

Ensayo anidado de la reacción en cadena de la polimerasa específico para los genes de la toxina del cólera

Karen Marrero-Domínguez, Heidy Peidro-Guzmán, Talena Ledón-Pérez y Rafael Fando-Calzada

Departamento de Biología Molecular, Área Enfermedades Infecciosas, Centro Nacional de Investigaciones Científicas, CNIC Ave. 25 y Calle 158, Playa, Apartado Postal 6412, La Habana, Código Postal 10 600, Cuba. karen.marrero@cnic.edu.cu

Recibido: 25 de noviembre de 2016.

Aceptado: 30 de diciembre de 2016.

Palabras clave: Candidato vacunal *V. cholerae* 638, PCR anidado, genes de la toxina del cólera.
Key words: Vaccine candidate *V. cholerae* 638, nested PCR, cholera toxin genes

RESUMEN. El candidato vacunal vivo contra el cólera CV638 contiene como ingrediente activo a la cepa atenuada genéticamente *Vibrio cholerae* 638, que se obtuvo a partir de la cepa de *V. cholerae* toxigénica C7258, mediante la remoción de los genes de la toxina del cólera (*ctxAB*). El uso de vacunas vivas atenuadas demanda ensayos que demuestren la estabilidad de la mutación atenuante; así como la ausencia de células infecciosas de tipo salvaje toxigénicas. El objetivo del presente trabajo fue diseñar un ensayo de PCR anidado específico para los genes *ctxAB* y evaluar su límite de detección en preparaciones del CV638 contaminadas con cantidades conocidas de la cepa toxigénica C7258Kn. Se diseñó un par de cebadores específicos para los genes *ctxAB* y se establecieron sus condiciones de empleo en cuanto a la temperatura de hibridación y concentración de $MgCl_2$. El límite de detección del ensayo de PCR anidado de células de *V. cholerae* toxigénica C7258Kn se determinó en preparaciones de CV638 contaminadas artificialmente con cantidades crecientes de dicha bacteria. El límite de detección se evaluó estadísticamente y fue de ~50 unidades formadoras de colonias (UFC) de la cepa toxigénica por dosis de CV638, valor inferior que la menor dosis infectiva informada para *V. cholerae* (10^3 UFC). Una vez validado, el ensayo de PCR anidado puede ser empleado como control de pureza durante el control de calidad del CV638.

ABSTRACT. The active ingredient of the live vaccine candidate CV638 is the genetically attenuated strain *Vibrio cholerae* 638, which was obtained from the wild type toxigenic *V. cholerae* strain C7258, by deleting the cholera toxin genes (*ctxAB*). The use of live attenuated vaccines requires assays that ensure the stability of the attenuating mutation; as well as the lack of wild type toxigenic infectious cells. The present study was aimed at designing a nested PCR assay specific for *ctxAB* genes and evaluating its detection limit in lots of CV638 contaminated with known amounts of the toxigenic strain C7258Kn. One primer pairs specific for *ctxAB* genes were designed and PCR conditions respect to annealing temperature and $MgCl_2$ concentration was established. The detection limit of the nested PCR assay of *V. cholerae* toxigenic bacteria was determined in CV638 preparations contaminated with increasing amounts of toxigenic vibrios. The detection limit was evaluated statistically and it was found to be ~ 50 colony forming units (CFU) of the toxigenic strain per CV638 dose, value lower than the smaller infective dose informed for *V. cholerae* (10^3 CFU). Once validated, the described nested PCR assay could be used as a purity control assay during the quality control testing of CV638.

INTRODUCCIÓN

El cólera se produce por la ingestión de agua o alimentos contaminados con la bacteria enterotoxigénica *Vibrio cholerae* de los serogrupos O1 u O139.¹ Este patógeno secreta la enterotoxina del cólera, causante de las abundantes diarreas característica de la enfermedad,^{2,3} las que pueden conllevar rápidamente a una deshidratación severa y la muerte, si no se tratan prontamente. Se estima que globalmente ocurren hasta 2,9 millones de casos y 95,000 muertes por cólera en 69 países donde es endémico.⁴ En el 2015, 172 454 casos y 1304 muertes de cólera se reportaron a la Organización Mundial de la Salud (OMS).⁵ El 41%, 37% y 21% de los casos reportados se correspondieron a África, Asia y América, respectivamente. La vacunación contra el cólera se encuentra entre las medidas que pueden ayudar a reducir el impacto en morbilidad y mortalidad de la enfermedad en estas regiones en un corto plazo.^{6,7}

En el 2013, la OMS creó una reserva global de más de dos millones de dosis de vacunas orales muertas para aumentar su acceso en situaciones epidémicas y en regiones endémicas y hasta la fecha se han empleado más de cinco millones

de dosis en campañas masivas de vacunación.⁸ El empleo de estas vacunas ha demostrado la efectividad y viabilidad de implementar estas campañas como una herramienta de control, al proteger a las poblaciones en alto riesgo de sufrir cólera. Todo esto ha promovido un auge en el desarrollo de las vacunas contra esta enfermedad.⁶ Entre las variantes de vacunas más promisorias se encuentran las vivas atenuadas, dado que tienen la potencialidad de proveer una protección a más largo plazo con una única dosis,^{9,10} esquema de más fácil administración.

