

# 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 contra el cólera

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

Departamento de Biología Molecular, Área Enfermedades Infecciosas, Centro Nacional de Investigaciones Científicas, CNIC.

**email:** heidy.peidro@cnic.edu.cu

El candidato vacunal vivo oral atenuado CV638 se produce siguiendo los criterios de las guías de Buenas Prácticas de Producción específicas para vacunas. El ingrediente activo de este candidato vacunal es la cepa atenuada genéticamente *Vibrio cholerae* 638; desarrollada por investigadores del Centro Nacional de Investigaciones Científicas de Cuba (CNIC), a partir de la cepa toxigénica de *V. cholerae* serogrupo O1, biotipo El Tor C7258, (Perú, 1991), mediante la remoción de los genes que codifican la producción de la toxina del cólera (*ctxAB*). Dado que la cepa 638 carece de estos genes en su genoma, la presencia de *ctxAB* en las preparaciones vacunales estaría dada por una contaminación con una cepa toxigénica de *V. cholerae*. El presente estudio tuvo como objetivo desarrollar un PCR específico para detectar los genes *ctxAB* a partir de ADN aislado de preparaciones del candidato vacunal CV638 contaminado artificialmente con *V. cholerae* toxigénico. La sensibilidad del ensayo de PCR empleando como molde ADN de la cepa toxigénica fue de 1 picogramo (pg) de ADN genómico por reacción, correspondiente a ~200 copias del genoma de la bacteria. La sensibilidad del método de PCR para detectar cepas toxigénicas en preparaciones vacunales de la cepa 638, contaminadas con una cepa toxigénica fue de  $\sim 7 \times 10^3$  unidades formadoras de colonia (UFC) de la cepa toxigénica por dosis del candidato vacunal CV638. Este método, una vez validado, pudiera emplearse en el control de la calidad de la producción del candidato vacunal vivo CV638.

**Palabras claves:** *V. cholerae* 638, vacunas, toxina del cólera, PCR.

## Introducción

La especie bacteriana *V. cholerae* enterotoxigénica de los serogrupos O1 y O139 es el agente causal del cólera (1). Aunque existen tratamientos completamente efectivos para esta enfermedad, en situaciones de brotes epidémicos muchos pacientes no reciben el tratamiento oportuno, por lo que pueden aumentar los casos de muertes. Entre el 75-85% de las infecciones ocurren en portadores asintomáticos que contribuyen además a la transmisión y a la instauración del endemismo. Por todo lo mencionado anteriormente, se han desarrollado varias vacunas contra el cólera con el objetivo de reducir el impacto en morbilidad y mortalidad de la enfermedad en esos escenarios (2). Los candidatos vacunales basados en cepas vivas atenuadas de *V. cholerae* se consideran una de las variantes más promisorias, dada su capacidad potencial para conferir una larga protección contra la enfermedad tras la administración de una sola dosis (3).

La cepa atenuada genéticamente *V. cholerae* 638 es el ingrediente activo del candidato vacunal CV638 y se obtuvo por investigadores del Centro Nacional

de Investigaciones Científicas a partir de la cepa *V. cholerae* C7258 de serogrupo O1, biotipo El Tor y serotipo Ogawa. La cepa 638 se modificó genéticamente por delección del profago CTX $\Phi$ , portador de los genes de la toxina del cólera (*ctxAB*), seguido del remplazo del gen *hapA*, codificante de la hemaglutinina proteasa, por un gen inactivado, mediante la inserción de un fragmento de ADN de la bacteria *Clostridium thermocellum* que contenía al gen *celA*, codificador de la endoglucanasa A (4). Esta modificación origina cepas que no expresan la hemaglutinina proteasa y poseen la actividad endoglucanasa, la cual permite distinguir a *V. cholerae* 638 de otros vibriones por la aparición de un halo de degradación en placas indicadoras de carboximetilcelulosa teñidas con rojo congo.

Para la liberación de los lotes vacunales de CV638 y cumpliendo las regulaciones establecidas (5) por el Centro para el Control Estatal de la Calidad de los Medicamentos (CECMED), es necesario determinar la ausencia de los genes de la toxina del cólera en las preparaciones vacunales para el control de calidad.

