



Implementación de un múltiplex PCR para el diagnóstico del vibrio cholera, en el control de calidad de camarón de exportación

Implementation of a multiplex PCR for the diagnosis of vibrio cholera, in quality control of export shrimp

Implementação de um PCR multiplex para o diagnóstico do Vibrio cholerae em qualidade de exportação de controle camarão

Elvia P. Aspiazu-Miranda ^I
aspiazu_elvita@yahoo.com

Yazmin De Las Mercedes Granda-Barba ^{II}
yazmin.grandab@ug.edu.ec

Carmen E. Mosquera-Herrera ^{III}
carmen.mosquerah@ug.edu.ec

Recibido: 30 de enero de 2017 * **Corregido:** 20 de febrero de 2017 * **Aceptado:** 20 junio de 2017

^I Docente, Universidad de Guayaquil, Guayaquil, Ecuador.

^{II} Docente, Universidad de Guayaquil, Guayaquil, Ecuador.

^{III} Docente, Universidad de Guayaquil, Guayaquil, Ecuador.

Resumen

El objetivo del presente trabajo, es implementar la técnica de Multiplex- PCR para el diagnóstico en forma simultánea de los genes de toxina de *Vibrio cholera*, aislados a partir de muestras de *Litopenaeus vannamei*, evaluar este diagnóstico en situaciones de control epidemiológico y de control de calidad. Se usaron muestras de bacterias en medio de cultivo sólido y en caldos pre-enriquecidos para evaluar eficiencia mediante comparaciones de protocolos de miniprep de purificación fenol/cloroformo/isoamil alcohol, y método rápido para evitar usar fenol/cloroformo/isoamil alcohol; se emplearon iniciadores específicos de genes marcadores de virulencia, y se optimizaron las condiciones de amplificación de la Simple y Multiplex -PCR para la detección de *Vibrio cholera*. Se logró optimizar un multiplex PCR para la detección de *Vibrio cholera* empleando iniciadores para 4 genes de virulencia (*ctxA*, *toxR*, *tcpA* e *hlyA*) la cual después de optimización es capaz de detectar *ctxA* e *hlyA* en las diluciones 10^{-7} mientras que para los genes *toxR* y *tcpA* hasta la dilución 10^{-8} , la cual basada en su sensibilidad se puede sugerir su uso como sistema de monitoreo sensible de productos acuícolas para determinar la inocuidad frente a este patógeno.

Palabras Claves: Genes, Multiplex – PCR, Diagnostico, Toxina, *Vibrio cholera*

Summary

The objective of the present work is to implement the Multiplex PCR technique for the simultaneous diagnosis of *Vibrio cholera* toxin genes isolated from *Litopenaeus vannamei* samples to evaluate this diagnosis in epidemiological control and control situations quality. Bacterial samples were used in solid culture medium and in pre-enriched broths to evaluate efficiency by comparisons of phenol / chloroform / isoamyl alcohol purification miniprep protocols, and rapid method to avoid using phenol / chloroform / isoamyl alcohol; Specific primers of virulence marker genes were used and the amplification conditions of the Simplex and Multiplex-PCR for the detection of *Vibrio cholera* were optimized. It was possible to optimize a PCR multiplex for the detection of *Vibrio cholera* using primers for 4 virulence genes (ctxA, toxR, tcpA and hlyA) which after optimization is able to detect ctxA and hlyA in 10⁻⁷ dilutions whereas for the ToxR and tcpA genes up to dilution 10⁻⁸, which based on their sensitivity can be suggested as a sensitive monitoring system for aquaculture products to determine the safety of this pathogen.

