

VII. Detección de la toxina del cólera

A. Modo de acción de la toxina del cólera

La producción de la toxina del cólera es una propiedad esencial de virulencia de las cepas epidémicas de *Vibrio cholerae* O1. Cada molécula de toxina del cólera está compuesta de cinco subunidades B (de enlace) y una subunidad A (activa). Las subunidades B se unen a los receptores del gangliósido G_{M1} en las células epiteliales de la mucosa intestinal. Después de la unión, se separan la subunidad A y el componente A2, lo cual facilita la entrada del componente A1 en la célula. El componente A1 estimula la producción de la enzima adenilciclasa, la cual rige la producción del monofosfato de adenosina cíclico (AMPc). Las altas concentraciones intracelulares de AMPc dan como resultado una alteración del transporte activo de los electrolitos a través de la membrana celular, lo cual impide la absorción de líquido y conduce a su secreción en el intestino delgado. Cuando el volumen de líquido que entra en el colon proveniente del intestino delgado es mayor que la capacidad de reabsorción de aquel, se presenta la diarrea. Desde el punto de vista antigénico y en su mecanismo de acción, la toxina del cólera es muy similar a la enterotoxina termolábil de *Escherichia coli*; por lo tanto, la mayor parte de las pruebas para la detección de la toxina del cólera también se aplican a la enterotoxina termolábil y viceversa.

B. Indicaciones para la prueba de producción de la toxina del cólera

En un laboratorio de diagnóstico, el valor de la prueba de la toxina del cólera varía según las características epidemiológicas del cólera en un país o comunidad determinados. En el curso de un brote de cólera, el aislamiento de *V. cholerae* que posea el antígeno O1 obtenido de pacientes sintomáticos se correlaciona bien con la producción de toxina y la virulencia, y no hay necesidad de someter a prueba, de manera sistemática, los aislamientos en busca de toxina del cólera. Esto también es válido para la mayor parte de los sitios que presentan cólera endémico y una frecuencia considerablemente alta de la enfermedad. Sin embargo, en circunstancias de endemicidad con incidencia baja del cólera, o al principio de un brote, la mayor parte de las cepas de *V. cholerae* O1 aisladas de heces diarreicas deben someterse a prueba para la detección de la toxina. (Véase en el Capítulo II, "La función del laboratorio de salud pública", la explicación de cuándo es necesario someter a prueba los aislamientos para la producción de la toxina del cólera.) Debido a que las cepas de *V. cholerae* O1 no tóxicas se encuentran ocasionalmente en muestras ambientales (en particular en las aguas de los mares y de los estuarios), todos los aislamientos de *V. cholerae* O1 obtenidos de alimentos o del ambiente se someterán a prueba para determinar la producción de toxina del cólera después de confirmar la identificación.

Antes de realizar la prueba de la toxina, se ratifica la identidad de los aislamientos de *V. cholerae* O1. Ciertas cepas de *V. cholerae* distinto de O1

pueden producir toxina de cólera u otras toxinas, como la enterotoxina termoestable o toxina similar a la de *Shigella* (toxina Shiga), pero dichas cepas son muy raras y no se asocian con enfermedad epidémica. Así pues, desde el punto de vista de la salud pública no es provechoso someter a prueba los aislamientos esporádicos de *V. cholerae* distinto de O1 para detectar la toxina del cólera u otras toxinas.

Aunque las necesidades clínicas y de salud pública exigen como mínimo algunas valoraciones de la toxina del cólera, por lo general esas necesidades se satisfacen eficiente y económicamente a nivel del laboratorio de referencia. Los laboratorios seleccionarán el método más adecuado para sus necesidades y competencia.

C. Resumen histórico de los métodos de valoración de la toxina del cólera

Hay varios métodos para valorar la toxina del cólera, incluidas pruebas de su actividad, de sus antígenos y de los genes que la codifican. La selección de una prueba específica dependerá de la capacitación, la experiencia y los recursos del laboratorio. El Cuadro VII-1 resume las características importantes de algunas de las pruebas más comunes que se utilizan para la detección de la toxina del cólera.

1. Biovaloraciones

Métodos que utilizan animales

En los años cincuenta, los investigadores descubrieron que la inyección de preparaciones de enterotoxina en segmentos ligados de intestino (asas ileales) de conejos (y más tarde, de otros animales, incluidos cerdos, perros y terneras) causaba acumulación de líquido. Este descubrimiento dio por resultado la primera valoración de la enterotoxina del cólera, en el asa ileal de conejo adulto, que fue la más utilizada para estos fines hasta los años sesenta. Este modelo se ha utilizado mucho para estudiar los mecanismos de acción de la toxina del cólera, la enterotoxina termolábil de *E. coli* y otras enterotoxinas. Después de la exteriorización y ligadura del intestino delgado del conejo, se inyecta un sobrenadante acelular en cada asa ileal y se mantiene cerrado el abdomen durante 18 horas. Entonces, se realiza la eutanasia, se extirpa el intestino y las asas se miden y se pesan para determinar la cantidad de líquido acumulado en virtud de la estimulación de la toxina. Los resultados se expresan como el volumen de líquido por la longitud del asa intestinal. Esta prueba no solo causa excesivo dolor a los animales sino que consume mucho tiempo, es incómoda y difícil de estandarizar. La prueba es relativamente cara por el número de animales que se requieren, ya que solo se pueden probar cerca de 8 a 14 sobrenadantes por cada animal, sin incluir los testigos positivos y negativos; asimismo, la aplicación de sobrenadantes a los animales se debe hacer por duplicado, y la orientación de los sobrenadantes se debe invertir de un animal al siguiente.

Cuadro VII-1. Métodos comunes para la detección de la toxina del cólera

Prueba	Sensibilidad por ml	Tipo de prueba	Objetivo específico de la prueba	Muestra estudiada
Asa ileal de conejo	30 ng	Biovaloración	Estimular la acumulación de líquido	Sobrenadante del cultivo
Valoración en conejo lactante	250 a 500 ng	Biovaloración	Estimular la acumulación de líquido	Cultivo en caldo o sobrenadante del cultivo
Prueba en la piel del conejo	0,1 a 3,5 ng	Biovaloración	Factor de permeabilidad	Sobrenadante del cultivo
Células suprarrenales Y1 de ratón	10 pg	Biovaloración	Acumulación de AMPc	Sobrenadante del cultivo
Células de ovario de hámster chino	10 pg	Biovaloración	Acumulación de AMPc	Sobrenadante del cultivo
ELISA G _{M1}	10 pg	Inmunitaria	Subunidad B ^b	Sobrenadante del cultivo
Coagulación	50 ng ^a	Inmunitaria	Subunidad B ^b	Lisados del cultivo
Agglutinación inversa pasiva en látex	1 a 2 ng	Inmunitaria	Subunidad B ^b	Sobrenadante del cultivo
Sondas de DNA	Detecta el gen <i>ctx</i>	Genética	Gen <i>ctx</i>	DNA (improntas de colonias)
PCR	Detecta el gen <i>ctx</i>	Genética	Gen <i>ctx</i>	DNA (faisado de la célula en bruto)

^a Sensibilidad para la detección de la toxina del cólera utilizando antisuero contra la enterotoxina termolábil de *E. coli*.

^b Subunidad B de la molécula de la toxina del cólera.

Detección de la toxina del cólera

El modelo de infección en conejo lactante se obtuvo en 1955 y se puede utilizar para la detección de enterotoxinas de *V. cholerae* y *E. coli*. Conejos lactantes de 7 días de edad se infectan con el microorganismo mediante intubación o por inyección directa intragástrica o intraluminal (en el intestino delgado). Se mantiene a los animales bajo observación para detectar diarrea acuosa y muerte por deshidratación. Otra opción consiste en matarlos después de un período de incubación de 7 horas; se extirpan los intestinos y se cuantifica el volumen de líquido por centímetro de intestino. El método del conejo lactante tiene como inconvenientes la variabilidad de los resultados y el costo de utilizar un animal por cada aislamiento sujeto a prueba.

La prueba en la piel del conejo, o valoración del factor de permeabilidad vascular, se ha utilizado para detectar la actividad de la toxina del cólera o de la toxina termolábil de *E. coli*. La especificidad de dicha prueba está determinada por la neutralización de la actividad mediante una cantidad estandarizada de antisueros contra la toxina del cólera. En la espalda afeitada de un conejo adulto joven se inyectan por vía intradérmica un sobrenadante acelular de un cultivo de *V. cholerae* o *E. coli* y diluciones de antisueros. Se pueden someter a prueba cerca de 30 a 40 sobrenadantes por conejo. Dieciocho horas más tarde se aplica una inyección intravenosa del colorante azul de Evans. El aumento de la permeabilidad capilar mediado por la actividad de la toxina del cólera conduce a la difusión del colorante en la piel (reacción de azulete), con induración localizada en los sitios de inyección. La zona de "azulete" se mide con relación a un testigo negativo. Este procedimiento permite el análisis de 30 a 40 cultivos por conejo; por lo tanto, es más económico en términos de número de animales requeridos que otros modelos animales como el del conejo lactante y las pruebas de asa ileal.