El candidato vacunal vivo contra el cólera CV638,¹¹ producido por el Instituto Finlay, contiene como ingrediente activo a la cepa atenuada genéticamente *V. cholerae* 638.¹² Esta cepa se obtuvo a partir de la cepa toxigénica C7258, mediante la remoción de los genes de la toxina del cólera (*ctxAB*) y posterior remplazo del gen *hapA* codificante de la hemaglutinina proteasa por un gen marcador que codifica para la endoglucanasa A (*celA*) de *Clostridium thermocellum*. De acuerdo con las regulaciones establecidas por el Centro para el Control Estatal de la Calidad de los Medicamentos (CECMED), la liberación de los lotes vacunales de CV638 requiere la demostración de la estabilidad de la mutación atenuante; así como la ausencia de células infecciosas de tipo salvaje, como un control de seguridad y pureza. La identificación de este tipo de cepas en las preparaciones vacunales requiere desarrollar métodos moleculares que sean capaces de detectar pequeñas cantidades del organismo en cuestión y que puedan ser realizados rutinariamente por los laboratorios de control y producción. Con este propósito, un ensayo simple de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés, *polymerase chain reaction*), específico para los genes *ctxAB*, se desarrolló previamente con un límite de detección de $\sim 7 \times 10^3$ unidades formadoras de colonias (UFC) de una cepa toxigénica por dosis del candidato vacunal CV638. Este valor es menor que la dosis infectiva de *V. cholerae* O1 en individuos sanos (10^5 – 10^8 UFCmL⁻¹),¹³ pero en algunos individuos con baja acidez estomacal la dosis infectiva de *V. cholerae* O1 se ha estimado en aproximadamente 10^3 UFCmL⁻¹,¹⁴ por lo que sería recomendable desarrollar métodos moleculares más sensibles que el reportado previamente, para ser empleado como una prueba adicional de la seguridad del candidato vacunal.

El ensayo de PCR anidado es un método muy sensible, que permite aumentar el rendimiento y la especificidad de la amplificación del ADN diana, ya que el producto de una primera amplificación es utilizado como molde para realizar una segunda amplificación con cebadores que se ubican dentro de la primera secuencia amplificada.^{15,16} Teniendo en cuenta estos antecedentes, el presente estudio tuvo como objetivo desarrollar un ensayo de PCR anidado a partir del ensayo simple de PCR específico para los genes *ctxAB* descrito previamente¹³ y evaluar el límite de detección de vibriones toxigénicos contaminantes en el candidato vacunal CV638.

MATERIALES Y MÉTODOS

Cepas bacterianas, medios y condiciones de cultivo

Las cepas de *V. cholerae* toxigénica C7258Kn (Serogrupo O1, biotipo El Tor, serotipo Ogawa, C7258ΔVC2215-VC2216::kn)¹⁷ y la atenuada 638 (C7258 ΔCTXΦ, *hap::celA*)¹⁸ se usaron como fuente de ADN genómico empleados como molde durante el establecimiento del ensayo de PCR.

Para la propagación de las cepas bacterianas se utilizó el caldo Luria-Bertani (LB) y el LB sólido se preparó por adición de agar al 1,5 %. Para el cultivo y selección de la cepa C7258Kn el medio de cultivo se suplementó con kanamicina (Kan), a 50 µg mL⁻¹. Los cultivos se incubaron a 37°C durante 16h y cuando fue necesario con agitación a 240 revmin⁻¹.

Purificación de ADN cromosomal

La purificación del ADN total a partir de las muestras de interés se realizó empleando el método de Ausubel y cols, según lo descrito anteriormente.¹³ Durante la purificación se tomaron numerosas precauciones para evitar la contaminación cruzada de las muestras (empleo de soluciones de reactivos frescas, purificación y manipulación de las muestras en gabinete de seguridad y utilización de puntas con filtro durante todo el proceso de purificación, entre otras). El ADN precipitado se resuspendió en 50 µL de agua para inyección, mediante pipeteos repetidos y se conservó a 4°C hasta su utilización. La concentración e integridad de cada muestra se evaluó espectrofotométricamente (espectrofotómetro Eppendorf, EUA) y por electroforesis en geles de agarosa al 0,8%, respectivamente.

Selección y síntesis de los cebadores

Los cebadores se diseñaron internos a la región del operón *ctxAB* amplificada en el trabajo previo,¹³ según la secuencia nucleotídica de la cepa *V. cholerae* N16961,¹⁹ empleando el programa GeneRunner v3.05 (Hastings Software, Inc., New York, EUA). La especificidad de los cebadores se evaluó *in silico* utilizando el programa Primer-Blast (20 de noviembre de 2016; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) y como molde la base de datos de cromosomas de referencia del Centro Nacional para la Información Biotecnológica (NCBI, del inglés, *National Center for Biotechnology Information*, EUA) de los grupos *Vibrionacea* (taxid:641) y *Enterobacteriaceae* (taxid:543). Además, la especificidad de los cebadores se evaluó con el programa BLASTn v2.5.1 (21 de noviembre de 2016; http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&PAGE_TYPE=BlastSearch&LINK_LOC=blasthome), utilizando la base de datos de cromosomas de todos los organismos de la especie *V. cholerae* y *Escherichia coli*;

así como la base de datos de secuencias nucleotídicas no redundantes. Los cebadores seleccionados se sintetizaron en el Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología, CIGB (Habana).

Selección de la temperatura de hibridación y concentración de MgCl₂ en ensayo de PCR simple con cebadores internos

Los reactivos y las concentraciones empleados en estas reacciones fueron: cebadores (0,5 pmol μL^{-1} ; CIGB, La Habana), mezcla de deoxynucleósidos trifosfato (200 μmolL^{-1} ; Promega, Madison WI, EUA), tampón de PCR 1X (Roche), 1 U de ADN polimerasa Taq (CIGB, Sancti Spiritus) y MgCl₂ (1,5 mmolL⁻¹; Promega, Madison WI, EUA). Se añadieron cantidades variables de ADN molde en un volumen de 2 μL , según el propósito final de la reacción. Las reacciones de PCR se realizaron en el equipo de ciclos térmicos Eppendorf (EUA).

Para seleccionar la temperatura de hibridación del ensayo, se utilizaron 100 ng de ADN molde de la cepa C7258Kn y las reacciones se sometieron a 25 ciclos de amplificación compuestos de tres pasos a 94°C, a la temperatura de hibridación evaluada (45, 50, 55, 60 o 65°C) y a 72°C de 30 seg cada uno, luego de un primer paso de desnaturalización de 2 min a 94°C. Se incluyó además un paso de extensión final a 72°C durante 2 min. Condiciones similares se emplearon para seleccionar la concentración de MgCl₂ a utilizar en el ensayo, evaluando 1,5; 2,0; 2,5; 3,0 y 3,5 mmolL⁻¹ de la sal y 40 ciclos de amplificación. Como controles se incluyeron reacciones que contenían agua destilada y los demás reactivos, pero no ADN molde.

