

Quino, Willi
 Pompa, Iris Janet
 Zamudio, María Luz
 Aguilera, Carmela
 Juscamayta, Eduardo
 G. Gavilán, Ronnie

Validación de una técnica de PCR múltiplex para la detección de *Vibrio cholerae* toxigénica

Validation of a multiplex PCR technique for the detection of toxigenic *Vibrio cholerae*

Fecha de aceptación: diciembre 2018

Resumen

El cólera es una de las enfermedades diarreicas más graves, responsable de causar al menos siete pandemias en el mundo. Entre los factores de virulencia asociados a esta enfermedad se encuentra la toxina del cólera, codificada por el gen *ctxA* y el pilus coregulador de toxina codificado por el gen *tcpA*, que juega un papel importante en la patogenicidad.

OBJETIVO. Validar una técnica de PCR múltiplex para el diagnóstico de *Vibrio cholerae* toxigénica basado en la detección de los genes *Vc-m*, *ctxA* y *tcpA*.

MÉTODOS. La validación de la técnica se realizó en el Laboratorio de Enteropatógenos, del Instituto Nacional de Salud, a partir de ensayos de PCR convencional (*Vc-m*) y PCR múltiplex (*ctxA-tcpA*), así como la estandarización del PCR múltiplex con tres blancos (*Vc-m/ctxA/tcpA*). La validación se realizó con 51 aislados clínicos de *Vibrio cholerae* toxigénica (*ctxA*) y 31 cepas de distintos géneros no productora de *ctxA*. Se determinó el rango de trabajo, la selectividad, la robustez, la sensibilidad, la especificidad, el valor predictivo positivo y el valor predictivo positivo de la técnica.

RESULTADOS. Se validó la metodología y se obtuvo un rango de detección que abarca de la dilución 10^0 a 10^{-2} . La robustez fue óptima al modificar diferentes variables. Se obtuvo 100% de inclusividad, exclusividad, precisión analítica, valor predictivo positivo y valor predictivo negativo, así como la sensibilidad y especificidad.

CONCLUSIONES. La estandarización y posterior validación de la PCR múltiplex (*Vc-m/ctxA/tcpA*), realizada por operadores distintos, corroboró los parámetros considerados y confirmó la repetibilidad y reproducibilidad de la técnica, por lo tanto provee una técnica rápida, precisa, segura y selectiva para la identificación de cepas de *Vibrio cholerae* toxigénica de aislados clínicos luego de un aislamiento primario.

Palabras clave: validación, PCR, *Vibrio cholerae*, toxina del cólera (fuente: DECS BIREME).

Abstract

Cholera is one of the most serious diarrheal diseases, responsible for causing at least seven pandemics in the world. Among the virulence factors associated with this disease is cholera toxin, encoded by the *ctxA* gene and the pilus coregulator of toxin encoded by the *tcpA* gene, plays an important role in pathogenicity.

OBJECTIVE. To validate a multiplex PCR technique for the diagnosis of toxigenic *Vibrio cholerae* based on the detection of *Vc-m*, *ctxA* and *tcpA* genes.

METHODS. The validation of the technique was carried out in the National Institutes of Health's Laboratory of Enteropathogens, using conventional PCR (*Vc-m*) and PCR multiplex (*ctxA-tcpA*) assays, and the standardization of multiplex PCR with three targets (*Vc-m/ctxA/tcpA*), validation was performed with 51 clinical isolates of toxigenic *Vibrio cholerae* (*ctxA*) and 31 non-*ctxA*-producing strains of different genera. The range of work, selectivity, robustness, sensitivity, specificity, positive predictive value and positive predictive value of the technique were determined.

RESULTS. The methodology was validated, obtaining a detection range ranging from 10^0 dilution to 10^{-2} . Robustness was optimal when modifying different variables. We obtained 100% inclusivity, exclusivity, analytical precision, positive predictive value and negative predictive value, as well as sensitivity and specificity.

CONCLUSIONS. The standardization and subsequent validation of multiplex PCR (*Vc-m/ctxA/tcpA*), performed by different operators, corroborates the parameters considered, confirmed the repeatability and reproducibility of the technique, thus providing a fast, safe and selective for the identification of toxigenic *Vibrio cholerae* isolates from clinical isolates after primary isolation.

Keywords: validation, PCR, *Vibrio cholerae*, cholera toxin (source: MESH NLM).

Laboratorio de Referencia Nacional de Enteropatógenos, Centro Nacional de Salud Pública, Instituto Nacional de Salud, Lima, Perú.
 Correspondencia: M.C. Willi Quino
 Centro Nacional de Salud Pública. Instituto Nacional de Salud. Cápac

Yupanqui 1400, Jesús María, Lima 11, Perú.
 Dirección electrónica: williqs@yahoo.com
 Teléfono: 51 1748 1111, anexo 1721

Introducción

El cólera es una de las enfermedades diarreicas más graves,¹ responsable de causar al menos siete pandemias distintas de cólera ocurridas desde 1817.^{2,3} Se conocen más de 200 serogrupos de *Vibrio cholerae*, pero sólo O1 y O139 causan epidemia y pandemia de cólera.^{4,5}

Entre los factores de virulencia, la toxina del cólera (CT) codificada por el gen *ctxA* es el principal factor de virulencia de *Vibrio cholerae* toxigénica, demostrada en 1959;⁶ y la toxin coregulated pilus (TCP) es el receptor para CT codificado por el gen *tcpA* y juega un papel importante en la colonización intestinal.⁷⁻⁹

Por otra parte, *ctxA* y *tcpA* no se expresan comúnmente en cepas ambientales.¹⁰ En la mayoría de serogrupos O1 y O139, la expresión de estos genes es crítica para la patogenicidad,^{11,12} los cuales se han relacionado con brotes epidémicos, aunque ciertos reportes indican que algunas de estas cepas no tienen la toxina causante del cólera.^{13,14}

El diagnóstico de rutina por laboratorio de *Vibrio cholerae*, según el Manual para la identificación y pruebas de susceptibilidad a los antimicrobianos de patógenos bacterianos de la OMS, se basa en el aislamiento y tipificación microbiológica mediante el uso de medio selectivo (TCBS) y pruebas bioquímicas.¹⁵ Una desventaja de los métodos bioquímicos para la detección de *Vibrio cholerae* es que requieren entre dos a siete días para confirmar el diagnóstico. En la detección del cólera es importante una prueba rápida, por lo que el tiempo es un factor crítico para determinar la utilidad de cualquier método de detección. Además son necesarios técnicos expertos para el proceso de las pruebas, experiencia de la que no se dispone en todos los laboratorios.^{16,17} Por lo tanto, la facilidad de uso y la velocidad son factores importantes en la creación de un nuevo método de detección.