Métodos de cultivo de tejidos

Los métodos de cultivo de tejido son muy sensibles y de fácil reproducción; se han utilizado mucho para el estudio de la producción de toxina. La acción de la toxina sobre un cultivo celular ha permitido la investigación con éxito de las bases moleculares de la patogenicidad. Además, estos métodos se pueden utilizar para detectar anticuerpos neutralizantes contra la toxina del cólera. Sin embargo, los métodos del cultivo de tejidos requieren técnicos capacitados, y reactivos y equipo especiales. Estas técnicas son las más adecuadas para utilizarse en los laboratorios que cuentan con recursos para el cultivo de tejidos.

Los cultivos de células suprarrenales Y-1 de ratón (Y-1) y de ovario de hámster chino han sido las pruebas modelo para la detección de la toxina del cólera y de la toxina termolábil, aunque también son sensibles otras líneas celulares como las células Vero de riñón de mono. Si la toxina del cólera o la termolábil (*E. coli*) están presentes en los sobrenadantes de los cultivos bacterianos agregados a las células, estimularán la producción de

adenilciclase, la cual eleva la concentración intracelular de AMPc. Las cantidades aumentadas de este compuesto dan por resultado una respuesta estructural que se puede observar al microscopio (las células de ovario de hámster chino se alargan y las células Y-1 se redondean). Las reacciones positivas pueden confirmarse mediante neutralización de los efectos tóxicos en el cultivo celular con antisuero contra toxina del cólera (o toxina termolábil de *E. coli*) o con gangliósido G_{M1} , el cual es el receptor para ambas toxinas en la membrana de la célula huésped, y se une a cualquiera de estas toxinas. Para la prueba de la toxina, se coloca una suspensión de células Y-1 en placas de microtitulación (microplacas) de 96 pozos. Por lo general, una botella de 75 cm² de células Y-1 es suficiente para sembrar hasta 25 microplacas. Cada microplaca puede utilizarse para someter a prueba hasta 60 sobrenadantes (30 sobrenadantes si se realiza por duplicado), cuando no se utilizan los pozos periféricos de la placa.

2. Inmunovaloración

ELISA

La toxina del cólera es inmunogénica para los seres humanos y los animales de laboratorio. Por ello, se han elaborado muchas técnicas inmunológicas para detectar esta toxina. El descubrimiento de que el gangliósido G_{M1} es el receptor natural para la toxina del cólera y la toxina termolábil, y su subsecuente purificación, condujo a la obtención de una prueba de inmuoabsorción enzimática con captura de gangliósido (G_{M1} -ELISA) para la detección de estas toxinas. Para realizar la prueba G_{M1} -ELISA, se agregan los sobrenadantes del cultivo a los pozos de la microplaca revestidos con gangliósido G_{M1} . La toxina unida a los receptores G_{M1} se detecta a continuación agregando antisuero contra la toxina del cólera, seguida por anticuerpo antiglobulina conjugado con enzima. En lugar de utilizar G_{M1} para revestir la placa, se puede recurrir a otro anticuerpo que se una a la toxina. Si se utiliza una microplaca de 96 pozos para el estudio de la toxina, es factible probar 30 sobrenadantes por duplicado en cada microplaca (por lo general, no se utilizan los pozos del margen externo).

Coagulación

Debido a que muchas cepas de *Staphylococcus aureus* tienen una cubierta de proteína A que puede combinarse directamente con la IgG, se han preparado reactivos serológicos para reacciones de aglutinación en los cuales un anticuerpo IgG específico se adsorbe en la superficie de las células estafilocócicas. Es factible preparar el reactivo a un costo relativamente bajo, pero se requiere un anticuerpo específico contra la toxina del cólera (o contra la toxina termolábil de *E. coli*). La coagulación de la enterotoxina termolábil de *E. coli* se realiza de manera rápida y sencilla, y requiere poco equipo especializado y capacitación del personal de laboratorio; sin embargo, esta prueba nunca se ha usado para detectar toxina del cólera a partir de sobrenadantes de cultivo de *V. cholerae* O1.

Aglutinación de látex

En la prueba de aglutinación de látex se utilizan anticuerpos específicos contra la toxina del cólera o la termolábil de *E. coli* unidos a partículas de látex. La técnica de aglutinación de látex requiere antisuero de alta calidad o anticuerpos purificados, una preparación adecuada de látex y material de laboratorio de fácil adquisición. Se expende en el comercio un estuche de esta prueba que se describe más adelante en este capítulo.

3. Análisis basados en el DNA

Sondas de DNA

Las pruebas moleculares que identifican a los microorganismos patógenos con base en las secuencias específicas de DNA tienen muchas aplicaciones en la microbiología diagnóstica y de salud pública. Las secuencias específicas de DNA en el gen o los genes que codifican la toxina del cólera se han usado como sondas para detectar secuencias de DNA homólogas en aislamientos de *V. cholerae* toxigénico. En la práctica, se pueden utilizar una variedad de moléculas de DNA como sondas, incluidos el DNA clonado, fragmentos de restricción del DNA clonado, ampliaciones de DNA generadas en una reacción en cadena de la polimerasa y oligonucleótidos. Primero se marca la sonda con una molécula de fácil detección, como es un radioisótopo, una enzima o un ligando, y entonces se hibrida al DNA del microorganismo de prueba. La sonda solo hibrida aquellos fragmentos de DNA de microorganismos que contengan secuencias homólogas. La sonda no hibridada se desecha, y la sonda hibridada remanente se detecta por medio de una prueba específica que la pone en evidencia.

Reacción en cadena de la polimerasa

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR en inglés) es otro método para efectuar pruebas diagnósticas moleculares que se basan en las secuencias específicas de DNA. En la PCR se utiliza la enzima DNA polimerasa para sintetizar o amplificar copias múltiples de una secuencia específica de DNA (ampliación), la cual puede entonces detectarse en un gel de agarosa o con sondas de DNA. La ampliación de DNA se define por la localización de dos oligonucleótidos cortos y específicos de DNA que señalan la secuencia de interés y son utilizados como iniciadores por la DNA polimerasa. Al igual que las sondas de DNA, el blanco de la PCR es un gen de virulencia, o una secuencia de DNA exclusivo de un microorganismo patógeno. La toxigenicidad de un aislamiento de *V. cholerae* se puede someter a prueba mediante la PCR y los iniciadores que, de manera específica, amplifican solamente los genes de la toxina del cólera. La PCR tiene la ventaja de ser una técnica muy rápida que no requiere cultivos puros ni microorganismos viables. Algunas pruebas de PCR pueden amplificar los segmentos de DNA directamente de las muestras fecales, alimentarias o ambientales; así, se puede determinar la presencia de un microorganismo en una muestra

sin cultivarlo. Asimismo, la PCR tiene aplicaciones en otras técnicas moleculares; se puede utilizar para producir rápidamente sondas de DNA marcadas para un análisis del polimorfismo de la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP en inglés) e improntas de colonias ("colony blots").

La sensibilidad y especificidad de las valoraciones basadas en el DNA ofrecen una ventaja sobre los métodos ordinarios. El uso de sondas de DNA o PCR evita las dificultades que se presentan con las cepas de *V. cholerae* que no expresan la toxina del cólera a concentraciones detectables pero poseen genes *ctx*. El uso de marcadores de DNA no radioactivos, como biotina y digoxigenina, ha eliminado los problemas técnicos asociados con los radioisótopos. Mientras que el uso de las pruebas diagnósticas basadas en el DNA requieren un adiestramiento específico en los métodos moleculares y los reactivos son costosos, las ventajas de sencillez, sensibilidad, seguridad y estabilidad han convertido a las técnicas basadas en el DNA en elementos invaluable para los laboratorios de investigación.