Selección del número de ciclos de la primera etapa de PCR anidado y evaluación preliminar del límite de detección del ensayo con ADN cromosomal de la cepa *V. cholerae* C7258Kn

Las reacciones de amplificación de ambas etapas se hicieron en un volumen final de 20 μL . En la primera etapa del PCR anidado se empleó como cebadores externos los descritos previamente, 5'-CCCAAAGTCTAGGTGTAATAATTC-3' y 5'-GCAATCCTCAGG GTATCCTTC-3', según las condiciones establecidas¹³ a 0,5 o 1,0 pmol μL^{-1} . El programa de amplificación constó de un paso inicial de desnaturalización a 94°C por 2 min, seguido de 10, 15 o 20 ciclos de tres pasos a 94°C, 50°C y 72°C por 30 segundos cada uno. Se utilizó un paso extensión final de 2 min a 72°C. Alícuotas de 2 μL de la reacción de la primera etapa se utilizaron como molde en la reacción de la segunda etapa que contenía los cebadores internos a 1 pmol μL^{-1} . El programa de amplificación de esta etapa constó de un paso inicial de desnaturalización a 94°C por 2 min, seguido de 40 ciclos de tres pasos a 94°C, 50°C y 72°C por 30 segundos cada uno. Se utilizó un paso de extensión final de 2 min a 72°C.

Para evaluar preliminarmente el límite de detección del ensayo anidado con ADN cromosomal de la cepa *V. cholerae* C7258Kn se realizaron diluciones seriadas (de base 10) del ADN genómico para la obtención de soluciones con concentraciones de ADN desde 1 ng μL^{-1} hasta 10 fg μL^{-1} . Alícuotas de 1 μL de cada suspensión por duplicado se emplearon para determinar la sensibilidad del ensayo de PCR. Las diluciones se prepararon tres veces y se ensayaron en duplicado, en tres ensayos de PCR independientes.

Contaminación de las dosis del candidato vacunal CV638 con la cepa toxigénica C7258Kn y extracción de ADN total

La contaminación *in vitro* de las dosis de CV638 (~10¹⁰ unidades formadoras de colonias (UFC) por dosis) con cantidades crecientes de la cepa C7258Kn (10, 10², 10³ y 10⁴ UFCmL⁻¹) se realizó según lo descrito previamente.¹³ Como control negativo se empleó a CV638 en solución salina. El número de UFC de las cepas de *V. cholerae* C7258Kn presente en las diluciones empleadas para contaminar las preparaciones vacunales y 638 presente en las preparaciones se cuantificó, por triplicado, según lo informado previamente.¹³ La purificación del ADN total a partir de las dosis contaminadas y el control negativo en salina se realizó empleando el método de Ausubel y cols, según lo descrito anteriormente.¹³

Evaluación del límite de detección del ensayo de PCR de la cepa toxigénica C7258Kn en lotes de CV638 contaminados con cantidades crecientes de la cepa C7258Kn

Para determinar el límite de detección del ensayo con un 95% de confianza, el ADN purificado de cuatro bulbos de cada condición (contaminadas con aproximadamente 10, 10², 10³ o 10⁴ células de *V. cholerae* C7258Kn) se purificó y cada muestra de ADN obtenida se evaluó mediante el ensayo de PCR anidado 12 veces en reacciones independientes, obteniéndose 48 réplicas por condición.

Detección de los amplicones y análisis densitométrico de las imágenes

Los productos de amplificación se separaron por electroforesis en geles de agarosa al 2% (m/v) y se visualizaron por tinción con bromuro de etidio (0,5 mg mL⁻¹) e incidencia de luz ultravioleta en transiluminador (Reuser, S.L, EUA). Cada gel se digitalizó para realizar, cuando fue necesario, el análisis densitométrico con el programa GuefastScan (<<http://www.neuronicsa.com/modulos/producto/guefast.htm>>).

Evaluación estadística

Para todos los análisis estadísticos se empleó el paquete GraphPad Prism, versión 5 (<<http://www.graphpad.com/scientific-software/prism-5-trial.software.informer.com>>) y el nivel de significación se

fijó en 0,05. La normalidad de los datos se verificó con la prueba de Kolmogorov-Smirnov (<<http://www.physics.csbsju.edu/stats/KS-test.html>>) y la homocidasticidad de múltiples grupos de muestras se comprobó por la prueba de Bartlett (<<http://www.itl.nist.gov/div898/handbook/eda/section3/eda357.htm>>). Se usó el ANOVA (del inglés, *Analysis of variance*) de clasificación simple para comparar los datos de las intensidades relativas de las bandas de PCR obtenidas en las reacciones para evaluar el efecto de la temperatura de hibridación, obtenidas del análisis mediante GuefastScan. Las comparaciones *a posteriori* se hicieron por el Test de Tukey (<<http://www.iasri.res.in/.../12-multiple-comparison-procedure.pdf>>). Para determinar el límite de detección del ensayo de PCR anidado con un 95% de confianza, el porcentaje de positividad de las reacciones de PCR obtenido para cada condición se ajustó con una ecuación de cuatro parámetros, que es un modelo general de ajuste de curva apropiado para generar curvas de calibración mediante el programa GraphPad Prism.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Previamente se han descrito al menos dos ensayos de PCR para detectar los genes de la toxina del cólera en las preparaciones vacunales vivas de *V. cholerae*.^{13, 20} En el presente estudio se describe el desarrollo de la variante anidada del PCR, mediante la amplificación de un fragmento interno al amplificado en el estudio previo de Peidro-Guzmán y cols.¹³

Selección de cebadores internos a los genes *ctxAB* y análisis de su especificidad

