

EMPLEO DE LA BIOLOGÍA MOLECULAR PARA LA IDENTIFICACIÓN DE CEPAS PATÓGENAS DE *Vibrio cholera*

Alicia Herrera Benavides¹, Norma Almaraz Abarca¹, Manuel Quintos Escalante¹, Maricela Esteban Méndez¹

¹Instituto Politécnico Nacional, Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional.
U. Durango. Sigma 119, Frac. 20 de noviembre II, Durango, Dgo. CP 34220
gfb.aliciaherrera@hotmail.com

RESUMEN

El presente estudio surgió después de detectarse la incidencia de *Vibrio cholerae* NO-O1 mediante la técnica de hisopo de Moore de el drenaje del municipio de Durango, por lo que fue necesario implementar una técnica rápida que nos permitiera diferenciar cepas patógenas de *Vibrio cholerae* de aquellas que no representaban un riesgo para la población, y determinar si las cepas tenían potencial patogénico. Mediante la técnica de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) se evaluaron muestras para buscar una secuencia del gen que codifica para la subunidad A de la toxina colérica (ctxA), que si está presente es indicativa de patogenicidad. La técnica de PCR permitió distinguir entre las cepas virulentas y las no virulentas. Las cepas aisladas del drenaje del municipio de Durango no presentaron el gen de la toxina colérica.

PALABRAS CLAVE: *Vibrio cholera*, toxina colérica, ctxA

INTRODUCCIÓN

La organización mundial de la salud (OMS) define el cólera como una infección intestinal aguada causada por la ingestión de agua o alimentos contaminados por la bacteria *Vibrio cholerae*, esta bacteria produce una enterotoxina que causa una diarrea abundante, indolora y acuosa que puede producir con rapidez una deshidratación grave o la muerte si no es tratada oportunamente. Esta enfermedad continúa siendo una amenaza de salud pública para los países con bajo grado de desarrollo social (OMS, 2012).

El último brote de cólera en México se presentó en el periodo comprendido de 1991 al 2001, este brote afectó a prácticamente todos los Estados de la República Mexicana y se registraron más de 45 mil casos y más de 500 defunciones (SSA, 2008). Después de esta fecha únicamente se reportó a la OMS un caso aislado en el 2008 y otro en el 2010 (SSA, 2008; OMS, 2009; OMS, 2011).

En el estado de Durango, durante el brote de 1991-2001, se presentaron casos en dos años de este periodo (SSA, 2001).

Vibrio cholerae es el agente etiológico del cólera epidémico y pandémico humano, se clasifica con base en su antígeno somático O, actualmente se conocen 198 serogrupos. Cada serogrupos se define por su suero monoespecífico; *Vibrio cholerae* O1 se define con este nombre ya que aglutina con el suero O1, mientras que los otros 198 restantes serogrupos se les denomina genéricamente como NO-O1 (Koneman et al., 2001; SSA, 2001).

Con base en sus características fenotípicas, propiedades metabólicas, susceptibilidad a bacteriófagos y a antimicrobianos, *Vibrio cholerae* O1 se divide en dos biotipos: Clásico y El Tor, estos biotipos se dividen de acuerdo a diversos antígenos somáticos en tres biotipos: Inaba, Ogawa e Hikojima (SSA, 2001).

El cólera es una enfermedad que no es producida por la invasión tisular del microorganismo, sino a través de la producción de la toxina que irrumpe en el intercambio intestinal normal del agua y electrolitos (Koneman et al., 2001).

La infección por *Vibrio cholerae* es adquirida por la ingestión de agua o alimentos contaminados consumidos crudos o insuficientemente cocidos. La posibilidad de que se desencadene un brote de cólera en una región dada depende de varios factores: el número de individuos susceptibles, la exposición a aguas cloacales o aguas no tratadas y alimentos contaminados, y la presencia de un reservorio acuático de *Vibrio cholerae* (Caffer et al., 2007). El ser humano es un huésped incidental y transitorio pero es quien disemina la bacteria hacia las fuentes de agua y alimentos (SSA, 2001), los *Vibrios* se desarrollan como células de vida libre en los reservorios de estuarios marinos. Mejorar las condiciones sanitarias puede hacer posible un control eficaz de la enfermedad (Murray et al., 2006).

