

# Manual de Procedimientos

## Aislamiento, Identificación y Caracterización de *Vibrio parahaemolyticus*

2008

### AUTORES

Wally Silva San Cristóbal  
Andrea Olea  
Viviana Cachicas Cubillos  
Jorge Fernández Órdenes  
Daniel Ibáñez Cabrera  
Juan Carlos Hormazábal  
Julio García Moreno  
Aurora Maldonado Ballesteros

Departamento Laboratorios Biomédicos  
Sección Bacteriología (ISP)  
Departamento de Salud Ambiental  
Sección Microbiología de Alimentos  
División de Epidemiología (Minsal)  
Ministerio de Salud - Instituto de Salud Pública  
CHILE

## **INDICE:**

- I. Introducción**
- II. Vigilancia epidemiológica de *V. parahaemolyticus***
  - 1. Aspectos Generales**
  - 2. Aspectos Clínicos**
  - 3. Transmisión**
  - 4. Aspectos de la vigilancia**
  - 5. Alertar y reforzar a los equipos de epidemiología en caso de brote de *Vibrio parahaemolyticus***
  - 6. Instrucciones para el laboratorio**
- III. Microbiología Características generales**
  - 1. Taxonomía**
  - 2. Descripción del género**
  - 3. Características de la especie**
  - 4. Mecanismos de patogénesis**
  - 5. Tipificación**
  - 6. Hábitat natural**
  - 7. Importancia clínica**
  - 8. Mecanismo de transmisión**
  - 9. Medidas de prevención**
- IV. Identificación de *V. parahemolyticus* En Muestras Clínicas**
  - 1. Recolección, transporte y conservación de las muestras**
  - 2. Procedimiento de aislamiento**
  - 3. Identificación bacteriana**
  - 4. Sistemas de tipificación**
  - 5. Flujograma Identificación presuntiva de *V. parahemolyticus***
  - 6. Flujograma Identificación definitiva de *V. parahemolyticus***
  - 7. Control de calidad**
  - 8. Anexo Medios de cultivo y reactivos**
- V. Detección de genes de virulencia y Caracterización Molecular de *Vibrio parahaemolyticus* por PCR de muestras clínicas.**

## **VI. Identificación de *V.parahaemolyticus* en Muestras de Alimentos**

- 9. Transporte y preparación de la muestra**
- 10. Método semicuantitativo (NMP)**
- 11. Método cualitativo**
- 12. Caracterización bioquímica**
- 13. Caracterización molecular de especie y factores de virulencia**
- 14. Preparación de reacción de PCR**
- 15. Amplificación de secuencias blanco de *Vibrio parahaemolyticus***
- 16. Visualización de amplificadores de ADN e informe**
- 17. Anexo III. Términos, Materiales, equipos, medios de cultivo y Reactivos**

## **VII. Referencias**

### **I. INTRODUCCION**

En las últimas décadas han emergido otros *Vibrio* productores de enfermedades que, aunque generalmente de menor severidad que el cólera, tienen la capacidad de producir importantes brotes epidémicos, como *Vibrio parahaemolyticus* (1).

En el año 1953, investigadores japoneses encabezados por Fujino identificaron por primera vez al *Vibrio parahaemolyticus* como el causante de intoxicación alimentaria, esto ocurrió durante la aparición de un brote en la provincia de Isaka en la cual hubo 272 personas afectadas, con 20 fallecidos. El brote se asoció al consumo de sardinas crudas. (2)

Numerosos brotes de intoxicaciones alimentarias y casos esporádicos de *Vibrio parahaemolyticus* han sido reportados en EEUU, Europa y Asia, pero no fue hasta 1969 en que este microorganismo se consideró un problema de salud pública, principalmente en EEUU.

En Europa, el riesgo de infecciones por *V. parahaemolyticus* es considerado ser muy bajo y por esta razón el monitoreo de este microorganismo ha sido excluido de las más importantes redes de vigilancia de enfermedades infecciosas. Sin embargo, brotes esporádicos se han reportado en países como España (brote importante en 1989, 1999 y 2004) y Francia (brote grave en 1997). Recientemente, siete casos de infecciones a la piel causadas por *V. parahaemolyticus* han sido descritos en Dinamarca asociadas a baños en el Mar Báltico.

En Asia, el *Vibrio parahaemolyticus* es la principal causa de infecciones intestinales transmitidas por alimentos, casi siempre asociada con el consumo de pescado o mariscos crudos. En Japón el 50-70% de diarrea por ETA son debidas a *Vibrio parahaemolyticus*. Es también la especie de *Vibrio* más frecuentemente aislada de muestras clínicas en Estados Unidos y es primariamente asociada a diarrea aunque se ha aislado de sitios extraintestinales. El *Vibrio parahaemolyticus* causa gastroenteritis con náuseas, vómitos, calambres intestinales, fiebre baja y enfriamiento. La diarrea es generalmente acuosa, pero puede ser en raras ocasiones sanguinolenta. Las muertes son extremadamente raras pero pueden ocurrir en casos de deshidratación severa. Generalmente la rehidratación es el único tratamiento necesario, pero en casos severos el paciente requiere hospitalización. La terapia antimicrobiana podría ser beneficiosa.

En Chile, entre 1992 y 1997 se recibieron 30 cepas en el Instituto de Salud Pública de Chile, procedentes de laboratorios regionales para identificar o confirmar el diagnóstico de *Vibrio parahaemolyticus*. Sin embargo, durante el verano de 1998, en la ciudad de Antofagasta ocurrió un brote que aumentó a más de 300 cepas estudiadas. En el verano de 2004 se produjo otro brote al sur del país que afectó aproximadamente a 1500 personas.

Un clon pandémico de *Vibrio parahaemolyticus* serotipo O3:K6 emergió en todo el mundo en 1996. Las cepas de ese serotipo causaron una gran proporción de brotes en Taiwán desde 1996 a 1999, sugiriendo algo inusual en la ecología, epidemiología o virulencia del organismo. Este clon pandémico ha continuado expandiéndose a través de Asia a Estados Unidos, Canadá, Rusia, Chile y Mozambique. Recientemente, ha emergido un nuevo grupo pandémico que ha mostrado ser genéticamente muy relacionado a la cepa O3:K6. Este grupo incluye O4:K68, O1:k25, O1:k41 y O1: KUT (UT: no tipificable). (3)

## **II. Vigilancia epidemiológica de *Vibrio parahaemolyticus***

### **1. Aspectos Generales**

El *Vibrio parahaemolyticus* es una bacteria entérica, cuyo hábitat natural son las costas marinas, pues requiere sal para su desarrollo. En la época de calor se encuentra en las aguas litorales y mariscos bivalvos, mientras que en la época fría

se encuentra en los sedimentos marinos. Existen diferentes clones patógenos de este agente, algunos de los cuales tienen distribución mundial y otros son propios de algunas regiones específicas.

No existe claridad sobre la dosis infectante requerida para provocar un cuadro gastroentérico y en consecuencia, los brotes epidémicos tienen frecuencias y características que varían ampliamente según la región.

Desde el punto de vista de la salud pública, la presencia de *Vibrio parahaemolyticus* en los productos del mar ha sido identificada en todo el mundo como una importante causa de brotes de intoxicación alimentaria.

Los antecedentes disponibles en el país demuestran que se producen brotes epidémicos extensos en número de casos y dispersión regional, aun cuando existen bajas concentraciones de *Vibrio parahaemolyticus* en productos frescos recolectados en los puntos de extracción. Muestra de esto son los brotes ocurridos en los dos últimos años, (entre los meses de enero y fines de abril), donde en el año 2005 se notificaron 10.984 casos, en el año 2006, hubo 3.651 casos notificados. Durante el verano 2007-2008 se han notificado 3643 casos.

## **2. Aspectos Clínicos.**

Se produce un cuadro intestinal (enteritis) caracterizado por diarrea acuosa y cólicos abdominales, que puede acompañarse de náuseas, vómitos, fiebre y cefalea.

Generalmente es autolimitado y dura alrededor de 3 días (rango 1 a 7).

El período de incubación es de 12 a 24 hrs. La muerte por esta causa es muy rara, no supera el 0,5%. La medida principal es la hidratación para reponer los fluidos perdidos por la diarrea.

## **3. Transmisión.**

La transmisión se produce por la ingestión de mariscos crudos o mal cocidos, especialmente bivalvos (ostras y almejas principalmente). También se puede transmitir por contaminación cruzada con otros alimentos debido a la manipulación incorrecta de mariscos crudos. La congelación inapropiada de productos del mar contaminados favorece su proliferación y la posibilidad de infectar. No se transmite de persona a persona.

La principal medida de prevención es consumir los productos del mar bien cocidos y mantener una adecuada higiene en la preparación de éstos.

## **4. Aspectos de la vigilancia:**

### **4.1. Definición de caso y confirmación:**

**-Caso sospechoso:** Persona que presente un cuadro de gastroenteritis, caracterizado por diarrea, vómitos y dolor abdominal, con el antecedente de ingesta de mariscos hasta 96 horas antes del inicio de síntomas.

**-Caso confirmado:** Caso sospechoso confirmado por laboratorio o por nexo

epidemiológico.

#### 4.2. Tipo de vigilancia

**Vigilancia de morbilidad:** Considera los casos sospechosos y confirmados. Según el modelo de vigilancia actualmente en uso, todos los establecimientos de salud, tanto públicos como privados, deben contar con un delegado de epidemiología, quien debe informar al epidemiólogo de la SEREMI (oficina provincial o regional, según corresponda) la ocurrencia de enfermedades de notificación obligatoria (entre las que se encuentran los **brotes de enfermedades transmitidas por Alimentos – ETA**), según lo establecido en el Decreto 158 de octubre de 2004.

Si bien las infecciones aisladas por *Vibrio parahaemolyticus* no son de notificación obligatoria, sí lo son los brotes por esta causa. Estos se informarán a la SEREMI correspondiente, quien notificará al Departamento de Epidemiología del MINSAL el número de casos semanales.

**Vigilancia de laboratorio:** el Decreto 158, a su vez, establece una serie de agentes que deben ser vigilados a través del laboratorio, entre éstos, aquellos productores de gastroenteritis ( *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio cholerae* O1, E coli enterohemorrágica, etc.).

#### 4.3. Estudio de laboratorio:

**Para cada caso de gastroenteritis** en que se sospeche como agente causal *Vibrio parahaemolyticus*, se deberá tomar muestra de deposiciones para coprocultivo. Sin perjuicio de lo anterior, se mantiene vigente la Circular 4F/03 del 12 de enero de 1998, sobre la vigilancia de laboratorio de *Vibrio cholerae*: “se practicará estudio de *Vibrio cholerae* en todo coprocultivo de pacientes que presenten un cuadro de diarrea aguda con deshidratación leve, moderada o grave” y “...se realizará un muestreo de los coprocultivos que se realizan habitualmente a los cuadros diarreicos: 1 de cada 5 en los mayores de 18 años y 1 de cada 10 en los menores de 18 años”. Es importante destacar que frente a la sospecha de un caso de cólera, dicha notificación deberá ser realizada de forma inmediata y por la vía más expedita al Departamento de Epidemiología de la SEREMI de Salud según corresponda.