\* Lic. Bioquímica y Biología Molecular. Dpto. Biología Molecular. Área de Enfermedades Infecciosas.

Aunque la cepa vacunal 638 posee el marcador *celA*, el cual permite su distinción fenotípica inequívoca de otras cepas de *V. cholerae*, la detección de pequeñas cantidades de vibriones toxigénicos mediante el análisis fenotípico de la expresión del marcador *celA* en presencia de hasta una cantidad  $10^6$  UFC/mL mayor de la cepa vacunal, requiere la evaluación de un gran número de colonias. Por esta razón, es necesario implementar métodos que permitan una evaluación confiable de las preparaciones vacunales y puedan ser utilizados por los laboratorios de control y producción.

La reacción en cadena de la polimerasa, conocida como PCR, en contraste con la caracterización fenotípica, permite una detección específica y sensible, y por tanto, una caracterización genotípica de las células bacterianas. Este método ha sido utilizado con éxito ampliamente para detectar cepas de *V. cholerae* toxigénicas presentes en muestras clínicas o ambientales (6), así como en preparados vacunales (7).

Teniendo en cuenta estos antecedentes, el presente estudio tiene como objetivo desarrollar un ensayo de PCR específico para detectar los genes de la toxina del cólera (*ctxAB*) y evaluar su desempeño en preparaciones del candidato vacunal vivo CV638 contaminadas artificialmente con *V. cholerae* toxigénico.

## Materiales y Métodos

### Cepas bacterianas, medios y condiciones de cultivo

La cepa de *V. cholerae* toxigénica C7258Kn (Serogrupo O1, biotipo El Tor, serotipo Ogawa, Perú, 1991), derivada de *V. cholerae* C7258 así como la cepa vacunal atenuada *V. cholerae* 638 (C7258  $\Delta$ CTX $\Phi$ , *hap::celA*) (4) se utilizaron como fuente de ADN genómico para ser empleado como molde durante el establecimiento de las condiciones del ensayo de PCR.

Para la propagación de las cepas bacterianas se utilizó el caldo Luria-Bertani (LB) (8) y el LB sólido se preparó por adición de agar al 1,5%. Para la selección de la cepa C7258Kn el medio de cultivo se suplementó con kanamicina (Kan), a  $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ .

### Selección y síntesis de cebadores

Los cebadores se diseñaron de acuerdo con la secuencia del operón *ctxAB* de la cepa *V. cholerae* El Tor N16961 (9), mediante el análisis con el programa GeneRunner v3.05 (Hastings Software, Inc., New York, EUA). La especificidad de los cebadores se evaluó in silico mediante las herramientas bioinformáticas

Primer-Blast (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) y BLASTn ([http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&PAGE\\_TYPE=BlastSearch&LINK\\_LOC=blasthome](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&PAGE_TYPE=BlastSearch&LINK_LOC=blasthome)). Una vez seleccionados los cebadores, estos se sintetizaron en el Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología (La Habana, Cuba).

### Preparación de mezclas de CV638 contaminadas con la cepa toxigénica C7258Kn

Diez dosis del candidato vacunal CV638 ( $10^{10}$  Unidades Formadoras de Colonias (UFC) por dosis vacunal) se resuspendieron individualmente en 1 mL de solución salina (NaCl 0,9%, m/v), se centrifugaron 10 min a 13.000 rpm y se desechó el sobrenadante. Paralelamente, a un cultivo exponencial de la cepa C7258Kn crecido en LB (Densidad óptica a 600 nm igual a 1,0) se le realizaron diluciones seriadas en base 10 hasta un factor  $10^{-8}$  en solución salina. Alícuotas de 1 mL de las diluciones  $10^{-5}$ - $10^{-8}$  de C7258Kn, por duplicado, se emplearon para resuspender los precipitados celulares de la suspensión del candidato vacunal CV638. A dos de las muestras que se emplearon como controles negativos se les añadió 1 mL de solución salina. Alícuotas de 500  $\mu\text{L}$  de las suspensiones del candidato vacunal CV638 se centrifugaron 10 min a 13.000 rpm y se desechó el sobrenadante. El precipitado celular se conservó a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta la purificación del ADN total.

