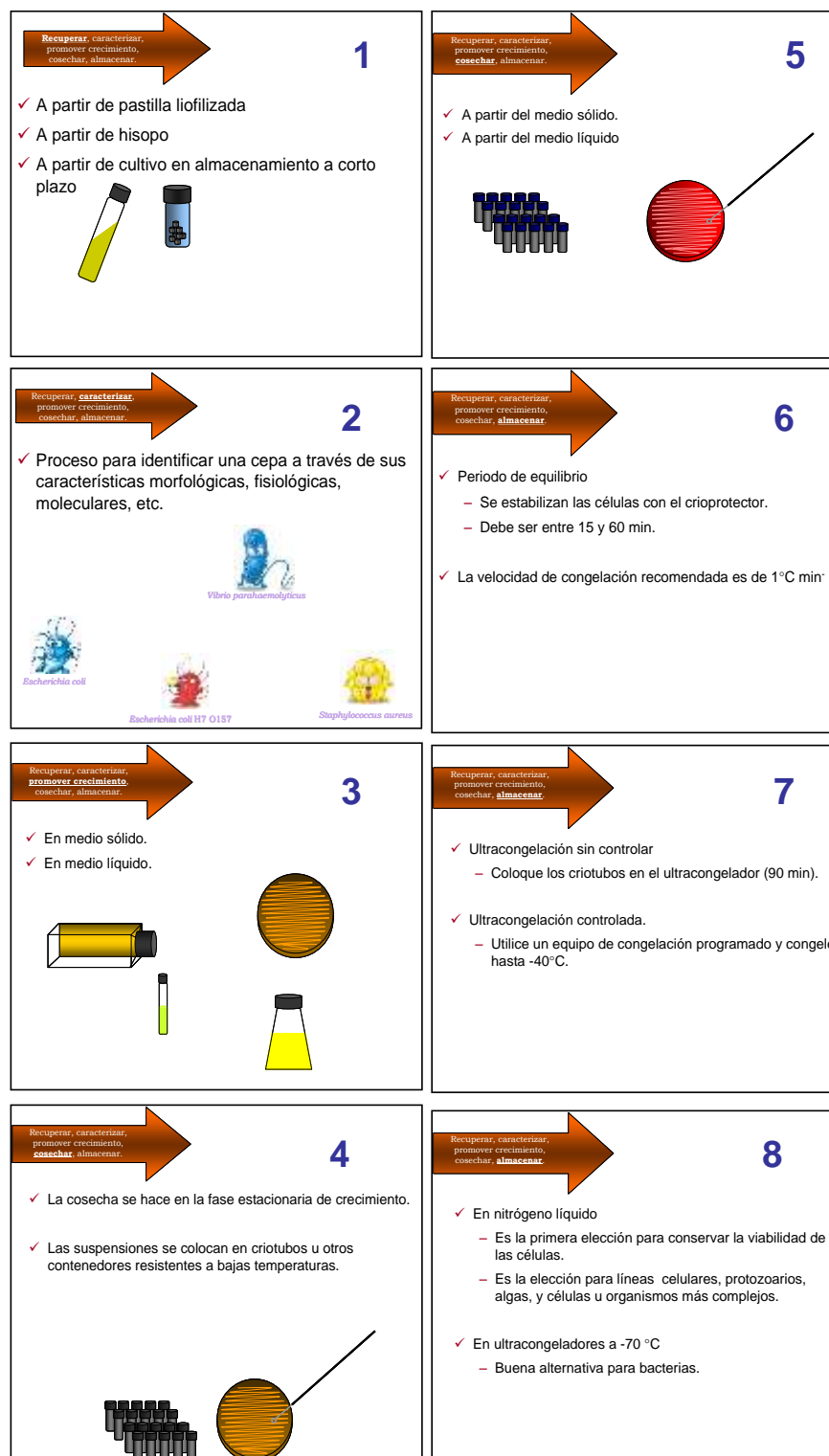


Figura AV. 4.- Representación esquemática del proceso de crioconservación de cultivos bacterianos



## Equilibrio

El tiempo que transcurre mientras la suspensión bacteriana está en contacto con el agente crioprotector y a que dé inicio el proceso de enfriamiento es llamado **periodo de equilibrio**. Para muchas células el periodo de equilibrio es de 15 minutos pero no más de 45 a 60 minutos. El agente crioprotector podría ser tóxico para la célula si el tiempo de equilibrio se prolonga. El equilibrio se puede alcanzar a temperatura ambiente para permitir que el agente crioprotector penetre la célula.