El genoma de *Vibrio cholerae* contiene 3885 marcos de lectura abiertos distribuidos en dos cromosomas circulares, el cromosoma 1 (2.96 millones de pares de bases) y el cromosoma 2 (1.07 millones de pares de bases). El primer cromosoma contiene genes para funciones celulares esenciales como la replicación del ADN, la transcripción y la síntesis de proteínas, además de contener la mayoría de los genes de virulencia como el gen de la toxina del cólera que está localizado en el fago CTX ϕ integrado en este cromosoma. El segundo cromosoma también contiene genes esenciales como genes de proteínas ribosomales y genes de transporte (Prescott et al., 2002).

La enterotoxina colérica está codificada por dos genes, *ctxA* y *ctxB* y su expresión está controlada por una proteína codificada por el gen *toxR* (Madigan et al., 2003). Los genes que codifican la Toxina Colérica forman parte del elemento genético CTX, el cual consiste por lo menos de seis genes que integran la región central (*ctxA*, *ctxB*, *zot*, *ace*, *cap* y *orfU*) (Eslava et al., 2007).

La toxina colérica es una enterotoxina de tipo A-B y está constituida por un componente A de 27,200 Da y por cinco subunidades B, cada una de 11,600 Da, la subunidad B contiene el sitio de unión a través del cual la toxina colérica se combina específicamente con el gangliósido GM1 en la membrana citoplasmática epitelial, la acción tóxica corresponde a la cadena A que activa la enzima celular adenilato ciclasa que transforma el ATP en AMP cíclico (cAMP), el aumento en los niveles de cAMP lleva consigo la secreción activa en el intestino de iones cloruro y bicarbonato procedentes de las células mucosas que van al lumen del intestino. Este cambio en el equilibrio iónico origina la secreción de grandes cantidades de agua, la intensidad de la pérdida acuosa en el intestino delgado es mayor que la reabsorción del agua en el intestino grueso (Fernández, 2008; Madigan et al., 2003).

En este trabajo se presentan los resultados de la implementación de la detección por PCR de una secuencia de patogenicidad de *V. cholerae* en cepas aisladas del drenaje del municipio de Durango, México.

MATERIALES Y MÉTODOS

Controles

Se estudió una cepa de *Vibrio cholerae* NO-O1 proporcionada por el Laboratorio Estatal de Salud Pública e identificada y serotipificada por el Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos (InDRE). Como control positivo para el presente estudio se utilizó una cepa toxigénica de *Vibrio cholerae* Ogawa proporcionada por el Laboratorio de Microbiología Sanitaria de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas.

El medio de cultivo utilizado para la siembra de las cepas de *Vibrio cholerae* fue agar selectivo Tiosulfato-Citrato-Bilis-Sacarosa (TCBS). Las cepas se incubaron durante 24 h a 35-37°C.

Extracción de ADN Genómico de *Vibrio cholerae*

Para la extracción rápida de ADN de las cepas de *Vibrio cholerae* NO-O1, se tomaron a partir de los aislamientos en placa de TCBS de 10-12 colonias, las cuales se suspendieron en un microtubo con 500 μ l de agua bidestilada estéril. Estas suspensiones se incubaron en baño maría a 100°C durante 10 minutos. Se dejaron enfriar y se realizó una centrifugación a 10,000 rpm durante 5 minutos para precipitar los restos celulares. El sobrenadante, conteniendo el ADN, se transfirió a un nuevo microtubo. Ese ADN se utilizó como

ADN molde en la reacción de PCR. Esta técnica de extracción se basó en el protocolo descrito por Caffer et al. (2007).

Concentración y pureza de ácidos nucleicos.