Los cebadores seleccionados hibridaron internos al fragmento amplificado en el ensayo de PCR simple descrito anteriormente.¹³ La secuencia de los cebadores fueron 5'-TGA CGA ATA CCA ATC TAA AGT T-3' y 5'-CCA GCT AGA GAT TCT GTA TAC G-3', que comprenden los nucleótidos 687-708 y 140-161 de *ctxA* (http://www.genome.jp/dbget-bin/www_bget?vch:VC1457) y *ctxB* (http://www.kegg.jp/dbget-bin/www_bget?vch:VC1456) de la cepa *V. cholerae* N16961, respectivamente. El análisis *in silico* de la especificidad de estos cebadores con el programa Primer-Blast, empleando como molde la base de datos de los genomas de referencia de los grupos *Vibrionaceae* y *enterobacteriaceae*, predijo que los cebadores amplificaban un único fragmento de 248 pb a partir del genoma de la cepa *V. cholerae* N16961. El análisis empleando como molde la base de datos de todos los genomas de estas familias, predijo la amplificación del fragmento de 248 pb a partir de cepas de *V. cholerae* pertenecientes al serogrupo O1 de los biotipos El Tor (ATCC 11629, TSY216, I-1300, FJ147, MS6, G4222, IEC224; así como aislados clínicos de Haití) y clásico (O395); así como del serogrupo O139 (MO10).

Por último, la sensibilidad de cada cebador para detectar las variantes génicas secuenciadas de los genes *ctxA* y *ctxB* se analizó mediante el programa Blastn, empleando como molde la base de datos de secuencias nucleotídicas no redundante. Este análisis reveló que la secuencia del cebador *ctxA* es 100% idéntica a todas las secuencias de *V. cholerae* informadas (119) excepto a las secuencias de una cepa serotipo Inaba aislada en Vietnam (número de acceso AJ575590.1) y dos cepas de serogrupo O1 aisladas en la India (cepas 0501 y 0701, con número de acceso GQ889284.1 y GQ889304.1, respectivamente) con las cuales es 95% idéntica. En el caso de la secuencia del cebador que hibrida en el gen *ctxB*, esta es 100% idéntica a todas las secuencias analizadas (227) excepto a la secuencia de la cepa *V. cholerae* DN19, un aislado clínico de la India de 2012 (número de acceso KJ730043.1). Además, el cebador de *ctxB* (nucleótidos 140-161) debe reconocer los 12 genotipos diferentes establecidos para este gen, sobre la base de las variaciones conservadas no aleatorias en los nucleótidos 58, 72, 83, 101, 115, 138, 165 y 203.²¹

En conjunto, los resultados de los análisis *in silico* realizados predijeron que el par de cebadores seleccionados debe amplificar a los genes *ctxAB* en la mayoría de las cepas de *V. cholerae* descritas, pertenecientes tanto al biotipo El Tor como Clásico, de los serogrupos O1 así como el O139. No obstante, la validación definitiva de la especificidad de los cebadores está dada por su evaluación experimental frente a un ADN diana.²² En ensayo de PCR simple se evaluó la especificidad de los cebadores, utilizando como ADN moldes representativos el de las cepas *V. cholerae* 638 y C7258Kn. El par de cebadores no amplificó ninguna banda visible en la cepa vacunal, que carece de los genes *ctxAB* (Fig. 1, carril 1), pero sí en la toxigénica que produjo un único fragmento (Fig. 1, carril 2). El tamaño del fragmento amplificado fue de 250 pb, según el análisis de su migración y comparación con la del patrón de peso molecular mediante GuefastScan. Esta talla es cercana a la esperada, 248 pb, según la secuencia nucleotídica de la cepa N16961¹⁹ y el programa Primer-Blast. Estos resultados indicaron que los cebadores seleccionados eran específicos para los genes *ctxAB*.

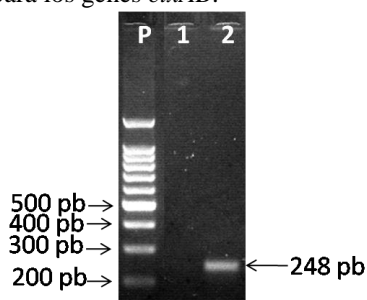


Fig. 1. Especificidad de los cebadores seleccionados en PCR simple. Gel de agarosa al 2% (m/v) de los productos de amplificación del ADN de *V. cholerae*: 1, 638; 2, C7258Kn. P, patrón de peso molecular de 100 pb (Promega). Se indican la talla molecular de algunas de las bandas del patrón de peso y del fragmento amplificado.

Selección de temperatura de hibridación y concentración de MgCl₂ de reacciones con cebadores internos en ensayo de PCR simple

Teniendo en cuenta las temperaturas de fusión de los cebadores, predicha por el programa Primer-Blast (53,2°C y 55,3°C), se evaluaron como temperaturas de hibridación 45, 50, 55, 60 y 65°C. El par de cebadores amplificó el fragmento esperado a todas las temperaturas evaluadas, excepto a 65°C (Fig. 2A, carriles 1-5). La intensidad relativa de los fragmentos amplificados se determinó mediante el análisis densitométrico de la imagen de los geles con el programa GueFastScan (Fig. 2B). En el gráfico se muestran el promedio de la relación señal/ruido de cada banda y la desviación estándar de tres réplicas de un mismo experimento por duplicado. La comparación de la intensidad relativa del producto de amplificación con los cebadores a las diferentes temperaturas de hibridación, mediante ANOVA de clasificación simple ($\alpha=0,05$; g.l.e.=23), reveló que no existían diferencias significativas en la intensidad relativa del producto amplificado a las temperaturas de hibridación de 45, 50 y 55 °C y sí existían diferencias significativas con 60°C, comparado con las temperaturas inferiores a esta anteriormente probadas, según análisis mediante Prueba de Tukey. De este análisis, resulta que para la amplificación pudiera emplearse como temperatura de hibridación 45, 50 o 55°C.