D. Producción de la toxina del cólera para las pruebas de laboratorio

Las condiciones óptimas de crecimiento para *V. cholerae* no siempre se corresponden con la mejor producción de la toxina *in vitro*. Por esta razón se han elaborado medios especializados para la producción de toxina del cólera. Las condiciones ideales para su producción varían de acuerdo con el medio que se utilice. En general, se ha encontrado que es mejor una temperatura de incubación de 30 °C que una de 37 °C para la producción de toxina con *V. cholerae* de cualquier biotipo. Con las cepas El Tor, utilizando el medio de Craig, la mejor combinación de tiempo y temperatura es 30 °C durante 48 horas sin aeración. Para las cepas del biotipo clásico, una temperatura de 30 °C con agitación vigorosa durante 48 horas permite la mejor producción de la toxina. Si se utilizan temperaturas de incubación de 37 °C se recomienda el medio AKI. Aunque este medio permite la producción de toxina del cólera a 37 °C, tiene el inconveniente de una vida corta de almacenamiento, lo que exige su preparación semanal. *V. cholerae* El Tor cultivado en medio AKI debe incubarse a 37 °C durante 20 horas sin agitación. El medio AKI no se ha evaluado con respecto a la producción de toxina por las cepas del biotipo clásico.

V. cholerae libera activamente su toxina hacia el medio de cultivo, a diferencia de la toxina termolábil de *E. coli*, la cual, por lo general, se encuentra en el espacio periplásmico. Los agentes antimicrobianos, como la polimixina B o la lincomicina, que favorecen la acumulación de toxina termolábil de *E. coli* en los medios de cultivo, no tienen efecto en la liberación de la toxina del cólera. Por lo tanto, no es necesario utilizar antimicrobianos en los medios donde se va a determinar la producción de dicha toxina.

La mayor parte de las pruebas de la toxina del cólera, inmunológicas y de biovaloración, buscan la toxina en los sobrenadantes de los cultivos. La

Detección de la toxina del cólera

valoración de la actividad de la toxina requiere toxina del cólera íntegra, en tanto que algunas pruebas antigénicas solamente detectan la subunidad B y no requieren la molécula completa. Las condiciones del cultivo para la producción de toxina se enuncian en una lista más adelante, y se recomiendan para la expresión óptima de la toxina completa (activa), tal como se requiere para las pruebas de asa ileal de conejo, piel de conejo y cultivo de tejidos.

Producción de la toxina del cólera

- 1) Los cultivos que se van a someter a prueba se siembran mediante estríación en un medio de plano inclinado no selectivo (como agar de infusión de corazón) y se incuban de 18 a 24 horas a una temperatura de 35 °C a 37 °C. Se incluyen cuatro cepas testigo (dos positivas y dos negativas).
- 2) Se inoculan las cepas en 5 ml de medio de Craig en tubos de tapa de rosca de 16 × 125 mm. Se mantienen los taponeros poco apretados y se incuban los tubos a 30 °C durante 48 horas sin agitar. [Nota: los cultivos se pueden someter a prueba al cabo de solo 24 horas de incubación, pero 48 horas es el tiempo óptimo para la producción de toxina.]
- 3) Se centrifugan los tubos para sedimentar las células bacterianas, y se retira el sobrenadante con una pipeta Pasteur. El sobrenadante se almacena a 4 °C hasta que se vaya a utilizar. Si el sobrenadante ha de almacenarse por más de 7 días, se congela a -70 °C.

E. Ensayo Y-1 para la toxina del cólera

La clona Y-1 de células de tumor suprarrenal de ratón es sensible a bajas concentraciones, incluso de 10 picogramos por mililitro, de toxina del cólera. Sin embargo, *Vibrio* y otros géneros bacterianos pueden sintetizar productos extracelulares termolábiles que causan redondeamiento no específico de dichas células, el cual se puede malinterpretar como si fuera causado por la toxina del cólera. Es preferible neutralizar las reacciones positivas o dudosas con antisueros específicos para la toxina o con otras sustancias específicas de enlace como el gangliósido G_{M1}, el receptor natural de la toxina en la membrana celular.

Material

- Incubadora de CO₂ programada a una temperatura de 37 °C con 5,0% de CO₂
- Campana de flujo laminar
- Microscopio invertido de contraste de fases
- Tubos de centrifuga cónicos estériles
- Centrifuga

- Botellas estériles de cultivo de tejido (75 cm² de área de crecimiento)
- Microplacas de 96 pozos de fondo plano, estériles, para cultivo de tejidos
- Mezcla nutritiva F-10 de Ham (GIBCO Laboratories, Grand Island, Nueva York) con 15% de suero de caballo, 2,5% de suero fetal de ternera y gentamicina (10 µg/ml)
- tripsina al 0,2%

Procedimientos semanales para prueba y mantenimiento del cultivo de tejidos

Las células suprarrenales Y-1 se mantienen en un cultivo de monocapa en mezcla nutritiva F-10 de Ham. Comúnmente las botellas de cultivo de tejido con un área de crecimiento de 75 cm² se llenan con 25 ml de medio y se incuban a 37 °C en una atmósfera humidificada y con 5% de CO₂. Todas las manipulaciones celulares se realizan bajo una campana de flujo laminar, y las células se examinan empleando un microscopio invertido de contraste de fase.

Día 1

- 1) Se desecha el medio F-10 de la monocapa confluyente (por lo general, se requiere una semana de crecimiento). Se lava la monocapa de células con 5 ml de solución salina con amortiguador de fosfato (PBS en inglés) estéril y se desecha el líquido.
- 2) Se agrega 1,5 ml de tripsina al 0,2% y se deja la monocapa cubierta de tripsina a temperatura ambiente hasta que las células comiencen a desprenderse de la superficie de plástico (de 5 a 10 minutos).
- 3) Se agregan 5 ml de medio F-10 para neutralizar la tripsina. (El medio F-10 de Ham se almacena a una temperatura de 4 °C y después se lleva a un baño de María a 37 °C antes de que todo el medio cambie y se presente proliferación celular.) Si permanece alguna monocapa, se desprende de la superficie de la botella con espátula de goma estéril.
- 4) Las células suspendidas se transfieren (aproximadamente 6,5 ml) a un tubo de centrifuga cónico estéril y se centrifuga de 500 a 1.000 × *g* durante 5 minutos.
- 5) El sobrenadante se aspira dejando un sedimento de células suprarrenales Y-1 en el tubo de centrifuga. Las células se resuspenden con una pipeta Pasteur en 5 ml de medio F-10 recién preparado.
- 6) Utilizando una pipeta Pasteur, se depositan 6 gotas de la suspensión celular en cada botella, a la cual se han agregado 25 ml de medio F-10 recién preparado. Como regla general, se siembran botellas por duplicado.
- 7) Para la prueba de la toxina, la cual se practica en una microplaca de fondo plano, de 96 pozos, hágase una dilución de 1:50 a 1:100 de la sus-

Detección de la toxina del cólera

pensión celular. Se deposita la suspensión, aproximadamente 0,15 ml por pozo, de modo tal que una botella sirve para sembrar de 12 a 25 placas. Se apilan las placas y se cubre la placa superior para evitar contaminación y evaporación.

- 8) Se colocan las botellas (con las tapas poco apretadas) y las microplacas en la incubadora de CO₂.

Día 2

Se revisan las botellas y los pozos al microscopio para observar la proliferación celular.

Día 3 (últimas horas de la tarde)

Utilizando una pipeta Pasteur, a cada pozo de la microplaca que contenga una monocapa de células suprarrenales Y-1 se le agregan 2 gotas (50 µl) de los sobrenadantes de la toxina (incluidos los testigos positivos y negativos). (Véase la Sección D para conocer los métodos de cultivo de *V. cholerae* para la producción de su toxina.) Se sugiere asegurarse de que las microplacas y las hojas de registro estén codificadas antes de efectuar la transferencia. Las microplacas se vuelven a apilar y se incuban en una atmósfera de CO₂ a 37 °C de un día para otro.

Día 4 (en la mañana)

Se leen los resultados de las pruebas. Los pozos se examinan con aumentos de 100x o 200x, utilizando un microscopio invertido de contraste de fases. Los pozos de prueba se comparan con los de testigo positivo. Las toxinas del cólera y termolábil provocan que las células suprarrenales Y-1 se redondeen (Figura VII-1). Para los análisis de toxina del cólera o toxina termolábil, un pozo positivo contiene más de 10% de células Y-1 redondeadas. Ocasionalmente, la actividad citotóxica en el sobrenadante dará por resultado muerte, lisis o desprendimiento de las células, lo cual puede enmascarar el efecto de redondeamiento que produce la toxina del cólera. Si esto ocurre, la dilución del sobrenadante (para intentar diluir la citotoxina) puede permitir que se visualicen las células redondeadas.