Los avances en técnicas de biología molecular han abierto la posibilidad de un diagnóstico más rápido y específico a través de la PCR convencional y la PCR dúplex, que permiten identificar y caracterizar los factores de virulencia de *Vibrio cholerae*.¹⁸⁻²² Las pruebas de detección basadas en PCR son rápidas y sensibles técnicas de diagnóstico primario y patogenicidad, en las que los genes específicos del biotipo, por ejemplo, *Vc-m* (16S-23S) se utilizan para identificar la presencia de *V. cholerae*,^{18,23,24} y *ctxA*, *tcpA*¹⁶ se usan para identificar los factores de virulencia, como la toxina del cólera.

El objetivo del presente estudio es estandarizar y validar una técnica de PCR múltiple para el diagnóstico de *Vibrio cholerae* toxigénica basado en la detección de tres genes; a través de la identificación de un fragmento específico para *Vibrio cholerae* que pertenece a una región del operón *rRNA* específica de la proteína de membrana externa, de las regiones espaciadoras intergénicas (IRSS) localizadas entre 16S y 23S del r ADN (*Vc-m*). Para detectar la presencia de la toxina del cólera se amplifica un fragmento del gen *ctxA*, el cual codifica para la subunidad A de la toxina. Asimismo se amplifica un fragmento del gen *tcpA* que codifica la proteína efectora (subunidad del pili) específico del biotipo El Tor.²³

Materiales y métodos

Cepas

Se seleccionó un total de 82 cepas: 51 de *Vibrio cholerae* toxigénica y 31 de distintos géneros no productores de *ctxA* (cuadro 1). Las cepas de *Vibrio cholerae* ATCC 14033 (Serovar O1, biotype El Tor, serotype Inaba) y *Escherichia coli* ATCC 25922 (sin factores de virulencia) se utilizaron como controles positivo y negativo, respectivamente. Las cepas usadas fueron caracterizadas mediante cultivo microbiológico, y pruebas bioquímicas y serológicas.²⁴ Asimismo, la presencia de *Vibrio cholerae* se determinó mediante un PCR convencional *Vc-m*,¹⁸ y los factores de virulencia (*ctxA* y *tcp*) se establecieron mediante un PCR múltiple.¹⁶ El producto de PCR del 20% de las cepas caracterizadas por estas pruebas fueron secuenciadas, y la identidad de las secuencias según el GenBank corresponden a *ctxA*, *tcpA* y *Vc-m* de *Vibrio cholerae* toxigénica, por lo que se consideró también como prueba de oro.

Preparación de muestras de ADN

Para la extracción rápida de ADN de las cepas de *Vibrio cholerae* toxigénica y de otros géneros, se tomaron de tres a cuatro colonias de un aislamiento en agar tripticosa de soya (TSA) y se preparó una suspensión en agua de 500 µL en agua de calidad molecular, a partir de la cual se realizaron diluciones con un rango de 10⁰ a 10⁻⁵ en volúmenes de 500 µL, estas suspensiones fueron sometidas a 100 °C durante 10 minutos, los tubos se centrifugaron a 12 mil rpm durante dos minutos. Se conservó el sobrenadante para ser utilizado como blanco en la técnica de PCR múltiple.²⁴

Estandarización de la PCR múltiple

La estandarización de la PCR múltiple se realizó a partir del conocimiento de las condiciones de las dos PCR originales. PCR de la secuencia de un fragmento específico para la detección de *Vibrio cholerae*: se utilizó la PCR descrita por Chun y colaboradores en 1999,¹⁸ con algunas modificaciones de Caffer en 2007.²⁴ Este ensayo amplifica un fragmento de la secuencia correspondiente a una región del operón *rRNA*, de las regiones espaciadoras intergénicas (IRSS) localizadas entre 16S y 23S del r ADN, obteniéndose una banda de 300pb. Los que se utilizaron primero fueron: pvc-F2-TTAAGCSTTTTCRCRTGA-GAATG y pVCm-R1-AGTCACTTAACCATACAACCCG.

La PCR se llevó a cabo en un volumen final de 25 µL, conteniendo buffer de PCR, -Mg 1X (Thermo Fisher Scientific), 2 mM de MgCl₂ (Thermo Fisher Scientific), 0.8 mM de la mezcla de dNTP's (Thermo Fisher Scientific), 0.8 µM de cada uno de los primers de *Vc-m* (pvc-F/pvc-m-R1), 1.25 U de Taq ADN polimerasa 5U/µL (Thermo Fisher Scientific), 13.25 µL de agua calidad molecular y finalmente 2 µL de ADN; como control positivo y negativo se utilizó el ADN de *Vibrio cholerae* ATCC 14033 (*Vc-m/ctxA/tcpA*) y *Escherichia coli* ATCC 25922 sin factores de virulencia, respectivamente. Además se utilizaron 25 µL de la mezcla de reacción de PCR sin ADN como control del sistema. La amplificación consistió en una primera desnaturalización de 2 min a 94 °C, seguida de 30 ciclos, cada uno de ellos compuesto por 45 s de desnaturalización a 94 °C, 45 s de alineamiento a 60 °C y 45 s de extensión a 72 °C. La extensión final fue de 10 min a 72 °C.

Cuadro 1
Cepas de *Vibrio cholerae* productoras de toxina ctxA y cepas de distintos géneros no productoras de ctxA

