

**Evaluación y comparación de siembra
inmunológica directa e hibridación de ADN
para la detección y enumeración de *Vibrio
parahaemolyticus***

Elmer Eduarlin Cantarero Martínez

Zamorano, Honduras

Diciembre, 2009

ZAMORANO
CARRERA DE AGROINDUSTRIA ALIMENTARIA

**Evaluación y comparación de siembra
inmunológica directa e hibridación de ADN
para la detección y enumeración de *Vibrio
parahaemolyticus***

Proyecto especial presentado como requisito parcial para optar
al título de Ingeniero en Agroindustria Alimentaria en el Grado
Académico de Licenciatura.

Presentado por:

Elmer Eduarlin Cantarero Martínez

Zamorano, Honduras
Diciembre, 2009

RESUMEN

Cantarero, E. 2009. Evaluación y comparación de siembra inmunológica directa e hibridación de ADN para la detección y enumeración de *Vibrio parahaemolyticus*. 24 p.

Vibrio parahaemolyticus es un mesófilo que crece óptimamente a temperaturas de 35 a 39°C y es portador de la toxina hemolisina Kanagawa causante de septicemia, *Síndrome de Respuesta Inflamatoria Sistémica* (SRIS), caracterizada por lesión generalizada del endotelio vascular. El método oficial para la detección de *Vibrio parahaemolyticus tdh+*, en moluscos es el de hibridación de ADN, el cual se basa en la detección del gen utilizando el antígeno específico “prueba *tdh*”. Recientemente se desarrolló un método de detección usando anticuerpos que se adhieren al flagelo directamente llamado siembra inmunológica directa para detección de *V. vulnificus*. El objetivo del proyecto fue evaluar la efectividad y precisión del método de siembra inmunológica directa para la detección y enumeración de *Vibrio parahaemolyticus*, el cual a comparación del método oficial reduce el tiempo de análisis de 45-48 a 3.5-4 horas. Se utilizó cepas clínicas y ambientales de *Vibrio parahaemolyticus* para la realización de pruebas simultáneas con ambas metodologías. La detección de *V. parahaemolyticus* clínico (*tdh+*) utilizando siembra inmunológica directa fue precisa e indiferente a la concentración de cepas ambientales (*tdh-*). Los resultados fueron evaluados estadísticamente usando prueba *t*, mostrando que no existe diferencia estadística entre siembra inmunológica directa e hibridación de ADN ($P \geq 0.05$), sino solamente en la conveniencia metodológica y reducción de tiempo para obtención de resultados.

Palabras clave: Anticuerpo, antígeno, gen, toxina.

CONTENIDO

Portadilla	i
Página de firmas	ii
Resumen	iii
Contenido	iv
Índice de cuadros, figuras y anexos	v
1. INTRODUCCIÓN	1
2. REVISIÓN DE LITERATURA	3
3. MATERIALES Y MÉTODOS	6
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	12
5. CONCLUSIONES	17
6. RECOMENDACIONES	18
7. LITERATURA CITADA	19
8. ANEXOS	21

ÍNDICE DE CUADROS, FIGURAS Y ANEXOS

Cuadro

1. Determinación de mezcla de diluciones de cepas positivas (<i>tdh</i> +) y cepas negativas (<i>tdh</i> -) contables	12
2. Conteos de UFC/ml en mezclas <i>V. parahaemolyticus tdh</i> + y <i>tdh</i> – con cargas de <i>tdh</i> + de 2 y 3 Log UFC/ml según los métodos SID y HADN.	13

Figura

1. Diferentes concentraciones de anticuerpos anti-hemolisina y IgG para la detección de <i>V. parahaemolyticus tdh</i> +	5
2. Metodología de los métodos hibridación de ADN y siembra inmunológica directa.....	8
3. Colonias detectadas con HADN.....	13
4. Colonias detectadas con SID	13
5. Comparación de resultados utilizando concentración 2 Log de <i>V. parahaemolyticus tdh</i> + mediante prueba <i>t</i>	14
6. Comparación de resultados utilizando concentración 3 Log de <i>V. parahaemolyticus tdh</i> + mediante prueba <i>t</i>	15
7. Correlación entre resultados obtenidos con siembra inmunológica directa e Hibridación de ADN.....	15

Anexo

1. Comparación de falsos positivos y positivos verdaderos mediante SID.....	20
2. Secado de muestras de SID y HADN.....	20
3. Solución lysis.....	21
4. Buffer acetato de amonio.....	21
5. Solución 20x SSC.....	21
6. Solución 5x SSC.....	21
7. Solución 3x SSC.....	21
8. Solución 1x SSC.....	22
9. Buffer de hibridación.....	22
10. Solución 1XSSC/SDS	22
11. Solución 3SSC/SDS	22
12. Solución NBT/BCIP 3%.....	22
13. Solución salina buffer fosfato (SSBF) 0.067M	23

1. INTRODUCCIÓN

La bacteria Gram negativa, anaerobio facultativo de forma similar a una varilla recta o con una curvatura rígida, *Vibrio parahaemolyticus* tiene un solo flagelo y produce catalasa, oxidasa y fermenta glucosa sin producir gas (Baumann y Schubert 1984). Este mesófilo es abundante en la estación de verano por tener una temperatura óptima de crecimiento entre los 35 y 39 °C. Para su reproducción el *V. parahaemolyticus* necesita sal, la concentración óptima oscila de 1 a 3%, pero puede tolerar niveles de 0.5 a 10%; siendo también capaz de tolerar diferentes concentraciones de iones metálicos que le ayudan en la competencia por la sobrevivencia dentro de la flora marina. Suele estar presentes en los sedimentos, plancton, muestras de pescado y marisco. Se asocia principalmente con el consumo de marisco crudo como ser las ostras, las almejas y los mejillones y crustáceos o poco cocido como el camarón y el cangrejo que han sido implicados también con infecciones de *V. parahaemolyticus* (Yeung *et al* 2004).

V. parahaemolyticus ha sido aislado en Japón, Corea, Tailandia, Indonesia, la India y países europeos como Dinamarca, Alemania, Italia, España. También se ha aislado de Canadá, Panamá, EEUU y de Madagascar en África (Takeda *et. al.* 1983). Las ostras son organismos filtro alimentadores y *V. parahaemolyticus* está asociado con zooplanton lo que se traduce en el aumento de la bioconcentración de las bacterias en las ostras. (Shirai y DePaola *et al.* 1990).

Desde su descubrimiento hace 50 años, *V. parahaemolyticus* ha sido clasificado como una de las principales causas de enfermedades transmitidas por la ingesta de alimentos en todo el mundo (Okabe 1974). En los Estados Unidos se observó *V. parahaemolyticus* por primera vez en la Bahía de Chesapeake, en asociación con los muertos y moribundos cangrejos azules en el año 1969; siendo en Maryland en 1971 el primer caso documentado, el cual se asoció con la ingesta de cangrejo poco cocido (Sakazaki *et. al.* 1986). Es la causa más frecuente de enfermedades transmitidas por los alimentos en Japón (Okabe 1974), donde muchos residentes enfermaron por comer pescado crudo. En EEUU los brotes de gastroenteritis son atribuidos a *V. parahaemolyticus*, particularmente asociados con el consumo de ostras (Nolan C. *et al.* 1984 y Kaysner C. A. 2000).