## Viales y ámpulas

Existe gran variedad de contenedores pequeños que pueden ser utilizados para la conservación de células a temperaturas ultra bajas. Los tamaños comúnmente usados son de 1.2 a 2.0 mililitros. Generalmente se dispensan entre 0.5 a 1.0 mL de la suspensión celular a cada contenedor.

Si el almacenamiento de los crioviales se va a hacer en nitrógeno, se deben elegir con precaución los contenedores debido a que existen algunos que no resisten esas condiciones de almacenamiento.

## Congelación

Una vez que las células han sido dispensadas en los contenedores y que han cumplido con el periodo de equilibrio con el crioprotector; el siguiente paso es enfriar la suspensión. Como se ha estado mencionando, la velocidad de enfriamiento es importante por los efectos que podrían ocurrir durante la congelación. Diferentes tipos de células podrían requerir velocidades de enfriamiento diferentes, sin embargo un enfriamiento uniforme de 1°C por minuto es efectivo para una amplia variedad de células y organismos.

Para conseguir velocidades de enfriamiento uniformes y controladas se emplean equipos de congelación celular programables. Hay equipos simples que solo permiten la selección de sólo una velocidad de enfriamiento pero también hay equipos más sofisticados que permiten la selección de diferentes velocidades de congelación.

El contenedor de congelación *Thermo Scientific Nalgene Mr. Frosty 1°C* (Cat. No. 5100-0001) proporciona un sistema de uso simple diseñado para alcanzar velocidades de enfriamiento de 1°C por minuto.

## Almacenamiento

Cuando las suspensiones celulares han estado congeladas durante 48 horas, se debe descongelar un vial para determinar si las células están viables y si son capaces de establecer una población celular. La temperatura a la cual las células están almacenadas afecta el periodo de conservación de las células. A menor temperatura de almacenamiento, es mayor el periodo de la viabilidad celular.

## Recuperación (descongelación)

Para muchos tipos celulares, la descongelación debe ser lo más rápido que sea posible. Para alcanzar una rápida descongelación se coloca el vial congelado en un baño de agua a 37°C. Recuerde, el material en contenedores de plástico podrían tomar más tiempo en descongelarse que aquellos que están en contenedores de vidrio, en algunas ocasiones es necesario agitar ligeramente el vial mientras se descongela. Una vez que el material se ha descongelado, retire el vial del baño de agua, desinfecte la superficie externa del contenedor antes de abrirlo. Transfiera inmediatamente el contenido del vial en el medio de cultivo apropiado para minimizar el contacto con el agente crioprotector.

## Determinación de recuperación celular

Los métodos usados para estimar el número de células viables recuperadas depende del tipo de material conservado. La inspección visual puede ser engañosa y aunque las tinciones son efectivas determinando la presencia de células viables, para muchas células de mamíferos no indican que sean capaces de establecer una población celular.

Para células microbianas se puede realizar una cuenta en placa de las células viables y se espera que la concentración de células sea semejante entre los viales. Si existe una diferencia significativa en la concentración celular entre los viales, puede ser un indicador de que algo pasó durante el proceso de congelación, almacenamiento y manejo.

## Control de inventarios

Es importante llevar un registro de los materiales que se tienen almacenados. Hay diferentes alternativas de control pero se debe establecer un método propio que permita tener la información clave que puede ser importante para uso futuro:

- El procedimiento normalizado de operación para la conservación.
- La localización e identificación del material almacenado.
- Fecha de conservación
- El número de pase del material replicado.

Cada dato registrado debe estar asociado al material y para algunos propósitos cada contenedor podría requerir un código de identidad único ligado a información única para la alícuota en particular. La identificación inicia con el etiquetado apropiado del contenedor almacenado, la identificación de la etiqueta podría incluir el código del material congelado así como el número de lote. La información de la etiqueta puede estar guardada con el registro de inventarios que incluye el código de localización para cada vial. Estos registros pueden mantenerse impresos en papel o de preferencia en archivos electrónicos. Se recomienda mantener resguardo de los registros de inventarios separados de los registros de trabajo. Los códigos de localización debe ser lo suficientemente específicos que permitan un fácil acceso.