Cepa	Serotipo	Genotipo	Cepa	Serotipo	Genotipo	Microorganismo	Cepa
1-532-92	O1 Inaba	<i>Vc-m/ctxA/tcp</i>	1.1336-92	O1 Ogawa	<i>Vc-m/ctxA/tcp</i>	<i>Salmonella enteritidis</i>	6.077-12
1-5101-92	O1 Ogawa	<i>Vc-m/ctxA/tcp</i>	1.1345-92	O1 Ogawa	<i>Vc-m/ctxA/tcp</i>	<i>Salmonella typhimurium</i>	1.148-12
1-5132-92	O1 Ogawa	<i>Vc-m/ctxA/tcp</i>	1.1354-92	O1 Inaba	<i>Vc-m/ctxA/tcp</i>	<i>Salmonella infantis</i>	1.276-12
1-5211-92	O1 Ogawa	<i>Vc-m/ctxA/tcp</i>	1.1594-92	O1 Inaba	<i>Vc-m/ctxA/tcp</i>	<i>Escherichia coli</i>	1.020-13
1-7442-92	O1 Ogawa	<i>Vc-m/ctxA/tcp</i>	1.1600-92	O1 Inaba	<i>Vc-m/ctxA/tcp</i>	<i>Enterobacter agglomerans</i>	1.082-13
1.0324-92	O1 Inaba	<i>Vc-m/ctxA/tcp</i>	1.1610-92	O1 Ogawa	<i>Vc-m/ctxA/tcp</i>	<i>Salmonella infantis</i>	1.291-12
1.0747-92	O1 Inaba	<i>Vc-m/ctxA/tcp</i>	1.1618-92	O1 Ogawa	<i>Vc-m/ctxA/tcp</i>	<i>Escherichia coli</i>	1.090-13
1.0748-92	O1 Inaba	<i>Vc-m/ctxA/tcp</i>	1.1661-92	O1 Ogawa	<i>Vc-m/ctxA/tcp</i>	<i>Salmonella enteritidis</i>	1.297-12
1.0792-92	O1 Ogawa	<i>Vc-m/ctxA/tcp</i>	1.1901-92	O1 Ogawa	<i>Vc-m/ctxA/tcp</i>	<i>Escherichia coli</i>	1.097-13
1.0811-92	O1 Ogawa	<i>Vc-m/ctxA/tcp</i>	1.1905-92	O1 Inaba	<i>Vc-m/ctxA/tcp</i>	<i>Salmonella enteritidis</i>	1.314-12
1.0817-92	O1 Ogawa	<i>Vc-m/ctxA/tcp</i>	1.2577-92	O1 Ogawa	<i>Vc-m/ctxA/tcp</i>	<i>Salmonella dublin</i>	1.328-12
1.0819-92	O1 Ogawa	<i>Vc-m/ctxA/tcp</i>	1.2660-92	O1 Ogawa	<i>Vc-m/ctxA/tcp</i>	<i>Escherichia coli</i>	1.103-13
1.4696-12	O1 Ogawa	<i>Vc-m/ctxA/tcp</i>	1.2661-92	O1 Inaba	<i>Vc-m/ctxA/tcp</i>	<i>Shigella flexneri 2a</i>	1.279-13
1.4730-12	O1 Ogawa	<i>Vc-m/ctxA/tcp</i>	1.2665-92	O1 Ogawa	<i>Vc-m/ctxA/tcp</i>	<i>Salmonella enteritidis</i>	1.332-12
1-672-92	O1 Inaba	<i>Vc-m/ctxA/tcp</i>	1.2677-92	O1 Ogawa	<i>Vc-m/ctxA/tcp</i>	<i>Shigella flexneri 1b</i>	1.280-13
1-5098-92	O1 Ogawa	<i>Vc-m/ctxA/tcp</i>	1.2684-92	O1 Inaba	<i>Vc-m/ctxA/tcp</i>	<i>Escherichia coli O157:H7</i>	oPS-191
1-5341-92	O1 Ogawa	<i>Vc-m/ctxA/tcp</i>	1.2770-92	O1 Ogawa	<i>Vc-m/ctxA/tcp</i>	<i>Salmonella infantis</i>	1.366-12
2-5367-92	O1 Inaba	<i>Vc-m/ctxA/tcp</i>	1.2772-92	O1 Ogawa	<i>Vc-m/ctxA/tcp</i>	<i>Salmonella infantis</i>	1.414-12
1.1642-92	O1 Ogawa	<i>Vc-m/ctxA/tcp</i>	1.2773-92	O1 Ogawa	<i>Vc-m/ctxA/tcp</i>	<i>Shigella sonnei I</i>	1.282-13
1.6892-92	O1 Ogawa	<i>Vc-m/ctxA/tcp</i>	1.2778-92	O1 Ogawa	<i>Vc-m/ctxA/tcp</i>	<i>Salmonella typhimurium</i>	2.484-12
1.0875-92	O1 Inaba	<i>Vc-m/ctxA/tcp</i>				<i>Shigella sonnei I</i>	1.284-13
1.2444-92	O1 Inaba	<i>c-m/ctxA/tcp</i>				<i>Salmonella infantis</i>	2.547-12
2.2798-92	O1 Inaba	<i>Vc-m/ctxA/tcp</i>				<i>Shigella flexneri 3a</i>	1.596-13
1.0242-92	O1 Inaba	<i>Vc-m/ctxA/tcp</i>				<i>Salmonella enteritidis</i>	2.548-12
1.0344-92	O1 Ogawa	<i>Vc-m/ctxA/tcp</i>				<i>Escherichia coli</i>	1.558-12
1.2432-92	O1 Ogawa	<i>Vc-m/ctxA/tcp</i>				<i>Salmonella enteritidis</i>	2.585-12
1.2427-92	O1 Inaba	<i>Vc-m/ctxA/tcp</i>				<i>Salmonella infantis</i>	1.725-12
1.2417-92	O1 Ogawa	<i>Vc-m/ctxA/tcp</i>				<i>Escherichia coli</i>	2.317-13
1.0207-92	O1 Ogawa	<i>Vc-m/ctxA/tcp</i>				<i>Escherichia coli</i>	1.597-11
1.0214-92	O1 Inaba	<i>Vc-m/ctxA/tcp</i>				<i>Escherichia coli</i>	1.600-11
1.0316-92	O1 Inaba	<i>Vc-m/ctxA/tcp</i>				<i>Escherichia coli</i>	1.607-11

PCR múltiplex del gen *ctxA/tcpA*: se utilizó la PCR descrita por Mehrabadi y colaboradores,¹⁶ con algunas modificaciones de Caffer.²⁴ Este ensayo amplifica un fragmento del gen *ctxA* que codifica para la subunidad de la toxina. Por otro lado, se amplifica un fragmento del gen *tcpA* que codifica para la proteína efectora (subunidad del pili), obteniéndose bandas de 564pb (*ctxA*) y 451pb (*tcpA*). Los que se utilizaron primero fueron: CT 94F-CGCGCAGATTCTAGACCTCTG, CT 614R-CGATGATCTGGAG-CATTCCAC, TCP-72F- CACGATAAGAAAACCGGTCAAGAG y TCP 477R-CGAAAG-CACCTTCTTTCACGTTG.