Se analizaron en el espectrofotómetro las muestras de ADN extraídas para determinar su concentración utilizando 5 µl de ADN diluido en 495 µl de agua bidestilada estéril y se calcularon los valores de absorbancias a 260 y 280nm. La concentración de ADN se calculó de acuerdo a la siguiente fórmula

$$(\text{Abs}_{260\text{nm}}) (\text{Factor de dilución}) (50\mu\text{g/ml}) = \mu\text{g/ml ADN}$$

La pureza de las muestras de ADN se evaluó de acuerdo a criterios estándares (Brusés et al., 2000), en los que el cociente $A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$ debe tener valores entre 1.7 y 2.

Detección de una secuencia del gen *ctxA* por la técnica de molecular de PCR

Para la amplificación de una secuencia del gen *ctxA* de *Vibrio cholerae* se realizó por PCR de acuerdo al protocolo publicado por Caffer et al. (2007). La reacción se realizó en un volumen final de 25 µl con los reactivos descritos en la Tabla 1. La mezcla de reacción fue distribuida en tubos de PCR con 23 µl y se agregó a cada uno de los tubos 2 µl del ADN molde. Como control interno del experimento se utilizó la mezcla de reacción sin ADN molde, en su lugar se le agregaron 2 µl de agua bidestilada estéril.

Tabla 1. PCR Simple / *ctxA*

Reactivos	Volumen (µl)	Concentración
H ₂ O	13.735	
Buffer de enzima	5	5X
Cl ₂ Mg 50mM	1.5	25 mM
dNTP Nucleótidos Mix (dATP, dCTP, dGTP y dTTP)	0.5	10 mM
CT94F (5'-CGCGCAGATTCTAGACCTCTG -3')	1.04	0.4 µM
CT614R (5'-CGATGATCTTGGAGCATCCCCAC -3')	1.1	0.4 µM
Go Taq ADN Polimerasa	0.125	5 U/µl
ADN molde	2	
Volumen Final (µl)	25	

La reacción de PCR se realizó en un termociclador marca Techne, bajo las condiciones de ciclado descritas en la Tabla 2. Este protocolo se realizó para la cepa problema de *Vibrio cholerae* NO-O1 y para la cepa toxigénica utilizada como control positivo *Vibrio cholera* Ogawa (*ctxAB*+).

Tabla 2. Condiciones de ciclado

	Temperatura	Tiempo	
Etapa 1	94 °C	2 min	} 30 ciclos
Etapa 2	94 °C	45 seg	
Etapa 3	60 °C	45 seg	
Etapa 4	72 °C	45 seg	
Etapa 5	72 °C	10 min	
Etapa 6	14 °C		

Electroforesis en gel de agarosa

Los productos de la PCR se separaron por electroforesis en geles de agarosa al 2%, con regulador TAE (Tris-acetato-EDTA) 1X. Los loci amplificados se visualizaron con Syber Green. El marcador de tamaño molecular empleado fue Bench Top, que presenta secuencias de 100 a 1500 pb. La corrida electroforética se desarrollo a voltaje constante (60 V). Los patrones de bandas generadas se visualizaron en un transiluminador de luz UV.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los valores de la concentración y pureza de las muestras de ADN genómico bacteriano utilizadas como moldes en la reacción de PCR, así como las absorbancias leídas en el espectrofotómetro a 260nm y 280nm de cada una de las muestras analizadas se muestran en la Tabla 3, en la que se observa que los valores de A_{260}/A_{280} indican la inexistencia de proteínas en exceso.

Se analizó la cepa de *Vibrio cholerae* NO-O1 aislada en drenajes del municipio de Durango, para determinar la presencia del gen que codifica para la subunidad A de la Toxina Colérica (*ctxA*) por la técnica de PCR estándar, basada en los protocolos descritos por Caffer et al. (2007). La banda correspondiente a una secuencia del gen *ctxA*, de aproximadamente 564 pb, no se encontró en las cepas problema de *Vibrio cholerae* NO-O1. En cambio, se observo una banda bien definida, de aproximadamente 564 pb, en la cepa toxigénica utilizada como control positivo de *Vibrio cholerae* Ogawa (*ctxAB+*) (Figura 1, carriles 6-7). Los controles internos utilizados no revelaron la presencia de ningún tipo de amplificación, con lo que quedo corroborada la especificidad de la técnica.