Según Sakazaki, 1986: “Existen tres manifestaciones clínicas de la infección por *V. parahaemolyticus*, la infección por herida (24%), septicemia primaria (17%) y la gastroenteritis (51%); las tasas de mortalidad son 5% para la infección por herida, 44% para las enfermedades sépticas y sólo el 1% para la gastroenteritis. El consumo de ostras crudas fue la causa principal del 68% para la gastroenteritis y el 83% de la septicemia primaria”.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo general

- Evaluación y comparación de siembra inmunológica directa e hibridación de ADN para la detección y enumeración de *Vibrio parahaemolyticus*.

1.1.2 Objetivos específicos

- Evaluar la efectividad del método de siembra inmunológica directa (SID) en la detección y enumeración del *Vibrio parahaemolyticus*.
- Evaluar la precisión del método siembra inmunológica directa (SID) en la detección y enumeración del *V. parahaemolyticus tdh +* en diferentes mezclas de *V. parahaemolyticus tdh -*.
- Comparar mediante una prueba *t* el método oficial de hibridación de ADN (HADN) con el método no oficial de siembra inmunológica directa (SID) en la detección y enumeración del *V. parahaemolyticus tdh +* en diferentes mezclas de *V. parahaemolyticus tdh -*.
- Realizar un análisis de correlación entre el método oficial de hibridación de ADN (HADN) con el método no oficial de siembra inmunológica directa (SID).

2. REVISIÓN DE LITERATURA

El brote de origen alimentario, debido a *V. parahaemolyticus* en mariscos contaminados está asociado con la Hemolisina Termoestables-Directa (*tdh*+) ó “hemolisina Kanagawa” presente en la mayoría de las cepas patogénicas (Shirai *et. al* 1990). La mayoría de los aislados clínicos de *V. parahaemolyticus* se diferencian de las cepas del medio ambiente por su capacidad para producir *tdh*, denominado fenómeno de Kanagawa; mas sin embargo sólo del 1-2% de las muestras ambientales son *tdh* positivo (Takeda 1983). La Hemolisina termolábil (*tlh*) se encuentra en todas las cepas de *V. parahaemolyticus*, pero no en otras especies. Pruebas genéticas basadas en PCR y algunos otros procedimientos como separación inmunomagnética (IMS) han sido desarrollados para detectar la *tlh*, específicamente los genes *tdh* y *trh* en *V. parahaemolyticus* (Takeda *et. al.* 1983). A diferencia de *Vp-tdh*, *Vp-trh* es inactivado por calor a 60 ° C durante 10 minutos (Honda 1993). Se ha observado que por análisis comparativo *tdh* y *trh* tienen el 68,6% de homología de secuencia de nucleótidos que sugiere que podría ser derivado de un ancestro común (Shirai *et al.* 1990). Entre todos los vibrios, *V. parahaemolyticus* es el que más se asocia a la gastroenteritis, desde 1988. El Centro para el Control y Prevención de Enfermedades (CDC) ha demoninado como estados susceptibles a *V. parahaemolyticus* a Florida, Alabama, Louisiana y Texas (Rippey *et. al.* 1994).

Anticuerpos IgG, son la clase más abundante presente en el suero que constituye aproximadamente el 80% del total de inmunoglobulina sérica. Debido a su abundancia relativa y excelente especificidad hacia antígenos, el IgG es el principal anticuerpo utilizado en la investigación inmunológica. Se han producido anticuerpos monoclonales para la investigación y se determinó que los anticuerpos IgG por sí mismos no se utilizan en pruebas serológicas para identificar *V. parahaemolyticus* a causa de reacciones cruzadas con otros muchos organismos marinos, sin embargo, durante las investigaciones de los brotes de origen alimentario, las pruebas serológicas se han convertido en una valiosa herramienta epidemiológica. La correlación ha sido bien establecida, las cepas de *V. parahaemolyticus* que causan enfermedad en los seres humanos son casi siempre Kanagawa positivo y aislados recuperados de mariscos, son casi siempre Kanagawa negativas (Miwatani y Takeda 1976).

Medios utilizados para la verificación de las reacciones bioquímicas de *V. parahaemolyticus* deben contener un 2 o 3% de NaCl. *V. vulnificus* requiere sal para el crecimiento, como mínimo de 0,5% de concentración.

El diluyente utilizado para la transferencia de suspensiones celulares debe contener sales como tampón fosfato salino (SSBF), agar TCBS es un medio utilizado para el aislamiento de *V. cholerae*, *V. parahaemolyticus*, y otras especies de vibrio en mariscos, este medio ayuda a un buen crecimiento de la mayoría de las especies de vibrio e inhibe la mayoría de especies no vibrios (Kobayashi *et. al.* 1963).

Tres sistemas de análisis para enumerar *V. parahaemolyticus* se han propuesto: El primero es el número más probable (NMP) procedimiento comúnmente utilizado por muchos laboratorios es casi idéntico al de recuento de *V. vulnificus*. El segundo es un procedimiento de filtración por membrana hidrofóbica (HGMF) (Entis y Boleszczuk. 1983). El tercero es un método directo en placas usando pruebas de ADN para la identificación de la población total de *V. parahaemolyticus* y cepas patógenas (McCarthy *et al.* 2000). Además, una prueba de genes *trh* procedimiento de confirmación y un análisis de PCR también se incluye (Jackson 1974). Con el fin de confirmar la presencia de *V. parahaemolyticus*, la prueba serológica para la detección de la especie flagelar de antígenos (H) podría utilizarse. Hay dos factores antigénicos determinantes en el flagelo de Vibrio, una de las cuales es la superficie antigen que existe en la superficie del filamento flagelar y es responsable de la aglutinación (H) cuando el antiserum reacciona con el antígeno. El antígeno se encuentra dentro de otros antígenos que existe en el interior del flagelo y se expone sólo cuando la disociación realizada de los filamentos es flagelar (Shirai *et al.* 1990). Especies específicas anti-*V. vulnificus* y anticuerpos policlonales H fueron producidos y utilizadas para la construcción de reactivos con acción coagulante, los cuales reaccionaron con el 99% de los aislados bacterianos, bacteriológicamente identificados como *V. vulnificus*, esto ofrece un procedimiento específico, rápido y un método económico para la detección del patógeno en un paso más allá del aislamiento primario. En cambio *Vibrio cholerae* y *V. parahaemolyticus*, presentan semejanza en exposición H con otros vibrios lo cual complica el uso de anticuerpo policlonal anti-H para detectar estos patógenos serológicamente (citado por Senevirathne 2008).

En la actualidad FDA recomienda el uso del método de hibridación de ADN para la detección de *Vibrio parahaemolyticus*. El método de hibridación de ADN se basa en la detección del gen *tdh* para enumerar la presencia de cepas patogénicas de *V. parahaemolyticus* en mariscos crudos. A comparación el método de siembra inmunológica directa puede detectar las cepas patogénicas a través de la reacción antígeno-anticuerpo anti-haemolysin con antígeno flagelar haemolysin y la reacción antígeno-anticuerpo IGg. Siembra inmunológica directa (SID) es un método de detección basado en anticuerpos. Ha sido desarrollado para detectar la relación de una toxina similar a la Shiga (SLT) en la reproducción de *E. coli* en muestras de heces. SID fue capaz de detectar una producción de una no-toxina en *E. coli* en la flora normal de las heces con alto nivel de sensibilidad y especificidad (Senevirathne. 2008).

