



Isolamento e identificação presuntiva de *Vibrio Cholerae* O1/O139 em amostras fecais

Controle de qualidade de Meios e Reagentes

Os laboratórios devem garantir um controle de qualidade adequado dos meios e reagentes em uso. Cada lote de meios preparado a partir de ingredientes individuais deve ser testado para uma ou mais das seguintes características:

- Verificação de esterilidade/contaminação
- Capacidade de favorecer o crescimento bacteriano
- Capacidade de produzir a reação bioquímica apropriada (se aplicável)

Enriquecimento em Água Peptonada Alcalina (APA):

APA é o caldo de enriquecimento recomendado para *V. cholerae*. APA melhora o isolamento de *V. cholerae* quando há poucos organismos presentes (por exemplo, pacientes convalescentes ou portadores assintomáticos suspeitos) ou quando há uma grande variedade de microorganismos competidores. As espécies de *Vibrio* spp. crescem rapidamente em APA devido ao pH alcalino e à salinidade do enriquecimento, e em 6 a 8 horas estarão presentes em maior número do que os organismos não-*Vibrio*.

O inóculo deve ser abundante, mas não deve exceder 10% do volume do caldo. Se possível, o meio pode ser distribuído em pequenos tubos contendo 2 a 5 mL de APA para observar mais rapidamente o crescimento bacteriano.

Após incubação de 6 a 8 horas, fazer subculturas em meio sólido seletivo e não seletivo. Para isso, coletar uma a duas alças do sobrenadante do cultivo bacteriano em APA, pois os vibrios crescem preferencialmente na superfície do caldo. Não agite ou misture o tubo antes de realizar o repique. Se o caldo não puder ser subcultivado após 6 a 8 horas de incubação, deixe crescer overnight e faça o repique para um novo tubo de APA utilizando uma alça de 10 µL. Após 6 a 8 horas de incubação, o material deste segundo tubo deve ser subcultivado em um meio sólido.

Plaqueamento em meios seletivos:

O Ágar Tiosulfato Citrato Bile Sacarose (TCBS) é o meio seletivo de escolha para isolar *V. cholerae* de amostras de fezes, diferenciando *V. cholerae* de outras bactérias com base na sua capacidade de crescimento e na fermentação da sacarose, levando à mudança da cor inicial verde do meio para colônias amarelas após 18 a 24 horas de crescimento a $35 \pm 2^\circ\text{C}$. As colônias suspeitas são grandes (2 a 4 mm de diâmetro), brilhantes, ligeiramente achatadas e amarelas.

Garanta que cada novo lote de TCBS seja testado com controles positivos e negativos (ou seja, com espécies bacterianas positivas e negativas para sacarose) antes do uso.

Inocule os meios seletivos com um inóculo pesado de fezes líquidas, suspensão fecal ou swab retal.

Colônias amarelas em TCBS podem se tornar verdes à temperatura ambiente se as placas inoculadas forem armazenadas por

mais de 24 horas. **Verifique o crescimento em menos de 24 horas após a inoculação.**

O crescimento neste meio não é adequado para testes diretos de oxidase, nem para testes com antissoro *V. cholerae* O1 ou O139. Colônias suspeitas devem ser subcultivadas em ágar não seletivo antes de se realizar testes adicionais.

Ágar não seletivo (ANS):

Estes meios de cultura incluem Ágar Mueller Hinton (recomendado), Ágar Infusão de Cérebro e Coração (BHI) e Ágar de Tripton de Soja (TSA). Ágar não seletivo tem baixa seletividade e deve ser levemente inoculado. Quando inoculado diretamente a partir de uma amostra, o crescimento em Ágar não seletivo provavelmente resultará em culturas mistas, então frequentemente é necessário repicar colônias suspeitas numa nova placa. No entanto, quando as colônias suspeitas estiverem bem isoladas na placa inicial, é possível proceder diretamente ao teste de oxidase conforme descrito abaixo. Colônias suspeitas isoladas em TCBS devem ser cultivadas em Ágar não seletivo antes de testes adicionais.

Teste de oxidase:

A reação de oxidase deve ser realizada com uma cultura fresca (18-24 horas) **crecida em ágar não seletivo**; não deve ser realizada a partir de cultura em TCBS, pois a composição do meio pode produzir resultados falsos. O uso de uma alça metálica pode levar a uma reação falso-positiva para o teste de oxidase. Use uma alça de inoculação de vidro ou plástico descartável. *V. cholerae* é oxidase positivo, enquanto *Enterobacteriaceae* são oxidase negativos.

Agglutinação:

Este é um passo chave para a identificação presuntiva de vibrios da cólera. Ambos os sorogrupos O1 e O139 devem ser identificados usando antissoros para o antígeno O específico. A agglutinação deve ser realizada com uma cultura fresca (18-24 horas) proveniente de ágar não seletivo. Culturas em meio TCBS podem dar reações de auto-aglutinação em solução salina, impedindo a interpretação da reação. A agglutinação com salina não deve ocorrer. Se ocorrer agglutinação, trata-se de uma cepa auto-aglutinante, e portanto não é necessário realizar testes adicionais de agglutinação com o soro anti-O1 ou anti-O139. Envie a cepa para um laboratório de referência.