Los brotes de enfermedades transmitidas por Alimentos (ETA), son de notificación obligatoria, de acuerdo al Decreto 158, entre las que se consideran las gastroenteritis por *Vibrio parahaemolyticus*.

**En caso de un brote** en que se sospeche como agente causal *Vibrio parahaemolyticus*, se deberá tomar muestra al mayor número posible de afectados, con el fin de confirmar el agente causal para su posterior notificación.

**En caso de un brote extenso** se deberá tomar coprocultivo al menos a un 5% de las personas que cumplan con la definición de caso y que consulten en un establecimiento de urgencia:

- 1) Para el muestreo seleccione aquel establecimiento de urgencia donde se registre el mayor número de consultas por esta causa.
- 2) Para calcular el 5% de casos a los que se tomará muestra, se debe tomar el número de pacientes atendidos el día anterior (ejemplo, si el día anterior consultaron 100 personas por gastroenteritis que cumplen la definición de caso, entonces se deben tomar 5 coprocultivos).
- 3) Tomar la muestra a los primeros pacientes que consulten por dicha causa (en el ejemplo, a los 5 primeros).

**Caso hospitalizado:** se le deberá tomar coprocultivo para su confirmación y notificación.

#### 4.4. Notificación

**En caso de ocurrencia de un brote de gastroenteritis por *Vibrio parahaemolyticus***, el nivel local deberá informar **todos** los casos que cumplan con la definición antes mencionada a la SEREMI de Salud correspondiente y a su vez, el epidemiólogo de la SEREMI deberá notificar el número de casos semanales al Departamento de Epidemiología del MINSAL.

Finalmente, se remitirá el informe final de investigación de brote de ETA al Departamento de Estadísticas e Información en Salud (DEIS) del MINSAL, cumpliendo con las directrices contenidas en el Ordinario B 52/2161 del 15 de junio de 2005. Cada laboratorio del país, por su parte, debe notificar y enviar los hallazgos al Instituto de Salud Pública. El hecho de enviar una cepa se considera automáticamente notificada. En aquellos casos en que por algún motivo no pudiera enviarse la cepa a confirmación, debe necesariamente notificarse considerando para ello los mismos antecedentes solicitados en el formulario antes mencionado.

En el caso particular de encontrarse una región en brote epidémico extendido, debe mantenerse la notificación al ISP de los hallazgos pero no será necesario enviar al Instituto todas las cepas aisladas, bastará una muestra representativa de ellas y la decisión y frecuencia será informada por el propio Instituto.

#### 5. Alertar y reforzar a los equipos de epidemiología en caso de brote de *Vibrio parahaemolyticus*

Para llevar a cabo las actividades de vigilancia es necesario:

1. Alertar y mantener informada a la red de establecimientos sobre la situación epidemiológica.
2. En caso de brote, la SEREMI debe contar con un epidemiólogo regional encargado de la vigilancia de *Vibrio parahaemolyticus*, e informar su nombre y

teléfonos de contacto al Departamento de Epidemiología del MINSAL. Este será el encargado de consolidar, analizar y notificar al nivel central.

3. Establecer turnos que permitan mantener la vigilancia epidemiológica.

4. Disponer de teléfono celular habilitado, tanto para recibir notificaciones como para informarlas.

5. Acceso a correo electrónico e internet.

6. Disponibilidad de vehículo en caso necesario.

7. Integrar un equipo de trabajo en conjunto con acción sanitaria y el laboratorio.

Frente a todo brote de gastroenteritis por *Vibrio parahaemolyticus*, la SEREMI deberá analizar la información y elaborar un breve informe de brote con los datos más relevantes para enviar al Depto. de Epidemiología del MINSAL y a su red de vigilancia.

## 6. Instrucciones para el laboratorio

Si hay desarrollo de *Vibrio parahaemolyticus* a nivel regional, se deben enviar las cepas al Instituto de Salud Pública (ISP) para su confirmación (Decreto N° 158).

## III. Microbiología: Características generales

### 1. Taxonomía:

El género *Vibrio*, de la familia *Vibrionaceae*, posee más de 75 especies, y su taxonomía está en constante revisión gracias a la incorporación de técnicas de biología molecular, lo cual puede llevar eventualmente a reclasificar en nuevos géneros. Al menos 12 de ellas son patógenas para el hombre y varias son también patógenas para animales tanto vertebrados como invertebrados. (3)

Tabla 1. Asociación de *Vibrio* patógenos con síndromes clínicos

<i>Vibrio</i> sp	Diarrea	Sepsis	Infección de
------------------	---------	--------	--------------

			<b>heridas</b>
<i>V. cholerae</i> 01	+++	no	+
<i>V. cholerae</i> no 01	+++	+	++
<i>V. parahaemolyticus</i>	+++	+	++
<i>V. vulnificus</i>	++	+++	+++
<i>V. fluvialis</i>	++	+	+
<i>V. alginolyticus</i>	no	+	+++
<i>V. damsela</i>	no	no	++
<i>V. furnissii</i>	+	no	no
<i>V. hollisae</i>	++	no	no
<i>V. mimicus</i>	++	no	++
<i>V. metschnikovii</i>	+	+	no
<i>V. cincinnatiensis</i>	no	+	no

## 2. Descripción del género:

La mayoría de las especies de *Vibrio* tienen las siguientes características: bacilos gramnegativos, anaerobios facultativos, curvos, en forma de coma, miden entre 1.4 y 2.6  $\mu\text{m}$ . de largo, son catalasa y oxidasa positivos. Los *Vibrio* son móviles ya sea por un flagelo monotrico o multitricos monopolares cuando crecen en medio líquido. Todas las especies de *Vibrio* requieren de sodio para crecer, y las especies halofílicas requieren que el NaCl sea agregado al medio de cultivo, (si la fórmula comercial no lo incorpora). Las concentraciones mínimas de NaCl para su desarrollo óptimo varía entre 0.029 y 4.1 %. El *Vibrio* fermenta la glucosa pero rara vez produce gas, reduce nitrato a nitrito

## 3. Características de la especie

*Vibrio parahaemolyticus* es un bacilo gramnegativo, levemente curvo, aerobio facultativo, halofílico, oxidasa positiva, fermentador de glucosa, pero no de sacarosa, y ureasa variable. Requiere de medios selectivos para su desarrollo, con una concentración de NaCl de 1%. En medio TCBS las colonias se observan de color verde, a diferencia de *V.cholerae* que es de color amarillo. (3)

## 4. Mecanismos de patogénesis

La **toxina termoestable directa** (TDH) es el factor de virulencia más importante en el mecanismo de producción de la diarrea. La TDH es una proteína con actividad hemolítica sobre una variada gama de eritrocitos (fenómeno de Kanagawa); esta toxina posee varias propiedades entre las que destacan: citotoxicidad, aumento de la permeabilidad vascular y acumulación de líquido en el asa de ileon en el modelo experimental en conejos. (6) El mecanismo patogénico es la alteración del flujo iónico de las células intestinales, el que desencadena una diarrea secretora. La toxina TDH es codificada por un gran número de genes *tdh*, los que han sido secuenciados, evidenciándose una estrecha relación genética entre ellos (97% de similitud). Otro factor importante en

la producción de diarrea es la presencia de la **toxina hemolisina relacionada** (TRH), que es codificada por los genes *trh*, genéticamente relacionado a *tdh*, con 68,6% de similitud genética. Esta toxina fue inicialmente determinada en cepas provenientes de casos de gastroenteritis que no presentaban el fenómeno hemolítico de Kanagawa. Al igual que TDH, TRH produce acumulación de líquido en el modelo experimental de asa ileal y presenta actividad citotóxica en una variedad de tejidos. Además de los anteriores, *V. parahaemolyticus* requiere de otros factores para causar enfermedad, como una variedad de pili, hemaglutininas (hemaglutinina manosa sensitiva, *mannose sensitive hemagglutinin*-MSHA), factores de colonización y capacidad de invasión celular. En la población ambiental de *V. parahaemolyticus* se han estudiado las cepas para constatar si contienen el gen *tdh* y/o *trh*, pero han sido detectados con baja frecuencia (0.3 a 3%). (10) Estos resultados indican que las cepas ambientales, aisladas recientemente en Europa, las cuales pertenecen a las cepas patógenas de *Vibrio* deben ser consideradas como portadoras potenciales de genes de virulencia incluyendo aquellas encontradas en “cepas pandémicas”. Debido a su potencial patogénico, su presencia debe ser puesta bajo vigilancia ya que representan un riesgo para la salud humana.

## 5. Tipificación

Existen diversos métodos de tipificación para *V. parahaemolyticus*, tanto fenotípicos como moleculares. Dentro de los primeros destaca la serotipificación de lipopolisacáridos somáticos (O) y polisacáridos capsulares (K). El esquema antigénico de tipificación fue diseñado inicialmente por Sakazaki en Japón en 1963, y complementado posteriormente por otros investigadores. Actualmente existen *kits* comerciales que reconocen 13 grupos O y 71 tipos K. Durante una vigilancia en un hospital en Calcuta, India, se detectó un aumento repentino en la proporción de infecciones asociadas con *V. parahaemolyticus* serotipo O3:K6. La alta virulencia considerada para el 63% de todas las cepas de *V. parahaemolyticus* aisladas de pacientes en Calcuta entre Septiembre 1996 y Abril 1997 fue subsecuentemente obtenida en altas tasas de pacientes en otros países del sureste de Asia y de viajeros que llegaron a Japón desde esta región. El aumento en la incidencia de gastroenteritis causada por este serovar ha sido reportado en varios países desde 1996. Por lo tanto, como resultado de este aumento en la incidencia con idénticas características fenotípicas y genotípicas, esta emergencia de cepas de *V. parahaemolyticus* ha sido llamada una “cepa pandémica”. Corrientemente el llamado “grupo pandémico” incluye la cepa “pandémica” O3:K6 y las nuevas emergentes O4:K68, O1:K25, O1:K26, y O1:K cepas no tipificables.

En relación a los métodos moleculares, existe una gran variedad, destacando la determinación de genes *tdh* y *trh* por RPC, de gran utilidad para diferenciar cepas patógenas de las no patógenas, ya que ambos genes representan los mayores factores de virulencia de *V. parahaemolyticus*. Para la determinación de genotipos se puede realizar electroforesis de campo pulsado (PFGE), ribotipificación y

diversas técnicas basadas en amplificación. La PFGE representa la técnica de tipificación genética de elección por su poder discriminatorio, estandarización y capacidad de almacenamiento de los distintos patrones genéticos en bases de datos.

#### **6. Hábitat natural:**

Los vibrios son primariamente, residentes acuáticos y su distribución relativa en el ambiente es dependiente de la temperatura, concentración de sodio, nutrientes en la columna de agua y la presencia de variadas especies animales vertebrados e invertebrados que habitan en el ecosistema. Los vibrios que requieren pequeñas cantidades de sodio para crecer, como *V.cholerae* y *V.mimicus*, se pueden encontrar en riveras de agua fresca así como en estuarios y ambientes marinos. En el ambiente marino y estuarios, los vibrios son comúnmente aislados del sedimento, columna de agua, plancton, bivalvos varios (mejillones, almejas y ostras), cangrejos, camarones y gambas. En climas de temperatura media, el aumento mayor de *Vibrio* se produce en los meses calurosos del año.