Método para la neutralización de la enterotoxina del cólera

Véase la Sección D de este capítulo para conocer los métodos de cultivo de *V. cholerae* para la producción de toxina del cólera. Los sobrenadantes de la prueba se diluyen 1:4 utilizando PBS (pH 7,2) con 0,1% de gelatina (PBS/G). Si se dispone de ella, se usará una preparación pura de toxina del cólera como testigo positivo. En esta prueba se utiliza un antisuero contra la toxina del cólera de título alto (en los CDC el antisuero contra la toxina del cólera utilizado para la G_{M1}-ELISA también se utiliza para la neutralización de las células Y-1). El antisuero se diluye en PBS/G.

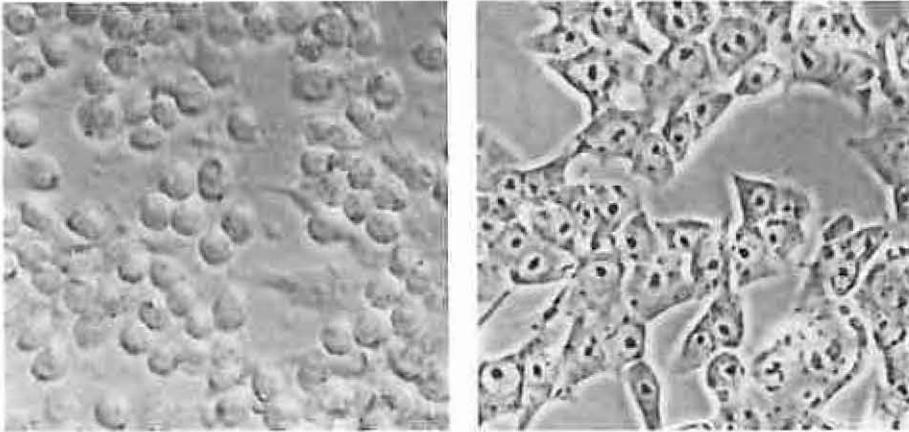


Figura VII-1. La fotografía de la izquierda muestra el redondeo típico de las células Y-1 suprarrenales de ratón causado por la presencia de la toxina del cólera. Se muestran células Y-1 normales en la fotografía de la derecha.

Se preparan diluciones al doble del antisuero contra la toxina del cólera en PBS/G, comenzando con una de 1:10 y terminando con una de 1:10.240. Se mezclan volúmenes iguales de diluciones del antisuero por duplicado y se mezclan con sobrenadante sin diluir y diluido al 1:4. Se repite el procedimiento para el resto de los sobrenadantes y la toxina del cólera purificada. El sobrenadante se incuba con mezclas de antisuero en baño de María a una temperatura de 37 °C. Después de una hora se transfieren 50 μ l de cada sobrenadante con la mezcla del antisuero a la monocapa de células Y-1 que se encuentra en la microplaca. Se agrega sobrenadante no neutralizado a un pozo por cada cultivo sujeto a prueba, con objeto de utilizarlo como testigo. Se incuban las células de 18 a 24 horas y se leen para determinar la dilución más alta de suero contra la toxina del cólera que neutraliza el efecto de redondeamiento de las células que provoca esta.

F. Ensayo G_{M1} -ELISA para la toxina del cólera

El ensayo G_{M1} -ELISA constituye una inmunoválora ción muy sensible para la detección de la toxina del cólera. Esta prueba utiliza una inmunoglobulina marcada con una enzima, la cual se cuantifica midiendo su actividad en un sustrato específico. Los pozos de microtitulación se revisten con gangliósido G_{M1} , el receptor natural para la toxina del cólera (Figura VII-2). De manera alternativa, los pozos de microtitulación se pueden revestir con anticuerpos contra toxina del cólera; pero, si se hace esto, dichos anticuerpos se deben preparar en una especie animal diferente a la del otro anticuerpo contra la toxina del cólera utilizado en la prueba. Los sobrenadantes del cultivo se agregan entonces a los pozos revestidos. Las moléculas

Detección de la toxina del cólera

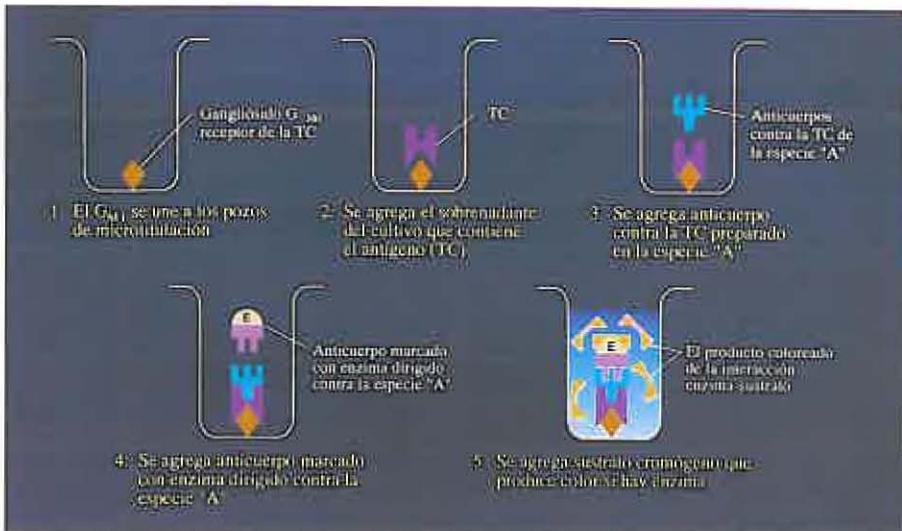


Figura VII-2. Diagrama del ensayo G_{M1}-ELISA para la detección de la toxina del cólera (TC).

de toxina del cólera en el sobrenadante se unen al G_{M1} en el pozo y reaccionan con el anticuerpo contra la toxina del cólera que se adiciona posteriormente. El anticuerpo contra la inmunoglobulina de la especie animal específica conjugado con una enzima (fosfatasa alcalina o peroxidasa del rábano) se agrega al pozo, donde reacciona con el anticuerpo contra la toxina del cólera. Por último, se agrega el sustrato de la enzima, y la enzima unida degrada el sustrato. Se forma así un producto de color que indica la presencia de toxina del cólera, toxina termolábil de *E. coli* u otras moléculas inmunológicamente afines. Estas reacciones se pueden leer con el espectrofotómetro o visualmente. En el Cuadro VII-2 se presenta un resumen del método ELISA. Todos los materiales y reactivos del ensayo G_{M1}-ELISA para la toxina del cólera, incluido el antisuero contra esta, se pueden adquirir en el comercio.

Equipo

- Microplacas de polivinilo o poliestireno, de fondo plano o fondo redondeado (en u)
- Micropipetas y pipetas múltiples (automáticas)
- Lector de placa de ELISA (opcional)

Reactivos

(Véanse en el Capítulo XI, "Preparación de medios de cultivo y reactivos", las instrucciones para preparar los siguientes reactivos.)

Cuadro VII-2. ELISA para la detección de la toxina del cólera (TC)

Paso	Reactivo	Diluyente	Concentración	Volumen/pozo	Tiempo de incubación
Recubrimiento	G _{M1}	PBS	2 µg/ml ^a	100 µl	De un día para otro
Bloqueo	Albúmina sérica de bovino (ASB)	PBS	1%	150 µl	30 minutos
Muestra	Sobrenadante del cultivo	Ninguno	Sin diluir	100 µl	60 minutos
Bloqueo	Albúmina sérica de bovino (ASB)	PBS	1%	150 µl	30 minutos
Anticuerpo	Anticuerpo contra TC preparado en cabra	PBS con ASB al 0,1%	1:2.000 ^a	100 µl	60 minutos
Conjugado	IgG anticabra marcada con fosfatasa alcalina	PBS con ASB al 0,1%	1:500 ^a	100 µl	60 minutos
Sustrato	p-nitrofenil fosfato disódico	Amortiguador de dietanolamina	1 mg/ml	100 µl	10 a 20 minutos
Detener la reacción	NaOH	H ₂ O	3 M	50 µl	Ninguno

^a La dilución óptima de cada reactivo se determinará mediante titulación.

Detección de la toxina del cólera

- Gangliósido G_{M1} (Sigma Chemical Co., St. Louis, Misuri)
- PBS con 0,05% de Tween 20 o sin él y albúmina sérica de bovino
- Anticuerpos de cabra contra toxina del cólera CT_b (Calbiochem Corp., La Jolla, California) [Nota: como una alternativa a los anticuerpos contra la toxina del cólera preparados en cabra, se pueden utilizar anticuerpos producidos en otra especie animal o anticuerpos monoclonales.]
- Globulina anticabra (o contra cualquier especie utilizada para producir el anticuerpo contra la toxina del cólera) marcada con fosfatasa alcalina (Kirkegaard and Perry Laboratories, Inc., Gaithersburg, Maryland) o con peroxidasa del rábano.
- *p*-nitrofenil fosfato (Sigma Chemical Co.) disuelto en amortiguador de dietanolamina [Nota: hay varios sustratos para la peroxidasa del rábano, cada uno con sus requisitos específicos de preparación.]