El número de UFC de la cepa C7258Kn presente en las diluciones empleadas para contaminar las preparaciones vacunales se cuantificaron por extensión en placas de LBKn, por triplicado, y en volúmenes variables según la dilución (1 mL de las diluciones  $10^{-8}$  y  $10^{-7}$ ; 100  $\mu\text{L}$  de la dilución  $10^{-6}$  y 100  $\mu\text{L}$  de una dilución  $10^{-1}$  de la dilución  $10^{-5}$ ). El número de UFC de *V. cholerae* 638 presente en las preparaciones se determinó por extensión de alícuotas de 10  $\mu\text{L}$  de las diluciones  $10^{-5}$ - $10^{-8}$  en triplicado y en placas de LB. Las placas se incubaron a  $37^{\circ}\text{C}$  durante toda la noche y al día siguiente se procedió al conteo de las colonias.

### Extracción del ADN total

La purificación del ADN total bacteriano se realizó mediante el método que emplea al bromuro de cetil-trimetil amonio (CTAB) (10). El ADN genómico de la cepa C7258Kn empleado como control positivo, se aisló a partir de un cultivo en LB durante toda la noche. El ADN obtenido a partir de las preparaciones del candidato vacunal CV638 se resuspendió en 100  $\mu\text{L}$  de

agua destilada 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.

### **Establecimiento de las condiciones del ensayo de PCR**

Las concentraciones de los reactivos empleadas para el ensayo de PCR fueron: MgCl<sub>2</sub>: 1,5 mM (Promega, Madison WI, U.S.A.), cebadores: 10 pmol/μL (CIGB, La Habana), deoxynucleósidos trifosfato: 200 μmol/L (Promega, Madison WI, U.S.A.), tampón de PCR 1X (Roche) y 1 U de ADN polimerasa Taq (CIGB, Sancti Spiritus). Las reacciones de PCR se realizaron en el equipo de ciclos térmicos Eppendorf (EUA) en un volumen final de 20 μL, con el siguiente programa de amplificación: desnaturalización a 94°C por 2 min, 40 ciclos de 94°C por 30 seg, 50°C por 30 seg y 72°C por 30 seg. Se utilizó un paso de extensión final de 2 min a 72°C. Los productos amplificados se conservaron a -20°C hasta su análisis electroforético, para lo cual se emplearon 15 μL del producto de la reacción de PCR.

Como temperatura de hibridación del ensayo se evaluaron 45, 50, 55, 60 y 65°C y se mantuvieron constantes el resto de los parámetros de la reacción. Para seleccionar la temperatura de hibridación del ensayo, se utilizaron 100 ng de ADN molde de la cepa toxigénica C7258Kn. El programa de amplificación no sufrió variaciones excepto en el rango de temperatura de hibridación evaluado (45°C – 65°C).

### **Determinación del límite de detección del ensayo de PCR**

Alicuotas de 1 μL del ADN genómico de la cepa C7258Kn (1 ng/μL-10 fg/μL) se emplearon en duplicado, en tres ensayos de PCR independientes, para determinar la sensibilidad del ensayo.

El ADN purificado a partir de cada una de las muestras del candidato vacunal 638, contaminadas con aproximadamente 10, 10<sup>2</sup>, 10<sup>3</sup> y 10<sup>4</sup> células de *V. cholerae* C7258Kn, se empleó para determinar igualmente la sensibilidad del método. En el ensayo de PCR, se realizaron 5 réplicas por cada muestra de ADN purificada (20 en total por cada condición).

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) e incidencia de luz ultravioleta en transiluminador

(Reuser, S.L, EUA). Para el análisis densitométrico de las imágenes se empleó el programa GuefastScan (<<http://www.neuronicsa.com/modulos/producto/guefast.htm>>), que permite realizar la exploración automática de los carriles de un gel para determinar objetivamente la posición e intensidad relativa de las bandas de ADN, a partir del cálculo de la relación señal/ruido de la banda.

### **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 análisis de varianza (ANOVA) 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>>).