Key Words: Genes, Multiplex - PCR, Diagnosis, Toxin, *Vibrio cholera*

Resumo

O objetivo deste trabalho é a implementar a técnica de multiplex-PCR para o diagnóstico in simultaneamente os genes de toxina da cólera *Vibrio* isolada a partir de amostras de *Litopenaeus vannamei*, este diagnóstico em situações avaliar a monitorização e controlo epidemiológico qualidade. Amostras de bactérias foram usadas na forma sólida e em caldo para avaliar a eficiência pré-enriquecido por comparações de protocolos de purificação de miniprep de fenol / clorofórmio / álcool isoamílico, e método rápido para evitar o uso de fenol / clorofórmio / álcool isoamílico; iniciadores específicos para o gene foram utilizados marcadores de virulência e as condições de amplificação do Multiplex-PCR simples e para a detecção de *Vibrio cholerae* optimizado. Foi possível optimizar um PCR multiplex para a detecção de *Vibrio cholerae* utilizando os iniciadores 4 genes de virulência (ctxA, Tox, tcpA e HlyA) após optimização que podem detectar ctxA e hlyA em diluições de 7/10, enquanto para genes tox e tcpA até diluição 8/10, que com base na sua sensibilidade pode sugerir a utilização como sistema de controlo sensível de produtos de aquacultura para a determinação da segurança contra este patogénio.

Palavras-chave: Genes, Multiplex - PCR, diagnóstico, toxina, *Vibrio cholerae*

Introduccion.

La camaronicultura en Ecuador, y en otros países productores, es una actividad que genera importantes recursos económicos (Aguirre *et al.*, 2000); en nuestro País representa el tercer rubro de ingresos por exportación, generando grandes fuentes de trabajo a través de los procesos de producción y procesamiento del producto para la exportación. Siendo el camarón uno de los productos marinos más importantes del comercio internacional y la mayor parte de este producto proviene de países en desarrollo. Mientras que el camarón de mucho valor es en su mayoría exportado por los países en desarrollo para ganar valiosas divisas, el camarón de poco valor se consume en el mercado interno.

En el caso del camarón para el mercado internacional, por lo general se implementan prácticas de higiene específicas para prevenir su contaminación. El camarón puede estar contaminado con *V. cholerae* toxigénico durante la manipulación debido a higiene insuficiente del personal y al lavado con agua contaminada.

Debido a esto el Ecuador mantiene un sistema de control de calidad de alimentos altamente reconocido, que cumple las exigencias de la FDA (Administración de Medicamentos y Alimentos de los EE.UU), del Departamento de Veterinaria de la Unión Europea, de la Organización de Protección del Consumidor en Japón, y de la Organización de Inspección del Canadá. Todas las plantas procesadoras de alimentos del país cumplen estas exigencias reconocidas como el sistema HACCP (Análisis de riesgos y puntos críticos de control), así como todos los requerimientos de los compradores. De esta manera, se puede considerar que los camarones exportados por Ecuador presentan uno de los más confiables niveles sanitarios del mundo.

Implementación de un múltiplex PCR para el diagnóstico del vibrio cholera, en el control de calidad de camarón de exportación

Sin embargo, los organismos internacionales están cada vez más estrictos en el control de calidad de los productos de exportación, particularmente en lo concierne la presencia de bacterias patógenas, tales como *Salmonella spp*, *Vibrio cholerae*, *Vibrio parahaemolyticus* (Oliver y Kaper, 1997, Dalsgaard, 1998). Consecuentemente, es necesario implementar técnicas modernas, tales como la PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa) que permitan la detección rápida, sensible y específica, además de ser estandarizadas y aprobadas por organismos internacionales.

Con el desarrollo y la aplicación de las técnicas modernas de biología molecular, será posible incrementar la confiabilidad microbiológica de los camarones y subsecuentemente mejorar la competitividad del sector camaronero ecuatoriano en el mercado internacional, precautelando el producto de exportación así como la salud de los consumidores.

Materiales y métodos.

- Obtención de las muestras.
- Optimización de los protocolos de extracción de ADN bacteriano.
- Extracción de ADN de bacterias a partir de colonias y de cultivo líquido (Método rápido).
- Protocolo miniprep de purificación con fenol/cloroformo /Isoamil alcohol.
- Obtención de los iniciadores específicos para detectar *V. cholerae*.
- Optimización de la Múltiplex-PCR.
- Optimización de la Simple-PCR para la detección de *V. cholerae*.
- Electroforesis del ADN en geles de agarosa.
- Sensibilidad de los iniciadores para la detección de *V. cholerae*.