#### **7. Importancia clínica:**

Actualmente, los integrantes del género *Vibrio* son aislados desde una amplia variedad de enfermedades humanas, intestinales y extraintestinales. Éstas incluyen diarrea, infecciones a la piel localizadas (celulitis) e invasivas (fasciitis necrotizante), infecciones oculares y óticas y septicemias. *V.parahaemolyticus*, es la principal causa de infección por alimentos en Japón y Sudeste asiático y es la más importante de infecciones intestinales debida a *Vibrio* en Estados Unidos.

#### **8. Mecanismo de transmisión:**

Principalmente por la ingestión de mariscos crudos o mal cocidos. También se puede transmitir por la contaminación cruzada por la manipulación de mariscos u otros alimentos crudos o enjuagar éstos con agua contaminada. Existe mayor probabilidad de adquirir la infección en los meses más cálidos del año. El transporte o almacenamiento de productos del mar sin las condiciones adecuadas de refrigeración favorecen su proliferación y la posibilidad de infectar. Se considera que la enfermedad puede producir con una ingesta de 1.000.000 de vibriones.

Es baja la probabilidad de que se produzca infección por la exposición de heridas o mucosas al agua de mar contaminada (cuando ésta es tibia).

No se transmite de persona a persona. (4)

#### **9. Medidas de prevención:**

La principal medida de prevención es consumir los productos del mar bien cocidos. Se considera que el *Vibrio parahaemolyticus* muere al alcanzar una temperatura de cocción de 70° C por 15 minutos. También se señala en la literatura médica evitar el contacto de heridas con el agua del mar a pesar de lo plantado en el punto anterior.

## **IV. IDENTIFICACIÓN DE *V. parahaemolyticus* EN MUESTRAS CLÍNICAS**

### **1. Recolección, transporte y conservación de las muestras**

Así como se procede con todas las muestras de deposición, éstas deben ser recolectadas en la fase aguda de la enfermedad, antes del inicio de tratamiento. También se puede tomar la muestra con tórula rectal aunque no se recomienda para los casos en que el número de microorganismos presentes pudiera ser bajo, como ocurre en casos de contacto conocidos o en pacientes convalecientes. Los vibrios son particularmente sensibles a la desecación, así es que cualquier muestra que no pueda ser inoculada en los medios de cultivo antes de 2 a 4 horas, deben ser colocados en un medio de transporte como Cary-Blair (los vibrios se mantienen viables hasta por 4 semanas). Las muestras recolectadas en estudio de campo podrían ser transportadas en caldos enriquecidos como agua peptonada alcalina o telurito-taurocolate-peptona, ambos deben ser inoculados en placas entre 12 a 24 horas.

Métodos especiales para la recolección y procesamiento de muestras de vibrio extraintestinales (sangre, heridas, etc.) no es requerido; los vibrios son aislados puros desde estos sitios, y la concentración de sal en el medio primario, es generalmente suficiente para su recuperación.

#### **Materiales:**

- Recipiente tapa rosca de boca ancha para recolección de muestras
- Tórulas
- Medio de transporte Cary-Blair
- Agua peptonada alcalina
- Marcadores de vidrio
- Guantes de látex

### **2. Procedimiento de aislamiento**

#### **Siembra e incubación de muestras o cepas**

- a. La búsqueda activa se realiza sembrando en placa de agar sangre o agar soya y agar TCBS, debido a que generalmente el laboratorio ha sido alertado por la historia clínica del paciente. La siembra en los medios sólidos se realiza con la técnica adecuada para obtener colonias aisladas.
- b. Incubar 18 hrs. a 35°C, en atmósfera normal.
- c. Si no se obtiene desarrollo, agregar caldo NaCl al 1% al tubo original, incubar 2-3 hrs. a 35°C y resembrar en placas. Incubar hasta 48 hrs.
- d. Si no se obtiene desarrollo la cepa se informará como “no viable”

- e. Si hay desarrollo en agar TCBS, anotar reacción de sacarosa:  
 colonias amarillas = sacarosa positiva  
 colonias verdes = sacarosa negativa.

La inclusión de sacarosa en el agar TCBS, ayuda a diferenciar preliminarmente las especies de *Vibrio*, ya que se producen colonias amarillas en *V.cholerae*, *V.fluvialis* y *V.alginolyticus*, mientras que *V.paraahaemolyticus*, *V.mimicus* y la mayoría de los *V.vulnificus*, producen colonias verdes indicando que no han fermentado sacarosa.

Se debe hacer notar que la prueba de oxidasa no debe realizarse a partir de un cultivo en agar TCBS, esta prueba se hará de agar sangre o agar soya.

Es común que los cultivos puros de *Vibrio* en cualquier medio, tengan una morfología múltiple de las colonias, las que pueden ser húmedas, convexas a planas, extendidas a delimitadas, ocasionalmente rugosas.

### 3. Identificación bacteriana

Desde el cultivo puro de la placa de agar sangre observar y anotar la hemólisis, hacer prueba de oxidasa y sembrar batería de identificación:

TSI-LIA-Ornitina-Arginina, arabinosa, maltosa, NaCl 0%, NaCl 1%.

Todos los medios se incuban a 35°C por 18 hrs., en atmósfera normal.

Las pruebas negativas se dejan en estufa por 18 hrs. adicionales.

Anotar los resultados de la lectura de pruebas bioquímicas e interpretar utilizando las tablas de identificación de vibrios. (Tabla N° 1, 2 y 3)

Conservar la cepa en caldo glicerol al 20% y congelar a -70°C.

**Tabla 1. Propiedades del género *Vibrio* y diferenciación de otros géneros fenotípicamente similares**

Reacción o propiedad de:				
Prueba	<i>Vibrio</i>	<i>Aeromonas</i>	<i>Plesiomonas</i>	<i>Enterobacteriaceae</i>
Oxidasa	+	+	+	-
Requerimiento Na <sup>+</sup>	+	-	-	-
Fermenta Manitol	+	+	-	+
Crece en TCBS	+	+	-	-

**Tabla 2. Pruebas claves diferenciales entre los grupos 1, 5 y 6**

Prueba	Grupo 1		Grupo 5		Grupo 6			
	<i>V.cho lerae</i>	<i>V.mimi cus</i>	<i>V.dam sella</i>	<i>V.flu vialis</i>	<i>V.algino lyticus</i>	<i>V.parahae molyticus</i>	<i>V.vul nificus</i>	<i>V.har veyi</i>
Crece en caldo con:								
Sin NaCl	+	+	-	-	-	-	-	-
1% NaCl	+	+	+	+	+	+	+	+
Arginina Moeller 1%NaCl	0	0	95	93	0	0	0	0
Lisina Moeller 1%NaCl	99	100	50	0	99	100	99	100
Ornitina Moeller 1%NaCl	99	99	0	0	50	95	55	0

**Tabla 3. Bioquímica diferencial para separar especies entre grupos 1, 5 y 6**

% de positividad para <sup>a</sup>								
Prueba	Grupo 1		Grupo 5		Grupo 6			
	<i>V.cho lerae</i>	<i>V.mimi cus</i>	<i>V.da m sella</i>	<i>V.flu vialis</i>	<i>V.algino lyticus</i>	<i>V.parahae molyticus</i>	<i>V.vul nificus</i>	<i>V.har veyi</i>
Voges-proskauer 1% NaCl	75	9	95	0	95	0	0	50
Movilidad	99	98	25	80	99	99	99	0
Ácido de:								
Sacarosa	100	0	5	100	99	1	15	50
D-Manitol	99	99	0	97	100	100	45	50
Celobiosa	8	0	0	30	3	5	99	50
Salicina	1	0	0	0	4	1	95	0

<sup>a</sup>: El número indica el porcentaje de cepas que son positivas después de 48 h. de incubación a 36°C.

**Tabla 4. Pruebas bioquímicas**

% de positividad para <sup>a</sup>								
Prueba	Grupo 1		Grupo 5		Grupo 6			
	<i>V. cholerae</i>	<i>V. mimicus</i>	<i>V. damsella</i>	<i>V. fluvialis</i>	<i>V. alginolyticus</i>	<i>V. parahaemolyticus</i>	<i>V. vulnificus</i>	<i>V. Harveyi</i>
Indol (HIB**, 1% NaCl*)	99	98	0	13	85	98	97	100
Citrato Simmons	97	99	0	93	1	3	75	0
Urea	0	1	0	0	0	15	1	0
Ácido de Glucosa	100	100	100	100	100	100	100	50
Gas de Glucosa	0	0	0	0	0	0	0	0
ONPG	94	90	0	40	0	5	75	0
Producción ácido de:								
L-Arabinosa*	0	1	0	93	1	80	0	0
Lactosa*	7	21	0	3	0	1	85	0
Sacarosa*	100	0	5	100	99	1	15	50
Crecimiento en caldo con:								
NaCl* 0%	100	100	0	0	0	0	0	0
NaCl* 6%	53	49	95	96	100	99	65	100
NaCl* 8%	1	2	0	71	94	80	0	2
NaCl* 10%	0	0	0	4	69	2	0	2

\* Recomendado para la identificación de rutina de *Vibrio*, al medio estándar se le agrega 1% de NaCl \*\*HIB: Caldo infuso-corazón

La mayoría de las cepas clínicas de origen humano de *V. parahaemolyticus*, producen una hemolisina directa termolabile (TDH) codificado por dos genes, *tdh* y *tdh2x*. Estas toxinas son raramente encontradas en cepas ambientales de *V. parahaemolyticus*. Esta hemolisina puede ser detectada observando la hemólisis en los eritrocitos del agar Watgatsuma, test difícil de realizar. (Test de Kanagawa: placas de agar con eritrocitos O humanos con una incubación a 35 °C durante 48-72 h.)

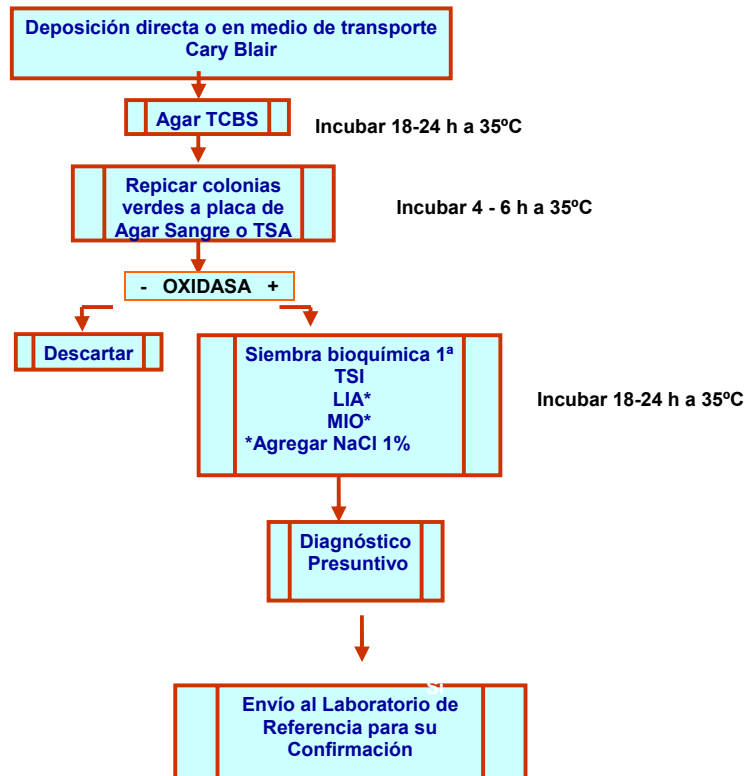
Al igual que la toxina del cólera, TDH puede ser detectada por una prueba de látex comercial (Oxoid), pero no hay productos comerciales que detecten la segunda hemolisina observada en las cepas de *V. parahaemolyticus*. Se han desarrollado ensayos por PCR para TDH y TRH pero no se encuentran comercialmente disponibles.