### **Resultados y Discusión**

La detección de los genes de la toxina del cólera en cepas de *V. cholerae* aisladas de pacientes con cólera, es un paso importante en el diagnóstico de la enfermedad, debido a que solo las cepas productoras de la toxina se han asociado con epidemias y diarreas acuosas, las cuales causan deshidratación grave al paciente (11). Por este motivo, para la liberación de los lotes vacunales CV638 cumpliendo las regulaciones establecidas por el CECMED (5), es necesario determinar la ausencia de los genes *ctxAB* en las preparaciones de este candidato. Varios ensayos de PCR se han descrito para detectar los genes *ctxAB*, utilizando cebadores que amplifican regiones que abarcan tanto al gen codificador de la subunidad catalítica A (*ctxA*) como la subunidad estructural B (*ctxB*) (6, 12-14).

### **Selección de cebadores específicos para los genes *ctxAB***

La sensibilidad y especificidad de una reacción de PCR depende en buena medida de usar cebadores de calidad, que incluye que sean específicos para cada alelo del

gen diana (15-18). Además, los cebadores no deben formar estructuras secundarias, tales como los lazos o burbujas, ni dímeros intermoleculares. En este estudio, se analizaron combinaciones de oligonucleótidos presentes en la región codificadora de los genes *ctxAB* a partir de la secuencia del genoma de *V. cholerae* N16961, con el objetivo de determinar la presencia de ambos genes simultáneamente. La especificidad de los cebadores se evaluó *in silico*, mediante la búsqueda de secuencias homólogas en las base de datos nucleotídica no redundante del NCBI. Al concluir estos análisis, se seleccionaron los oligonucleótidos de secuencias: 5'-CCC AAA GTC TAG GTG TAA AAT TCC-3' y 5'-GCAATC CTC AGG GTA TCC TTC-3', los que se corresponden con los nucleótidos 686-709 de *ctxA* y 267-287 de *ctxB*, respectivamente.

Posteriormente, se realizó una evaluación de los cebadores en *V. cholerae* y *E. coli* mediante el programa Primer-Blast. Este análisis reveló que los cebadores amplifican una única banda de 399 pb, solamente en cepas de referencia de *V. cholerae* y no en *E. coli*.

Las cepas de *V. cholerae* identificadas pertenecían al serogrupo O1 y los biotipos El Tor (N16961, MAK757, 2010EL-1786, IEC224 y G4222) y Clásico (O395), así como al serogrupo O139 (MO10). Este análisis indicó que el par de cebadores seleccionados permiten detectar la presencia de los genes *ctxAB* en una gran variedad de cepas de *V. cholerae*, pertenecientes tanto al biotipo El Tor como Clásico, del serogrupo O1 así como el serogrupo O139.

La calidad de los cebadores informados en la literatura que han sido utilizados para detectar los genes de patogenicidad de *V. cholerae*, incluidos los empleados para detectar *ctxA* y *ctxB*, se analizó *in silico* recientemente (19-20). Este análisis reveló que dos terceras partes de los cebadores publicados no son capaces de detectar apropiadamente todas las variantes genéticas de los genes diana.

En el caso de *ctxA*, de acuerdo al análisis del alineamiento de 10 secuencias únicas derivadas de 65 secuencias informadas, los 18 cebadores analizados fueron capaces de identificar todos los alelos de *ctxA* secuenciados (19-20). En el caso del cebador seleccionado en el presente estudio, que hibrida con el gen *ctxA*, el alineamiento de las secuencias correspondientes a 9 secuencias únicas de *ctxA* reveló que este cebador hibrida en las regiones conservadas en todas las secuencias, excepto en la del fragmento *ctxAB* de una cepa de *V. cholerae* serotipo Inaba aislada en Vietnam (número de acceso AJ575590.1) (21).