Tabla 3: Pureza y concentración del ADN de dos cepas de *V. cholerae*

Cepa	A_{260nm}/A_{280nm}	Concentración ($\mu\text{g/mL}$)
<i>Vibrio cholerae</i> NO-O1	1.9	662.5
<i>Vibrio cholerae</i> Ogawa	2.1	187.5

Los resultados obtenidos indican que el gen *ctxA* no estuvo presente en el genoma de la cepa problema *Vibrio cholerae* NO-O1 aislada en el municipio de Durango. Este resultado coincide con los resultados obtenidos en otros estudios, que indican que la mayoría de las cepas de *Vibrio cholerae* NO-O1,

NO-O139 no poseen el gen codificante de la subunidad A de la enterotoxina del cólera (*ctxA*) (Briseño *et al.*, 2009). Sin embargo existen hallazgos de genes *ctxA* en cepas NO-O1 ambientales (Eslava *et al.*, 2007).

En estudios realizados a cepas de *Vibrio cholerae* NO-O1, NO-O139 aisladas de la bahía de Newport California se encontró que el 17% presentaban el gen de la toxina colérica (*ctxA*), lo que sugiere que *ctxA* es frecuente (Jiang *et al.*, 2003). De acuerdo a datos publicado por González *et al.* (2009), en un estudio realizado de aislados de *Vibrio cholerae* NO-O1 en Argentina, ninguno presento el gen que codifica para la toxina colérica *ctxA*, excepto una cepa caracterizada como *Vibrio cholera* NO-O1, NO-O139. Así mismo resultados obtenidos del trabajo de Viñas (2004) revelan que el 88% de los aislamientos analizados de *Vibrio cholerae* NO-O1, NO-O139 en su estudio fueron *ctxA*-. Debido a que existe cierta probabilidad de que cepas de *V. cholerae*, usualmente no patógenas, posean el gen de la toxina colérica, como lo demostraron los trabajos de Jiang *et al.* (2003), González *et al.* (2009), y Viñas *et al.* (2004), la detección del gen de esa toxina en cepas NO-O1, NO-O139 se vuelve una práctica importante de salud pública.