Recientemente se ha desarrollado el método para la detección de *V. vulnificus* utilizando anticuerpos anti-flagelar. Este método puede detectar todas las colonias clínicas y ambientales de las cepas de *V. vulnificus* estudiadas y una reacción no cruzada con otras especies de Vibrio.

El método (SID) y el método estándar de hibridación de ADN son comparables y no mostraron diferencia estadística significativa al enumerar *V. vulnificus* de cultivos mixtos de la ostra homogenizada. El método SID también ha demostrado el desarrollo de color claro y que toma menos tiempo, que la hibridación de ADN; todo esto gracias al desarrollo de anticuerpos anti-haemolysin contra el haemolysin de *V. parahaemolyticus*, el cual podría utilizarse en el protocolo SID siendo capaz de distinguir *V. parahaemolyticus* patogénico (*tdh*+) y no patogénico (*tdh* -); brindando a las agencias reguladoras un método rápido y fácil de usar para detectar y enumerar *V. parahaemolyticus* (Senevirathne *et. al.* 2008).

Según Senevirathne (2008), la concentración de anticuerpos que genera un mejor desarrollo de color y facilita el conteo de *V. vulnificus* en siembra inmunológica directa es de 1:2000 en SSBF. Basados en esta información, se hizo una prueba con concentraciones de 1:1000, 1:2000 y 1:4000 de anticuerpos en SSBF para la detección de *V. parahaemolyticus*, mediante siembra inmunológica directa. Los resultados obtenidos confirmaron que la concentración de anticuerpos 1:2000 óptima para recuentos de *V. parahaemolyticus*, como se muestra en la figura 2.

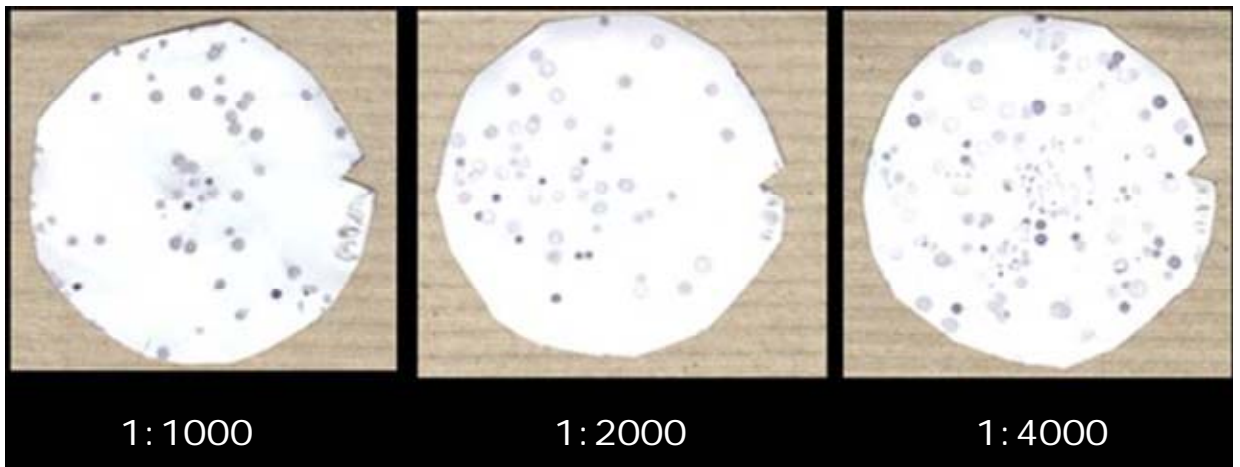


Figura 1. Diferentes concentraciones de anticuerpos anti-hemolisina y IgG para la detección de *V. parahaemolyticus*.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 UBICACIÓN

El estudio fue realizado en el laboratorio de química agrícola de la Universidad Estatal de Louisiana (LSU), Baton Rouge 70802, LA, EEUU.

3.2 EQUIPOS Y MATERIALES

- Autoclave
- Incubadora (35°C)
- Balanza con sensibilidad de 0.01gr.
- Agua de baño calentada a 42°C y a 54 °C
- Batidor orbital
- Vortex
- Stomacher
- Pipeteador de un solo canal, volumen de 2µl- 20µl
- Pipeteador de un solo canal, volumen de 20µl - 200µl
- Micropipetas
- Microondas 1000 watt
- Batidora y tazas para batidora
- Platos estéril de cultivo
- Guantes de látex
- Esparcidor estéril de plástico
- Whatman #541 (filtros)
- Platos petri
- Contenedor plástico (500ml)
- Bolsas plásticas Whirl-pak (4.5" x 9")(NASCO B00736WA)
- Cultivos: *tdh+* *V. Parahaemolyticus*
tdh- *V. parahaemolyticus*

3.2.1 Materiales para hibridación de ADN

- Solución salina buffer fosfato (SSBF)
- *Vibrio vulnificus* agar (VVA)
- Solución lysis (0.5M NaOH 1.5M NaCl)
- Buffer acetato de amonio (2M)
- Solución salina estándar de citrato (SSC) 1x, 3x, 5x Y 20x
- Solución para activar la proteinasa K (ProK)
- Buffer de hibridación
- Solución 1 x SSC/ SDS Y 3x SSD/SDS
- Solución NTB/BCIP
- Etiquetado alcalino fosfatasa *tlh* o prueba *tdh*

3.2.2 Materiales para siembra inmunológica directa

- Solución salina buffer fosfato (SSBF)
- Tween 20 (emulsificante)
- Platos petri
- Membrana de transferencia 0.45 Mm
- Botes
- Bolsas plásticas Whirl-pak (4.5" x 9")(NASCO B00736WA)
- Guantes
- Pipeta
- Propano
- Etanol 70%
- Papel toalla
- Tubos de 45ml
- Suero bovino albúmina (BSA)
- *Vibrio vulnificus* agar (VVA)
- Thiosulfate citrato bile salt (TCBS)
- Gabacha
- Encendedor y tijeras
- Anti Rabbit IgG peroxidasa conjugada
- 3,3-Diaminobenzidina tetrahidrocloridrico (Tabletas 10mg)

3.3 PASOS PRELIMINARES A LA SIEMBRA

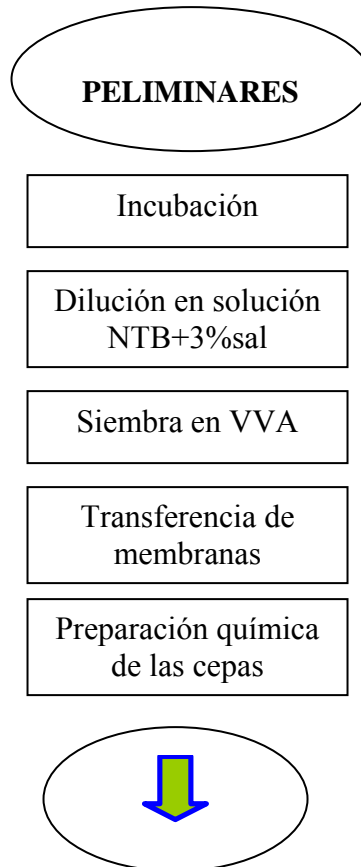
Se Incuba una muestra del cultivo: *V. Parahaemolyticus tdh+* y *V. parahaemolyticus tdh-* de 18-24 horas en 10ml de solución NTB+ 3%NaCl en tubos separados, tomar 10 µl de dichas muestras y dejarlas 16 horas en solución NTB+ 3%NaCl en tubos separados para proceder a realizar diluciones de ambos cultivos.