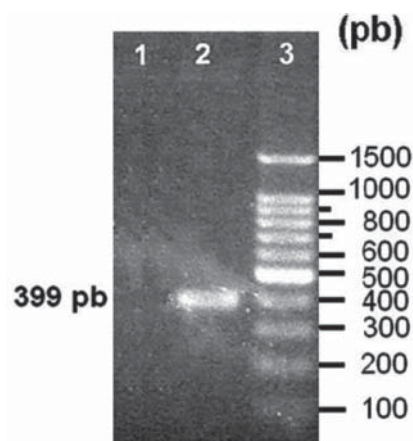
En el caso del gen *ctxB*, de acuerdo al análisis del alineamiento de 24 secuencias únicas derivadas de 205 secuencias informadas, ninguno de los cebadores publicados es capaz de identificar a todos los alelos de *ctxB* secuenciados (19-20). En el caso del cebador seleccionado que hibrida con el gen *ctxB*, este no se encuentra en la región conservada en todas las secuencias de *ctxB*. Sin embargo, hasta el momento, entre las cepas de *V. cholerae* de diferentes serogrupos y biotipos se han descrito 9 genotipos diferentes de *ctxB*, sobre la base de variaciones conservadas no aleatorias en los nucleótidos 58, 72, 83, 101, 115, 138, 165 y 203 (21). El análisis de estas variaciones reveló que el cebador en *ctxB* no hibrida en estas secuencias (nucleótidos 267-287), por lo que debe ser capaz de reconocer todos los genotipos descritos.

La especificidad de los cebadores se evaluó experimentalmente utilizando como ADN molde el de las cepas *V. cholerae* C7258Kn y *V. cholerae* 638. El par de cebadores amplificó un único fragmento de ADN en la cepa toxigénica, no así en la vacunal que tiene delecionados los genes *ctxAB* (Fig. 1, carriles 1-2).

El tamaño del fragmento amplificado fue de 400 pb, según el análisis de su migración y su comparación con la del patrón de peso molecular. Esta talla es cercana a la esperada (399 pb). Estos resultados indicaron que los cebadores seleccionados eran específicos para los genes *ctxAB*.

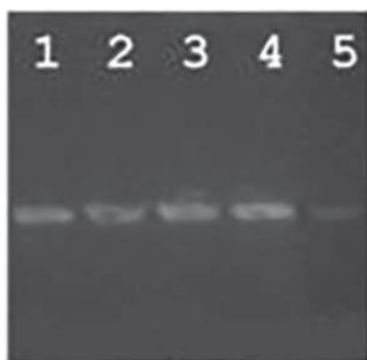
### Rango de temperatura de hibridación útil para el par de cebadores seleccionados

Teniendo en cuenta la temperatura de fusión de los cebadores, predicha por el programa GeneRunner (60,1°C



**Fig. 1.** Especificidad del ensayo de PCR empleando como molde ADN cromosomal de la cepa: 1, 638; 2, C7258Kn. En 3, patrón de peso molecular de 100 pb (Promega, EUA).

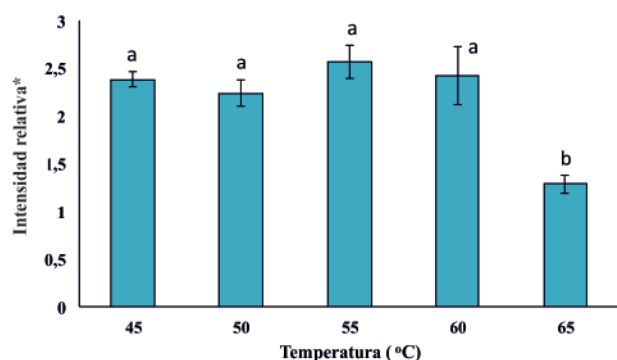




**Fig. 2.** Efecto de la temperatura de hibridación en el ensayo de PCR empleando como molde el ADN de la cepa C7258Kn: 1, 45°C; 2, 50°C; 3, 55°C; 4, 60°C; 5, 45°C.

para el cebador 1 y 61,2°C para el cebador 2), 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 (Fig. 2, carriles 1-5).

La intensidad relativa de los fragmentos amplificados se determinó mediante el análisis densitométrico de la imagen de los gels con el programa GueFastScan (Fig. 3). En el gráfico se muestran el promedio de la relación señal/ruido de cada banda y la desviación estándar de 3 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.=29), reveló que no existen diferencias significativas en la intensidad relativa del producto amplificado a las temperaturas de hibridación de 45, 50, 55 y 60°C y sí existen diferencias significativas a 65°C, según



**Fig. 3.** Efecto Intensidad relativa de los productos amplificados en función de las temperaturas de hibridación ensayadas. Letras iguales, diferencias no significativas; letras diferentes, diferencias significativas.