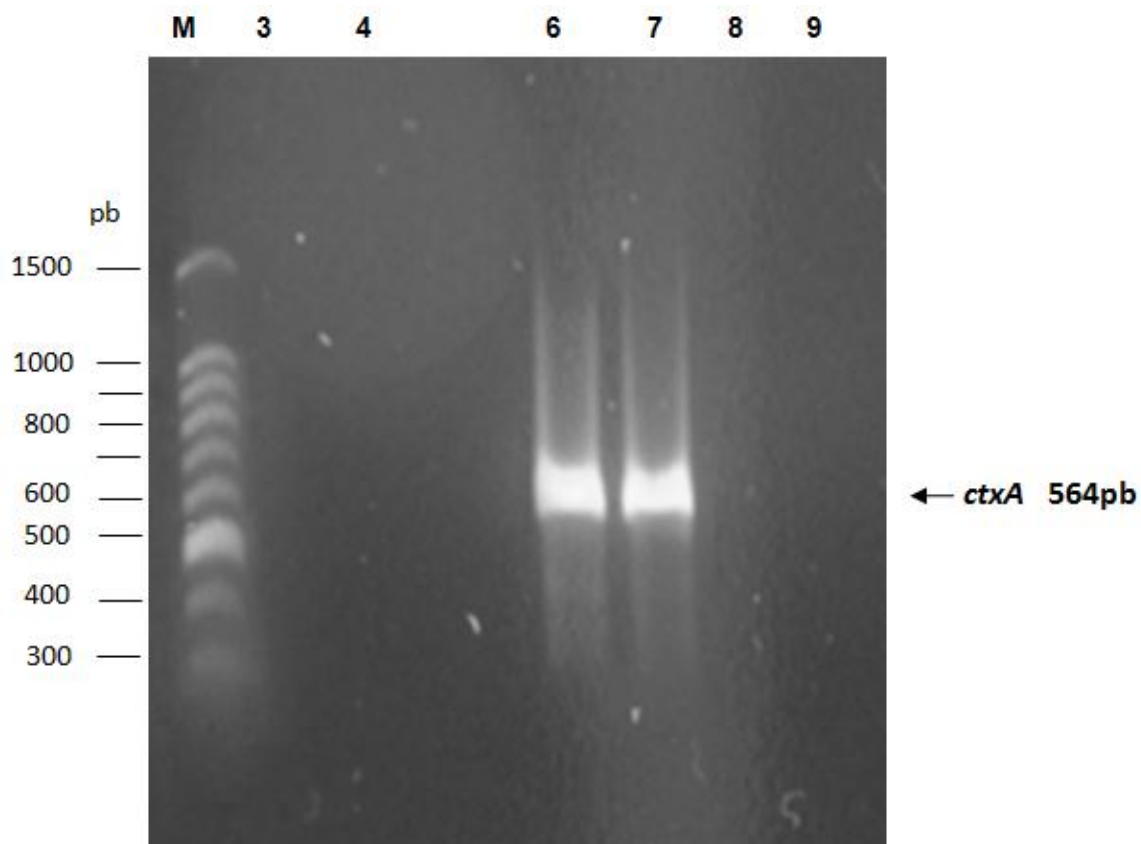


Figura 1. Productos de amplificación del gen *ctxA* en *Vibrio cholerae*. M: Marcador de tamaño molecular. Carriles 3-4: aislado de *Vibrio cholerae* NO-O1 en Durango. Carril 6-7: Control positivo *Vibrio cholerae* toxigénica. Carriles 8 y 9: control interno

Es necesario destacar la importancia de continuar con los programas de vigilancia para *Vibrio cholerae* en el estado de Durango, ya que algunas cepas NO-O1, NO-O139 poseen patogenicidad y han causado brotes o casos esporádicos de gastroenteritis o infecciones extra intestinales en humanos (Briseño *et al.*, 2009). Además algunos cuadros esporádicos de diarreas han sido asociados a estos serotipos aun en cepas que no presentan el gen que codifica para la toxina colérica (*ctxA*) en su genoma (González *et al.*, 2009; Viñas, 2004).

El protocolo evaluado de PCR para *Vibrio cholerae* puede ayudar en un futuro a conocer los perfiles de virulencia de nuevas cepas en Durango. Este trabajo constituyó el primer estudio de caracterización de *Vibrio cholerae* NO-O1 en Durango utilizando la técnica de PCR.

CONCLUSIONES

Los cambios climáticos ambientales cada vez es más frecuentes, la presencia de temperatura altas, además de temporales erráticos, que ocasionan inundaciones y desbordes de cauces de ríos, pueden favorecer la incidencia de *Vibrio cholera* toxigénico. Además, las nuevas vialidades, como la carretera Durango-Mazatlán, que permite realizar ese recorrido en tres horas, acercaran a la población de Durango a posibles portadores de la enfermedad. Por esas razones el estado de Durango debe contar con técnicas rápidas y sensibles, como la de PCR, que permita detectar la patogenicidad de las cepas de *V. cholerae* encontradas en esa entidad.

Actualmente, La Central de Instrumentación y el Laboratorio de Biotecnología del CIIDIR IPN DGO han estandarizado un método de PCR, rápido y preciso, que permite detectar la presencia de genes que codifican la producción de la toxina colérica.