La dilución óptima de la preparación de cada reactivo específico se determinará por titulación. En esta sección se describe un procedimiento de titulación de la muestra.

Testigos

En cada microplaca se deben incluir por lo menos dos testigos positivos de *V. cholerae* conocidos y dos testigos de sobrenadante negativo conocidos.

Realización de la prueba

- 1) Se agregan 100 μ l de G_{M1} diluido adecuadamente en PBS a los 60 pozos internos de la microplaca. Los pozos vacíos que se encuentran en la periferia de la placa se llenan con PBS/Tween. Se cubre la placa con un sellador de placa o se coloca la placa en una cámara húmeda y se deja a temperatura ambiente de 18 a 24 horas o a una temperatura de 35 °C a 37 °C durante 4 horas.
- 2) Se lava la placa tres veces con PBS/Tween de la manera siguiente: se invierte la placa sobre una toalla absorbente y se vacía el contenido con cuidado. Con una piceta u otro instrumento adecuado, cada pozo se llena con PBS/Tween (aproximadamente 200 μ l). Se deja la placa durante 3 minutos. Se elimina el PBS/Tween y se repite la operación dos veces. Al guardar la placa para uso posterior, se deja el tercer lavado en las placas y se refrigera (4 °C). La placa se puede almacenar por un período de 4 a 6 semanas.
- 3) Se bloquean los sitios de unión restantes llenando cada pozo con 150 μ l de albúmina sérica de bovino (BSA en inglés) al 1% en PBS. Se incuba la placa a temperatura ambiente durante 30 minutos. Se retira el contenido y se lavan los pozos tres veces con PBS/Tween como se describió en el paso 2.
- 4) Con una micropipeta, se agregan por duplicado 100 μ l de cada sobrenadante a pozos de la placa. Se deja vacía una sola hilera de pozos en el

Detección de la toxina del cólera

margen externo de la placa. Esto permitirá 30 pruebas por placa. Se llenan los pozos vacíos del perímetro de la placa con PBS/Tween. La placa se coloca en una cámara húmeda o se sella y se incuba por una hora a una temperatura de 35 °C a 37 °C. Se lavan las placas tres veces como se describe en el paso 2.

- 5) Se agregan 150 µl de BSA al 0,1% en PBS a cada pozo, y se incuba a temperatura ambiente durante 30 minutos. Se lava tres veces (paso 2).
- 6) Se agregan 100 µl del suero de cabra anti-CT. (diluido en PBS con BSA al 0,1%) en cada uno de los pozos de prueba. La placa se coloca en una cámara húmeda o se sella e incuba a una temperatura de 35 °C a 37 °C durante una hora. Se lava la placa tres veces.
- 7) A cada pozo de prueba se agregan 100 µl de globulina anticabra preparada en conejo y marcada con fosfatasa alcalina, diluida adecuadamente en PBS que contenga 0,1% de BSA. Se coloca la placa en una cámara húmeda o se sella e incuba a una temperatura de 35 °C a 37 °C durante una hora. Se lava la placa tres veces.
- 8) Se agregan 100 µl de la solución de sustrato de la enzima (*p*-nitrofenil fosfato en amortiguador de dietanolamina) a todos los pozos. Se incuba la placa a la temperatura ambiente hasta 30 minutos o hasta que la aparición de color en los pozos del testigo positivo alcance una intensidad adecuada, pero sin que transcurra tanto tiempo que aparezca color excesivo en los pozos del testigo negativo (aproximadamente 10 a 20 minutos, pero no más de 30 minutos).
- 9) La reacción se detiene agregando 50 µl de NaOH 3 M a cada pozo. Se mezcla bien.

Lectura de los resultados de la prueba

- 1) Se comparan los pozos del testigo positivo con los del sobrenadante testigo negativo. Debe haber un poco de color o ausencia de este en los pozos del testigo negativo. Se observará un color amarillo distintivo (Figura VII-3) en los pozos del testigo positivo.
- 2) El grado de color en los pozos de prueba se compara con el color en los pozos del testigo negativo. Las muestras que claramente desarrollen un color más intenso que los testigos negativos se considerarán positivas.
- 3) Si se utiliza un lector de microplacas, la longitud de onda debe programarse de manera adecuada para el sustrato que se utilice. Para el *p*-nitrofenil fosfato la longitud de onda debe ser de 405 nm. Se calcula la relación de positivo a negativo (P/N) dividiendo la densidad óptica (DO) de la muestra desconocida entre la media de la densidad óptica de los pozos que contienen los testigos negativos. Las muestras que tengan una relación P/N de 2,0 o mayor se considerarán positivas.



Figura VII-3. En el ensayo G_{M1}-ELISA para la toxina del cólera, la aparición de un color amarillo distintivo en los pozos de la microplaca indica una reacción positiva.

Titulación de los reactivos de la prueba G_{M1}-ELISA para la toxina del cólera

1) Se diluye G_{M1} en PBS a las concentraciones que siguen:

- 0,5 µg/ml
- 1,0 µg/ml
- 2,0 µg/ml
- 5,0 µg/ml

2) Se agregan 100 µl del gangliósido G_{M1} (Sigma Chemical Co.) a cada uno de los 60 pozos internos de las microplacas de polivinilo de fondo redondo o placas de poliestireno de fondo plano que contengan las siguientes diluciones de G_{M1}:

Placa 1	0,5 µg/ml
Placa 2	1,0 µg/ml
Placa 3	2,0 µg/ml
Placa 4	5,0 µg/ml

Se cubre con un sellador de placa o se colocan las placas en una cámara húmeda y se dejan a temperatura ambiente de 18 a 24 horas. Se lavan las placas tres veces con 200 µl de PBS/Tween.

- 3) Para bloquear los sitios de unión remanentes de los pozos, se llena cada pozo con 150 µl de BSA al 1% en PBS y se incuba la placa a temperatura ambiente durante 30 minutos. Después de la incubación, se retira el contenido y se lavan los pozos tres veces con 200 µl de PBS/Tween.
- 4) Se rehidrata la toxina del cólera pura (Calbiochem Corp.) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se diluye en PBS con BSA al 0,1%

DetECCIÓN DE LA TOXINA DEL CÓLERA

(se requieren por lo menos 4 ml de cada dilución para la titulación en 4 placas) como sigue:

Dilución	Concentración de la toxina del cólera
10^{-3}	1,0 $\mu\text{g/ml}$
10^{-4}	100,0 ng/ml
10^{-5}	10,0 ng/ml
10^{-6}	1,0 ng/ml
10^{-7}	100,0 pg/ml
10^{-8}	10,0 pg/ml

A cada placa se agregan 100 μl de cada dilución diferente de la toxina del cólera, de tal forma que cada dilución ocupe una hilera en la placa (hileras B, C, D, E, F, G). Los pozos vacíos se llenan con PBS/Tween. Se incuba a una temperatura de 35 °C a 37 °C durante una hora. Las placas se lavan tres veces con 200 μl de PBS/Tween.

- 5) Se bloquea con 150 μl de BSA al 1%. Se incuba a temperatura ambiente durante 30 minutos. La placa se lava tres veces.
- 6) Se preparan 5 diluciones de anticuerpo contra la toxina del cólera en PBS con 0,1% BSA al 0,1%:

1:500
1:1.000
1:2.000
1:5.000
1:10.000

[Nota: El anticuerpo monoclonal se probará a diluciones de 1:100, 1:200, 1:500, 1:1.000.]

A cada placa se agregan 100 μl de anticuerpo contra la toxina del cólera diluido de tal forma que cada dilución ocupe una columna de la placa (columnas 2 a 6). Se repite para las columnas 7 a 11. Los pozos vacíos se llenan con PBS/Tween. Se incuba a una temperatura de 35 °C a 37 °C durante una hora. La placa se lava tres veces.

- 7) El conjugado marcado con fosfatasa alcalina se diluye en PBS con BSA al 0,1% como sigue:
1:500
1:1.000

A cada placa se agregan 100 μl de cada dilución del conjugado, de tal forma que cada dilución ocupe la mitad de la placa (desde la columna 2 hasta la 6 para una dilución y desde de la columna 7 hasta la 11 para la otra dilución). Los pozos vacíos se llenan con PBS/Tween. La placa se incuba a una temperatura de 35 °C a 37 °C durante una hora. La placa se lava tres veces.

- 8) Se agregan 100 μl del sustrato de *p*-nitrofenil fosfato. Se incuba durante 30 minutos a temperatura ambiente.