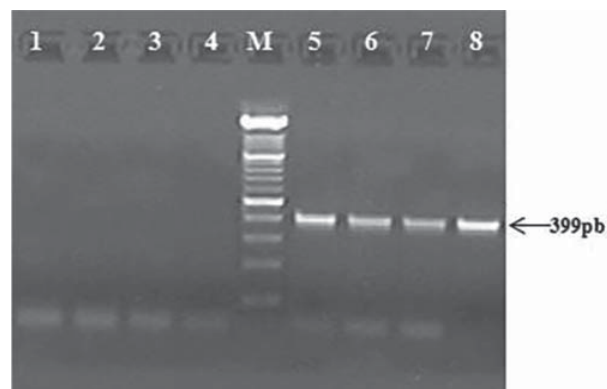
\*: Intensidad relativa expresada como la relación señal/ruido detectada para la banda del gel

análisis con Prueba de Tukey. Como temperatura de hibridación se seleccionó 50°C, dado que se observó una amplificación específica de la banda esperada.

### Límite de detección del ensayo de PCR

La sensibilidad del ensayo de PCR frente al ADN de la cepa toxigénica C7258Kn se evaluó preliminarmente utilizando cantidades decrecientes de ADN (1 ng hasta 10 fg por reacción) por triplicado. Las reacciones que amplificaron consistentemente la banda esperada fueron aquellas en las que se encontraban como mínimo 1 pg de ADN molde, valor estimado como límite de detección de este ensayo (Fig. 4). Teniendo en cuenta que el genoma de *V. cholerae* posee 3,2 Mb, 1 pg de ADN se corresponden con aproximadamente 200 genomas de la bacteria. Dado que los genes *ctxAB* se encuentran en simple copia, mediante este ensayo es posible detectar hasta ~200 copias de los genes *ctxAB* por reacción.

Aunque la amplificación a partir de ADN puro de la cepa toxigénica es relativamente simple, la verdadera prueba de los métodos basados en un PCR para detectar cepas toxigénicas de *V. cholerae* en una preparación de una cepa vacunal viva, es la detección de su sensibilidad en condiciones donde exista un alto número de células de la cepa vacunal, así como lio-protectores tales como leche y sacarosa que pueden interferir durante la purificación del ADN. Por esta razón, el ADN purificado a partir las dosis de CV638 contaminadas con las diferentes cantidades de la cepa toxigénica (Tabla 1) se empleó como molde en el ensayo de PCR para determinar el límite de detección en estas condiciones, empleando 2 µg de ADN total por reacción. Se observó una correspondencia entre el número de UFC de la cepa toxigénica en las dosis del CV638 contaminadas con las



**Fig. 4.** Límite de detección del ensayo de PCR: 1, sin ADN (control de reactivos); 2, ADN de 638; 3, 10 fg; 4, 100 fg; 5, 1 pg; 6, 10 pg; 7, 100 pg y 8, 1 ng de ADN de C7258Kn. M, marcador de peso de ADN de 100 pb (Roche, EUA).

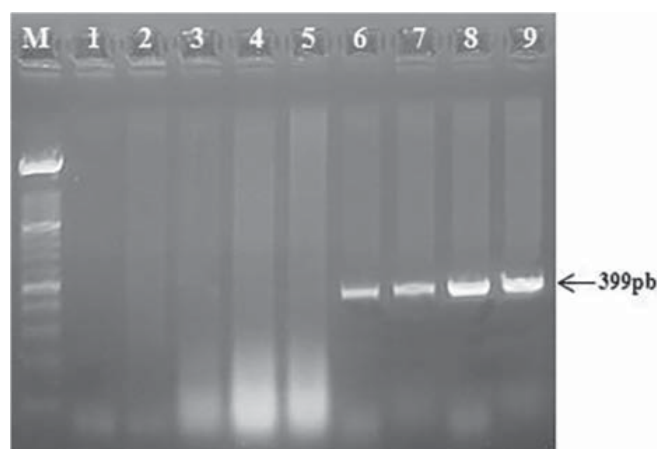
**Tabla 1.** Número de unidades formadoras de colonias (UFC) de la cepa toxigénica *V. cholerae* C7258Kn en las diluciones empleadas para contaminar las preparaciones vacunales.