### **Aseguramiento de la calidad para las colecciones de cultivos**

Es muy importante que los organismos sean mantenidos en una forma que permita conservar sus propiedades. Los procedimientos seguidos por las colecciones de recursos microbianos deben asegurar la calidad del producto brindando materiales de referencia que permitan obtener resultados reproducibles. Las colecciones deben aplicar el control de la calidad y medidas de aseguramiento para mantener esas condiciones teniendo en cuenta las necesidades de los usuarios y la disponibilidad de los recursos. Existen un gran número de modelos nacionales e internacionales para los Sistemas de Aseguramiento de Calidad que pueden ser utilizadas por las colecciones de cultivos, entre ellas están las ISO 9000 y las normas para la acreditación. En el mundo existen algunas normas generales para las colecciones, como por ejemplo, los lineamientos de la WFCC (*World Federation Culture Collection*) para el establecimiento y operación de las colecciones de microorganismos.

Los siguientes requisitos aparecen contenidos en todas las normas revisadas y constituyen los requisitos mínimos para el aseguramiento de calidad de las colecciones de cultivos:

- Documentación
- Identificación y autenticidad de las cepas
- Pureza
- Monitoreo de viabilidad
- Estabilidad de las propiedades de las cepas
- Estandarización de las condiciones de crecimiento
- Metodologías y protocolos de preservación estandarizados
- Mantenimiento de los equipos
- Normas para el suministro e intercambio de cepas
- Seguridad a largo plazo
- Control de las condiciones ambientales
- Auditorías
- Cumplimiento de las legislaciones
- Personal y entrenamiento

## Documentación

Un aspecto fundamental para llevar cabo un riguroso control de calidad en una colección de cultivos es contar con sistema de documentación eficiente. Las colecciones de cultivos reconocidas internacionalmente cuentan con listas de verificación que son llevadas para cada lote de material que es conservado. Es esencial mantener documentos que contengan los datos de los cultivos, sobre todo si varias personas están involucradas en el proceso. Esta información puede estar almacenada en libretas, archivos o registros, tarjetas indexadas, o en sistemas electrónicos.

Los datos originales suministrados por quien deposita el cultivo deben ser registrados (datos del mantenimiento, caracterización de las cepas, etc.). La mayor cantidad de información debe ser registrada y actualizada regularmente, esto incrementa el valor de una colección de cultivos.

## REGISTROS CON LOS QUE DEBE CUMPLIR UNA COLECCIÓN DE CULTIVOS BACTERIANOS

Registros de cepas	<p><b>1. Aspectos esenciales:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>a) # de referencia en el laboratorio</li> <li>b) # alternativo (colección de servicios, otros laboratorios)</li> <li>c) nombre (si se conoce)</li> <li>d) datos del depósito</li> <li>e) requerimientos del cultivo (medio, temp., pH, requerimientos nutricionales)</li> <li>f) métodos de mantenimiento</li> </ul> <p><b>2. Otros aspectos:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>a) Usos del cultivo (cepa de producción, cepa de ensayo, prueba de esterilidad)</li> <li>b) Propiedades del cultivo (fisiológicas, morfológicas, genéticas)</li> <li>c) Referencias</li> </ul>
Registros del mantenimiento:	<p><b>1. Información del subcultivo</b> (medio, temperatura)</p> <p>Registros del período de almacenamiento (fecha, características culturales, etc.)</p> <p><b>2. Información de la liofilización</b> (métodos de crecimiento, concentración celular del inóculo, medio de suspensión, # de viales que se prepararon, almacenamiento, procedimiento de recuperación).</p> <p>Registros (fecha de realización del proceso, # de lote, conteo de viables antes y después del proceso, fecha de vencimiento del lote, # de viales almacenadas).</p> <p><b>3. Información sobre el almacenamiento en nitrógeno</b> (métodos de crecimiento, concentración celular del inóculo, crioprotector, temperatura de congelación, #</p>

	<p>de viales que se prepararon para el almacenamiento, procedimiento de recuperación).</p> <p>Registros (fecha de congelación, # de lote, conteo de viables, fecha de vencimiento del lote, # de viales crioconservados).</p>
<b>Registros para el suministro de cultivos:</b>	<p>Fecha de entrega, persona que solicita el cultivo, propósito de la solicitud, información suministrada por el usuario (retroalimentación).</p>

Las colecciones deben contar con procedimientos normalizados de manera que todo el personal pueda utilizarlos para la ejecución de las operaciones de rutina. El sistema de documentación de la colección de cultivos debe incluir además, el registro de estas operaciones, lo cual constituye una evidencia del trabajo realizado y permite la trazabilidad de los resultados. Se deben elaborar manuales de procedimientos que aseguren la continuidad del trabajo, y estos deben ser dominados por todo el personal incluyendo el personal en entrenamiento.