#### **4. Sistemas de tipificación**

Los esquemas de tipificación forman dos grupos, uno tradicional y otro molecular. Entre las técnicas tradicionales; la serotipificación es la más utilizada, aunque los esquemas descritos son para *V.cholerae*, *V.parahaemolyticus* y *V.vulnificus* y comercialmente disponibles, solo para los dos primeros mencionados.

Un gran número de métodos de tipificación molecular ha sido exitosamente usado para detectar la migración clonal de *V.parahaemolyticus*. Sin embargo, estas son herramientas epidemiológicas o taxonómicas que no se encuentran comercialmente ni fáciles de adaptar en un laboratorio clínico. Entre ellos se encuentra la detección por PCR y la electroforesis de campo pulsado (PFGE), que ha sido utilizada extensivamente para *V.cholerae* y *V.parahaemolyticus*.

## 5. Flujograma para la Identificación presuntiva de *V. parahaemolyticus*



Lectura de pruebas presuntivas:

Agar TCBS: colonias sacarosa negativa (verdes)

Oxidasa: positiva

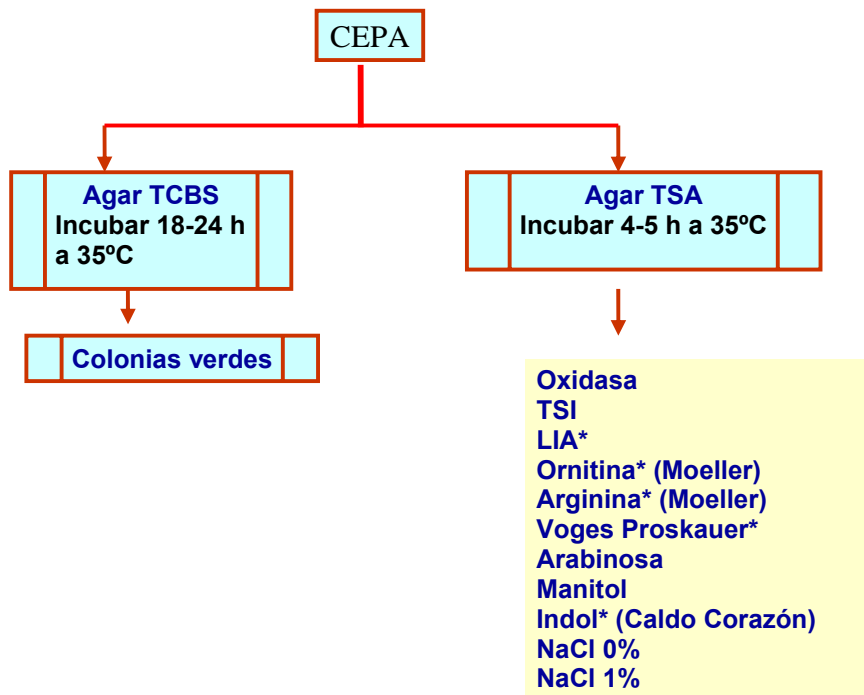
TSI: K/A-,-

LIA: K/K-,-

MIO: +,+,+ o +,-,+ \*

\* El MIO no es muy sensible para la prueba de indol de Vibrio

## 6. Flujograma para la Identificación definitiva de *V. parahaemolyticus*



\*Estos medios deben tener NaCl al 1%.

\*\* Hacer prueba de Indol en este tubo.

Lectura de pruebas de confirmación:

TSI	K/A-,-
LIA	K/K-,-
Ornitina*	+
Arginina*	-
Voges Proskauer*	-
Arabinosa	+
Manitol	+
Indol	+
NaCl 0%	no crece
NaCl 1%	crece

## 7. Control de Calidad

El control de calidad en el laboratorio, comprende el permanente monitoreo de medios de cultivo, reactivos, equipos, procedimientos y personal. Todo en su conjunto nos permite asegurar una correcta ejecución del aislamiento, identificación y caracterización de los agentes patógenos en una muestra clínica y realizar la susceptibilidad a agentes antimicrobianos.

La realización de procedimientos de alta calidad dependen de factores tangibles como por ejemplo los reactivos para tinción de Gram y de factores intangibles, quizás más importantes como son las habilidades cognitivas. En el control de calidad es fundamental el personal que analiza en forma crítica sus resultados y aplica estándares que permiten cuestionar resultados inusuales o aislamientos infrecuentes.

### 7.1 Interpretación y control de calidad de Medios de cultivo

Medio	Cepa control	Reacción esperada	Incubación
TCBC	<i>V.cholelae</i> <i>V.parahaemolyticus</i> <i>E.coli</i>	Colonia amarilla (sacarosa +) Colonia verde (sacarosa -) Sin desarrollo	Atmósfera normal 18-24 hrs. 35°C
Agar sangre	<i>S.pyogenes</i> <i>S.pneumoniae</i> <i>Vibrio spp.</i>	Crece ( $\beta$ hemólisis) Crece ( $\alpha$ hemólisis) Crece	Atmósfera normal 18-24 hrs. 35°C
Agar TSA	<i>S.aureus</i> <i>N.gonorrhoeae</i> <i>Vibrio</i>	Crece No crece Crece	Atmósfera normal 18-24 hrs. 35°C
Agua peptonada alcalina	<i>V.parahaemolyticus</i> <i>E.coli</i>	Crece al subcultivo Inhibición parcial en subcultivo	Atmósfera normal 4-6 hrs. 35°C

## 7.2 Interpretación y control de calidad de pruebas bioquímicas

Prueba	Cepa control	Reacción esperada
TSI	<i>E.coli</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Tendido: acidifica (amarillo)</li> <li>- Columna: acidifica (amarillo)</li> <li>- Gas : positivo (ruptura del agar)</li> <li>- H2S : negativo</li> </ul>
	<i>Proteus vulgaris</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Tendido: acidifica (amarillo)</li> <li>- Columna: acidifica (amarillo)</li> <li>- Gas : positivo (ruptura del agar)</li> <li>- H2S : positivo (ennegrecimiento del agar)</li> </ul>
	<i>Shigella flexneri</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Tendido: alcaliniza (rojo)</li> <li>- Columna: acidifica (amarillo)</li> <li>- Gas : negativo</li> <li>- H2S : negativo</li> </ul>
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Tendido: alcaliniza (rojo)</li> <li>- Columna: alcaliniza (rojo)</li> <li>- Gas : negativo</li> <li>- H2S : negativo</li> </ul>
LIA	<i>E.coli</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Tendido: alcaliniza(púrpura)</li> <li>- Columna: decarboxila (púrpura)</li> <li>- Gas : positivo (ruptura del agar )</li> <li>- H2S : negativo</li> </ul>
	<i>Proteus vulgaris</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Tendido: deamina(rojo)</li> <li>- Columna: acidifica (amarillo)</li> <li>- Gas : positivo (ruptura del agar)</li> <li>- H2S : positivo (ennegrecimiento del agar)</li> </ul>
	<i>Shigella flexneri</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Tendido: alcaliniza (rojo)</li> <li>- Columna: acidifica (amarillo)</li> <li>- Gas : negativo</li> <li>- H2S : negativo</li> </ul>

<b>MIO</b>	<p><i>E.coli</i></p> <p><i>Klebsiella pneumoniae</i></p>	<p>- Movilidad: positiva (columna turbia)</p> <p>- Indol: positivo (anillo rojo superior)</p> <p>- Ornitina : positiva (columna púrpura)</p> <p>- Movilidad: negativa (desarrollo en la picada)</p> <p>- Indol: negativo (anillo amarillo superficie)</p> <p>- Ornitina : negativa (columna amarilla)</p>
<b>Oxidasa</b>	<p><i>Pseudomonas aeruginosa</i></p> <p><i>E.coli</i></p>	<p>- Reacción positiva: color azul violeta</p> <p>- Reacción negativa: no vira</p>
<b>Decarboxilasa base Moeller (Arginina-Ornitina)</b>	<p><i>Salmonella Typhimurium</i></p> <p><i>Proteus vulgaris</i></p>	<p>Decarboxilación positiva de arginina y ornitina: color púrpura</p> <p>Decarboxilación negativa de arginina y ornitina: color amarillo</p>
<b>Voges Proskauer</b>	<p><i>Klebsiella pneumoniae</i></p> <p><i>E.coli</i></p>	<p>Reacción positiva: color rojo</p> <p>Reacción negativa: no vira</p>

<b>Fermentación azúcares Arabinosa</b>	<i>E.coli</i>	<b>Acidifica</b>
	<i>Enterococcus faecalis</i>	<b>No vira</b>
<b>Manitol</b>	<i>E.coli</i>	<b>Acidifica</b>
	<i>Enterococcus faecalis</i>	<b>Acidifica</b>
<b>Na Cl 0%</b>	<i>Vibrio cholerae</i>	<b>Crece</b>
	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	<b>No crece</b>

## 8. Anexo. Medios de cultivo y reactivos

### 1. Agua Peptonada Alcalina

La viabilidad de *Vibrio* spp. se mantiene intacta a pH alcalino y el uso de agua peptonada alcalina ha sido recomendado para incrementar la recuperación de *Vibrio* spp. de materia fecal y de otras muestras.

El medio contiene peptona de carne, cloruro de sodio y el pH final es de  $8.6 \pm 0.2$  a 25°C. Se incuba 6 a 8 horas y se siembra en los medios de cultivo.

Peptona (Difco) 10g  
Na Cl 10g  
Agua 1000ml

Ajustar pH a 8.6, distribuir 6-8 ml por tubo y esterilizar a 121°C por 15 minutos

### 2. Agar Trypticase soya (TSA)

Es un medio utilizado para propósitos generales que favorece el desarrollo y el aislamiento de una gran variedad de microorganismos aerobios, anaerobios facultativos y estrictos. Se prepara según las recomendaciones del fabricante. Se autoclave 15 minutos a 121° C

### 3. Agar TCBS

Es un medio selectivo para el aislamiento de *Vibrio cholerae*.

El medio contiene: tiosulfato, citrato, sales biliares y sacarosa y está disponible comercialmente.

Se prepara según las indicaciones del fabricante. No se debe autoclavar.  
Por su doble indicador (azul de timol y azul de brotímol) vira a amarillo con pequeñas variaciones de pH por la acidificación de la sacarosa.