- Simulación de infección por inoculación de *V. cholerae* en tejido de camarón.

Resultados

El presente trabajo permitió el desarrollo y optimización de una prueba de multiplex PCR para la detección de *Vibrio cholerae* en muestras de camarón.

1) Extracción de ADN bacteriano

Los protocolos de extracción probados en este estudio, son considerados altamente eficientes para la extracción de ADN de bacterias en muestras de tejido homogenizado de camarón pre-enriquecidas en APB y en cultivos bacterianos puros realizados en agares y caldos debido a que eliminan eficientemente los inhibidores de la PCR que puedan estar presentes en los medios de cultivo.

El protocolo para extracción de ADN bacteriano basado en CTAB permitió la obtención de ADN de buena calidad, los cuales conduciría a una óptima amplificación de los diferentes genes de virulencia de *V. cholerae*. El protocolo de extracción rápida de ADN bacteriano permite obtener ADN suficiente para una identificación rápida de muestras analizadas para determinar la presencia de *V. cholerae*.

Se determinó que el protocolo de extracción rápida de ADN cumplen los requisitos necesarios para la obtención de ADN que permita la detección de *V. cholerae* por PCR. No se excluyó el protocolo de purificación con fenol cloroformo (CTAB), lo cual es un método confiable aunque extenso y caro. Cabe recalcar que el método de extracción rápida puede ser modificado conduciendo a iguales resultados para obtener el ADN preservado.

2) **Iniciadores específicos para detectar *V. cholerae*.**

Los iniciadores empleados en la detección de los genes asociados a virulencia, los cuales en el previamente han sido empleados para la detección de *V. cholerae* mediante PCR (Rivera *et al.*, 2003), permitieron *in silico* mediante el análisis en el software on-line Blast y en este estudio la detección de sus respectivos genes como son los genes *ctxA*, *toxR*, *tcpA* y *hlyA* empleando simple y Multiplex PCR.

Las condiciones de amplificación fueron optimizadas para cada uno de los cuatro genes blancos, antes de optimizar el ensayo para el empleo de los mismos en un formato de multiplex. Mediante el análisis de las condiciones termodinámicas de los iniciadores en el programa Vector NTi se obtuvo que los diferentes juegos de iniciadores tuvieran una temperatura de hibridación de 60°C, por lo cual podrían trabajar en condición de multiplex, una vez optimizadas las condiciones de amplificación.

3) **Optimización de una simple PCR para detectar *V. cholerae*.**

Los iniciadores desarrollados por Rivera *et al.*, 2001 para la detección de los genes de virulencia de *V. cholerae* fueron probados frente a cepas de referencia en este estudio permitiendo la amplificación de los fragmentos de 564, 779, 451/620 y 481/738-727 pb correspondientes para la detección de los genes asociados a virulencia *ctxA*, *toxR*, *tcpA* e *hlyA* respectivamente.

Se observó que ambos protocolos de extracción (CTAB y rápida) permiten la amplificación de los diferentes genes de virulencia.

Basado en estos resultados, se optimizó las condiciones de amplificación teniendo en cuenta que aunque la extracción rápida permite los mismos resultados que el método CTAB, al no contener procesos de purificación podría ocurrir inhibiciones, para esto se evaluó si al realizar dilución del

ADN extraído mostraba iguales o mejores resultados, el número de ciclos de PCR y concentración de MgCl₂ necesarios para una óptima amplificación.

Así mismo se observa que las muestras a las cuales se les realiza una dilución de su ADN extraído muestran mejores resultados, debido a la dilución de los posibles inhibidores de la reacción de PCR los cuales podrían influir en los resultados dando falsos negativos.

La concentración de MgCl₂ no influye en el proceso de amplificación ya que se obtuvieron similares resultados para los diferentes genes evaluados, en los cuales los genes *ctxA* y *tcpA* no se obtuvieron amplificaciones a diluciones de 10⁻⁸ mientras de los otros dos genes la amplificación si se obtenía hasta la menor dilución 10⁻⁸

No se observa diferencias entre muestras de camarón inoculado con *V. cholerae* y colonias cultivadas.