Tomando 1ml del cultivo madre en 9ml de solución salina buffer fosfato (SSBF) esterilizados en autoclave realizar mezcla y pasarlo nuevamente a 9ml de solución salina buffer fosfato (SSBF), repetir esto 5 veces ($1:10^{-6}$); seguidamente se toman 100 μ l de las 2 últimas concentraciones del cultivo *tdh+* (10^{-5} y 10^{-6}) y se mezclan utilizando vortex para homogenizar la mezcla 100 μ l de las últimas 4 diluciones del cultivo *tdh-* (10^{-3} a 10^{-6}). Luego se depositan en platos petri con medio vibrio vulnificus agar (VVA) 100 μ l de la mezcla de 200 μ l de cada tubo (sembrar los 100 μ l restantes de la mezcla para tener un plato extra de cada concentración), utilizar la técnica de Spreads plate y guardar en incubadora a 37°C toda la noche. El medio VVA utilizado para detectar *V. vulnificus*, mostró ser selectivo y se obtuvieron colonias más pequeñas y con menos adherencia, lo cual facilitó el conteo en las membranas, a comparación de los medios TCBS, BHI+ o NA+. Basados en esta afirmación se procedió a utilizar VVA como medio de crecimiento para *V. parahaemolyticus*, además de contar con la recomendación de este medio por parte de la FDA (Senevirathne 2008).

Cálculo para obtener la cantidad de prueba *tdh*:

(μ l prueba igual 5 pico moles) = (volumen en μ l x 5) \div (concentración in nmol x 1000)

TDH=1000*5 / (1.05*1000) = 4.76 μ l



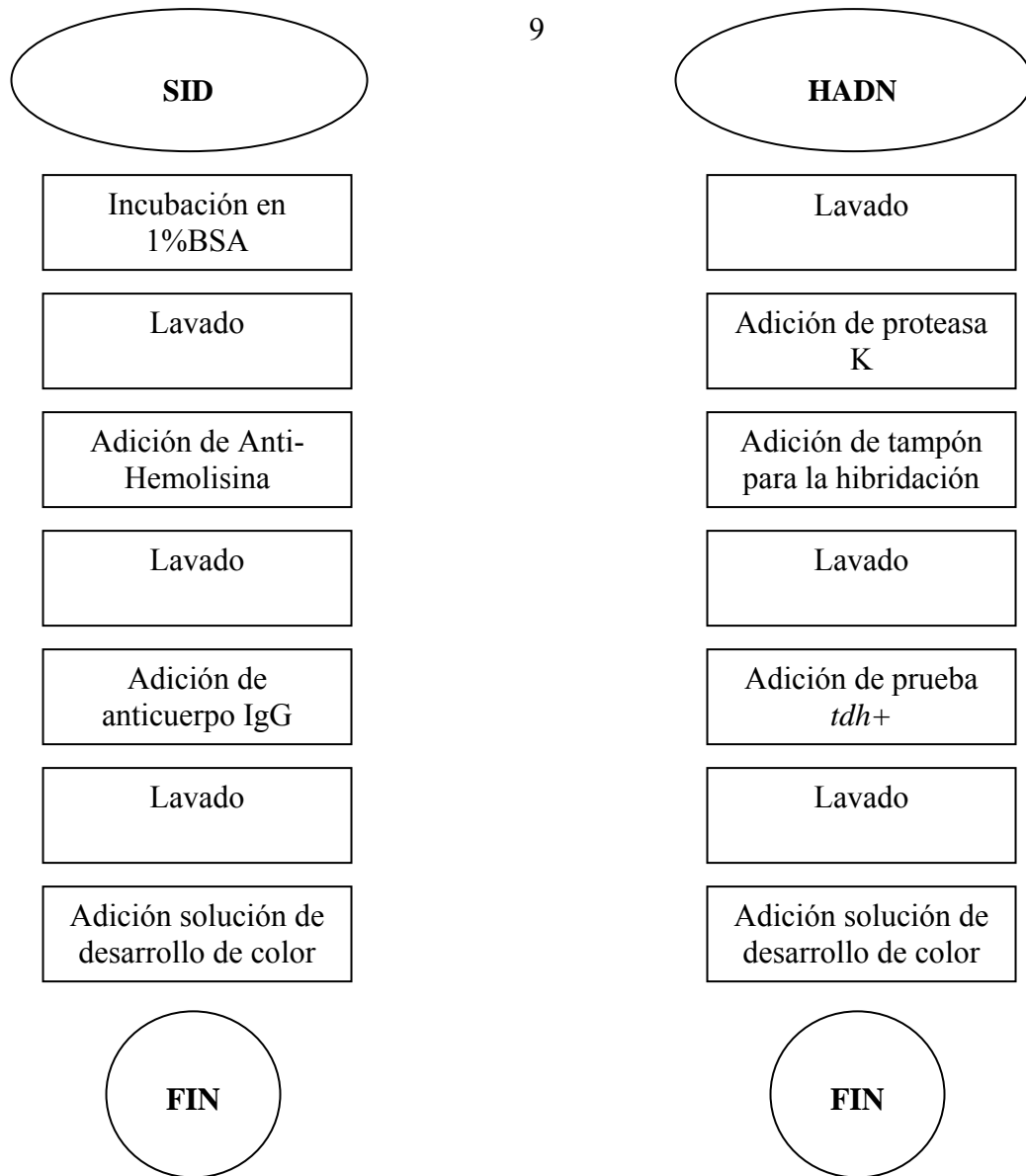


Figura 2. Metodología de los métodos hibridación de ADN y siembra inmunológica directa.

3.4 SIEMBRA IMNUNOLÓGICA DIRECTA (SID)

Se transfieren las colonias que han crecido en el medio *Vibrio Vulnificus* Agar (VVA) a las membranas, dejándoles secar por 10min, se procede a identificar cada una de las membranas y se depositan en un plato petri cada una de ellas y luego se “lavan” con agitación a 25°C con 20ml SSBF (0.067 M 7.1-7.3pH 1 pH) + 0.05% de tween20 por 10min.

Se mueve cada membrana en un plato petri limpio para incubar con SSBF (1% BSA) por 30min; se lavan nuevamente las membranas una vez con el SSBF +0.05% de tween20 por 10min y se combinan con 20 µl anticuerpo anti-Hemolisina diluido en SSBF (1:2000) por

30min. Se remueve el anticuerpo desatado lavando 4 veces con SSBF +0.05% de tween20 por 10min en SSBF T-20 y luego las membranas incubadas con 20 µl anticuerpo antirabbit IgG obtenido en sangre de cabra diluido (1: 2000) en SSBF + 1%BSA por 30min, se lavan las membranas 4 veces con SSBF +0.05% de tween20 por 5min y se agrega la solución para desarrollo del color: una tableta 10mg (3,3-Diaminobenzidina tetrahidrocloridrico), 20ml tris NaCl 0.05M, 1ml el 8% NiCl₂, 0.1ml de H₂O₂ al el 30% por membrana; El desarrollo de color se detiene lavando cada membrana con agua destilada 6 veces (20ml/filtro).