La PCR se llevó a cabo en un volumen final de 25 μ L, conteniendo buffer de PCR, -Mg 1X (Thermo Fisher Scientific), 2 mM de MgCl₂ (Thermo Fisher Scientific), 0.8 mM de la mezcla de dNTP's (Thermo Fisher Scientific), 0.4 μ M de cada uno de los primers de *ctxA* (CT 94F/CT 614R), 0.4 μ M de cada uno de los primers de *tcpA* (TCP 72F/TCP 477R), 1.25 U de Taq ADN polimerasa (Thermo Fisher Scientific), 13.25 μ L de agua calidad molecular y finalmente 2 μ L de ADN; como control positivo y negativo se utilizó el ADN de *Vibrio cholerae* ATCC 14033 (*Vc-m/ctxA/tcp*) y *Escherichia coli* ATCC 25922 sin factores de virulencia, respectivamente. Además se usaron 25 μ L de la mezcla de reacción de PCR sin ADN como control del sistema. La amplificación consistió en una primera desnaturalización de 2 min a 94 °C, seguida de 30 ciclos, cada uno de ellos compuesto por 45 s de desnaturalización a 94 °C, 45 s de alineamiento a 60 °C y 45 s de extensión a 72 °C. La extensión final fue de 10 min a 72 °C.

Estandarización de la PCR múltiplex *Vc-m/ctxA/tcp*: se partió con las condiciones descritas por Caffer²⁴ La PCR se llevó a cabo en un volumen final de 25 μ L, buffer de PCR, -Mg 1X (Thermo Fisher Scientific), 2 mM de MgCl₂ (Thermo Fisher Scientific), 0.2 mM de mezcla de dNTP (Thermo Fisher Scientific), 0.8 μ M de cada uno de los primers de *Vc-m* (pvc-f/pvc-m-r1), 0.4 μ M de cada uno de los primers de *ctxA* (CT 94F/CT 614R) (cuadro 2), 0.4 μ M de cada uno de los primers de *tcpA* (TCP 72F/TCP 477R), 1.25 U de Taq ADN polimerasa (Thermo Fisher Scientific), 9.3 μ L de agua calidad molecular y finalmente 2 μ L de ADN; como control positivo y negativo se utilizó el ADN de *Vibrio cholerae* ATCC 14033 (*Vc-m/ctxA/tcp*) y *Escherichia coli* ATCC 25922 sin factores de virulencia, respectivamente. Además se utilizaron 25 μ L de la mezcla de reacción de PCR sin ADN como control del sistema. La amplificación consistió en una primera desnaturalización de 2 min a 94 °C, seguida de 30 ciclos, cada uno de ellos compuesto por 45 s de desnaturalización a 94 °C, 45 s de alineamiento a 60 °C y 45 s de extensión a 72 °C. La extensión final fue de 10 min a 72 °C.

Análisis de los productos de PCR: los productos de la PCR se analizaron en corridas electroforéticas empleando geles de agarosa al 2% (p/v). Las corridas se realizaron a 100 V durante 40 min. Los geles de agarosa fueron teñidos con bromuro de etidio 1 μ g/mL (Fluka Biochemika) durante 15 minutos. Los resultados se analizaron y fotodocumentaron mediante un transiluminador (Vilber Lourmat, Torcy, Francia).

Cuadro 2

Secuencia de los oligonucleótidos iniciadores utilizados en la técnica de PCR múltiplex para la detección de los genes *Vc-m/ctxA/tcpA*

Primers	Gen blanco	Secuencia de oligonucleótidos (5'-3')	Tamaño del fragmento de amplificación (pb)	Referencia
pvc-F2	<i>Vc-m</i>	5' TTAAGCSTTTTCRCTGAGAATG 3'	300	19
pvc-m-r1		5' AGTCACTTAACCATACAACCCG 3'		
TCP 72F	<i>tcpA</i>	5' CACGATAAGAAAACCGGTCAAGAG 3'	451	19
TCP 477R		5' CGAAAGCACCTTCTTTCACGTTG 3'		
CT 94F	<i>ctxA</i>	5' CGCGCAGATTCTAGACCTCTG 3'	564	18
CT 614R		5' CGATGATCTGGAGCATTCCAC 3'		

Validación de la PCR *Vc-m/ctxA/tcpA*+

• Rango de trabajo

Se utilizó la cepa de *Vibrio cholerae* ATCC 14033 (*Vc-m/ctxA/tcp*) en diluciones que abarcan desde 10⁰ a 10⁵. La cepa *Escherichia coli* ATCC 25922 sin factores de virulencia se utilizó como control negativo (10⁰). La PCR múltiplex se repitió por cuadruplicado, en cuatro días distintos por el mismo operador, empleando el mismo equipamiento y los mismos reactivos. Se determinó el límite de detección para la PCR múltiplex (*Vc-m/ctxA/tcpA*).

• Selectividad

Se realizaron amplificaciones de todas las cepas *Vibrio cholerae* toxigénica y cepas de distintos géneros

no productoras de *ctxA* (cuadro 1), empleando como blanco el ADN correspondiente a la dilución 10⁰. Como controles se emplearon las cepas de *Vibrio cholerae* ATCC 14033 y *Escherichia coli* ATCC 25922. La PCR múltiplex (*Vc-m/ctxA/tcpA*) se repitió por quituplicado, en cinco días distintos por dos operadores diferentes, empleando el mismo equipamiento y los mismos reactivos.

• Robustez

Se utilizó la cepa de *Vibrio cholerae* ATCC 14033 (*Vc-m/ctxA/tcpA*), así como 10 cepas referenciales provenientes de aislamientos clínicos cuya identidad de las secuencias genómicas de sus amplificadores corresponden a *ctxA*, *tcpA* y *Vc-m* de *Vibrio cholerae* según

el GenBank (1.532-92, 1.5132-92, 1.5211-92, 1.034-92, 1.079-92, 1.0811-92, 1.0817-92, 1.4696-92, 1.4730-92) (cuadro 1), también se utilizó una cepa de *Escherichia coli* ATCC 25922 (sin factores de virulencia). Los ensayos se realizaron por quintuplicado, se identificaron aquellas variables que puedan afectar el desempeño del ensayo, con operador distinto, días diferentes de realización del ensayo, se utilizó el termociclador 2720 Thermal Cycler (Applied Biosystems).

• Análisis estadístico

Para determinar la utilidad del PCR múltiplex (*Vc-m/ctxA/tcpA*) como prueba diagnóstica para *Vibrio cholerae* se compararon los resultados con los obtenidos en la PCR simple (*Vc-m*) y la PCR múltiplex (*ctxA/tcpA*) antes descritos.

La sensibilidad, especificidad, índice de Youden, los valores predictivos positivos y negativos de las pruebas diagnósticas fueron calculados utilizando el programa para análisis epidemiológico de datos tabulados EPIDAT versión 3.1 en un intervalo de confianza de 95%.