Diluciones de la cepa toxigénica	UFC de la cepa toxigénica ± DE*
10 <sup>-8</sup>	7,33 ± 2,4
10 <sup>-7</sup>	53,40 ± 13,0
10 <sup>-6</sup>	683,33 ± 18,8
10 <sup>-5</sup>	7333,3 ± 2248

\* Promedio de UFC ± desviación estándar por mL de dilución.

diluciones realizadas (Tabla 1). El número de UFC de 638 en la preparación vacunal fue de  $9,8 \pm 1,5 \times 10^{10}$ .

Este ensayo amplificó la banda de la talla esperada (399 pb) en las muestras de ADN provenientes de las preparaciones contaminadas con  $\sim 7 \times 10^3$  células de la cepa toxigénica *V. cholerae* C7258Kn (Fig. 5). Este valor está en el mismo orden que el reportado por otros autores para garantizar la seguridad de vacunas orales vivas contra el cólera como es el caso de la vacuna Orochol (7) por lo que, una vez validado, el ensayo del presente estudio pudiera emplearse en la detección de cepas toxigénicas en los preparados vacunales. Otros métodos de PCR tales como el PCR anidado y el PCR en tiempo real, pudieran mostrar una sensibilidad mayor; pero desde el punto de vista técnico son más exigentes.



**Fig. 5.** Límite Sensibilidad del ensayo de PCR empleando ADN del candidato vacunal CV638 contaminado con la cepa toxigénica C7258Kn: 1, sin ADN (control de reactivos); 2, 2 µg de ADN de 638; 3, 2 µg de ADN contaminado con  $\sim 73$  UFC de C7258Kn; 4 y 5, 2 µg de ADN contaminado con  $\sim 534$  UFC de C7258Kn; 6 y 7, 2 µg de ADN contaminado con  $\sim 6833$  UFC de C7258Kn; 8 y 9, 2 µg de ADN contaminado con  $\sim 7333$  UFC de C7258Kn. M, marcador de peso de ADN de 100 pb (Roche).

La dosis infectiva de *V. cholerae* O1 se ha estimado sea de  $10^5$ – $10^8$  UFC totales en individuos sanos, aunque en algunos individuos con baja acidez estomacal se ha estimado que pudiera llegar a ser de hasta  $10^3$  UFC/mL (1). La comparación de estas dosis infectivas con el nivel de detección de  $\sim 7 \times 10^3$  células de la cepa toxigénica por preparación vacunal, indica que el nivel de detección del ensayo descrito es adecuado para ser empleado durante el control de calidad de los lotes vacunales y pudiera, por tanto, ser una herramienta valiosa en el aseguramiento de la calidad de los lotes del candidato vacunal vivo CV638. Para ello será necesario validar la técnica de acuerdo a las regulaciones establecidas por el CECMED (5) entre las que se encuentran determinar el límite de detección, la especificidad y la robustez del método. En este caso, se determinó el límite de detección y la sensibilidad del método, dos características importantes del ensayo.

## Referencias

- Harris JB, La Rocque RC, Qadri F, Ryan ET, Calderwood SB. Cholera. Lancet 2012;379(9835):2466-76.
- O’Ryan M, Vidal R, Del Canto F, Carlos SJ, Montero D. Vaccines for viral and bacterial pathogens causing acute gastroenteritis: Part I: Overview, vaccines for enteric viruses and *Vibrio cholerae*. Hum Vaccin Immunother 2015;11(3):584-600.
- Pastor M, Pedraz JL, Esquisabel A. The state-of-the-art of approved and under-development cholera vaccines. Vaccine 2013;31(38):4069-78.
- Benítez JA, García L, Silva A, García H, Fando R, Cedré B, et al. Preliminary assessment of the safety and immunogenicity of a new CTXPhi-negative, hemagglutinin/protease-defective El Tor strain as a cholera vaccine candidate. Infect Immun 1999;67(2):539-45.
- Centro para el control estatal de la calidad de los medicamentos (CECMED). Validación de métodos analíticos. Regulación No. 41-2007. La Habana: CECMED; 2007.
- Dalusi L, Lyimo TJ, Lugomela C, Hosea KM, Sjoling S. Toxigenic *Vibrio cholerae* identified in estuaries of Tanzania using PCR techniques. FEMS Microbiol Lett 2015;362(5): doi:10.1093/femsle/fnv009.
- 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.
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. Molecular cloning: A Laboratory Manual. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor; 1989.
- Heidelberg JF, Eisen JA, Nelson WC, Clayton RA, Gwinn ML, Dudson RJ, et al. DNA sequence of both chromosomes of the cholera pathogen *Vibrio cholerae*. Nature 2000;406(6795):477-83.

10. Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD; Seidman JG, Smith JA, et al, editors. *Short protocols in molecular biology*. 3rd ed. New York: John Wiley & Sons; 1995.
11. WHO. Cholera, 2013. *Wkly Epidemiol Rec* 2014;89(31):345-56.
12. Li F, Kan B, Wang D. Development of both multiple PCR and real-time SYBR green PCR for the detection of *Vibrio cholerae* non-O1/O139 serogroups. *Zhonghua Liu Xing Bing Xue Za Zhi*. 2014;35(1):66-70.
13. Vinothkumar K, Bhardwaj AK, Ramamurthy T, Niyogi SK. Triplex PCR assay for the rapid identification of 3 major *Vibrio* species, *Vibrio cholerae*, *Vibrio parahaemolyticus*, and *Vibrio fluvialis*. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2013;76(4):526-8.
14. Wei S, Zhao H, Xian Y, Hussain MA, Wu X. Multiplex PCR assays for the detection of *Vibrio alginolyticus*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio vulnificus*, and *Vibrio cholerae* with an internal amplification control. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2014;79(2):115-8.
15. Chuang LY, Cheng YH, Yang CH. Specific primer design for the polymerase chain reaction. *Biotechnol Lett* 2013;35(10):1541-9.
16. Ye J, Coulouris G, Zaretskaya I, Cutcutache I, Rozen S, Madden TL. Primer-BLAST: a tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. *BMC Bioinformatics* 2012;(13): doi:10.1186/1471-2105-13-134.
17. Apte A, Daniel S. PCR primer design. *Cold Spring Harb Protoc*. 2009;(3): doi:10.1101/pdb.ip65.
18. Dieffenbach CW, Lowe TM, Dveksler GS. General concepts for PCR primer design. *PCR Methods Appl* 1993;3(3):S30-S37
19. Kumar A, Chordia N. In silico PCR primer designing and validation. *Methods Mol Biol* 2015;1275:143-51.
20. Gardes J, Croce O, Christen R. In silico analyses of primers used to detect the pathogenicity genes of *Vibrio cholerae*. *Microbes Environments*. 2012;27(3):250–6.
21. Safa A, Nair GB, Kong RY. Evolution of new variants of *Vibrio cholerae* O1. *Trends Microbiol* 2010;18(1):46-54..

---

## Development of a PCR assay to detect cholera toxin genes (*ctxAB*) in preparations of attenuated live vaccine candidate against cholera CV638

### Abstract

The live oral vaccine candidate against cholera CV638 is produced under Good Manufacturing Practices. The active ingredient of this vaccine candidate is the genetically modified strain *Vibrio cholerae* 638; developed by researchers at the National Center of Scientific Research, from the strain *V. cholerae* serogroup O1 biotype El Tor C7258 (Peru, 1991), by removing cholera toxin genes (*ctxAB*). Since the strain 638 lacks these genes in its genome, the presence of *ctxAB* in vaccine preparations would be given by a contamination with a toxigenic *V. cholerae* strain. The present study aimed at designing a specific PCR to detect *ctxAB* genes in DNA isolated from preparations of the vaccine candidate CV638, artificially contaminated with toxigenic *V. cholerae* strain. Sensitivity of the optimized PCR assay was 1 pg of genomic DNA from toxigenic strain of *V. cholerae* C7258, corresponding to ~200 genomic copies. The sensitivity of the PCR method for detecting toxigenic strains in CV638 vaccine preparations contaminated with a toxigenic strain was ~7 x 10<sup>3</sup> colony forming units of the toxigenic strain per dose of CV638. Once validated, this method could be used in the quality control of the production of the live vaccine candidate CV638.

**Keywords:** *V. cholerae* 638, vaccines, cholera toxin, PCR.

---

*Recibido: Octubre de 2015*

*Aceptado: Diciembre de 2015*