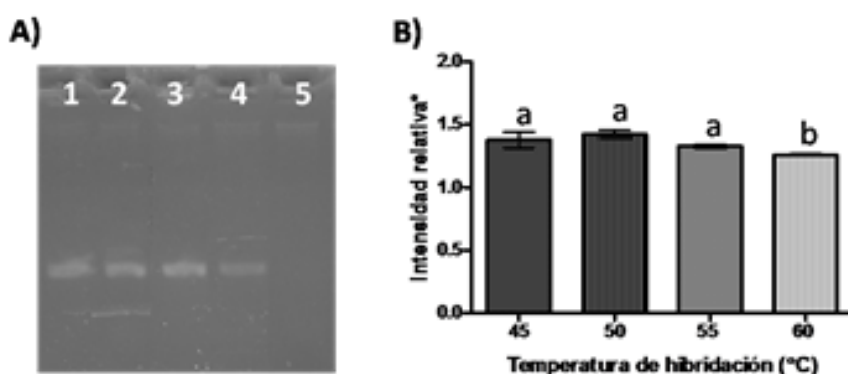


Fig. 2. Efecto de la temperatura de hibridación en PCR simple con los cebadores seleccionados. A) Gel de agarosa al 2% (m/v) representativo de los productos de amplificación del ADN de *V. cholerae* C7258Kn con los cebadores seleccionados a las temperaturas de hibridación: 1, 2, 3, 4 y 5; 45, 50, 55, 60 y 65°C, respectivamente. B) Intensidad relativa de los productos amplificados, según análisis densitométrico mediante GueFastScan. Se muestran el promedio de la intensidad relativa de cada banda y la desviación estándar de tres réplicas de un mismo experimento, realizado por duplicado. Letras iguales, diferencias no significativas; letras diferentes, diferencias significativas. Prueba de Tukey ($\alpha = 0,05$; g.l.e. = 23). *: intensidad relativa expresada como la relación señal/ruido detectada para la banda del gel.

La influencia de la concentración de MgCl₂ en la reacción se evaluó en el rango entre 1,5 y 3,5 mmolL⁻¹, con incrementos de 0,5 unidades utilizando 45°C o 50°C como temperatura de hibridación. El par de cebadores internos amplificó específicamente el fragmento esperado en todas las concentraciones de MgCl₂ y las dos temperaturas de hibridación evaluadas (Fig. 3A). La intensidad relativa de los fragmentos amplificados se determinó mediante análisis densitométrico de los geles con el programa GueFastScan (Fig. 3B) y la intensidad relativa del producto de amplificación a las diferentes concentraciones de MgCl₂ evaluadas en cada temperatura se comparó mediante ANOVA de clasificación simple ($\alpha = 0,05$; g.l.e. = 14). En el caso de la temperatura de hibridación de 45°C la comparación reveló que no existen diferencias significativas en la intensidad relativa del producto amplificado con 1,5 y 2 mmolL⁻¹ de MgCl₂ y sí hay diferencias significativas en la intensidad relativa de los productos amplificados con 2,5; 3 y 3,5 mmolL⁻¹ de MgCl₂. En el caso de la amplificación utilizando como temperatura de hibridación 50°C, la intensidad relativa del producto de amplificación obtenido con 1,5 mmolL⁻¹ no presentó diferencias estadísticamente significativas con la intensidad del producto obtenido con 3,5 mmolL⁻¹ y sí con la intensidad relativa del producto obtenido con 2; 2,5 y 3 mmolL⁻¹. De acuerdo con estos resultados, para el ensayo de amplificación con los cebadores internos se seleccionó como concentración de MgCl₂ 2,5 mmolL⁻¹. Como temperatura de hibridación se seleccionó 45°C, debido a la tendencia observada de una mayor intensidad del producto amplificado en todas las concentraciones de MgCl₂ evaluadas a esa temperatura de hibridación respecto a la de 50°C, sin disminuir la especificidad de la reacción.

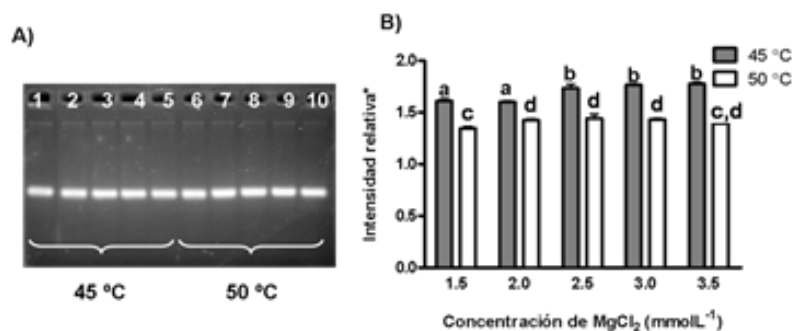


Fig. 3. Efecto de la concentración de MgCl₂ en PCR simple con los cebadores seleccionados. A) Gel de agarosa al 2 % (m/v) representativo del producto de amplificación del ADN de *V. cholerae* C7258Kn con los cebadores seleccionados empleando diferentes concentraciones de MgCl₂: 1/6; 2/7; 3/8; 4/9 y 5/10: 1,5; 2,0; 2,5; 3,0 y 3,5 mmolL⁻¹ y una temperatura de hibridación de 45°C (carriles 1-5) o 50°C (carriles 6-10). B) Intensidad relativa de los productos amplificados, según análisis densitométrico mediante GueFastScan. Se muestran el promedio de la relación señal/ruido de cada banda y la desviación estándar de 3 réplicas del mismo experimento, realizado en duplicado. Letras iguales, diferencias no significativas; letras diferentes, diferencias significativas. a/b y c/d, comparación de valores a 45 y 50 °C, respectivamente. Prueba de Tukey (α = 0,05; g.l.e. = 14). *: intensidad relativa expresada como la relación señal/ruido detectada para la banda del gel.