Además se usó la prueba de índice de Kappa de Cohen para evaluar el nivel de concordancia de la PCR múltiplex (*Vc-m/ctxA/tcpA*) con la PCR simple (*Vc-m*) y la PCR múltiplex (*ctxA/tcpA*), también se utilizó este estadístico para evaluar la concordancia entre los dos analistas en los criterios evaluados. Para determinar si la proporción de los resultados fueron iguales en los cinco días de evaluación, se utilizó el estadístico de α de Cochran. Estos análisis estadísticos se realizaron con el programa STATA versión 14.0.

Cuadro 3
Contingencia para el análisis estadístico de los resultados

		PCR simple (<i>Vc-m</i>)		
		Positivo	Negativo	
PCR múltiplex (<i>Vc-m/ctxA/tcpA</i>)	Positivo	A (VP)	B (FP)	A + B
	Negativo	C (FN)	D (VN)	C + D
Total		A + C	B + D	

		PCR Dúplex (<i>ctxA/tcpA</i>)		
		Positivo	Negativo	
PCR múltiplex (<i>Vc-m/ctxA/tcpA</i>)	Positivo	A (VP)	B (FP)	A + B
	Negativo	C (FN)	D (VN)	C + D
Total		A + C	B + D	

Resultados

Estandarización de la PCR múltiplex *Vc-m/ctxA/tcpA*

Se comenzó por evaluar el comportamiento de cada par de primer en las condiciones que se emplearían en la PCR múltiplex. Para ello se preparó una mezcla de reactivos que contenían sólo primers que hibridaban con la secuencia de *Vc-m* y otras que hibridaban con *ctxA/tcpA*. En las condiciones estándares detalladas se produjo una amplificación adecuada de las secuencias seleccionadas.

Cuando se emplearon todos los primers en la misma reacción para realizar la PCR múltiplex (*Vc-m/ctxA/tcpA*), se obtuvo una buena amplificación en dos bandas (*Vc-m* y *tcpA*), sin embargo, la intensidad de la tercer banda (*ctxA*) indicaba un desempeño subóptimo de la amplificación en el formato múltiplex y, por lo tanto, la necesidad de mejorar la sensibilidad de la reacción. Con este objetivo se analizaron los cambios posibles en las condiciones de reacción y se realizaron

distintas experiencias para evaluarlos. Las modificaciones consideradas fueron: distintas temperaturas de alineamiento o hibridación, diferentes concentraciones de $MgCl_2$ y distintas concentraciones de $dNTP$'s.

A continuación se detallan los resultados obtenidos al modificar cada una de las condiciones indicadas.

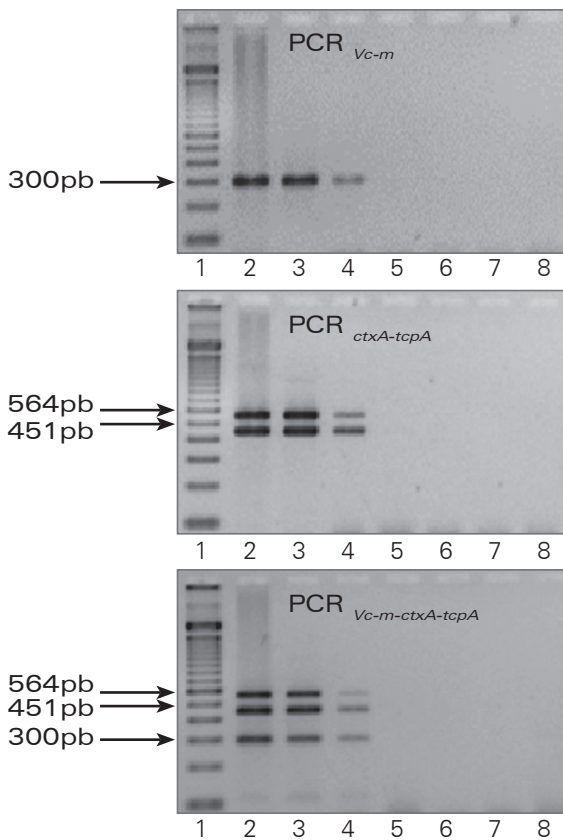
- **Temperatura de alineamiento (hibridación).** Se realizaron ensayos en los que se emplearon distintas temperaturas cercanas a las óptimas para cada par de primers. Se determinó que a 61 °C durante 45 segundos se obtiene la mayor sensibilidad e intensidad de las bandas para cada uno de los amplicones.
- **Concentración de cloruro de magnesio ($MgCl_2$).** Se hicieron ensayos utilizando distintas concentraciones de cloruro de magnesio. El límite de detección de cada uno de los amplicones mejoró de forma significativa con el cambio en la concentración de $MgCl_2$, cuando se utilizó a una concentración final de 3 mM.

- **Concentración de dNTP's.** Se llevaron a cabo ensayos utilizando distintas concentraciones de dNTP's. El límite de detección de las bandas no varió en los rangos de concentración de 0.2 a 0.6 mM, sin embargo, cuando se utilizó a una concentración final de 0.8 mM, esto derivó en una mejoría notable en la detección de las tres bandas.

Con base en todas las experiencias anteriores, las concentraciones finales de los reactivos de la PCR múltiplex (*Vc-m/ctxA/tcpA*) quedaron definidas de la siguiente forma.

Para un volumen final de 25 μ L: buffer de PCR, -Mg 1X (Thermo Fisher Scientific), 3 mM de MgCl₂ (Thermo Fisher Scientific), 0.8 mM de la mezcla de dNTP's (Thermo Fisher Scientific), 0.8 μ M de cada uno de los primers de *Vc-m* (pvc-f/pvc-m-r1), 0.4 μ M de cada uno de los primers de *ctxA* (CT 94F/CT 614R), 0.4 μ M de cada uno de los primers de *tcpA* (TCP 72F/TCP 477R), 1.25 U de Taq ADN polimerasa (Thermo Fisher Scientific), se utilizaron 2 μ L de ADN y capacidad suficiente de agua calidad molecular para 25 μ L.

Figura 1
Electroforesis en gel de agarosa 2% (p/V) de los productos de las reacciones de PCR *Vc-m*, PCR *ctxA-tcpA* y PCR *Vc-m-ctxA-tcpA*. Límite de detección para los tres PCR



Como templado se utilizó ADN obtenido de la lisis de *Vibrio cholerae* ATCC 14033 en diluciones equivalentes a 10⁰ a 10⁻⁵ bacterias/reacción. Carril 1: Marcador de tamaño de pares de base (pb), Carriles del 2-7: rango de diluciones que van de 10⁰ a 10⁻⁵. Carril 8: *Escherichia coli* ATCC 25922 10-0.