3.5 HIBRIDACIÓN DE ADN

Se identifica cada filtro Whatman #541 y se humedece con agua destilada en un plato petri limpio, luego se deposita en el plato petri que contiene las colonias suavemente asegurando que todo el filtro toque la superficie de las colonias, el filtro con las colonias en un nuevo plato petri es colocado para adicionarle 1 ml de la solución lysis, luego se seca en el microondas por 10-12 segundos y se transfieren a un recipiente para “lavado”.

Adicionar posteriormente 4ml de buffer acetato de amonio por filtro y con agitación por 5min utilizando batidor orbital, se retira el buffer acetato de amonio del recipiente y se adicionan 10ml de solución 1x SSC por filtro, agitándolo por 1-2 minutos, se retira la solución del recipiente y se adicione nuevamente 10ml de solución 1x SSC por filtro, agitándolo por 1-2 minutos. Se retiran los filtros del recipiente de lavado y dejándolos reposar en papel absorbente, una vez secos, se depositan en una bolsa plástica y almacenándose indefinidamente.

Se adicionan 10 ml de 1x SSC y 20 µl de Proteasa K de activación por filtro para agitarlos posteriormente en el incubador a 42°C por 30min, se lavan 3 veces con 1 x SSC (10ml/filtro) por 10minutos a temperatura de cuarto en batidor orbital, luego se deposita de 1 a 5 filtros en una bolsa plástica para stomacher (Whirl pack 4.5” x 9”) y se adicionan 10ml de buffer para hibridación/bolsa, seguido de una agitación en el incubador a 54°C por 1 hora, se procede a retirar la solución buffer y adicionar 10ml de buffer para hibridación; luego se Adicionaron 4.76 µl de la prueba *tdh* en las bolsas con los filtros, agitando gentilmente y con cuidado de no generar burbujas para incubar por 1 hora a 54 °C, luego se remueven los filtros de la bolsa y se “lavan” 2 veces con 3x SSC/SDS (10ml/filtro) por 10minutos con agitación a 54°C; se lava 5 veces por 5min con 1x SSC (10ml/filtro) a temperatura de cuarto (25°C) con agitación de batidor orbital y en un nuevo plato petri se adicionan 20ml de solución NBT/BCIP a 5 filtros, los cuales se incuban con agitación a temperatura de cuarto (25°C) o a 35°C para resultados mas rápidos y cubriendo los platos petri con papel aluminio durante 11 ó 12 horas hasta que desarrolle color; al final se detiene la reacción con agua destilada, lavando con agua destilada 3 veces por 10min cada vez (10ml/filtro) y se colocan los filtros en papel absorbente en la obscuridad para posteriormente realizar el conteo y el escaneado de los resultados.

3.6 DISEÑO EXPERIMENTAL

El diseño experimental utilizado fue comparación estadística de todos los pares usando prueba t y separación de medias Tukey con nivel de significancia 5%, seguido de un análisis de correlación (JUMP versión 4.0.3, SAS Inst. Inc., Cary, N.C., U.S.A.); en la cual se tuvieron 8 tratamientos para cada método y 3 repeticiones por tratamiento para evaluar si existe diferencia estadística significativa entre los resultados del método oficial hibridación de ADN (HADN) y el no oficial siembra inmunológica directa (SID).

Hipótesis a evaluar:

- Hipótesis nula (H_0): No existe diferencia estadística significativa entre la detección y enumeración de *V. parahaemolyticus tdh+* utilizando el método de siembra inmunológica directa (SID) e hibridación de ADN (HADN).
- Hipótesis alterna (H_a): Si existe diferencia estadística significativa entre la detección y enumeración de *V. parahaemolyticus tdh+* utilizando el método de siembra inmunológica directa (SID) e hibridación de ADN (HADN).

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 ESTUDIOS PRELIMINARES

Debido a que las cepas aisladas de *V. parahaemolyticus* obtenidas de ATCC vienen en una alta concentración, se decidió hacer una prueba para poder establecer las concentraciones a las que puedan ser contables. Se realizó una mezcla en proporciones iguales de diferentes diluciones (desde 10^0 hasta 10^{-6}) de las cepas positivas (*tdh+*) y negativa (*tdh-*), como se muestra en el cuadro 1.

Cuadro 1. Determinación de mezcla de diluciones de *V. parahaemolyticus* positivas (*tdh+*) y negativas (*tdh-*) contables.

		<i>tdh-</i>						
		10	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}
<i>tdh+</i>	10	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC
	10^{-1}	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC
	10^{-2}	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC
	10^{-3}	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC
	10^{-4}	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC
	10^{-5}	NC	NC	NC	C	C	C	C
	10^{-6}	NC	NC	NC	C	C	C	C

NC: No contable
C: Contable

Las mezclas que dieron conteos menores a 100 colonias por plato fueron seleccionadas, siendo estas las combinaciones de 10^{-3} a 10^{-6} de *tdh-* con 10^{-5} y 10^{-6} de *tdh+*. Según resultados la carga de *V. parahaemolyticus tdh +* en diluciones 10^{-5} y 10^{-6} fue de 3 Log UFC/ml y 2 Log UFC/ml respectivamente.

4.2 COMPARACIÓN ESTADÍSTICA DE LOS MÉTODOS UTILIZADOS

La comparación estadística se realizó según dos concentraciones de *V. parahaemolyticus* clínico (10^{-5} - 10^{-6}) en 4 concentraciones de *V. parahaemolyticus* ambiental (10^{-3} - 10^{-6}). Se realizaron 48 eventos constituyéndose de 8 muestras por cada método y 3 repeticiones por muestra; los resultados obtenidos por ambos métodos fueron evaluados mediante una prueba *t* y separación de medias Tukey con nivel de significancia 0.05, seguido de un

análisis de correlación (JUMP versión 4.0.3, SAS Inst. Inc., Cary, N.C., U.S.A.). Al comparar el conteo de *V. parahaemolyticus* clínico (*tdh*+) estadísticamente se obtuvo que no existe diferencia estadística entre los métodos (SID/HADN).

Según Senevirathne (2008), no existe diferencia estadística significativa entre el uso de siembra inmunológica directa (SID) e hibridación de ADN (HADN) para la detección de *V. vulnificus*, sino solamente se diferencian en el corto tiempo de obtención de resultados que brinda SID (4 hora) y la facilidad metodológica; también afirma que los clínicos positivos son de color púrpura oscuro y los positivos ambientales de color púrpura casi transparentes. Lo cual es muy similar al trasladarlo a los resultados obtenidos en la detección de *V. parahaemolyticus* utilizando siembra inmunológica directa como se muestra en las figuras 3 y 4.

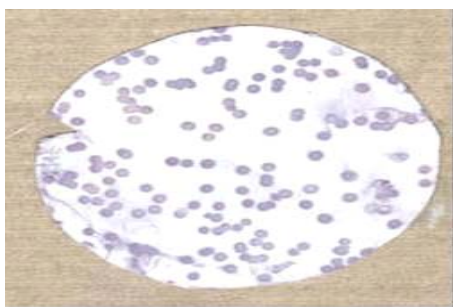


Figura 3. Colonias detectadas con HADN.