Límite de detección de PCR anidado de ADN de cepa toxigénica

El límite de detección del ensayo de PCR anidado compuesto por 20 ciclos de amplificación en la primera etapa y 40 en la segunda frente al ADN de la cepa C7258Kn se evaluó preliminarmente utilizando cantidades decrecientes de ADN cromosomal puro (1 ng hasta 10 fg por reacción) por triplicado. Las reacciones en las que se amplificó consistentemente la banda de 248 pb fueron aquellas en las que se encontraba como mínimo 10 fg de ADN molde/reacción, valor estimado como límite de detección del ensayo (Fig. 4). Teniendo en cuenta que el genoma de *V. cholerae* posee 3,2 Mb,¹⁹ 10 fg de ADN se corresponden con aproximadamente 2 genomas de la bacteria. Dado que los genes *ctxAB* se encuentran en simple copia, mediante este ensayo es posible detectar hasta ~2 copias de los genes *ctxAB* por reacción. El límite de detección de este ensayo fue mayor que la informada previamente para el ensayo de PCR simple empleando los cebadores externos (1 pg de ADN por reacción).¹³ La mayor sensibilidad del ensayo de PCR anidado, entendida como la capacidad de detectar positivamente el ADN de la cepa toxigénica, respecto al ensayo de PCR simple coincide con lo informado previamente por otros autores.²³⁻²⁵ Así, Goel y cols, encontraron que un ensayo de PCR semi-anidado fue capaz de detectar una cantidad de ADN 10 veces menor que la cantidad detectada por el ensayo de PCR simple.²³ Igualmente, Mendes y cols, encontraron que un ensayo de PCR anidado detectó una cantidad de ADN 10 veces menor que la cantidad detectada mediante un ensayo de PCR simple.²⁴ Los resultados alcanzados indicaron que los cebadores diseñados en este estudio pueden ser utilizados para detectar un número pequeño de copias de los genes *ctxAB*.

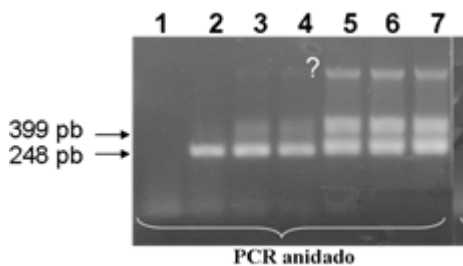


Fig. 4. Sensibilidad del ensayo de PCR anidado frente ADN de *V. cholerae* C7258Kn. Gel de agarosa al 2 % (m/v) representativo del producto de amplificación mediante el ensayo con 20 ciclos de amplificación en la primera etapa y 40 en la segunda usando: 1, 2, 3, 4, 5, 6 y 7; 0 fg, 10 fg, 100 fg, 1 pg, 10 pg, 100 pg y 1 ng de ADN.?, banda inespecífica en las muestras positivas.

En las reacciones del ensayo en las que se utilizaron concentraciones mayores de ADN molde (10 pg, 100 pg y 1 ng) se observaron tres bandas, dos de las cuales poseen la talla esperada para los fragmentos amplificados con los cebadores externos e internos (399 pb y 248 pb) y una tercera de mayor talla (Fig. 4, banda con signo de interrogación). La aparición de la banda correspondiente al producto amplificado con los cebadores externos puede relacionarse con la presencia de un exceso de estos cebadores en la segunda etapa del ensayo, por lo que su concentración en la primera reacción se disminuyó a 10 pmol en los ensayos subsiguientes. La aparición de una banda inespecífica de mayor talla que la esperada para los productos de los cebadores internos y externos no tiene una explicación aparente, pero pudiera relacionarse con algún tipo de interacción entre los cebadores externos e internos, lo que coincide con informes previos que utilizan este tipo de ensayos.²⁴ Dado que la banda adicional no interfiere con la visualización de las bandas específicas de *ctxAB* y solo se amplifica en presencia del ADN de la cepa

toxigénica y no en el control negativo de la cepa 638, como se muestra en el siguiente acápite (Fig. 5), no se considera invalidante del ensayo.

Selección del número de ciclos de primera etapa del PCR anidado y límite de detección del ensayo de la cepa toxigénica C7258Kn en preparaciones del candidato vacunal CV638

La sensibilidad y especificidad de la detección de concentraciones muy pequeñas del ADN de interés pueden reducirse en el contexto de un exceso de ácidos nucleicos no relacionados.^{26, 27} Esto se debe fundamentalmente a la unión inespecífica de los cebadores, lo que puede provocar un cebado erróneo y un fallo de la reacción de amplificación. Este es el caso de un ensayo de PCR que detecte cepas toxigénicas de *V. cholerae* en una preparación de un candidato vacunal vivo, donde existe un gran número de células de la cepa vacunal (10^8 - 10^9 UFC/dosis), así como lio-protectores tales como leche y sacarosa que pueden interferir durante la purificación del ADN. En estas condiciones la relación entre la cantidad del ADN proveniente de la cepa contaminante y la de la vacunal puede ser muy pequeña. Por esta razón, el límite de detección del ensayo de PCR anidado de la cepa toxigénica en las preparaciones vacunales de CV638 se evaluó empleando 2 μ g de ADN purificado a partir de las dosis de CV638 contaminadas con cantidades conocidas de la cepa C7258Kn. En este caso, el límite de detección se refiere a la menor cantidad de células de la cepa toxigénica contaminante que puede ser detectada mediante el ensayo anidado, empleando como molde el ADN purificado a partir de las dosis del candidato vacunal contaminado con cantidades conocidas de la cepa toxigénica.

Para seleccionar el número de ciclos de amplificación de la primera etapa del PCR anidado se comparó el límite de detección de los ensayos con 10, 15 y 20 ciclos en esta etapa y 40 en la segunda. Al comparar los resultados se constató que el ensayo con 10 ciclos mostró un límite de detección mayor, ya que solo resultó positivo con el ADN derivado del bulbo que contenía $\sim 7 \times 10^2$ células de C7258Kn (Fig. 5A, carril 5). En el caso del ensayo anidado con 15 ciclos, el límite de detección fue menor dado que detectó $\sim 1 \times 10^2$ células de la cepa C7258Kn (Fig. 5A, carril 4) y una especificidad adecuada, dado que no se observaron falsos positivos (Fig. 5B, carriles 2 y 3). En el caso del ensayo con 20 ciclos, este resultó positivo en todas las muestras contaminadas con la cepa C7258Kn al igual que uno de los controles negativos de *V. cholerae* 638, a pesar de todas las precauciones tomadas durante la purificación y manipulación de las muestras. Estos resultados sugirieron que en estas condiciones se afectó la especificidad del método. Por esta razón, el número de ciclo de la primera etapa se fijó en 15.