#### 4. Agar conservación de cepas

Extracto levadura	3g
Peptona	10g
NaCl	20g
Agar	10g
Agua	1000ml

Ajustar pH a 7.0 Distribuir 3 ml en tubo de Khan. Esterilizar a 121°C por 15 min.  
Sembrar dos picadas, poner tapón de goma, guardar a temperatura ambiente y en oscuridad.

#### 5. Caldo Tolerancia Na Cl 0-1-6%

Triptona	1g
Agua	100ml

Agregar 1- 6 g de NaCl según la concentración que se quiera preparar.  
Ajustar pH a 7.2 y esterilizar a 121°C por 15 minutos.

#### 6. Caldo Base Fermentación

Peptona	10g
Extracto carne	3g
NaCl	10g
Bromocresol púrpura solución al 1.6% en etanol	2.5ml
Agua	1000ml

Ajustar pH a 7.0-7.2, distribuir 4 ml por tubo y esterilizar a 121°C por 15 minutos.

#### 7. Preparación de Azúcares

Preparar solución de azúcar al 20% en agua destilada  
Filtrar por filtro 0,45 micrones.

Guardar en refrigeración

Agregar al caldo base de fermentación la cantidad suficiente para una concentración final de 1%

#### 8. Prueba de la Oxidasa

##### Principio

El objetivo de esta prueba es buscar la presencia de la enzima *Citocromo C oxidasa* que es una enzima de la cadena respiratoria perteneciente al grupo de las hierro porfirinas. Se encuentra presente en los géneros *Pseudomonas*, *Vibrio*, *Aeromonas*, etc., pero no en los miembros de la familia *Enterobacteriaceae*.

##### Materiales

Se detecta utilizando el *tetrametil-p-fenilendiamina* (reactivo de oxidasa) que contiene este compuesto que va a ser oxidado por la enzima. Se prepara una solución al 1% en agua destilada.

También existen discos comerciales.

Son estables por un año en oscuridad a 4°C.

### **Procedimiento**

A. En un tubo de Khan preparar una suspensión espesa del microorganismo en estudio en aproximadamente 0.2 ml de agua destilada, colocar un disco del reactivo.

B. Si hay escaso número de colonias sospechosas, se puede humedecer el disco con una gota de agua y luego colocar sobre el mismo material de una de las colonias en estudio.

C. En un trozo de papel filtro se impregna el reactivo de oxidasa y a partir de la placa de agar sangre o TSA se toma una asada de la bacteria problema y se pone sobre el papel filtro. Tras unos 30 segundos, se observa si ha ocurrido algún cambio. Se considera positiva esta prueba cuando toma un color púrpura la muestra.

## **9. Agar TSI (Hierro Tres Azucares)**

### **I. Principio**

El medio fue diseñado para determinar la habilidad de las bacterias de fermentar hidratos de carbono y producir sulfuro de hidrógeno (H<sub>2</sub>S). El medio contiene 1 parte (0.1%) de glucosa y 10 partes (1.0%) de lactosa y sacarosa. El indicador de pH es el rojo fenol y el sulfato ferroso pone en evidencia la formación de H<sub>2</sub>S. Si el microorganismo fermenta glucosa, tanto la punción como la estría aparecerán de color amarillo. Si el organismo fermenta lactosa y/o sacarosa, la estría permanecerá ácida (amarilla). Si no fermenta lactosa, la estría se vuelve alcalina (roja). Los organismos que no fermentan glucosa no producen cambios en el pH del medio o producirán productos alcalinos y el medio TSI permanecerá rojo. La producción de H<sub>2</sub>S se manifiesta por un ennegrecimiento del medio.

### **Materiales**

El medio está disponible comercialmente. Disolver en agua destilada y dispensar volúmenes de 3.0 ml en tubos con tapa a rosca de 12 x 120; autoclavar a 121°C por 15 minutos y enfriar inclinado dejando un fondo de 5 a 10 mm. El sustrato es estable por 3 meses. Rotular indicando fecha de preparación y de expiración.

Conservar refrigerado.

### **Procedimiento**

A. Con un asa estéril tomar la cepa en estudio.

B. Punzar el fondo en el centro.

C. Retirar el asa y estriar sobre la superficie del agar.

D. Dejar la tapa floja para permitir intercambio de aire.

E. Incubar a 35°C por 18 a 24 horas.

### **Resultados**

Estría ácida/fondo ácido (amarillo/amarillo): fermentación de glucosa, sacarosa y/o lactosa (*E. coli*).

Estría alcalina/fondo ácido (rojo/amarillo): fermentación de glucosa solamente (*Shigella* spp.).

Estría alcalina/fondo alcalino (rojo/rojo): no fermentador (*Pseudomonas aeruginosa*).

Precipitado negro en el fondo: producción de H<sub>2</sub>S (*Salmonella* spp).

Burbujas o roturas: producción de gas (*E. coli*, *Salmonella* spp.).

### **Consideraciones**

El test se debe leer entre las 18 y 24 horas. Lecturas tempranas pueden dar falsos resultados ácido/ácido, mientras que lecturas tardías pueden dar falsos resultados alcalino/alcalino.

## **10. Agar LIA (Lisina Hierro)**

### **Principio**

La decarboxilación de la lisina a cadaverina produce una alcalinización del medio y un viraje al violeta del indicador púrpura de bromocresol. Como la reacción tiene lugar en medio ácido, es necesaria la fermentación previa de la glucosa.

Los microorganismos que no decarboxilan lisina, pero fermentan la glucosa producen un viraje al amarillo en todo el medio.

La formación de H<sub>2</sub>S produce una coloración negra debido al sulfuro de hierro producido. Las bacterias del grupo *Proteus-Providencia*, con excepción de *Morganella morganii*, desaminan la lisina a ácido α-cetocarbónico que forma compuestos pardo-rojizos en el medio de cultivo con la sal de hierro y en aerobiosis.

### **Materiales**

El medio está disponible comercialmente. Disolver el polvo en agua destilada y dispensar en volúmenes de 3 ml en tubos con tapa a rosca de 12 x 120. Esterilizar a 121°C por 15 minutos. Enfriar de manera de tener estría y fondo. Conservar refrigerado.

### **Procedimiento**

A) Inocular punzando el fondo y luego estriar la superficie del agar.

Incubar a 35°C por 18 a 24 horas en atmósfera normal.

### **Resultados**

Los microorganismos que decarboxilan la lisina producen un viraje al violeta.

Los microorganismos que no decarboxilan la lisina y fermentan glucosa producen un viraje al amarillo.

La formación de H<sub>2</sub>S se indica por la aparición de una coloración negra.

## 11. Prueba del Indol

### Principio

El indol es uno de los productos del metabolismo del aminoácido triptofano. Con un medio rico en triptofano, el indol se puede detectar por su habilidad para combinarse con ciertos aldehídos para formar un compuesto coloreado. El ensayo constituye un método rápido para detectar organismos productores de indol. Como indicador de la presencia del aldehído se usa el reactivo de Erlich.

Es especialmente útil en la identificación preliminar de *Escherichia coli*, y para diferenciar *Edwardsiella* (+) de *Salmonella* (-).

### Materiales

A. Caldo triptofano

- Peptona 20.0 gr
- Cloruro de sodio 5.0 gr
- Agua destilada 1000 ml

A este caldo se le incorpora triptofano en una concentración del 1%. El medio se esteriliza a 121°C durante 15 minutos. Dejar enfriar antes de su empleo y guardar a 4-8°C para su conservación.

B. Reactivo de Erlich

- p-dimetilaminobenzaldehído 1.0 g
- alcohol etílico, 95% 95.0 ml
- ácido clorhídrico, concentrado 20.0 ml

Se disuelve el aldehído en el alcohol (puede requerir un calentamiento suave), luego se agrega lentamente el ácido. El reactivo de color amarillo es estable por un año. Identificar el reactivo con una etiqueta indicando la fecha de expiración y guardar refrigerado en botellas color caramelo.

### Procedimiento

- 1) Con un asa tomar material de una colonia aislada e inocular el caldo que contiene triptofano.
- 2) Incubar a 35°C por 18 a 24 horas.
- 3) Transferir 2 ml de la suspensión de caldo a un segundo tubo.
- 4) Agregar 5 gotas del reactivo de Erlich por la pared del tubo.
- 5) En la reacción positiva se observa un anillo de color rojo, cuando la prueba es negativa, se observa un anillo amarillo.

## **Resultados**

Ensayo positivo: desarrollo de un color rojo en la interfase del reactivo y el caldo, segundos después de agregar el reactivo.

Ensayo negativo: no hay cambio de color o hay un color amarillo en la interfase.

## **12. Test de Decarboxilasa-Dihidrolasa**

### **Principio**

La decarboxilación es un proceso en el cual las decarboxilasas atacan el extremo carboxilo de los aminoácidos, formando la correspondiente amina. Los tres aminoácidos que se ensayan en la identificación de Enterobacterias son arginina, lisina y ornitina. La decarboxilación de lisina y ornitina da cadaverina y putrescina (diaminas), mientras que arginina da citrulina por acción de una dihidrolasa. El test se debe acompañar con un tubo control que contiene el medio base sin aminoácido. Como la decarboxilación es una reacción anaeróbica, se debe cubrir el medio con una capa de aceite mineral estéril. El proceso ocurre en dos etapas: por fermentación de la glucosa se produce una acidificación del medio ( $\text{pH} < 6.0$ ), apareciendo color amarillo. La acidificación es necesaria para que ocurra la decarboxilación. Este último proceso da lugar a la formación de las aminas que elevan el pH con el consiguiente viraje del indicador al color violeta.

### **Materiales**

El medio basal más comúnmente utilizado es el medio de decarboxilasa de Moeller. El medio está disponible comercialmente. Las concentraciones de aminoácidos a usar son: 1% para la forma L y 2% para la forma DL. Fraccionar el medio base en 4 porciones de 250 ml cada una. Agregar los aminoácidos a 3 porciones del medio. El pH se debe ajustar después de agregar el aminoácido y antes de esterilizar a 6 – 6,2. Fraccionar en volúmenes de 3 a 4 ml en tubos con tapa a rosca y autoclavar a 121°C por 10 minutos. El sustrato es estable por 3 meses. Rotular los tubos y conservar refrigerado.

### **Procedimiento**

- A. Tomar la cepa en estudio con un asa e inocular el tubo control y los tubos con los aminoácidos.
- B. Cubrir todos los tubos con una capa de vaselina estéril.
- C. Incubar a 35°C en atmósfera normal.
- D. Efectuar las lecturas día por día hasta 4 días, registrando los resultados día por día.

### **Resultados**

Ensayo positivo: medio turbio y púrpura a púrpura amarillento.

Ensayo negativo: color amarillo

Tubo control: permanece con su color original o se vuelve amarillo si el organismo es un fermentador de glucosa (se debe ver turbidez en el tubo).

### **13. Prueba de Voges-Proskauer**

#### **Principio**

El piruvato es un intermediario en el metabolismo de la glucosa. A partir del ácido pirúvico un microorganismo puede seguir varios caminos. Algunos lo rompen para formar como productos finales ácidos láctico, acético o fórmico. Otros metabolizan el piruvato por el camino del butilenglicol para formar como productos finales acetoina (acetilmetilcarbinol) y 2,3-butanodiol (diacetilo). El ensayo de Voges-Proskauer (VP) detecta estos productos metabólicos. En presencia de oxígeno e KOH, la acetoina se oxida a diacetilo, que da un complejo rojo. La sensibilidad del ensayo se aumenta por el agregado de  $\alpha$ -naftol antes del agregado de KOH.