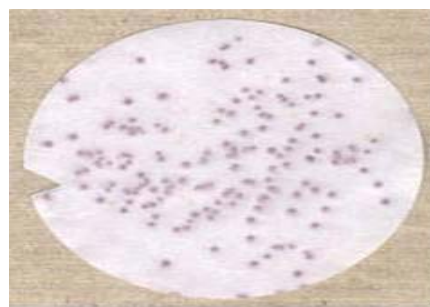


Figura 4. Colonias detectadas con SID.

Ambas figuras muestran colonias fácilmente identificables puesto que la selección preliminar, la concentración de anticuerpos utilizados (1:2000) y el medio selectivo utilizado (VVA) fueron ideales para el experimento.

Cuadro 2. Conteos de UFC/ml en mezclas *V. parahaemolyticus* *tdh* + y *tdh* - con cargas de *tdh* + de 2 y 3 Log UFC/ml según los métodos SID y HADN.

<i>V. parahaemolyticus</i>		SID**	HADN***
<i>tdh</i> +	<i>tdh</i> -		
3 Log*	10 ⁻³	2.95 ± 0.40 a(x)	2.97 ± 0.41 a(x)
	10 ⁻⁴	3.15 ± 0.30 a(x)	3.15 ± 0.29 a(x)
	10 ⁻⁵	3.01 ± 0.46 a(x)	3.02 ± 0.48 a(x)
	10 ⁻⁶	3.25 ± 0.42 a(x)	3.28 ± 0.44 a(x)
2 Log*	10 ⁻³	2.03 ± 0.28 a(x)	2.05 ± 0.27 a(x)
	10 ⁻⁴	1.74 ± 0.65 a(x)	1.85 ± 0.50 a(x)
	10 ⁻⁵	1.88 ± 0.40 a(x)	1.85 ± 0.39 a(x)
	10 ⁻⁶	1.60 ± 0.51 a(x)	1.55 ± 0.38 a(x)

a Medias con la misma letra en la columna no son significativamente diferentes $P \geq 0.05$.

x Medias con la misma letra en la fila no son significativamente diferentes $P \geq 0.05$

* Número de colonias *tdh*+ *V. parahaemolyticus* que fue determinado por el crecimiento en medio VVA.

** Número de colonias *tdh*+ *V. parahaemolyticus* determinadas por método siembra inmunológica directa.

*** Número de colonias *tdh*+ *V. parahaemolyticus* determinadas por metodo de hibridación de ADN.

La detección de *V. parahaemolyticus* clínico (*tdh+*) Utilizando SID fue precisa e indiferente a la concentración de cepas ambientales (*tdh-*), como se muestra en el cuadro 2; Al evaluar la detección con el método de siembra inmunológica directa (SID) utilizando concentraciones de 3 log y 2 log no mostró diferencia estadística entre todas las mezclas de las mismas (10^{-5} y 10^{-6}) con las diferentes concentraciones de cepas ambientales (10^{-3} a 10^{-6}), igualmente al evaluar la detección con el método de hibridación de ADN (HADN) utilizando concentraciones de 3 log y 2 log no se observó diferencia estadística entre todas las mezclas de las mismas (10^{-5} y 10^{-6}) con las diferentes concentraciones de cepas ambientales (10^{-3} a 10^{-6}).

Se realizó una comparación entre las medias de los resultados obtenidos por siembra inmunológica directa (SID) y los resultados obtenidos por hibridación de ADN (HADN^d); alta concentración (3 Log) o baja concentración (2 Log) según el caso, como se muestra en las figuras 5 y 6.

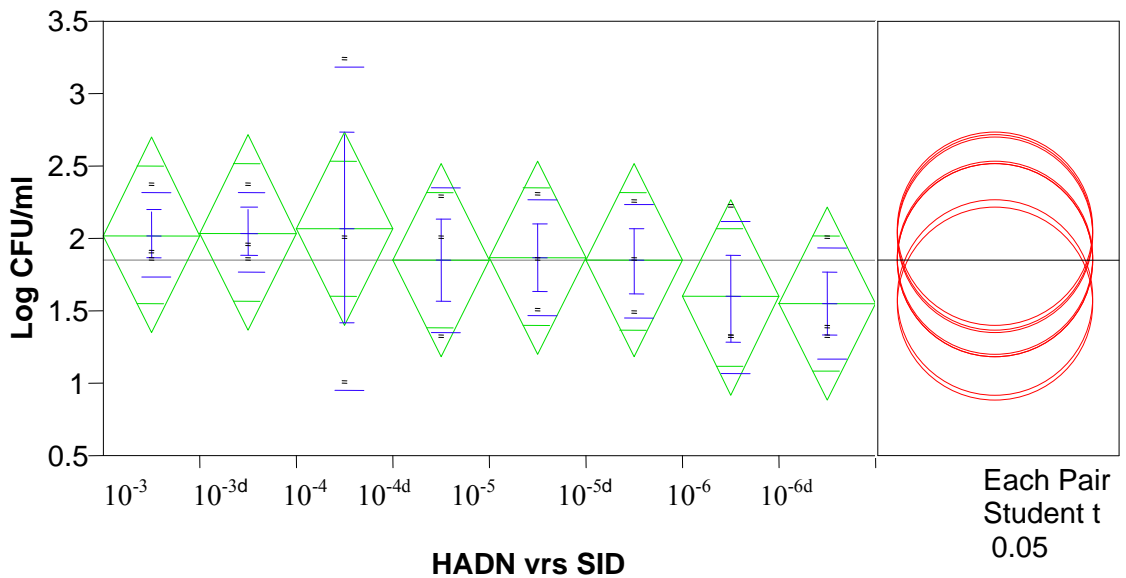


Figura 5. Comparación de resultados utilizando concentración 2 Log de *V. parahaemolyticus* *tdh+* mediante prueba *t*.