Detección de la toxina del cólera

- 9) Se agregan 50 μ l de NaOH 3 M para detener la reacción y se leen los resultados con el espectrofotómetro o visualmente. Se anota la dilución más alta de cada reactivo que presente una intensidad de color adecuada. El reactivo más difícil de obtener, o el más caro, se utilizará en la dilución más alta posible.

G. Prueba de aglutinación de látex para la toxina del cólera

El estuche VET-RPLA (Oxoid Limited, Hampshire, Inglaterra) se ideó para la detección de la toxina del cólera o la toxina termolábil en el líquido sobrenadante de un cultivo. Este procedimiento se conoce como aglutinación pasiva inversa de látex (RPLA en inglés). Las partículas de látex de poliestireno se sensibilizan con antisuero purificado producido en conejos inmunizados con enterotoxina purificada de *V. cholerae*. Estas partículas de látex se aglutinarán en presencia de la toxina del cólera o de la toxina termolábil. Se provee un reactivo testigo, que consiste en partículas de látex cubiertas o "sensibilizadas" con globulinas de conejo no inmunes.

La prueba se realiza en las microplacas de fondo en forma de V o de U (se prefieren las placas de fondo V; las placas de fondo plano no son adecuadas para este procedimiento). Las diluciones del sobrenadante del cultivo sujeto a prueba se hacen en dos columnas de pozos. [Nota: Los sobrenadantes de prueba se prepararán de acuerdo con las instrucciones que aparecen en la sección D de este capítulo; no se prepararán sobrenadantes por el método descrito en las instrucciones incluidas con el estuche, debido a que, por lo general, *V. cholerae* no produce toxina del cólera en cantidades suficientes cuando crece en agua peptonada alcalina (APW en inglés).] Una suspensión de partículas de látex cubiertas con anticuerpos se agrega a la primera columna, y el látex testigo, no sensibilizado, se agrega a la segunda columna. Si en el sobrenadante hay cantidades suficientes de toxina del cólera o toxina termolábil, se presentará aglutinación. La aglutinación resulta de la formación de enlaces cruzados entre las partículas de látex unidas a las moléculas de toxina del cólera. Esta estructura, similar a una red, aparecerá y formará una capa difusa en el fondo del pozo. Si no hay enterotoxina o está en una concentración inferior al nivel de detección, no se formará la estructura reticular; en su lugar, las partículas de látex no aglutinadas formarán un "botón", al sedimentarse.

Material requerido

- Placas de 96 pozos (con fondo en V o U) con tapa
- Micropipetas fijas o ajustables y puntas (25 μ l)
- Látex sensibilizado: suspensión de látex sensibilizado con anticuerpos específicos (IgG de conejo) contra la toxina del cólera (que viene con el estuche)
- Látex testigo: suspensión de látex cubierto con globulinas de conejo no inmunes (viene con el estuche)

- Toxina del cólera testigo (deshidratada, viene con el estuche)
- Diluyente: BSA en PBS (viene con el estuche)

Realización de la prueba

- 1) Cada muestra requiere dos columnas (ocho pozos por columna) en la placa. Con una pipeta o cuentagotas, se depositan 25 μ l del diluyente en cada pozo, excepto en el primer pozo de cada columna.
- 2) Agréguese 25 μ l de la muestra que se va a probar al primero y segundo pozos de cada grupo de dos columnas.
- 3) Utilizando una pipeta o diluidor, y comenzando con el segundo pozo de cada columna, se retiran 25 μ l y se realizan diluciones al doble. Detenerse en el séptimo pozo de la columna, de tal forma que el octavo pozo contenga solamente diluyente. Los 25 μ l extra del séptimo pozo se desechan.
- 4) Se agregan 25 μ l de látex sensibilizado a cada pozo de la primera columna para cada sobrenadante de prueba y testigo. Se agregan 25 μ l de látex testigo no sensibilizado a cada pozo de la segunda columna para cada sobrenadante de prueba y testigo.
- 5) El contenido de cada pozo se mezcla agitando la microplaca suavemente con la mano.
- 6) Para evitar la evaporación, la placa se cubre con una tapa y se coloca en un recipiente de plástico para almacenamiento junto con una toalla de papel húmeda. La placa se coloca sobre una superficie que no vibre y se deja allí sin mover, a temperatura ambiente, durante 20 a 24 horas.

Lectura de los resultados de la prueba

- 1) Cada pozo de cada columna se examina contra un fondo negro para observar aglutinación. La presencia de la toxina del cólera o de la termolábil causará aglutinación, manifiesta por la formación de una estructura reticular; al sedimentarse esta, formará una capa difusa en el fondo del pozo (Figura VII-4). Si no hay enterotoxinas o se encuentran en concentraciones inferiores al nivel de detección de la prueba, no se formará dicha estructura reticular; por lo tanto, al sedimentarse se observará un botón compacto.
- 2) Los resultados de la columna de pozos que contiene el látex testigo deben ser negativos. El último pozo de todas las columnas debe ser negativo. Si se observan resultados positivos en alguno de estos pozos, la reacción se considerará como no válida.
- 3) Cuando hay exceso de toxina del cólera, se puede observar un efecto de prozona; esto es, se obtiene un resultado negativo en los primeros pozos que contienen la muestra en estudio y el látex sensibilizado. Sin embargo, como resultado de las diluciones al doble, la concentración de la

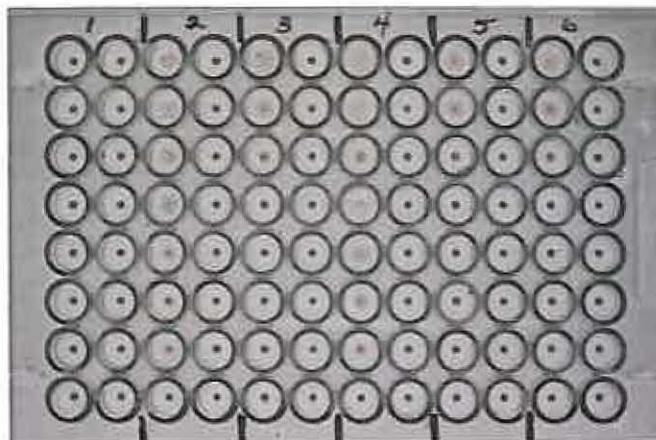


Figura VII-4. Microplaca con resultados de la prueba VET-RPLA (Oxoid Limited). La muestra 1 es negativa; las muestras 2, 3, 4, 5 y 6 son positivas.

toxina del cólera en cada pozo a lo largo de la columna se reduce progresivamente, anulando el efecto prozona debido a las cantidades excesivas de toxina del cólera. Se observará un resultado positivo de aglutinación después de los resultados negativos en los primeros pozos de la columna. Con tales resultados, la muestra de prueba se clasificará como positiva.

- 4) La sensibilidad de este estuche de prueba en la detección de la toxina del cólera es de 1 a 2 ng/ml. La enterotoxina, que se encuentra a concentraciones más bajas que esta, dará por tanto resultados negativos. El método es ligeramente menos sensible que el de G_{MI} -ELISA y rara vez una cepa toxigénica dará resultados negativos.

H. Reacción en cadena de la polimerasa para los genes de la toxina del cólera

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es una técnica que emplea dos oligonucleótidos de DNA cortos y específicos (iniciadores) y la enzima DNA polimerasa para sintetizar copias múltiples de DNA en la porción del genoma bacteriano que tiene la secuencia complementaria al iniciador en cada extremo. En la PCR para la toxina del cólera descrita aquí, los iniciadores específicos detectan solamente el gen que codifica para la subunidad A de la toxina del cólera (*ctxA*; Figura VII-5). El DNA amplificado de *ctxA* se detecta como una banda de 564 pares de bases (pb) en un gel de agarosa. La ampliación de la PCR se puede caracterizar aún más mediante digestión con enzimas de restricción o hibridación con una sonda interna específica para asegurarse de que la banda de ampliación en el gel