Validación de la PCR *Vc-m/ctxA/tcp*

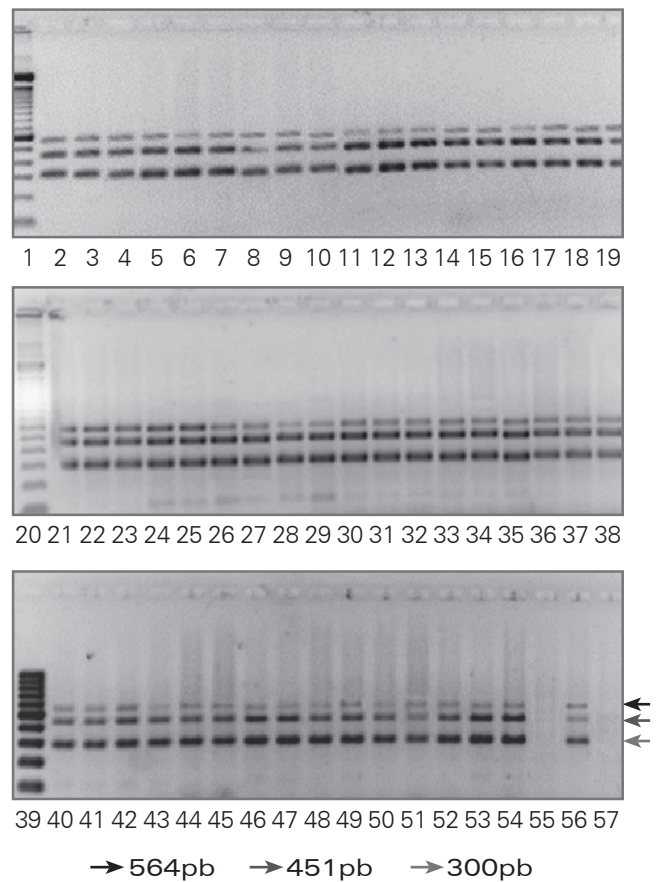
- **Rango de trabajo**

La cepa de *Vibrio cholerae* ATCC 14033 analizada tanto por las PCR simples como por la PCR múltiplex, presentó un rango de detección que abarca desde la dilución 10⁰ a 10⁻². Esto indica que se lograron las condiciones óptimas de la PCR múltiplex para conservar la sensibilidad de las reacciones individuales (figura 1). La cepa analizada presentó como límite de detección la dilución correspondiente a 10⁻¹. Los resultados obtenidos con la cepa *Escherichia coli* ATCC 25922 (sin factores de virulencia) fueron negativos.

- **Selectividad**

Inclusividad. La totalidad de las cepas de *Vibrio cholerae* toxigénica estudiadas presentaron las bandas esperadas para los genes correspondientes, al utilizar el ADN equivalente a la dilución 10⁰. Así, las cepas presentaron bandas de 300 pb (*Vc-m*), 451 pb (*tcpA*) y 564 pb (*ctxA*). Parte de los resultados se muestra en la figura 2.

Figura 2
Inclusividad de la técnica de PCR múltiplex para la detección de *Vc-m-ctxA-tcpA**



Carriles 1, 20 y 39: marcador de tamaño de pares de base (pb), carriles del 2 al 19, 21 al 38 y del 40 al 54: cepas de *Vibrio cholerae* proveniente de aislados clínicos. Carril 55: *Escherichia coli* ATCC 25922. Carril 56: cepa de *Vibrio cholerae* ATCC 14033. Carril 57: control del sistema.

• Exclusividad

La totalidad de las cepas de distintos géneros no productoras de *ctxA* no presentaron señal positiva para los fragmentos genómicos evaluados, al utilizar el ADN correspondiente a 10^0 .

En este criterio de validación los ensayos fueron llevados a cabo por dos operadores y se evaluó la concordancia de la técnica de PCR múltiplex (*Vc-m/ctxA/tcpA*). Mediante el estadístico de Kappa de Cohen se obtuvo un valor de 1 verificando que existe una alta concordancia entre los dos operadores. También se pudo evaluar la significación obteniendo el estadístico z con un valor de 13.04 y la prueba chi 2 de independencia observando un valor significativo ($p < 0.05$).

Mediante el estadístico de α de Cochran se pudo determinar que la proporción de casos negativos detectados por la prueba PCR múltiplex (*Vc-m/ctxA/tcpA*) presentó una proporción de 33:1, además fue posible determinar que no existieron diferencias significativas en los resultados obtenidos en los cinco días en la prueba evaluada ($\alpha = 0.000$; $p > 0.05$).

En la determinación de la exclusividad, las 31 cepas de distintos géneros no tóxicas fueron negativas en una concentración de 10^0 en la mezcla de reacción de PCR.

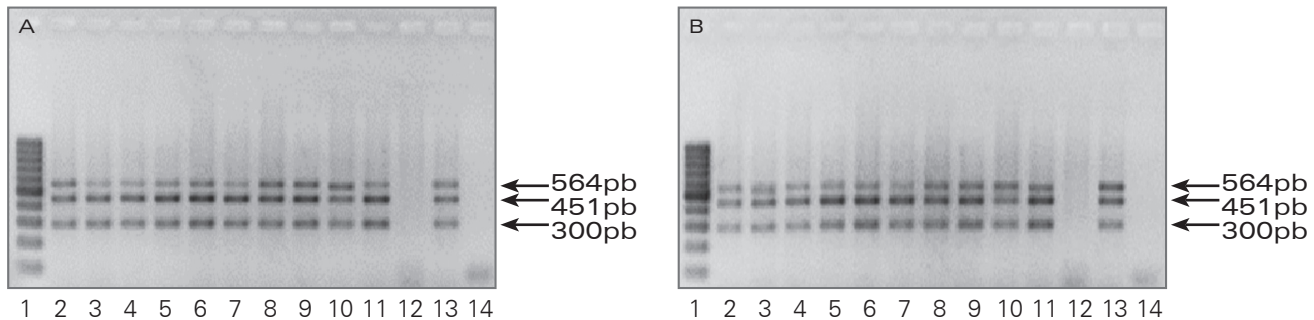
• Robustez

Las 11 cepas estudiadas presentaron las tres bandas esperadas en un total de 10 repeticiones que incluyeron dos operadores y realizados en cinco días distintos. Se demuestra así que la PCR es resistente al cambio de respuesta cuando se introducen variaciones deliberadas tanto por el operador como en los distintos días (figura 3). En un total de cinco repeticiones se obtuvieron las tres bandas esperadas, empleando como blanco el ADN correspondiente a la dilución 10^0 .