#### **Materiales**

A. Preparación del medio

El medio está disponible comercialmente. Para la preparación del caldo RMVP, ver el procedimiento indicado para el test de rojo de metilo.

B. Preparación de solución de  $\alpha$ -naftol

Disolver 5.0 gr de  $\alpha$ -naftol en una pequeña cantidad de alcohol absoluto y luego llevar el volumen a 100 ml. La solución debe ser incolora. El reactivo es estable por 1 año. Rotular indicando fecha de preparación y de expiración. Guardar en heladera en frascos color caramelo.

C. Preparación de la solución de KOH

Disolver los pellets de KOH en agua destilada y luego llevar el volumen final a 100 ml (trabajar sobre baño de agua fría para evitar recalentamiento). El reactivo es estable por 1 año. Rotular indicando fecha de preparación y de expiración.

#### **Procedimiento**

A. Tomar una asada de la cepa en estudio e inocular un tubo de caldo RM/VP.

B. Incubar a 35°C por un mínimo de 48 horas.

C. Transferir 2.5 ml de la suspensión a otro tubo.

D. Agregar 0.6 ml del reactivo de  $\alpha$ -naftol.

E. Agregar 0.2 ml del reactivo de KOH.

F. Agitar el tubo y dejar descansar 10 a 15 minutos.

G. Observar la formación de un color rosado a rojo.

#### **Resultados**

Ensayo positivo: desarrollo de color rojo dentro de los 15 minutos.

Ensayo negativo: no hay desarrollo de color.

## 14. Crecimiento en NaCl

### Principio

Es una prueba que se usa para diferenciar distintas especies del género *Vibrio*.

### Materiales

Peptona 20g

Agua destilada: Completar a 100ml

Ajustar el pH a 8-8,2 con solución de NaOH al 30%

Agregar NaCl al 1, 6, 8 y 10% y fraccionar 3 ml en tubos de 13x100, con tapa a rosca,

esterilizar 15 minutos a 121°C.

### Procedimiento

A) Hacer una suspensión de la bacteria en un tubo de agua peptona sin NaCl.

B) Con esa suspensión, se siembran los tubos con 0,1, 6, 8, 10% de NaCl

### Resultados

Ensayo positivo: desarrollo de turbidez por crecimiento

Ensayo negativo: ausencia de turbidez por falta de crecimiento

### Control

*Vibrio cholerae* al 0% y 1% de NaCl +

*Vibrio cholerae* al 8 y 10% de NaCl –

## V. Detección de genes de virulencia y Caracterización Molecular de *Vibrio parahaemolyticus* por PCR de muestras clínicas.

### 1. Fundamentos y variables de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

El fundamento de la técnica es la replicación de ADN celular donde hay helicasas que producen la separación de las cadenas de ADN, seguida de una ARN polimerasa que sintetiza una secuencia corta de ARN o "primer". Luego, una ADN polimerasa reconoce estos oligonucleótidos y sintetiza las cadenas complementarias de ADN.

La técnica de PCR amplifica un fragmento de ADN, en forma exponencial, utilizando una enzima ADN polimerasa termoestable durante ciclos sucesivos

donde se utiliza la desnaturalización por calor. El segmento de ácidos nucleicos amplificado es específico ya que sus extremos son reconocidos por oligonucleótidos sintéticos diseñados especialmente que se unen a secuencias complementarias en el extremo 5' de cada hebra de ADN a amplificar. Se utiliza como molde una muestra de ADN o ARN, que puede estar presente en un bajo número de copias.

A partir de la PCR se puede obtener distintos tipos de información, que básicamente se puede resumir en: 1) presencia o ausencia de las secuencias complementarias a los oligonucleótidos, y 2) distancia a la que se encuentran los cebadores o "primers" en el ADN templado.

## 2. Etapas de la PCR

Al comienzo de la reacción de PCR hay una etapa de desnaturalización inicial para separación las hebras de ADN, seguida de un número variable de ciclos de PCR que consiste en tres etapas:

- **Desnaturalización:** se produce la separación de las hebras de ADN por calentamiento a 95°C. El tiempo va a depender del tamaño del fragmento y el contenido de G+C.

- **Hibridación o "annealing":** los partidores se unen a los sitios complementarios en la hebra de ADN a la temperatura óptima de hibridación ( $T_a$ ). Esta depende de la composición de bases, el largo y la concentración de los "primers". La  $T_a$  ideal se encuentra generalmente 5°C por debajo de la verdadera temperatura de melting ( $T_m$ ) de los partidores. La  $T_m$  es la temperatura a la cual el 50% de las cadenas primers-target se encuentra separadas en solución. El uso de una  $T_a$  inapropiada modifica la especificidad y sensibilidad de la reacción. El tiempo de alineamiento afecta la especificidad de la hibridación.

- **Polimerización:** luego del alineamiento de los partidores se produce la extensión de la hebra por acción de la ADN polimerasa termoestable que no se desnaturaliza por la alta temperatura y cuya temperatura óptima de polimerización es 72°C. A partir del partidor la enzima lee la hebra de templado e incorpora los nucleótidos complementarios. El tiempo de extensión depende de la concentración y del tamaño del fragmento a amplificar.

El número de ciclos utilizados depende del grado de especificidad y del grado de amplificación que se desee obtener, aconsejándose entre 25 y 35 ciclos.

Al final de los ciclos se realiza una extensión final que le da tiempo a la polimerasa para terminar todos los fragmentos para obtener bandas más definidas.

## 3. Protocolos de procedimiento para la detección de los genes de virulencia de *V. parahaemolyticus*.

De los aislamientos clínicos confirmados de *V. parahaemolyticus* se amplifican los genes que codifican los factores de virulencia, tdh (hemolisina termoestable directa), trh (termolisina relacionada a TDH) y la detección de cepas pandémicas mediante PCR de grupo-específico, del gen *toxRS* y del marco de lectura abierto *orf8*.

### **Extracción de ADN a partir de un aislamiento bacteriano**

Para la extracción rápida de ADN de *V. parahaemolyticus*, tomar 3-4 colonias y preparar una suspensión en 200  $\mu$ l de solución chelex 100 al 5% en un microtubo de 1.5 ml. Esta suspensión es sometida a 100°C durante 10 min. Se deja enfriar y centrifugar a 14000 rpm por 10 min para precipitar los detritos celulares. El sobrenadante donde se encuentra el ADN se utiliza como templado de la reacción de PCR. Los templados así preparados pueden conservarse a -20°C. El mismo procedimiento debe realizarse con las cepas de referencia a utilizar como controles positivos

### **Preparación de reacción de PCR:**

Preparar la mezcla de reactivos de PCR en área limpia libre de ADN, (ejemplo Flujo Laminar). Se debe considerar el número de muestras más el control positivo y negativo y volumen de pérdida (n+1). Los reactivos, concentraciones y volúmenes utilizados en la preparación de la reacción de PCR se muestran en la siguiente tabla.

<b>Reactivos</b>	<b>Volumen</b>
Buffer PCR 10x	5 $\mu$ l
MgCl <sub>2</sub> (50mM)	3 $\mu$ l
dNTPs (2.5mM)	2 $\mu$ l
P 1 (30 pmol)	1 $\mu$ l
P 2 (30 pmol)	1 $\mu$ l
Taq DNA polimerasa	0.2 $\mu$ l
ADN	3 $\mu$ l
Volumen Final	50 $\mu$ l

En un área distinta a la de preparación de la reacción (ejemplo: gabinete de bioseguridad) se agrega posteriormente ADN.

Las distintas secuencias de los primers o partidores y programas de PCR utilizados para la detección de los genes blanco son mostradas a continuación:

TDH-F 5'-GGTACTAAATGGCTGACATC-3'  
TDH-R 5'-CCACTACCACTCTCATATGC-3'

94° x 5 min, 30 ciclos 94° x 1 min, 48° x 1 min, 72° x 1 min; 72° x 5 min

TRH-F 5'-GGCTCAAATGGTTAAGCG-3'  
TRH-R 5'-CATTTCCGCTCTCATATGC-3'

94° x 5 min, 30 ciclos 94° x 1 min, 48° x 1 min, 72° x 1 min; 72° x 5 min

toxRS 1 5'-TATCTCCCATGCGCAAACGTA-3'  
toxRS 2 5'-ACAGTACCGTAGAACCGTGAT-3'

95° x 5 min, 30 ciclos 95° x 1 min, 55° x 1 min, 72° x 1 min; 72° x 7 min

ORF8A 5'-GTTTCGCATACAGTTGAGG-3'  
ORF8B 5'-AAGTACAGCAGGAGTGAG-3'

94° x 5 min, 30 ciclos 94° x 30 seg, 60° x 30 seg, 72° x 30 seg; 72° x 5 min

GS-VP 1 5'-TAATGAGGTAGAAACA-3'  
GS-VP 2 5'-ACGTAACGGGCCTACA-3'

95° x 5 min, 30 ciclos 94° x 1 min, 50° x 2 min, 72° x 3 min; 72° x 7 min

#### **4. Visualización de los productos de PCR**

- Preparación del gel de agarosa

Pesar la cantidad de agarosa según el porcentaje y el tamaño del gel que se desea preparar, agrega el volumen de buffer TAE correspondiente y fundir en horno microondas o baño María. La concentración de agarosa (0.7-2%) dependerá del tamaño de los fragmentos amplificados, tal que para fragmentos de bajo peso molecular se empleará la mayor concentración y viceversa. La agarosa fundida se coloca en el soporte armado con su peine, que es retirado una vez solidificado el gel.

- Electroforesis

Una vez solidificado el gel, se coloca en la cuba electroforética que contiene suficiente cantidad de buffer TAE 1X de tal modo que el gel quede cubierto. Se

mezcla el buffer de siembra con la muestra en una proporción de 1 parte y 5 partes respectivamente, cargar 10 µl de muestra en los pocillos; conjuntamente sembrar el control positivo y el control negativo. Finalmente sembrar también el marcador de peso molecular. Conectar la cámara electroforética a la fuente de poder teniendo la precaución de que la línea de siembra se encuentre en el polo negativo ya que las moléculas de ADN migran hacia el polo positivo. Las condiciones de la corrida electroforética recomendadas para las PCRs descriptas son 100 voltios durante 30-60 minutos.

- Tinción del gel

Finalizada la corrida electroforética se procede a la tinción del gel en una solución de bromuro de etidio en una concentración de 1µg/ml durante 10-30 minutos. Posteriormente enjuagar el gel en agua destilada.

**Precaución:** el bromuro de etidio es un reactivo cancerígeno por lo cual debe manipularse con extremo cuidado y el operador debe estar protegido con guantes.

- Visualización de los fragmentos de PCR.

El gel teñido es colocado en el transiluminador de UV que permite la visualización de las bandas de las diferentes muestras. Comparando la distancia recorrida de los fragmentos obtenidos de las muestras con el marcador de peso molecular se puede estimar el tamaño de los fragmentos. Para documentar esta reacción puede obtenerse una fotografía.