DetECCIÓN DE LA TOXINA DEL CÓLERA

Reactivos

- Agua estéril (preparéense alícuotas de 10 a 20 ml y utilícense alícuotas nuevas para cada prueba)
- Amortiguador de PCR 10x (Tris-HCl 100 mM, KCl 500 mM, MgCl 15 mM, gelatina al 0,1% [p/v])
- dNTP 12,5x (2,5 mM cada uno, dATP, dCTP, dGTP, dTTP en agua destilada estéril)
- Iniciador CTX2: 5' CGG GCA GAT TCT AGA CCT CCT G 3'; 100 μ M en agua destilada
- Iniciador CTX3: 5' CGA TGA TCT TGG AGC ATT CCC AC 3'; 100 μ M en agua destilada
- DNA polimerasa AmpliTaq (5 unidades/ μ l, Perkin-Elmer)
- Aceite mineral (estéril)
- Agarosa (FMC BioProducts, Rockland, Maine)
- Amortiguador Tris borato EDTA (TBE) 10x (108 g de base Tris, 55 g de ácido bórico, 40 ml de 0,5 M EDTA y agua destilada hasta completar 1.000 ml; ajustar pH a 8,0)
- Amortiguador de carga del gel 10x (0,5% sulfato dodecil sódico, 10 mM EDTA, 50% glicerol, 0,1% azul de bromofenol, 0,1% de cianol de xileno)
- Bromuro de etidio (la solución primaria es de 10 mg/ml de agua)
- Columnas de separación en tubo de microcentrífuga (G-50, Boehringer Mannheim, Indianápolis, Indiana)
- Endonucleasas de restricción *AluI* y *RsaI* (Gibco BRL, Gaithersburg, Maryland)
- Amortiguador 1 de restricción 10x (Gibco BRL)
- Marcador del tamaño de DNA molecular: escalera 1 kb (Gibco BRL)
- TEMED (Sigma Chemical Co.)
- Persulfato de amonio al 10% en agua, se prepara todos los días (Gibco BRL)
- Acrilamida al 30% (29 partes de acrilamida: 1 parte de bisacrilamida en agua), se guarda en la oscuridad a 4 °C

Nota: La acrilamida es neurotóxica; debe utilizarse máscara protectora cuando se prepara la solución primaria.

Cepas testigo

- *V. cholerae* ATCC 14035 (clásica, Ogawa, toxina positiva)
- *V. cholerae* ATCC 14033 (El Tor, Inaba, toxina negativa)

Realización de la prueba

NOTA ESPECIAL: Solo se requiere una cantidad muy pequeña del molde de DNA (DNA a partir del cual se genera la ampliación de la PCR) para la PCR. La presencia de cantidades pequeñas de DNA contaminante, en especial las que son producto de pruebas anteriores de la PCR, pueden dar resultados falsos positivos. Es importante usar testigos negativos así como positivos en cada experimento. El uso de agua en lugar del molde de DNA y una cepa negativa conocida son testigos negativos apropiados. El testigo positivo debe ser una cepa de referencia positiva conocida que se prepara junto con las cepas de prueba.

Para reducir la posibilidad de contaminar la PCR con productos obtenidos de dicha prueba en reacciones anteriores, las reacciones se prepararán en una habitación y la amplificación y la electroforesis se realizarán en otra. El producto de la PCR nunca debe llevarse a la habitación donde se prepara dicha reacción. Se reservará un juego separado de micropipetas, de preferencia pipetas de desplazamiento positivo, para preparar las pruebas de PCR.

- 1) Para preparar un molde de DNA, se suspende una asada de 1 μl del testigo o de las cepas de prueba en 0,5 ml de agua para obtener una concentración de 10^6 a 10^8 microorganismos/ml. Se hierve la muestra durante 20 minutos para liberar el DNA. Son suficientes 1 a 10 ng de DNA; demasiado DNA puede inhibir la reacción de amplificación. Es importante usar agua en lugar de PBS u otro amortiguador que contenga fosfato pues este inhibe la PCR. Los grupos heme de las placas de agar sangre también pueden inhibirla.
- 2) Para cada prueba de PCR, se utiliza una mezcla de reacción de 50 μl que consta de 38,75 μl de agua estéril, 5 μl de amortiguador de PCR 10x, 4 μl de dNTPs 12,5x, 0,5 μl de cada iniciador (volumen total, 1 μl), 0,25 μl de la DNA polimerasa AmpliTaq y 1 μl del molde de muestra. Se prepara una "mezcla maestra" de todos los reactivos excepto del DNA de muestra. Esto reduce los errores de pipeteo y produce concentraciones más uniformes de los reactivos. Se mezcla suficiente amortiguador de PCR, dNTPs, polimerasa *Taq*, iniciadores y agua para todas las pruebas que se van a realizar en un solo tubo que debe contener el volumen necesario y posteriormente se colocan alícuotas individuales de 49 μl de la mezcla de reacción maestra en cada tubo de microcentrífuga de 0,5 ml. A continuación, se agrega 1 μl del molde de DNA de muestra.
- 3) Se cubre la mezcla reactiva con una gota de aceite mineral estéril, y se cierran los tubos. Se programa el termociclador para un paso de preincubación a 95 °C durante 5 minutos, después a 30 ciclos de 1 minuto a 95 °C, 1 minuto a 60 °C, 1 minuto a 72 °C y una incubación final a 72 °C durante 10 minutos. Se puede agregar un paso final que consiste en mantener los tubos a 4 °C para refrigerar las muestras hasta que estén

Detección de la toxina del cólera

cargadas en el gel. Los tubos se colocan en el termociclador y se inicia el proceso.

- 4) Se prepara un gel de agarosa al 0,8% con amortiguador TBE. Se mezclan 10 μ l de la solución de PCR con 1 a 2 μ l del amortiguador de carga del gel de 10x y se cargan los pozos. Cuando se retiran los 10 μ l de la PCR, hay que cerciorarse de que la punta de la pipeta descienda más allá de la capa de aceite. Se utilizan testigos positivos y negativos adecuados con cada grupo de las reacciones, incluido un patrón de tamaño molecular en cada gel.
- 5) Se corre el gel hasta que el azul de bromofenol (color morado) ha migrado cerca de dos terceras partes del largo de la distancia en el gel. El voltaje y el tiempo efectivos variarán dependiendo del aparato de electroforesis que se utilice (por lo general, son suficientes un lapso de 2 a 3 horas y unos 60 a 80 voltios). La amplificación del gen *ctxA* de 564 pb debe migrar cerca del azul de bromofenol. Se tiñe el gel con bromuro de etidio (1 gota de la solución primaria en 500 ml de agua) durante 20 minutos, entonces se destiñe en agua durante 10 a 20 minutos. [Nota: el bromuro de etidio es mutagénico; siempre hay que usar guantes.] Se coloca el gel en el transiluminador UV y se toman fotografías para documentación.

Interpretación de los resultados

La prueba de PCR genera un producto amplificado de 564 pb. Esta ampliación migrará exactamente por arriba de la banda de 0,5 kb y del patrón de tamaño del DNA de 1 kb. Los iniciadores pueden verse como un frotis tenue que migra exactamente por abajo del patrón de tamaño de 200 pb (Figura VII-6). Los iniciadores, pero no la banda de ampliación de 564 pb, serán visibles para las muestras negativas. Las bandas que no sean del tamaño adecuado se considerarán negativas. Las bandas tenues que parezcan tener el tamaño correcto se deben interpretar con precaución. Cuando los resultados son dudosos, se puede verificar que el DNA amplificado proviene del gen *ctxA* recurriendo a la digestión con enzimas de restricción o a la hibridación con una sonda interna después de la prueba de transferencia de Southern. Para las aplicaciones comunes, la prueba con enzimas de restricción es más sencilla y más rápida que el sondeo con hibridación.

Verificación de la ampliación de la PCR

- 1) Se retira el aceite mineral de la muestra colocando el volumen total de la PCR sobre una cinta selladora Parafilm inclinada. El aceite mineral se adhiere al Parafilm a medida que la gota acuosa resbala hacia abajo. Se purifica el fragmento de DNA en una columna de separación en tubo de microcentrífuga G-50. Para preparar la columna, se centrifuga a $600 \times g$ durante 5 minutos. Se agrega la muestra (10 a 50 μ l) y se repite la centrifugación. El mismo volumen de DNA purificado que se agregó a la columna pasará a través de la misma.

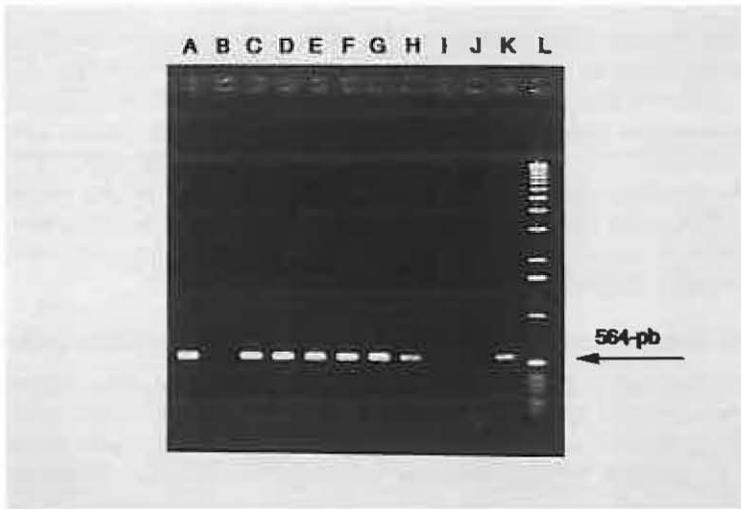


Figura VII-6. Gel de agarosa con resultados de una prueba PCR típica de la toxina del cólera. Las bandas A, C, D, E, F, cepas de prueba positivas; las bandas B, J, cepas de prueba negativas; bandas G, K, testigos positivos; bandas H, I, testigos negativos; banda L, escalera de ADN de 1 kb.