## Identificación y autenticidad de las cepas

Para una colección de cultivos es esencial contar con cepas identificadas, pues coleccionar materiales sin datos descriptivos puede conllevar a la duplicación innecesaria y a la pérdida de recursos. Un organismo no es útil si no se conoce nada acerca de él. Si un organismo no puede ser identificado completamente, es necesario recopilar datos descriptivos; microfotografías, perfiles metabólicos, datos de secuenciación, entre otros.

La verificación de la autenticidad se realiza para comprobar que el cultivo mantiene sus características originales. Es importante demostrar que las características y funciones propias del microorganismo no están alteradas. Esto implica realizar una caracterización de las cepas, y la profundidad de este estudio depende de varios factores entre los que se destacan: recursos disponibles, naturaleza y usos de los cultivos.

## Pureza

La verificación de la pureza tiene como objetivo comprobar que los cultivos conservados se encuentran puros. Es obvio que las cepas deben estar puras,

sin embargo en ocasiones es necesario conservar cultivos mixtos, pues existen cepas que no pueden crecer sin su simbiote u hospedero, pero esto debe estar bien definido y registrado. Esta verificación debe realizarse y registrarse antes de la preservación, inmediatamente después y durante el almacenamiento, y puede realizarse en la misma placa de Petri con la cual se hace la verificación de viabilidad. Estas placas son examinadas para detectar ausencia de contaminantes.

Es necesario tener en cuenta que existen microorganismos de crecimiento lento que pueden estar contaminando los cultivos, por lo que estas placas se deben mantener por un período de tiempo mayor, y posteriormente se reexaminan. En ocasiones es necesario hacer verificaciones de pureza utilizando varios medios de cultivo para descartar la presencia de microorganismos que requieren otras condiciones nutricionales para su crecimiento.

### **Monitoreo de viabilidad**

La verificación de viabilidad se realiza con el objetivo de detectar el nivel de viabilidad del cultivo. Lo cual permite que en la medida que ésta disminuya se puedan tomar medidas para impedir la pérdida del material. Esta verificación, al igual que el de identidad y pureza, debe realizarse y registrarse antes de la preservación, inmediatamente después y durante el almacenamiento. Este monitoreo puede realizarse por diferentes métodos; en el caso de la preservación por el método de subcultivo, es suficiente realizar un pase de cultivo a un medio fresco, este se incuba y posterior al tiempo de incubación se puede determinar si el cultivo está viable por la observación de colonias típicas del microorganismo; pero este método es cualitativo. En el caso de métodos de conservación a largo plazo como la liofilización y criopreservación, es deseable que este control se realice cuantitativamente por el método de conteo en placas utilizando diluciones seriadas.

### **Estabilidad de las propiedades de los cultivos**

Las colecciones de cultivos deben desarrollar programas de investigación para determinar y asegurar la estabilidad de las cepas. Las propiedades conocidas deben verificarse periódicamente, pero para estimar la estabilidad con precisión debe seleccionarse una propiedad que no sea estable en la cepa y verificar su comportamiento en el tiempo (siempre que sea posible). Los

estudios de estabilidad pueden incluir la verificación en el tiempo de la viabilidad, la pureza y la identidad de las cepas.

### **Estandarización de las condiciones de crecimiento**

Cuando sea factible, se deben realizar estudios para establecer las condiciones de crecimiento óptimas de los microorganismos de las colecciones de cultivos, pues esto favorece el proceso de conservación de los mismos.

### **Metodologías y protocolos de preservación**

Las colecciones de cultivos deben desarrollar metodologías y protocolos para garantizar la preservación a largo plazo de sus recursos biológicos, deben estar documentados con todos los detalles de las operaciones y ser de dominio de todo el personal. Para cada microorganismo se debe seleccionar el método de preservación que garantice su conservación por un período de tiempo prolongado, así como el medio de preservación que proporcione adecuada protección durante el proceso de preservación. Estos protocolos de preservación deben incluir los controles necesarios a realizarle a las cepas antes, durante y después de concluido el proceso, y pueden contemplar verificaciones de viabilidad, pureza e identidad. Durante el proceso se pueden hacer controles de temperatura y otros dependiendo del método de preservación utilizado.