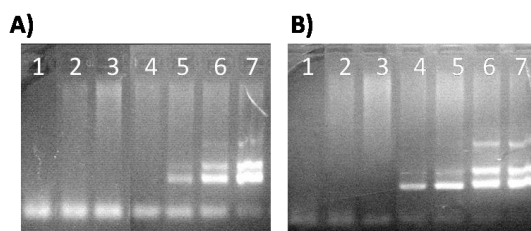


Fig. 5. Efecto del número de ciclos de amplificación de la primera etapa del PCR anidado sobre la detección de la cepa toxigénica C7258Kn en preparaciones liofilizadas del candidato vacunal 638. Geles de agarosa al 2 % (m/v) representativos del producto de amplificación del PCR anidado empleando en la primera etapa A) 10 y B) 15 ciclos y como molde: 1, sin ADN (control de reactivos); 2 y 3, ADN de bulbo 1 y 2 de 638; 4, 5, 6 y 7, ADN de bulbo contaminado con 91 ± 10 , 706 ± 120 , $2 \pm 0,2 \times 10^3$ y $9,6 \pm 0,9 \times 10^4$ células de C7258Kn, respectivamente.

El límite de detección del ensayo de PCR anidado compuesto de 15 ciclos en la primera etapa se reevaluó, empleando como molde cantidades crecientes de ADN de la cepa C7258Kn (1 fg – 100 fg) en triplicado. Las reacciones en las que se amplificó consistentemente el fragmento esperado fueron aquellas con 50 fg de ADN molde/reacción (Fig. 6) y este se estimó como el límite de detección del ensayo. Este valor se corresponde con 10 genomas de *V. cholerae* por reacción y puede considerarse una sensibilidad adecuada para el método, que está en conformidad con lo informado para otros ensayos del mismo tipo por otros autores²⁴ y mayor que el PCR simple descrito previamente.

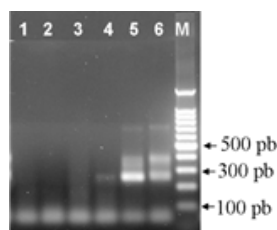


Fig. 6. Límite de detección de PCR anidado utilizando cantidades crecientes de ADN de *V. cholerae* C7258Kn. Gel de agarosa al 2% (m/v) representativo del producto de amplificación de PCR anidado con 15 ciclos de amplificación en la primera etapa y 40 en la segunda usando: 1, 2, 3, 4, 5 y 6; 0, 1 fg, 5 fg, 10 fg, 50 fg y 100 fg de ADN. M, marcador de peso molecular de ADN de 100 pb (Promega).

Por último, se determinó el límite de detección del ensayo de PCR anidado con un nivel de confianza del 95%, en las preparaciones de ADN purificadas a partir de las dosis de CV638 contaminados con diferentes cantidades de la cepa toxigénica C7258Kn (Tabla 1).

Tabla 1. Resumen de ensayos de PCR anidado a partir de ADN purificado de CV638 contaminado con la cepa *V. cholerae* C7258Kn.

UFC de C7258Kn mL ⁻¹ CV638	Extracción 1* %Pos**	Extracción 2 %Pos	Extracción 3 %Pos	Extracción 4 %Pos
6808,76 ± 2915,5	100	100	100	100
593 ± 198,7	100	100	100	100
51,60 ± 14,5	100	92	100	92
6,93 ± 2,6	75	83	67	50

*: Cada suspensión contaminada se extrajo cuatro veces y se analizó subsiguientemente 12 veces.

** : % Pos, porcentaje de reacciones positivas de las 12 réplicas ensayadas.

La totalidad de los resultados obtenidos (Tabla 1) se procesaron con el programa GraphPad Prism, según el procedimiento descrito por Studer y Candrian.²⁰ Los datos se introdujeron en una tabla de datos XY y se realizó una curva de calibración, empleando un ajuste de regresión no lineal (ecuación de dosis-respuesta: log (agonista) vs respuesta – de pendiente variable), denominada también como una ecuación de cuatro parámetros y se interpoló la concentración de células en la que el 95% de las reacciones de PCR resultaban positivas (Fig. 7). El límite de detección con un nivel de confianza del 95% se correspondió a 50 células toxigénicas por dosis de CV638. Dado que la menor dosis infectiva experimental informada para *V. cholerae* es de hasta 10³ UFC en individuos con baja acidez estomacal,¹⁴ superior al límite de detección del ensayo propuesto, se considera que el PCR anidado, una vez validado, pueda ser empleado como una herramienta útil en el control de calidad de CV638.

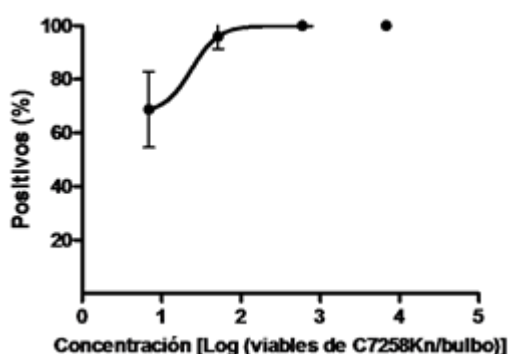


Fig. 7. Evaluación del límite de detección del ensayo de PCR anidado con un nivel de confianza del 95%. Se grafica la media ± la desviación estándar de 4 extracciones de cada concentración celular contaminante de C7258Kn, analizada cada una 12 veces mediante el ensayo

CONCLUSIONES

Los cebadores diseñados en este estudio amplifican específicamente a los genes *ctxAB* en un ensayo de PCR anidado y permiten la detección de contaminantes toxigénicos en preparados vacunales vivos. El ensayo de PCR anidado descrito detecta aproximadamente 50 UFC de una cepa toxigénica en preparaciones vacunales de 638, inferior a la menor dosis infectiva de *V. cholerae* y pudiera ser útil como prueba de seguridad durante la producción de candidatos vacunales vivos, una vez validado.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Almagro-Moreno S, Pruss K, Taylor RK. Intestinal Colonization Dynamics of *Vibrio cholerae*. PLoS Pathog. 2015;11(5):e1004787.
2. Sanchez J, Holmgren J. Cholera toxin - a foe & a friend. The Indian journal of medical research. 2011;133:153-63.
3. Pal P. Role of cholera toxin in *Vibrio cholerae* infection in humans-A Review. International Letters of Natural Sciences. 2014;17.
4. Ali M, Nelson AR, Lopez AL, Sack DA. Updated global burden of cholera in endemic countries. PLoS Negl Trop Dis. 2015;9(6):e0003832.
5. OMS. Cholera, 2015. Weekly Epidemiological Record. 2015;91(38):433-40.