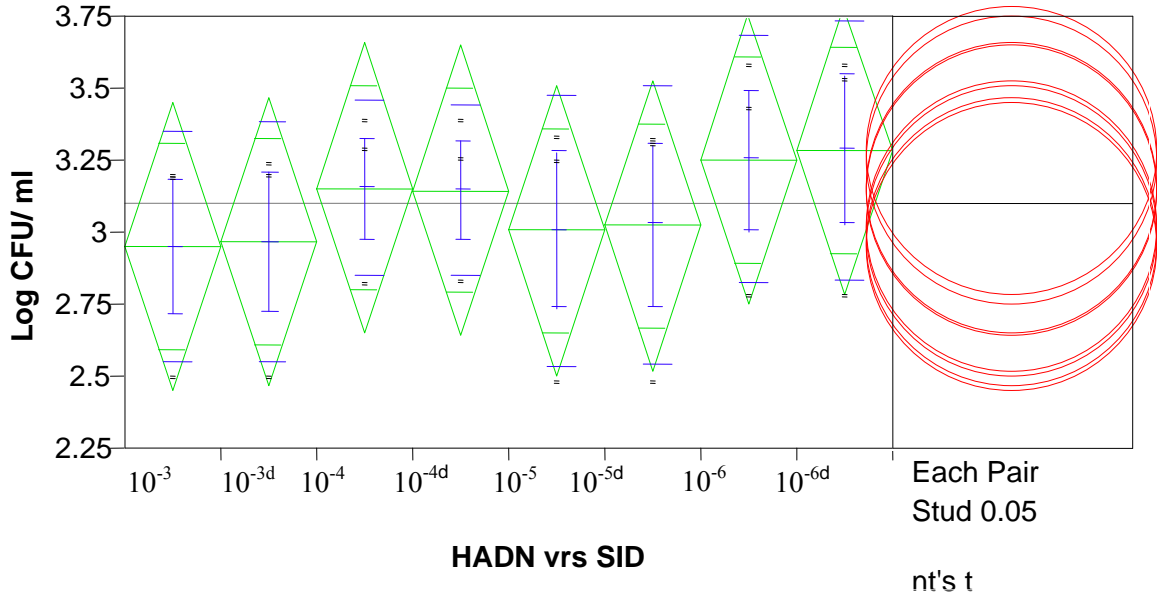


Figura 6. Comparación de resultados utilizando concentración 3 Log de *V. parahaemolyticus tdh+* mediante prueba *t*.

Los resultados obtenidos en todas las concentraciones de 3 Log y de 2 Log muestran que no existe diferencia estadística significativa entre las medias de cada método utilizado (ángulos obtusos entre los círculos rojos). Asimismo, al realizar un análisis de correlación entre los resultados obtenidos utilizando siembra inmunológica directa (SID) e hibridación de ADN (HADN) se encontró que existe una correlación alta positiva (0.93) como se puede apreciar en la figura 7.

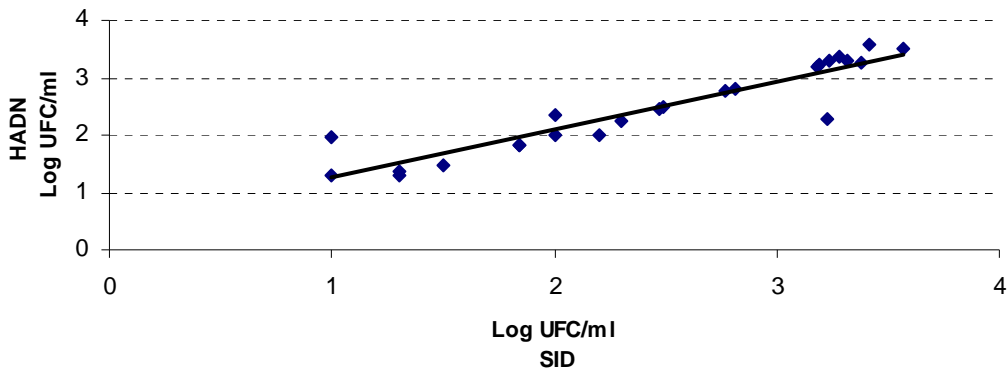


Figura 7. Correlación entre resultados obtenidos con siembra inmunológica directa e hibridación de ADN.

5. CONCLUSIONES

- El método oficial HADN brinda un color verde claro para los falsos positivos, lo cual facilita el conteo, a comparación del SID que mostró falsos positivos púrpuras claro; sin embargo es igual de efectivo en la obtención de resultados que HADN.
- La detección de *V. parahaemolyticus* clínico (tdh+) utilizando SID fue precisa e indiferente a la concentración de cepas ambientales (tdh-).
- Los resultados obtenidos utilizando el método de siembra inmunológica (SID) directa e hibridación de ADN (HADN), no presentaron diferencia estadística significativa ($P \geq 0.05$), sino solamente en la conveniencia metodológica.
- El método no oficial (SID) mostró una correlación alta positiva (0.93) con respecto al método oficial (HADN).

6. RECOMENDACIONES

- Facilitar la validación del método de siembra inmunológica directa (SID), y de esta forma contar con mayor agilidad en sistemas extensivos de inspección de *V. parahamolyticus* en ostras.
- Tomar muestras frescas del golfo de México y de los almacenes en diferentes puntos de distribución de ostras para proceder al análisis el mismo día.
- Realizar el estudio en varios laboratorios para corroborar datos y para la validación del método de siembra inmunológica directa (SID).

7. LITERATURA CITADA

Baumann, P., and R. H. W. Schubert. 1984. Family II. Vibrionaceae, p. 516-550. In N. R. Krieg, and J. G. Holt (eds.), *Bergey's manual of systematic bacteriology*, 1st ed. Williams & Wilkins Co., Baltimore/London.

Entis, P. y P. Boleszczuk. 1983. Overnight enumeration of *Vibrio parahaemolyticus* in seafood by hydrophobic grid membrane filtration. *J. Food Protect.* 46:783-786.

Honda, T., Y. Ni, and T. Miwatani. 1988. Purification and characterization of a hemolysin produced by a clinical isolate of Kanagawa phenomenon-negative *Vibrio parahaemolyticus* and related to the thermostable direct hemolysin. *Infect. Immun.* 56:961-965.

Hugh, R., and J. C. Feeley. 1972. Report (1966-1970) of the subcommittee on taxonomy of vibrios to the International Committee on Nomenclature of Bacteria. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 2:123-126.

Jackson, H. 1974. Temperature relationships of *Vibrio parahaemolyticus*. In T. Fujino, G. Sakaguchi, R. Sakazaki, y Y. Takeda (eds.), *International Symposium on Vibrio parahaemolyticus*. Saikon Publishing Company. pp139-146.

Kaysner, C. A. 2000. *Vibrio* species. In B. M. Lund, A. D. Baird-Parker, and G. W. Gould (eds.), *The Microbiological Safety and Quality of Food*. Vol. II. Chapter 48. Aspen Publishers, Gaithersburg, MD. Pág1336-1362.

Kobayashi, T., S. Enomoto, and R. Sakazaki. 1963. A new selective isolation medium for the vibrio group on modified Nakanishi's medium (TCBS agar). *Jpn. J. Bacteriol.* 18:387-392.

McCarthy, S.A., A. DePaola, C.A. Kaysner, W.E. Hill, and D.W. Cook. 2000. Evaluation of nonisotopic DNA hybridization methods for detection of the *tdh* gene of *Vibrio parahaemolyticus*. *J. Food Protect.* 63:1660-1664.

Miwatani, T., y Y. Takeda. 1976. *Vibrio parahaemolyticus*: A causative bacterium of food poisoning. Saikon Publishing Co., Ltd., Tokyo.

Nolan, C. M., J. Ballard, C. A. Kaysner, J. Lilja, L. B. Williams, and F. C. Tenover. 1984. *Vibrio parahaemolyticus* Gastroenteritis: An outbreak associated with raw oysters in the Pacific Northwest. *Diag. Microbiol. Infect. Dis.* 2:119-128.

Okabe, S. 1974. Statistical review of food poisoning in Japan, especially that by *Vibrio parahaemolyticus*. In T. Fujino, G. Sakaguchi, R. Sakazaki, and Y. Takeda (eds.), *International Symposium on Vibrio parahaemolyticus*. Saikon Publishing Co., Ltd., Tokyo. pp. 5-8.