Debido a que la amplificación de muestras de camarón inoculadas con *V. cholerae* fue posible se evaluó el mínimo de horas podrían ser detectables los diferentes genes de *V. cholerae*. Resultando que 8 horas sería tiempo suficiente de incubación de muestras de camarón pre-enriquecido para la detección de los diferentes genes de virulencia.

4) **Optimización de Multiplex PCR para detectar *V. cholerae*.**

Debido a que las condiciones de amplificación fueron optimizadas para la detección de los genes de forma individual, se procedió a combinarlos en un proceso de multiplex PCR, empleando los mismos parámetros que se emplearon en la PCR simple (35 ciclos, 2mM MgCl₂). Mediante ambos procesos de extracción de ADN se pudo obtener similares resultados de amplificación de las

muestras en formato multiplex, sin necesidad de modificar las condiciones empleadas en la optimización de simple PCR

Conclusiones.

En este estudio, se han optimizado los protocolos de extracción de ADN bacteriano, tanto para la Simple-PCR como la Multiplex-PCR, a fin de detectar de manera sensible y específica diferentes genes de *V. cholerae*. Los iniciadores específicos mostraron ser ampliamente específicos ya que permitieron amplificar los fragmentos de los tamaños esperados en los genes blancos.

Los protocolos puestos a punto en el presente trabajo resultaron entonces ser confiables y rápidos para la detección sensible y específica de *V. cholerae*.

Varios de los actuales ensayos de PCR para la detección de *V. cholerae* describen el límite de detección en referencia al ADN extraído a partir de diferentes tipos de muestras y no específicamente definido el número mínimo de células requeridos para la detección (Albert *et al.*, 1997; Lipp *et al.*, 2003; Lyon, 2001; Rivera *et al.*, 2003; Shangkuan *et al.*, 1995).

Con relación a pruebas de convencional multiplex PCR para la detección de *V. cholerae*. Kapley and Purohit, 2001 reportaron niveles de sensibilidad de 100 UFC para su prueba dúplex, y Hoshino *et al.*, 1998 reportó niveles de sensibilidad de 65 y 200 UFC para los serotipos O1 y O139 de *V. cholerae* respectivamente en su prueba triplex.

En conclusión la detección simultánea por Multiplex-PCR de los genes marcadores de virulencia nos provee de una información comprensible acerca de la ocurrencia y distribución de estos genes en *V. cholerae* y otras especies.

Bibliografía.