## **VI. IDENTIFICACIÓN DE *V.parahaemolyticus* EN MUESTRAS DE ALIMENTOS (Mariscos bivalvos crudos y congelados)**

**1. Transporte y preparación de la muestra:** Al realizar el muestreo se recomienda almacenar durante el transporte entre 7-10°C evitando el contacto directo del alimento con el hielo.

Procesar las muestras dentro de 3 horas y guardar a -70 si se requiere mayor tiempo. El muestreo para bivalvos crudos y congelados consiste en un pool de 12 especímenes con su licor y sin concha. Para extraer el espécimen lavar los mariscos con su concha con agua corriente fría y escobilla. Para las muestras congeladas descongelar los mariscos a temperatura ambiente. Usar un cuchillo estéril por muestra.

Poner los 12 especímenes en un vaso de licuadora estéril previamente tarada y registrar el peso.

Poner igual volumen de PBS estéril. Ejemplo si los 12 especímenes pesaron 150 g, agregar 150 ml de PBS. Esta dilución corresponde a 1:2.

Licuar la mezcla por 90 segundos hasta la intensidad máxima.

Tarar a cero en balanza un Frasco Schott de 250 ml que contiene 80 ml de PBS estéril y agregar 20 gramos de suspensión licuada. Esta suspensión constituye la dilución 1/10.

Preparar dilución 1/100 con 1 ml de 1/10 en 9 ml de PBS.

Preparar dilución 1/1000 con 1 ml de 1/100 en 9 ml de PBS y proceder a sembrar tres tubos en tres series de APA con 9 ml y una serie de APA 2X con 10 ml si la presencia de *Vibrio parahaemolyticus* es baja en las muestras ambientales

## **2. Método semicuantitativo (NMP)**

Sembrar en triplicado 3 tubos de APA 2X con 10 ml e inocular 10 ml de suspensión 1: 10.

Sembrar con 9 ml por triplicado en APA las tres diluciones en PBS (1/10 1/100 y 1/1000). Incubar 18 horas  $35 \pm 2^{\circ}\text{C}$ .

Traspasar los tubos con turbidez positiva a TCBS con asa aislamiento. Incubar  $35^{\circ}\text{C}$  18 horas. Debido a su costo, en lo posible traspasar en paralelo una asada del pool de NMP a agar cromogénico vibrio.

Traspasar las colonias verdes oscuras desde agar TCBS a Agar T1N3 o Agar Soya Tripticasa con 3% NaCl. Si es posible reaislar en TCBS nuevamente. Seleccionar las colonias Burdeos con borde blanco desde el agar cromogénico CHROMagar®.

Registrar el resultado de este NMP como NMP/g presuntivo. Ejemplo 3333 a 0000 Traspasar hasta tres colonias por tubo positivo a agar no selectivo (Agar Soya Tripticasa o Agar T1N3) y caracterizar bioquímicamente la colonia aislada.

## **3. Método cualitativo**

Inocular la porción a evaluar diluida 1/10 en el primer medio de enriquecimiento APA. Ejemplo se puede inocular 10 g de un composite 12 especímenes en 90 ml de APA o 250 g de muestra en 2.25 litros de medio de enriquecimiento de acuerdo a la sensibilidad requerida. Si el producto está congelado incubar a  $37 \pm 1^{\circ}\text{C}$  por  $6 \pm 1$  h. si el producto es fresco incubar a  $41.56 \pm 1^{\circ}\text{C}$  por  $6 \pm 1$  h. Traspase a 1 ml a 10 ml de APA. Incubar  $18 \pm 1$  h a  $41.5^{\circ}\text{C}$ . Sembrar en aislamiento en dos medios sólidos selectivos: TCBS y CHROMagar® Vibrio u otro selectivo de Vibrio. Incubar el TCBS a  $37^{\circ}\text{C}$  por  $24 \pm 3$  h. Seleccionar las colonias verdes sacarosa negativa desde el agar TCBS y colonias Burdeos con borde blanco del agar cromogénico. Traspasar en aislamiento en agar nutritivo salino como Soya Tripticasa + 3%NaCl. Realizar la confirmación bioquímica de por lo menos 5 colonias puras utilizando las baterías bioquímicas mediante kit comerciales de acuerdo a las

recomendaciones del fabricante y estudios moleculares para evaluar la potencial virulencia.

Interpretar la presencia o ausencia de *Vibrio parahaemolyticus* potencialmente patogénico por gramo de alimento.

#### 4. Caracterización bioquímica

Evaluar de por lo menos 3 colonias por tubo del NMP la siguiente batería bioquímica o en forma alternativa el sistema de reacciones bioquímicas miniaturizado API 20E®

Actividad de oxidasa positiva con reactivo al 1% N,N, N',N' tetrametil-p-fenilendiamina-2HCl en dH<sub>2</sub>O.

Crecimiento en escala T1N3, T1N6, T1N8

Ausencia de crecimiento den T1N0 y T1N10

Ausencia de fermentación de Sacarosa, Lactosa

Fermentación de L arabinosa.

Ausencia de utilización de arginina y utilización de glucosa en agar tendido AGS (K/A : tendido alcalino morado ausencia de utilización de arginina y profundidad amarilla utilización de glucosa positiva).

No produce gas ni hidrógeno sulfurado.

	Vch	Vp	Va	Vv	Vflu
Oxidasa	+	+	+	+	+
Producción de gas	-	-	-	-	-
Arginina	-	-	-	-	+93%
Lactosa	-	- 1%	-	+ 85%	- 3%
Sacarosa	+ 100%	- 1%+	+ 99%	- 15%	+ 100%
L-arabinosa	-	+ 80%	- 1%	-	93%
Crecimiento en agua peptonada 0%NaCl	+	-	-	-	-
2%NaCl	+	+	+	+	+
6%NaCl	+	+	+	+	+
8%NaCl	+	+	+	+	+
10%NaCl	-	-	70%+	1%+	4%+

Las colonias positivas se informan según el tubo positivo como lectura de NMP confirmativa.

Ejemplos: NMP/ gramo de mariscos de *Vibrio parahaemolyticus* .

Lectura Confirmativa	Informe NMP/g de marisco
3333	> 1100
3000	0.3
2000	0.92
1000	0.36
0000	< 0.3

Observaciones

Observaciones:

1. Si una colonia es sacarosa negativa y lactosa positiva, puede corresponde a *Vibrio vulnificus*, difícil de aislar en agar TCBS.
2. Muchas colonias resultan ser sacarosa positiva correspondiendo en su mayoría a *V. fluvialis* y *V. alginolyticus*.

### 5. Caracterización molecular de especie y factores de virulencia.

Los aislamientos de origen clínicos de cepas de *Vibrio parahaemolyticus* presentan factores relacionados con la virulencia en un 99% de las cepas. Los aislados de origen ambientales sólo las presentan en un 1% o menos. La identificación molecular de estas toxinas mediante PCR, es importante para caracterizar las cepas clínicas y evaluar su rol patógeno. Los estudios genéticos se basan en identificación de especie (*tl*) y de factores de virulencia presentes en islas de patogenicidad (*tdh*, *trh*) y la identificación del clon pandémico *orf8*.

### 6. Preparación de reacción de PCR.

Contar con una colonia pura e inocular en un tubo de reacción de PCR según especificaciones del termociclador (50, 20 y 10 µl). Agregar 50 µl de H<sub>2</sub>O calidad biología molecular. Calentar 10 min. a 95-100°C en termoblock.

En forma opcional se puede purificar el ADN con algún kit de extracción comercial de ADN o evaluar la presencia de especie directamente en enriquecidos. Se puede realizar PCR tradicional o PCR en tiempo real cualitativo con Sybr green o cuantitativo con sondas específicas. Si las muestras resultan positivas se puede continuar el aislamiento en medios selectivos. Para objetivos legales se requiere la colonia viable.

Preparar la mezcla de reactivos sin ADN en área limpia, (ejemplo Flujo Laminar). Considerar el número de muestras y tres volúmenes extra para el control positivo y negativo y volumen de pérdida. El ADN se agrega al final en área específica (ejemplo: gabinete de bioseguridad)

Las concentraciones recomendadas de los reactivos son las siguientes:

Reactivos	Volumen ( $\mu$ l)	Concentración (mM)
Partidores F y R 20 $\mu$ M	2	2
dNTP 20mM	1	
10X Tampón	2	
Mg <sub>2</sub> Cl 25 mM	1	1
Taq polimerasa 5U/ $\mu$ l.	0,2	1 U/ensayo
Templado	1	
dH <sub>2</sub> O	20	
Volumen final	20	

Agregar primero el volumen de agua, luego el tampón concentrado diez veces (10 X), luego el magnesio, luego los nucleótidos y finalmente la enzima Taq polimerasa. Considerar un volumen final de 20 $\mu$ l o el que les acomode entre 10 y 50  $\mu$ l. Agregar la mezcla de reacción sobre el 1  $\mu$ l de ADN denaturado.

### 7. Amplificación de secuencias blanco de *Vibrio parahaemolyticus*.

Amplificar primero el gen *tl* que confirma especie. Luego verificar si la cepa es o no toxigénica con los partidores que identifican los genes *tdh* y *trh*. Si se ha descrito en el país la presencia del clon asiático pandémico identificar la presencia del fragmento de ORF 8.

Realizar los ciclos de amplificación considerando la temperatura de fusión de los partidores:

Gen	Proteína codificada	Ubicación	Secuencia	Tamaño amplificado Pares de base (pb)	Ciclo de amplificación
<i>tlh</i>	Hemolisina termoestable		F 5'aaa gcg gat tat gca gaa gca ctg 3' R 5'gct act ttc tag cat ttt ctc tgc 3'	450	94°C 3 min 25 ciclos= 94°C 1min 60°C 1 min 72°C 2 min 72°C 3min 8°C indefinido.
<i>tdh</i>	Hemolisina termoestable directa		F5'GTAAAGGTCTCTGACTTTTGGAC-3 R5'GGAATAGAACCTTCATCTTCACC-3	270	94°C 3 min 25 ciclos= 94°C 1min 58°C 1 min 72°C 2 min 72°C 3min 8°C indefinido

<i>trh</i>	Hemolisina termoestable relacionada		F 5 TTGGCTTCGATATTTTCAGTATCT-3 R 5-CATAACAAACATATGCCCATTTCCG-3	500	94°C 3 min 25 ciclos= 94°C 1min 60°C 1 min 72°C 2 min 72°C 3min 8°C indefinido
<i>Orf8</i>	Marco de lectura abierto 8		F 5'AGGACGCAGTTACGCTTGATG-3 R 5'CTAACGCATTGTCCCTTTGTAG-3	369	94°C 3 min 25 ciclos= 94°C 1min 60°C 1 min 72°C 2 min 72°C 3min 8°C indefinido

## 8. Visualización de amplificadores de ADN e informe:

La reacción de PCR la puede realizar en termocicladores de PCR tradicional o en tiempo real siguiendo las recomendaciones del fabricante. Para PCR tradicional se debe visualizar los amplificadores en geles de agarosa al 1.5 % teñidos con Bromuro de etidio.