Rippey, S. R. 1994. Infectious diseases associated with molluscan shellfish consumption. *Clin. Microbiol. Rev.* 7:419-425.

Sakazaki, R., y T. Shimada. 1986. *Vibrio* species as causative agents of food-borne infection. In R. K. Robinson, ed., *Developments in Food Microbiology*. 2nd. Ed. Elsevier Applied Science Publishers, New York, NY.

Sakazaki, R., S. Iwanami, and H. Fukumi. 1963. Studies on the enteropathogenic, facultatively halophilic bacteria, *Vibrio parahaemolyticus*. I. Morphological, cultural and biochemical properties and its taxonomic position. *Jpn. J. Med. Sci. Biol.* 16:161-188.

Senevirathne, R. 2008. Detection and enumeration of *Vibrio Vulnificus* by Direct Colony Immunoblot. IFT.

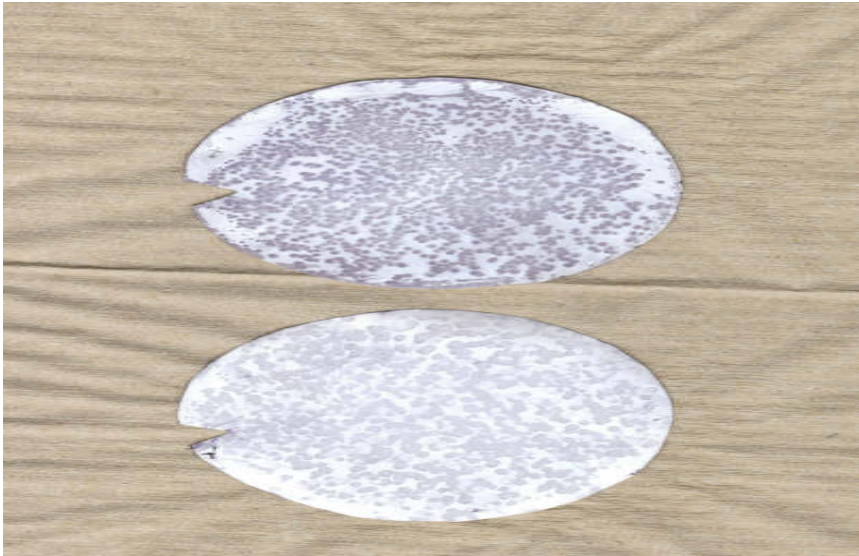
Shirai, H., H. Ito, T. Hirayama, Y. Nakamoto, N. Nakabayashi, K. Kumagai, Y. Takeda, y M. Nishibuchi. 1990. Molecular epidemiologic evidence for association of thermostable direct hemolysin (TDH) and TDH- related hemolysin of *Vibrio parahaemolyticus* with gastroenteritis. *Infect. Immun.* 58:3568-3573.

Takeda, Y. 1983. Thermostable direct hemolysin of *Vibrio parahaemolyticus*. *Pharmac. Ther.* 19:123-146. Taniguchi, H., H. Hirano, S. Kubomura, K. Higashi, and Y. Mizuguchi. 1986. Comparison of the nucleotide sequences of the genes for the thermolabile hemolysin from *Vibrio parahaemolyticus*. *Microb. Pathogenesis.* 1:425-432.

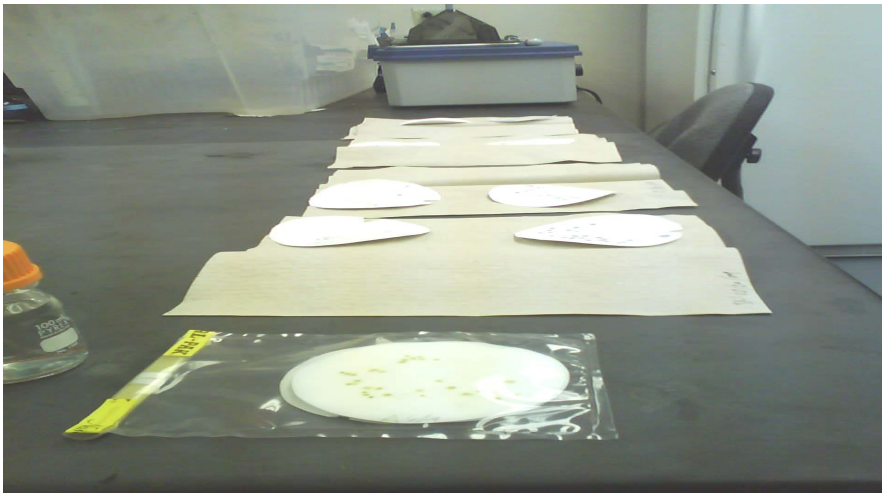
Vibrio vulnificus agar. Bacteriological Analytical Manual Online. Consultado el 20 de enero de 2009. Disponible en: <http://www.cfsan.fda.gov/~ebam/bam-9.html>.

8. ANEXOS

Anexo 1. Comparación de falsos positivos y positivos verdaderos mediante SID.



Anexo 2. Secado de muestras de SID y HADN.



Anexo 3. Solución lysis.

NaOH	20.00g
NaCl	87.00 g
Agua destilada	1000ml
*Ajustar el pH a 7.2-7.4 antes de ingresarlo a la autoclave. Almacenar a temperatura de cuarto (25°C)	

Anexo 4. Buffer acetato de amonio.

Acetato de amonio	154g
Agua destilada	1000ml
Almacenar a temperatura de cuarto (25°C)	

Anexo 5. Solución 20x SSC.

NaCl	175.40g
Citrato de Sodio	88.20 g
Agua destilada	1000ml
Disolver en 800ml de agua destilada y ajustar a pH 7 con NaOH (10N) Almacenar a temperatura de cuarto (25°C)	

Anexo 6. Solución 5x SSC.

20X SSC	25 ml
Agua destilada	75ml
Almacenar a temperatura de cuarto (25°C)	

Anexo 7. Solución 3x SSC.

20X SSC	150ml
Agua destilada	850ml
Almacenar a temperatura de cuarto (25°C)	

Anexo 8. Solución 1x SSC.

20X SSC	50ml
Agua destilada	950ml
Almacenar a temperatura de cuarto (25°C)	

Anexo 9. Buffer de hibridación.

Suero bovino albúmina (BSA)	0.50 g
Sulfato sódico dodecilico (SDS)	1.00g
Polivinilo pirrolidona (PVP-360)	0.50g
5x SSC	100ml
Almacenar a 4°C y calentarlo antes de usarlo a 54°C.	

Anexo 10. Solución 1XSSC/SDS.

1x SSC	1000ml
Sulfato sodico dodecilico (SDS)	10.00g
Almacenar a temperatura de cuarto (25°C)	

Anexo 11. Solución 3SSC/SDS.

3x SSC	1000ml
Sulfato sodico dodecilico (SDS)	10.00g
Almacenar a temperatura de cuarto (25°C)	

Anexo 12. Solución NBT/BCIP 3%.

Agua destilada	20ml
Tabletas NBT/BCIP	2
Almacenar a temperatura de cuarto (25°C)	

Anexo 13. Solución salina buffer fosfato (SSBF) 0.067M.

Fosfato Diácido de Potasio	23g
Fosfato Monoácido de Potasio	18g
Cloruro de Sodio	16g