- Aguirre-Guzmán G. and Ascencio-Valle F. 2000. Infectious disease in shrimp species with aquaculture potential. *Resent Research. Development Microbiology*, 4:333-348.
- Albert MJ, Bhuiyan NA, Talukder KA, Faruque AS, Nahar S, Faruque SM, Ansaruzzaman M, Rahman M. Phenotypic and genotypic changes in *Vibrio cholera* O139 Bengal. *J Clin Microbiol*. 1997 35(10):2588-92.
- Dalsgaard, A. 1998. The occurrence of human pathogenic *Vibrio* spp. and *Salmonella* in aquaculture. *International Journal of Food Science and Technology*, 33: 127-138.
- Faruque SM., Albert MJ., and Mekalanos JJ. Epidemiology, genetics, and ecology of toxigenic *Vibrio cholerae*. *Microbiol Mol Biol Rev* 62 (4):1301-14, 1998.
- Faruque SM., Asadulghani, Abdul ARM, Albert M.J., Nasirul Islam K.M., and Mekalanos JJ. Induction of the lysogenic phage encoding cholera toxin in naturally occurring strains of toxigenic *Vibrio cholerae* O1 and O139. *Infection and Immunity* 66 (8):3752-3757, 1998
- Fields P.I., Popovic T., Wachsmuth K., and Olsvik O. Use of polymerase chain reaction for detection of toxigenic *Vibrio cholerae* O1 strains from the Latin American cholera epidemic. *J Clin.Microbiol* 30 (8):2118-2121, 1992.
- Gubala A.J. and Proll D.F. Molecular-beacon multiplex real-time PCR assay for detection of *Vibrio cholerae*. *Appl Environ Microbiol* 72 (9):6424-6428, 2006.
- Gubala AJ. Multiplex real-time PCR detection of *Vibrio cholerae*. *Journal of Microbiological Methods* 65 (2):278-293, 2006.
- Hoshino K., Yamasaki S., Mukhopadhyay A.K., Chakraborty S., Basu A., Bhattacharya S.K., Nair G.B., Shimada T., and Takeda Y. Development and evaluation of a multiplex PCR assay for rapid detection of toxigenic *Vibrio cholerae* O1 and O139. *FEMS Immunology and Medical Microbiology* 20 (3):201-207, 1998.
- Jin D., Xiao-Jing Xu, Su-Hong Chen, Si-Yuan Wen, Xue-En Ma, Zheng Zhang, Feng Lin and Sheng-Qi Wang. (2007) Detection and identification of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 and *Vibrio cholerae* O139 using oligonucleotide microarray. *Infectious Agents and Cancer*, 2:23.
- Kapley A, Purohit HJ. Detection of etiological agent for cholera by PCR protocol. *Med Sci Monit*. 2001 Mar-Apr;7(2):242-5.
- Keasler, S. P., and R. H. Hall. 1993. Detecting and biotyping *Vibrio cholerae* O1 with multiplex chain reaction. *Lancet*. 341:1661
- Kong R.Y., Lee S.K., Law T.W., Law S.H., and Wu R.S. 2002. Rapid detection of six types of bacterial pathogens in marine waters by multiplex PCR. *Water Res* 36 (11):2802-12.
- Lipp E.K., Rivera I.N.G., Gil A.I., Espeland E.M., Choopun N., Louis V.R., Russek-Cohen E., Huq A., and Colwell R.R. Direct detection of *Vibrio cholerae* and *ctxA* in Peruvian coastal water and plankton by PCR. *Applied and Environmental Microbiology* 69 (6):3676-3680, 2003.
- Lyon WJ. TaqMan PCR for detection of *Vibrio cholerae* O1, O139, non-O1, and non-O139 in pure cultures, raw oysters, and synthetic seawater. *Appl Environ Microbiol* 67 (10):4685-93, 2001.

Implementación de un múltiplex PCR para el diagnóstico del vibrio cholera, en el control de calidad de camarón de exportación

Oliver, J.D. and Kaper, J.B. 1997. *Vibrio* Species. In M.P. Doyle, L.R. Beuchat and T.J. Montville, eds. *Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers*, p228-264. Washington, D.C., ASM Press.

Rivera I.N., Chun J., Huq A., Sack R.B., and Colwell R.R. 2001. Genotypes associated with virulence in environmental isolates of *Vibrio cholerae*. *Appl. Environ. Microbiol* 67 (6):2421-2429.

Shangkuan, Y. H., Y. S. Show, and T. M. Wang. 1995. Multiplex polymerase chain reaction to detect toxigenic *Vibrio cholerae* and to biotype *Vibrio cholerae* O1. *J. Appl. Bacteriol.* 79:264–273.

Sharma C., Thungapathra M., Ghosh A., Mukhopadhyay AK., Basu A., Mitra R., Basu I., Bhattacharya SK., Shimada T., Ramamurthy T., Takeda T., Yamasaki S., Takeda Y., and Nair GB. Molecular analysis of non-O1, non-O139 *Vibrio cholerae* associated with an unusual upsurge in the incidence of cholera-like disease in Calcutta, India. *Journal of Clinical Microbiology* 36 (3):756-63, 1998.

Singh D.V., Isac S.R., and Colwell R.R. Development of a hexaplex PCR assay for rapid detection of virulence and regulatory genes in *Vibrio cholerae* and *Vibrio mimicus*. *Journal of Clinical Microbiology* 40 (11):4321-4324, 2002.

Singh D.V., Matte M.H., Matte G.R., Jiang S., Sabeena F., Shukla B.N., Sanyal S.C., Huq A., and Colwell R.R.. Molecular analysis of *Vibrio cholerae* O1, O139, non-O1, and non-O139 strains: clonal relationships between clinical and environmental isolates. *Appl Environ Microbiol* 67 (2):910-21, 2001.