Se logró concordancia de la técnica de PCR múltiplex (*Vc-m/ctxA/tcpA*) para los dos operadores mediante el estadístico de Kappa de Cohen obteniendo un valor de 1, lo que corrobora la alta concordancia de los resultados obtenidos. También se pudo evaluar la significación obteniendo el estadístico z con un valor de 8.06 y la prueba chi 2 de independencia observando un valor significativo ($p < 0.05$).

Mediante el estadístico de α de Cochran se pudo determinar que la proporción de casos detectados de *Vibrio cholerae* por la prueba PCR múltiplex (*Vc-m/ctxA/tcpA*) presentó una proporción de 52:2, además fue posible determinar que no existieron diferencias significativas en los resultados obtenidos en los cinco días en la prueba evaluada ($\alpha = 0.000$; $p > 0.05$).

Figura 3
Robustez de la técnica de PCR múltiplex para la detección de *Vc-m-ctxA-tcpA**



A: operador 1. B: operador 2 (se muestran algunas imágenes de las cinco repeticiones). Carril 1: marcador de tamaño de pares de base (pb), carriles del 2 al 11: cepas referenciales de *Vibrio cholerae* proveniente de aislados clínicos. Carril 12: *Escherichia coli* ATCC 25922. Carril 13: cepa de *Vibrio cholerae* ATCC 14033. Carril 14: control del sistema.

Discusión

En los últimos años se han desarrollado muchas técnicas basadas en PCR, las cuales permiten identificar y caracterizar factores de virulencia de microorganismos patógenos presentes en muestras clínicas, de animales, de alimentos y ambientales.

Los métodos microbiológicos actualmente utilizados para la detección de *Vibrio cholerae* presentan desventajas en el tiempo de diagnóstico. La detección del cólera requiere una prueba rápida, por lo que el tiempo es un factor crítico para determinar la utilidad de cualquier método de detección.

Los avances en técnicas de biología molecular han abierto la posibilidad de un diagnóstico más rápido y especí-

fico a través de la PCR convencional y la PCR dúplex, las cuales permiten identificar y caracterizar los factores de virulencia de *Vibrio cholerae*.¹⁸⁻²² Las pruebas de detección basadas en PCR son rápidas y sensibles técnicas de diagnóstico primario y de patogenidad, donde los genes específicos del biotipo, como el *Vc-m* (16S-23S)^{18,23,24} y *ompW*¹⁶ se utilizan para identificar la presencia de *Vibrio cholerae*, y *ctxA* y *tcpA*¹⁶ se usan para identificar y caracterizar los factores de virulencia como la toxina del cólera.

En el presente trabajo se estandarizó y se validó una PCR múltiplex utilizando como secuencias blanco el fragmento específico para *Vibrio cholerae*, que pertenece a una región del operón *rRNA*, de las regiones espaciadoras intergénicas (IRSS) localizadas entre 16S y 23S del rADN (*Vc-m*),¹⁸

el fragmento del gen *ctxA* que codifica para la subunidad A de la toxina y el fragmento del gen *tcpA* que codifica para la proteína efectora (subunidad del pili) específica del biotipo El Tor, ya que esta proteína es polimórfica. Los tamaños de los productos de amplificación (300 pb para Vc-m, 451 pb para *tcpA* y 564 pb para *ctxA*) se pueden diferenciar muy bien en un gel de agarosa. Asimismo, las temperaturas de hibridación son compatibles con los distintos cebadores.

En nuestro estudio se estandarizó la técnica de la PCR múltiple y luego fue validada. Ésta es una condición indispensable para que la técnica pueda ser aplicada en la detección de un agente etiológico, por lo tanto el desempeño de la técnica debe estar bien definida y asegurada adecuadamente.²⁶ La Organización Internacional de Normalización define validación como la confirmación mediante la aportación de evidencia objetiva de que se han cumplido los requisitos para una utilización o aplicación específica prevista.^{26,27}

En esta investigación se ha podido determinar que el desempeño de la validación de la PCR múltiple Vc-m/*ctxA*/*tcpA* fue óptimo, ya que se obtuvo un límite de detección igual al de cada PCR realizada individualmente, al utilizar el ADN correspondiente a la dilución de 10⁻¹. No se observaron interferencias al utilizar concentraciones elevadas de ADN (10⁻⁰) cuando se determinó el rango de trabajo, lo que implica una excelente sensibilidad para el diagnóstico de la patología.

La extracción de ADN mediante el hervido a 100 °C permitió extraer concentraciones óptimas de ADN para la PCR, debido a que es una técnica rápida, fácil y económica en comparación con el uso de kits de extracción y de equipos comerciales. Por este motivo, dicha técnica de extracción se utilizó en todas las etapas de la validación.

Los ensayos de selectividad permitieron evidenciar el adecuado desempeño de la PCR múltiple, ya que presentó 100% en los resultados de inclusión y exclusión, lo cual demuestra un desempeño óptimo.

Finalmente, se demostró la robustez de la técnica mediante resultados 100% concordantes al cambiar de analista y realizando el ensayo en cinco días distintos. Para el desempeño de la PCR múltiple en este parámetro se probó en total en diez situaciones diferentes.

La estandarización y posterior validación de la PCR múltiple realizada en el Laboratorio de Referencia Nacional de Enteropatógenos del Instituto Nacional de Salud, por operadores distintos, utilizando los mismos reactivos, en diferentes días, además de corroborar los parámetros considerados, confirmó la repetibilidad y reproducibilidad de la técnica, por lo tanto provee una técnica rápida, precisa, segura y selectiva para la identificación de cepas de *Vibrio cholerae* toxigénica de aislados clínicos luego de un aislamiento primario.