La cepa de *Vibrio cholera* NO-O1 que se aisló del drenaje del municipio de Durango no presento el gen que codifica para la subunidad A de la toxina colérica (*ctxA*). Sin embargo, la investigación de la toxina colérica en aislados ambientales es necesaria ya que constituye un riesgo para la salud pública.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Briseño, I., C. Puebla, F. Guerra, D. Jensen, H. Núñez, M. T. Ulloa, C. G. Osorio. 2009. Septicemia fetal causada por *Vibrio cholerae* NO-O1, NO-O139 hemolítico en Chile, Caso clínico. Revista Médica de Chile 9: 1193-1196.
- Brusés, B. L., H. Lucero, M. V. Aguirre, J. O. Gorodner. 2000. Comparación de técnicas de extracción de DNA para la detección de *Trypanosoma cruzi* mediante la técnica de PCR. Comunicaciones Científicas y tecnológicas, Universidad Nacional del Nordeste. Argentina.
- Caffer, M. I., R. Terrago, R. González, M. R. Viñas, M. Pichel. 2007. Manual de procedimientos, aislamiento, identificación y caracterización de *Vibrio cholerae*. Organización Panamericana de la Salud (OPS).
- Eslava, C. A., I. Rosas, M. Solano, G. Delgado, M. Ramírez, J. M. Villaseca, A. Cravioto. 2007. *Vibrio cholerae*: bacteria ambiental con diferentes tipos de vida. Instituto Nacional de Ecología (SEMARNAT) [en línea]. México [citado: 16 de agosto del 2010]. Disponible en Internet: <http://www2.ine.gob.mx/publicaciones/libros/440/cap2.html>
- Fernández, E. 2008. Microbiología e inocuidad de los alimentos. Universidad Autónoma de Querétaro. México.
- González, S., A. Villagra, M. Pichel, S. Figueroa, G. Merletti, M. I. Caffer, M. C. Del Castillo, N. Binsztein. 2009. Caracterización de aislamientos de *Vibrio cholerae* NO-O1, NO-O139 asociados a cuadros de diarrea. Revista Argentina de Microbiología 41: 11-19.
- Jiang, S., W. Chu, W. Fu. 2003. Prevalence of cholera toxin genes (*ctxA* and *zot*) among NO-O1/O139 *Vibrio cholerae* strains from Newport Bay, California. Applied and Environmental Microbiology 69: 7541-7544.
- Koneman, E. W., S. D. Allen, W. M. Janda, P. C. Schreckenberger, W. C. Winn. 2001. Diagnóstico Microbiológico. Editorial Médica Panamericana. Madrid.
- Madigan, M. T., J. M. Martinko, J. Parker. 2003. Biología de los microorganismos. Editorial Prentice Hall. Madrid.
- Murray, P. R., K. S. Rosenthal, M. A. Pfaller. 2006. Microbiología médica. Elsevier. Madrid.

- OMS (Organización Mundial de la Salud). 2009. Weekly epidemiological record, No.31 [en línea]. Suiza: OMS, 2009, [citado: 04 de Agosto del 2012]. Disponible en Internet: <http://www.who.int/wer/2009/wer8431.pdf>
- OMS (Organización Mundial de la Salud). 2011. Weekly epidemiological record, No.31 [en línea]. Suiza: OMS, 2011, [citado: 04 de Agosto del 2012]. Disponible en Internet: <http://www.who.int/wer/2011/wer8631.pdf>
- OMS (Organización Mundial de la Salud). 2012. Cólera [en línea]. OMS, 2012, [citado: 4 de Agosto del 2012]. Disponible en Internet: <http://www.who.int/topics/cholera/about/es/index.html>
- Prescott, L. M., J. P. Harley, D. A. Klein. 2002. Microbiología. MacGraw Hill. México.
- SSA (Secretaría de Salud). 2001. Manual para la vigilancia epidemiológica del cólera en México. SSA. México.
- SSA (Secretaría de Salud). 2008. Programa de acción específico 2007-2012 Cólera. SSA. México.
- Viña, M. R. 2004. *Vibrio cholerae* NO-O1 asociado a diarreas: factores de virulencia y diversidad genética de un patógeno emergente en Latinoamérica. Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas-ANLIS "Carlos G. Malbrán". Departamento Bacteriología. Servicio Enterobacterias. Argentina.