### **Mantenimiento de los equipos**

Todos los equipos de la colección de cultivos deben ser mantenidos y calibrados periódicamente, según los programas establecidos, lo cual asegura que estos operen dentro de los límites establecidos. Debe controlarse el uso y operación de los mismos, lo cual puede permitir la trazabilidad y reproducibilidad de los resultados. En el caso de los equipos especiales como las liofilizadoras, deben ser manipulados por personal competente.

### **Auditorías**

Es muy importante que los procedimientos y normas establecidas en una colección de cultivos sean monitoreados a cada nivel, a través de auditorías. Estas deben llevarse a cabo por personal competente y pueden ser internas o externas. Estas últimas pueden ser producto de procesos de acreditación por



organismos nacionales competentes. El registro de estas auditorías es vital para demostrar la competencia del laboratorio.

## Cumplimiento de las legislaciones

Existen múltiples regulaciones que se aplican al trabajo de las colecciones de cultivos desde el aislamiento y la manipulación, hasta la distribución y su transporte. El personal de las colecciones debe conocer de tales regulaciones, estas abarcan el embalaje, envío y transporte; seguridad y salud; así como la acreditación.

## Personal y entrenamiento

El personal que labora en la colección de cultivos debe tener alta calificación y debe estar entrenado en las operaciones desarrolladas en la colección de cultivos a la que pertenece. Se debe garantizar el adecuado entrenamiento para este personal, así como para el de nuevo ingreso. Este último estará bajo supervisión hasta que adquiera las habilidades necesarias. El entrenamiento y la capacitación pueden incluir programas de maestrías y doctorados.

### Anexo VII: Apoyo a la Vigilancia Sanitaria del *V. cholerae*. *V. parahaemolyticus* y *Salmonella spp.*

En apoyo a la vigilancia sanitaria, los LESP deberán enviar al InDRE los aislamientos obtenidos de muestras ambientales y de alimentos de acuerdo a la siguiente tabla:

Microorganismo	Fuente	Porcentaje
<i>Vibrio cholerae</i> O1	Alimentos	100%
	Ambientales	
<i>V. cholerae</i> NO O1	Alimentos	30%
	Ambientales	
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	Alimentos	100%
	Ambientales	
<i>Salmonella spp</i>	Alimentos	100%
	Ambientales	

## Envío y transporte de la muestra

El transporte de las muestras de agentes patógenos (cepas) se debe hacer en sistema básico de triple embalaje para reducir al mínimo el riesgo para los seres humanos, el medio ambiente y para proteger la viabilidad de los microorganismos. Las cepas deben ser enviadas en tubos herméticamente cerrados, con medio de cultivo Base de Agar Sangre (BAB) o algún otro medio apropiado que no contenga azúcares.

## Recepción de cepas en el InDRE

- Las cepas que se envíen al InDRE deben ir acompañadas del oficio de solicitud del servicio, dirigido a la Dirección General Adjunta del InDRE en atención al Laboratorio de Cólera y Enterobacterias especificando el servicio solicitado.
- Deben estar acompañadas con el Formato único de envío de muestras biológicas al InDRE.

## Criterios de Aceptación y Rechazo para cepas:

### Aceptación:

- Las cepas deben estar perfectamente identificadas con la clave de la muestra.
- Las cepas deben enviarse en tubo de ensaye de 13 x 100 mm con tapón de rosca, en agar base sangre, sellados con parafilm, etiquetados y transportadas con el sistema básico de triple embalaje.

### Rechazo:

- Cepas no identificadas con la clave de la muestra.
- Cepas mal identificadas donde la clave no coincida con los listados en el oficio de solicitud del servicio o con el formato único de envío de muestras biológicas al InDRE.
- Cepas que no estén acompañadas con el oficio de solicitud de servicio y del formato único de envío de muestras biológicas al InDRE.
- Cepas donde el agar este seco, o que el tubo llegue roto, o mal sellados.
- O no cumplan con alguno de los criterios de aceptación antes mencionados.



*Siendo Referencia Nacional en Salud Pública*

# INDRE

# SALUD

SECRETARÍA DE SALUD



Subsecretaría de Prevención y Promoción de la Salud  
Dirección General de Epidemiología

Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos  
"Dr. Manuel Martínez Báez"