Referencias

- Pang, B., Yan, M., Cui, Z., Ye, X., Diao, B. y Ren, Y., "Genetic diversity of toxigenic and nontoxigenic *Vibrio cholerae* serogroups O1 and O139 revealed by array-based comparative genomic hybridization", *Journal of Bacteriology*, 2007; 4837-4849.
- Barua, D., *History of cholera*, Nueva York, Plenum, 1992.
- Colwell, R., "Global climate and infectious disease: the cholera paradigm", *Science*, 1996, 274: 2025-2031.
- Goel, A.K., Ponmariappan, S., Kambol, D.V. y Singh, L., "Single multiplex polymerase chain reaction for environmental surveillance of toxigenic-pathogenic O1 and non-O1 *Vibrio cholerae*", *Folia Microbiol*, 2007, 52: 81-85.
- Xu, J., Zhang, J., Lu, X., Liang, W., Zhang, L. y Kan, B., "O antigen is the receptor of *Vibrio cholerae* serogroup O1 El Tor typing phage VP4", *J Bacteriol*, 2013, 195: 798-806.
- De, S.N., "Enterotoxicity of bacteria-free culture filtrate of *Vibrio cholerae*", *Nature*, 1959, 183: 1533-1534.
- Taylor, R.K., Miller, V.L., Furlong, D.B. y Mekalanos, J.J., "Use of pho gene fusions to identify a pilus colonization factor coordinately regulated with cholera toxin", *Proc Natl Acad Sci*, 1987, 84: 2833-2837.
- Dalmasso, A., Civera, T. y Bottero, M.T., "Multiplex primer-extension assay for identification of six pathogenic vibrios", *International Journal of Food Microbiology*, 2009, 129: 21-25.
- Kaper, J.B., Morris, J.G. Jr. y Levine, M.M., "Cholera", *Clinical Microbiology Reviews*, 1995, 8: 48-86.
- You, Y., Fu, C., Zeng, X., Fang, D., Yan, X., Sun B. *et al.*, "A novel DNA microarray for rapid diagnosis of enteropathogenic bacteria in stool specimens of patients with diarrhea", *Journal of Microbiological Methods*, 2008, 75: 566-571.
- Kumar, P., Peter, W.A. y Thomas, S., "Rapid detection of virulence-associated genes in environmental strains of *Vibrio cholerae* by multiplex PCR", *Current Microbiology*, 2010, 3: 199-202.
- Kurazono, H., Pal, A., Bag, P.K., Nair, G.B., Karasawa, T.T., Mihara, T. *et al.*, "Distribution of genes encoding cholera toxin, zonula occludens toxin accessory cholera toxin, and El Tor hemolysin in *Vibrio cholerae* of diverse origins", *Microbial Pathogenesis*, 1995, 18: 231-235.
- Faruque, S.M., Albert, M.J. y Mekalanos, J.J., "Epidemiology, genetics, and ecology of toxigenic *Vibrio cholerae*", *Microbiol Mol Biol Rev*, 1998, 62: 1301-1314.
- Pichel, M., Rivas, M., Martin, F., Ibarra, C. y Binszttein, N., "Genetic diversity and emergence of a new variant of *Vibrio cholerae* O1 isolated in Argentina", *J Clin Microbiol*, 2003, 41: 124-134.
- Perilla, M.J. *et al.*, *Manual de laboratorio para la identificación y prueba de susceptibilidad a los antimicrobianos de patógenos bacterianos de importancia para la salud pública en el mundo en desarrollo*, Organización Mundial de la Salud, Ginebra, 2003.
- Mehrabadi, J.F., Morsali, P., Nejad, H.R. e Imani Fooladi, A.A., "Detection of toxigenic *Vibrio cholerae* with new multiplex PCR", *J Infect Public Health*, 2012, 5 (3): 263-267.
- Tarr, C.L., Patel, J.S., Puh, N.D., Sowers, E.G., Bopp, C.A. y Strockbine, N.A., "Identification of *Vibrio* isolates by a multiplex PCR assay and rpoB sequence determination", *Journal of Clinical Microbiology*, 2007: 134-140.
- Chun, J., Huq, A. y Colwell, R.R., "Analysis of 16S-23S rRNA intergenic spacer regions of *Vibrio cholerae* and *Vibrio mimicus*", *Applied and Environmental Microbiology*, 1999, 65 (5): 2202-2208.

19. Rivera, I., Lipp, E., Gil, A., Choopun, N., Huq, A. y Colwell, R., "Method for extraction and application of multiplex PCR to detect toxigenic *V. cholerae* O1 and O139 from aquatic ecosystems", *Environm Microbiol*, 2003, 5: 599-606.
20. Nandi, B., Nandy, R.K., Mukhopadhyay, S., Nair, G.B., Shimada, T., Asoke, C. *et al.*, "Rapid method for species-specific identification of *Vibrio cholerae* using primers targeted to the gene of outer membrane protein Omp W", *Journal of Clinical Microbiology*, 2000, 38 (11): 4145-4151.
21. Fields, P.I., Popovic, T., Wachsmuth, K. y Olsvik, O., "Use of polymerase chain reaction for detection of toxigenic *Vibrio cholerae* O1 strains from the Latin American cholera epidemics", *J Clin Microbiol*, 1992, 30: 2128-2121.
22. Binsztein, N., Costagliola, M., Pichel, M., Jurquiza, V., Ramírez, F., Akselman, R., Vacchino, M., Huq, A. y Colwell, R., "Viable but nonculturable *Vibrio cholerae* O1 in the aquatic environment of Argentina", *Appl Environ Microbiol*, 2004, 70: 7481-7486.
23. González Fraga, S., Villagra-Trejo, A., Pichel, M., Figueroa, S., Merletti, G., Caffer, M., Cecilia-Castillo, M. y Binsztein, N., "Caracterización de aislamientos de *Vibrio cholerae* no-O1, no-O139 asociados a cuadros de diarrea", *Rev Argent Microbiol*, 2009, 41 (1): 11-19.
24. Caffer, M.I. *et al.*, *Manual de procedimientos: aislamiento, identificación y caracterización de Vibrio cholerae*, Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas-ANLIS Dr. Carlos Malbrán-Centro Regional de Referencia de la OMS Global Salm Surv para América del Sur, 2007.
25. *Manual de Laboratorio Cólera*, Serie de Normas Técnicas N° 2, Instituto Nacional de Salud, 1994.
26. Trullols, E., Ruisánchez, I. y Xavier Rius, F., "Validation of analytical methods", *Trends Analyt Chem*, 2004, 23: 137-145.
27. Leotta, G.A., Chinen, I., Epszteyn, S., Miliwebsky, E., Melamed, I.C., Motter, M. *et al.*, "Validación de una técnica de PCR múltiple para la detección de *Escherichia coli* productor de toxina Shiga", *Rev Argent Microbiol*, 2005, 37: 1-10.

Fuente de Financiamiento

Este trabajo fue financiado por el Instituto Nacional de Salud (INS)

Conflicto de interés

Los autores declaran no tener conflictos de interés.