6. Saha A, Rosewell A, Hayen A, MacIntyre CR, Qadri F. Improving immunization approaches to cholera. *Expert Review of Vaccines*. 2016;1-14.
7. OMS. Cholera vaccines: WHO position paper. *Weekly Epidemiological Record*. 2010;85(13):117-28.
8. Desai SN, Pezzoli L, Alberti KP, Martin S, Costa A, Perea W, et al. Achievements and challenges for the use of killed oral cholera vaccines in the global stockpile era. *Human vaccines & immunotherapeutics*. 2016;0.
9. O'Ryan M, Vidal R, del Canto F, Salazar JC, Montero D. Vaccines for viral and bacterial pathogens causing acute gastroenteritis: Part I: Overview, vaccines for enteric viruses and *Vibrio cholerae*. *Human vaccines & immunotherapeutics*. 2015;11(3):584-600.
10. van den Biggelaar AHJ, Poolman JT. Live-Attenuated and Inactivated Whole-Cell Bacterial Vaccines. In: Nunnally BK, Turula VE, Sitrin RD, editors. *Vaccine Analysis: Strategies, Principles, and Control*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2015. p. 139-86.
11. Talavera A, García H, Moreira T, Delgado H, Riverón L, Gil S, et al. Process development for a Cuban cholera vaccine based on the attenuated strain *Vibrio cholerae* 638. *Vaccine*. 2006;24(18):3746-9.
12. Zelada-Valdés AL-P, T.; Fando-Calzada, R. El cólera: una enfermedad infecciosa reemergente. El candidato vacunal cv 638, una herramienta para su prevención. *Revista CENIC, Ciencias Biológicas*. 2015;46(2):131-43.
13. Peidro-Guzmán H, Marrero-Domínguez K, Ledón-Pérez T, Fando-Calzada R. Desarrollo de un ensayo de PCR para detectar los genes codificadores de la toxina del cólera (*ctxAB*) en preparaciones del candidato vacunal vivo atenuado CV638. *Vacunas*. 2016;17(2):55-61.
14. Harris JB, LaRocque RC, Qadri F, Ryan ET, Calderwood SB. Cholera. *Lancet (London, England)*. 2012;379(9835):2466-76.
15. Deshmukh RA, Joshi K, Bhand S, Roy U. Recent developments in detection and enumeration of waterborne bacteria: a retrospective minireview. *Microbiology Open*. 2016.
16. Alhamlan FS, Al-Qahtani AA, Al-Ahdal MNA. Recommended advanced techniques for waterborne pathogen detection in developing countries. *The Journal of Infection in Developing Countries*. 2015;9(02):128-35.
17. Marrero K, Sánchez A, González LJ, Ledón T, Rodríguez-Ulloa A, Castellanos-Serra L, et al. Periplasmic proteins encoded by VCA0261–0260 and VC2216 genes together with *copA* and *cueR* products are required for copper tolerance but not for virulence in *Vibrio cholerae*. *Microbiology*. 2012;158(8):2005-16.
18. Robert A, Silva A, Benitez JA, Rodriguez BL, Fando R, Campos J, et al. Tagging a *Vibrio cholerae* El Tor candidate vaccine strain by disruption of its hemagglutinin/protease gene using a novel reporter enzyme: *Clostridium thermocellum* endoglucanase A. *Vaccine*. 1996;14(16):1517-22.
19. Heidelberg JF, Eisen JA, Nelson WC, Clayton RA, Gwinn ML, Dodson RJ, et al. DNA sequence of both chromosomes of the cholera pathogen *Vibrio cholerae*. *Nature*. 2000;406(6795):477-83.
20. Studer E, Candrian U. Development and validation of a detection system for wild-type *Vibrio cholerae* in genetically modified cholera vaccine. *Biologicals*. 2000;28(3):149-54.
21. Kim EJ, Lee CH, Nair GB, Kim DW. Whole-genome sequence comparisons reveal the evolution of *Vibrio cholerae* O1. *Trends in microbiology*. 2015;23(8):479-89.
22. Kumar A, Chordia N. In silico PCR primer designing and validation. *Methods in molecular biology (Clifton, NJ)*. 2015;1275:143-51.
23. Goel AK, Bhaduria S, Kumar P, Kamboj DV, Singh L. Semi-nested polymerase chain reaction for detection of toxigenic *Vibrio cholerae* from environmental water samples. *Indian journal of microbiology*. 2007;47(3):207-11.
24. Mendes CL, Abath FG, Leal NC. Development of a multiplex single-tube nested PCR (MSTNPCR) assay for *Vibrio cholerae* O1 detection. *Journal of microbiological methods*. 2008;72(2):191-6.
25. Theron J, Cilliers J, Du Preez M, Brozel VS, Venter SN. Detection of toxigenic *Vibrio cholerae* from environmental water samples by an enrichment broth cultivation-pit-stop semi-nested PCR procedure. *Journal of applied microbiology*. 2000;89(3):539-46.
26. Gijavanekar C, Strych U, Fofanov Y, Fox GE, Willson RC. Rare target enrichment for ultrasensitive PCR detection using cot-rehybridization and duplex-specific nuclease. *Analytical biochemistry*. 2012;421(1):81-5.
27. Pan X, Wang J, Zhang Y, Dong P, Li C, Liang X. Detection of trace amounts of target DNA from massive background of nucleic acids by using LM-PCR-based pre-amplification method. *Biotechnology and Applied Biochemistry*. 2016.