Sembrar 12 ul en pocillo previamente suspendido en 1 ul de tampón de carga.

Sembrar 7 ul de Estándar de PM conocido que tenga entre 100 y 500 pb.

Someter a campo eléctrico el gel a 75 mV por 40 min.

Teñir con solución de Bromuro de Etidio 10 min.

TL: Positiva. Confirma especie *Vibrio parahaemolyticus*.

TDH: Positiva: Presencia de Vp toxigénico

TRH: Positiva: Presencia de Vp toxigénico

Orf8 : Positiva: Presencia de cepa asiática pandémica.

## 9. ANEXO

### a. TERMINOLOGÍA

PBS=Tampon Fosfato pH 7.4

APA=Agua Peptonada alcalina pH 8.5

APA2X=Agua Peptonada alcalina pH 8.5

AGS: Agar Tendido de Arginina Glucosa

NMP: Número Más Probable.

### b. MATERIALES, INSUMOS Y EQUIPOS

#### Aislamiento de Vp desde alimento

Vaso de Licuadora estéril y licuadora.

Estufa incubadora 35 +/- 2 °C.

Tubos graduados con 9 ml APA y APA2X para NMP en gradilla

Tubos graduados con 9 ml con PBS  
Tubos con 10 ml de APA 2X.  
Un lote de mariscos de 12 especímenes vivos o congelados  
Balanza sensibilidad 1 mg para preparación de medios de cultivos con  
carbohidratos.  
Micropipeta P1000 (1000 ul).  
Puntas estériles para micropipeta P1000.  
Pipetas microbiológicas de 1 y 10 ml.  
Tampón PBS en frascos de 1 litro y frascos de 250 ml con 80 ml de PBS  
estéril.  
Caldo APA 1X en frascos de 1 litro.  
Caldo APA 2X en frascos de 1 litro.  
Agar TCBS  
Agar CHROMagar Vibrio

### **Identificación Bioquímica**

Caldo T1N0  
Caldo T1N3  
Caldo T1N6  
Caldo T1N8  
Caldo T1N8  
Reactivo de oxidasa.  
Agar Soya tripticasa tendido y placas.  
Caldo de fermentación sin carbohidratos.  
Solución sacarosa 50% p/v filtrada 0.22 um.  
Solución Lactosa 50% p/v filtrada 0.22 um.  
Solución L- arabinosa 50% p/v filtrada 0.22 um  
Agar tendido AGS  
Kit Biomeriux API 20E

### **Identificación Molecular**

Termociclador  
Microcentrifuga de 0.2 y 1 ml  
Flujo Laminar.  
Cámara electroforesis con pocillos de 15 ul.  
Fuente de poder  
Transiluminador  
Set de micropipetas de 10. 100. 200 y 1000 ul.  
Puntas de micropipetas de 10, 100, 200 y 1000 ul.  
Tubos tipo eppendorf de 20 ul para reacción en termociclador  
Agua para biología molecular.  
Tampón de muestra  
Agarosa 1.5% en TAE.  
MgCl<sub>2</sub> 50 mM

Taq:  
dNTP 10 nM  
Partidores 10 nM

### C. MEDIOS DE CULTIVO, CALDO DE ENRIQUECIMIENTO Y SOLUCIONES:

#### **Agar AGS** (para aislamiento de *Vibrio parahaemolyticus*)

Peptona	5g
Extracto de levadura	3g
Triptona	10g
NaCl	20g
Glucosa	1 g
L-Arginina (hidrocloruro)	5g
Citrato de Amonio Férrico	0.5 g
Tiosulfato de Sodio	0.3 g
Púrpura de Bromo Cresol	0.02 g
Agar	13.5 g
Agua destilada	1000 mL

- Suspender los ingredientes en agua destilada y hervir hasta disolver. Dispensar en tubos de 13x100 mm utilizando 5 ml. Autoclavar 10-12 min a 121°C. Luego de esterilizar melificar en tendido. pH final 6.8-7.0

#### **Caldo fermentación de carbohidratos para *Vibrio parahaemolyticus***

Peptona	10g
Extracto de carne	3g
NaCl	5 g
Púrpura de Bromo Cresol	0.04 g
Agua destilada	1000 mL

- Pesar los reactivos y adicionar 1 L de agua destilada.
- Dispensar en tubos de fermentación de 5x50 mm que contiene tubos de fermentación invertidos.
- Autoclave 10 min a 121°C
- pH 7.0 ± 0.2.

#### **CALDO DE ENRIQUECIMIENTO APA Y APA 2X** (para aislamiento de *Vibrio parahaemolyticus*)

Peptona	10 g	(y 2X 20 g)
NaCl	10 g	(y 2X 20 g)
Agua destilada	1000 mL	

- Pesar según lo indica el fabricante y adicionar 1 L de agua destilada.
- Ajustar a pH de modo que después de la esterilización el pH sea  $8.5 \pm 0.2$
- Dispensar en tubos a presión.
- Autoclavar 10 min a  $121^\circ\text{C}$ .
- Guardar en refrigeración 3 meses ( $2$  a  $8^\circ\text{C}$ ) o a T ambiente 1 mes.

**CALDO TRIPTONA Y CALDOS SALADOS DE TRIPTONA** (Para usar en aislamiento de *Vibrio parahaemolyticus*.)

Triptona	10	g
NaCl	0, 10, 30, 60, 80 ó 100	g
Agua destilada	1	L

- Disolver los ingredientes en agua destilada
- Para T1NO no agregar NaCl
- Para T1N1 usar 10 g NaCl (1% p/v)
- Para T1N3 usar 30 g NaCl (3%)

Dispensar em tubos de tapa rosca de 16x 125 mm . Apretando las tapas para mantener la concentración correcta de sales en el tubo.

Autoclavar 15 min a  $121^\circ\text{C}$ . pH final  $7.2 \pm 0.2$

**CALDO TRIPTONA Y CALDOS SALADOS DE TRIPTONA**

Triptona	10	g
NaCl	0, 10, 30, 60, 80 ó 100	g
Agua destilada	1	L

- Disolver los ingredientes en agua destilada
- Para T1NO no agregar NaCl
- Para T1N1 usar 10 g NaCl (1% p/v)
- Para T1N3 usar 30 g NaCl (3%)

Dispensar em tubos de tapa rosca de 16x 125 mm . Apretando las tapas para mantener la concentración correcta de sales en el tubo.

Autoclavar 15 min a  $121^\circ\text{C}$ . pH final  $7.2 \pm 0.2$

**TAMPÓN PBS pH 7.4** (para aislamiento de *Vibrio parahaemolyticus*)

NaCl	7.65	g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> anhidro	0.724	g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.210	g
Agua destilada	1000	mL

- Pesar ingrediente y adicionar 1 L de agua destilada.
- Ajustar pH a 7.4 con 1N de NaOH y producir lotes de 80 ml y un litro en frascos tipo schott de 250 y 1 litro respectivamente.

- Autoclavar 15 min a 121°C
- Guardar 3 meses en refrigeración con envases de tapa rosca.

## VII. Referencias

1. Tantillo G M, Fontanarosa M, Di Pinto A, Musti M. Updated perspectives on emerging vibrios associated with human infections. *Lett Appl Microbiol* 2004; 39: 117-26.
2. Paris E, Ríos JC, Bettini M, Mieres JJ, Sánchez P y De la Barra P. Intoxicación por *Vibrio parahaemolyticus* *Rev. Chil. Infec*
3. Heitmann I, Jofré L, Hormázabal J C, Olea A, Vallebuona C, Valdés C. Revisión y recomendaciones para el manejo de diarrea por *Vibrio parahaemolyticus* *Rev Chil Infect* 2005; 22 (2): 131-140
4. Murray y cols. *Manual of Clinical Microbiology*, Nª Edición 2007
5. *Vibrio parahaemolyticus*. Disease Information. Division of Bacterial and Mycotic Diseases, Centers for Disease Control and Prevention (CDC). <http://www.cdc.gov/ncidod/dbmd/diseaseinfo/vibrioparahaemolyticus>
6. *Vibrio parahaemolyticus*. Center of Food Safety & Applied Nutrition, U.S. Food & Drug Administration. (FDA). <http://www.cfsan.fda.gov/~mow/chap9>
7. Isolation of a *Vibrio parahaemolyticus* pandemic strain from a marine water sample obtained in the northern Adriatic. *Euro Surveill* 2008;13(11).
8. Opinion of the Scientific Committee on Veterinary measures relating to public health on *Vibrio vulnificus* and *Vibrio parahaemolyticus*. European Commission, 2001.
9. Muramatsu K. Comparison of epidemiological markers for *Vibrio parahaemolyticus* isolated from food poisoning. *Kansenshogaku Zasshi*. 1999;73:179-186

10. Reville MJ, Ruiz MA, Uriel B, García-Zuecoa JC, García-Moya JB. Gastroenteritis aguda por *Vibrio parahaemolyticus* ureasa positivo en una paciente inmunocomprometida. *Hospital Universitario Miguel Servet. Zaragoza*.
11. Pérez JL, Cabré M, Riera L, Príu R, Berrocal CI Gastroenteritis por *Vibrio parahemolyticus* asociada a consumo de ostras. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 1987; 5: 160-163.
12. Honda T, Ni Y, Miwatani T, Adachi T, Kim J The thermostable direct hemolysin of *Vibrio parahaemolyticus* is a pore-forming toxin. *Can J Microbiol* 1992; 38: 1175-1180.
13. Okura M, Osawa R, Arakawa E, Terajima J, and Watanabe H. 2005. Identification of *Vibrio parahaemolyticus* Pandemic Group-Specific DNA Sequence by Genomic Subtraction. *J. Clin. Microbiol.* 43: 3533–3536.
14. Matsumoto C, Okuda J, Ishibashi M, Iwanaga M, Garg P, Rammamurthy T, Wong H, Depaola A, Bu Kim Y, Albert M. J, and Nishibuchi M. 2005. Pandemic Spread of an O3:K6 Clone of *Vibrio parahaemolyticus* and Emergence of Related Strains Evidenced by Arbitrarily Primed PCR and *toxRS* Sequence Analyses. *J. Clin. Microbiol.* 43: 3533–3536.
15. Fica A. Infecciones por *Vibrio parahaemolyticus*. Departamento de Medicina Hospital Clínico Universidad de Chile.
16. Okura M, Osawa R, Iguchi A, Arakawa E, Terajima J and Watanabe H. 2003. Genotypic Analices of *Vibrio parahaemolyticus* and Development of aPandemic Group-Specific Multiplex PCR Assay. *J. Clin. Microbiol.* 41. 4676-4682.
17. Manual de CDC Electroforesis de Campo Pulsado para *Escherichia coli*, *Salmonella* sp
18. BAM FDA on line 2004.
19. Improved Method for Detection of *Vibrio parahaemolyticus* in sea food. Yukiko Hara-Kido et al. Dec 2001. *Applied and Environmental Microbiology*. P5819-5823.
20. Microbiology of food and animal feedind stuffs-Horizontal method for the detection of potentially enteropathogenic *Vibrio spp.* Part I Detection of *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio cholerae*. *ISO/TS 21872-1:2007 (E)*

**Agradecimientos:** A René López P. por su participación en edición de este Manual.