- 2) Se transfieren 15 μ l de la solución de la PCR a un tubo de microcentrífuga; se agregan 2 μ l de agua, 2 μ l del amortiguador 1 de restricción (BRL) y 1 μ l de *Rsa*I o *Alu*I (o ambos). Se incuba durante 2 horas a 37 °C.
- 3) Los fragmentos de restricción se separan por electroforesis en gel de acrilamida. Los geles de acrilamida producen mejor resolución de los fragmentos pequeños de DNA. Para un miniaparato de electroforesis, se prepara un gel al 8% con 6,6 ml de acrilamida al 30% (29:1 acrilamida: bisacrilamida en agua), 15,6 ml de agua, 2,5 ml de TBE 10x, 0,2 ml de persulfato de amonio al 10% y 20 μ l de TEMED. Se vierte el gel y se deja polimerizar durante 1 hora antes de inocular las muestras (10 μ l de la PCR y 1 μ l del amortiguador de carga 10x). Se deja que el azul de bromofenol migre la mitad de la distancia antes de teñir el DNA, como se hace con el de agarosa. La restricción de la ampliación del gen *ctxA* de 564 pb con la endonucleasa *Rsa*I genera tres fragmentos de 480, 70 y 14 pb; es factible que no se pueda ver el fragmento de 14 pb. La endonucleasa de restricción *Alu*I produce dos fragmentos de 499 y 65 pb. La combinación de las dos enzimas genera cuatro fragmentos: 415, 70, 65 y 10 pb.

I. Sondas de DNA para los genes de la toxina del cólera

En las improntas o “manchas” de colonias, las colonias aisladas que se van a someter a prueba para la detección de genes de la toxina del cólera

Detección de la toxina del cólera

se inoculan en una placa de agar no selectivo utilizando una cuadrícula y se incuban hasta que los inóculos o parches de crecimiento alcancen el tamaño deseado. Las colonias, entonces, se transfieren a un filtro de nailon donde se someten a una serie de pasos para lisar a las células y fijar al filtro el DNA desnaturalizado o monocatenario. El filtro se hibrida con una sonda de DNA específica que corresponde al gen *ctx*. Aunque se han sometido a prueba DNA y los oligonucleótidos clonados, una amplificación generada mediante PCR que contiene bases marcadas con digoxigenina ha resultado ser una opción sensible, estable y segura.

1. Generación de amplicones de PCR marcadas con digoxigenina

El procedimiento para generar sondas para PCR marcadas con digoxigenina es similar al que detecta genes *ctxA* con la misma reacción (sección H de este capítulo), excepto que ahora se utiliza una cepa bien caracterizada de *V. cholerae* O1 toxigénica para producir el molde de DNA, así como una segunda amplificación para incorporar la base marcada con digoxigenina.

Equipo y suministros

Véase la Sección VII-H ("Reacción en cadena de la polimerasa para los genes de la toxina del cólera")

Reactivos

- Véase la Sección VII-H ("Reacción en cadena de la polimerasa para los genes de la toxina del cólera")
- Mezcla 10x de dNTP "digoxigenina" (dATP 1 mM, dCTP 1 mM, dGTP 1 mM, dTTP 0,65 mM)
- Digoxigenina-11-dUTP (Boehringer Mannheim; la concentración es de 1 mM)

Procedimiento

- 1) Se genera el producto amplificado por PCR que se utilizará como molde de DNA para la detección, siguiendo el procedimiento descrito en la sección VII-H usando una cepa productora de toxina del cólera (ATCC 14035 u otra cepa productora de toxina del cólera bien caracterizada) como fuente para el molde de DNA. La incorporación de dUTP marcado con digoxigenina en una molécula de DNA es menos eficiente que la incorporación de los dNTP estándar; por lo tanto, en la PCR de marcación se utiliza la ampliación de PCR como molde de DNA en lugar del DNA genómico total; esto se hace con la finalidad de aumentar la cantidad de DNA marcado (sonda) que se produce.
- 2) Se corren de 5 a 10 μ l de la mezcla de la PCR en un gel de agarosa al 0,8% para confirmar la producción de la ampliación de DNA de tamaño y concentración adecuados. Se tiñe y se fotografía para documentación.

- 3) Se hace una dilución de la mezcla de PCR de tal forma que cerca de 50 ng de los fragmentos de PCR se utilicen como moldes en la PCR de marcación (por lo general, de 1 a 3 μ l de una dilución 1:10).
- 4) Se prepara la PCR de marcación en un tubo de microcentrífuga de 0,5 ml: de 1 a 3 μ l del molde de DNA generado por PCR diluido, 1 μ l de cada iniciador (2 μ l del volumen total), 10 μ l del amortiguador de PCR 10x, 10 μ l de la mezcla de “-digoxigenina” dNTP 10x, 7 μ l de digoxigenina-11-dUTP (1 mM), 0,5 μ l de polimerasa *Taq* y de 67,5 a 69,5 μ l de agua destilada estéril. Se cubre la mezcla con 2 gotas de aceite mineral.
- 5) Se programa el termociclador para 40 ciclos de 30 segundos a 95 °C, 90 segundos a 60 °C, 3 minutos a 72 °C, luego se incuba 10 minutos a 72 °C, y se mantiene a 4 °C. Se colocan los tubos en el termociclador y se inicia el proceso.
- 6) Los dNTP no incorporados y los iniciadores se retiran por purificación del DNA en una columna de separación en tubo de microcentrífuga G-50.
- 7) Se corren de 2 a 3 μ l de la mezcla de PCR en un gel de agarosa al 0,8%. Se tiñe y se fotografía. La ampliación marcada con digoxigenina migrará más lentamente (esto es, a un peso molecular más alto) que la ampliación no marcada, debido a la presencia de digoxigenina en la molécula.

2. Hibridación de colonias para los genes de la toxina del cólera

Equipo y suministros

- Filtros de nailon circulares de 8 cm de diámetro (Micron Separations, Inc., Westboro, Massachusetts)
- Papel de cromatografía Whatman 3MM
- Horno de secado
- Agitador de plataforma
- Bolsas de plástico sellables con calor
- Aparato de sellado mediante calor
- Cajas de Petri
- Placas de caldo de Luria (LB en inglés) u otro medio de enriquecimiento (no utilizar placas de MacConkey debido a que causan más tinción de fondo en las manchas)

Reactivos

- Sonda marcada con digoxigenina (ampliación preparada en la Sección I.1.)
- NaOH 10 N

Detección de la toxina del cólera

- Tris 1M, pH 8,0
- NaCl 5 M
- SDS al 20%
- SSC 20x: 175,3 g de NaCl, 88,2 g de citrato de sodio en 1 litro de agua, pH 7,0
- Solución de prehibridación: SSC 5x, reactivo de bloqueo al 1% (Boehringer Mannheim), N-laurilsarcosina al 0,1%, SDS al 0,02% (se puede preparar previamente en grandes cantidades, hacerse alícuotas y almacenarse a una temperatura de $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$) [Nota: La solución de prehibridación se utiliza para prehibridaciones y para hibridaciones.]
- Amortiguador A: Tris 100 mM, pH 7,5, NaCl 150 mM
- Amortiguador C: Tris 100 mM, pH 9,5, NaCl 100 mM, MgCl_2 50 mM
- Leche descremada en polvo
- Conjugado de fragmento Fab de antidigoxigenina/fosfatasa alcalina (Boehringer Mannheim)
- Azul de tetrazolio (NBT en inglés): 75 mg/ml en agua
- 5-bromo-4-cloro-3-indolilfosfato toluidino (BCIP): 175 $\mu\text{g/ml}$ en agua

Preparación de las improntas o manchas de colonias

- 1) Las colonias aisladas de cada cepa de prueba se transfieren a una placa de caldo de Luria (LB en inglés) utilizando una cuadrícula para organizar las colonias. La placa se incuba durante varias horas o de un día para otro a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta que todas las colonias se observen claramente en la placa.
- 2) Se marca un filtro de nailon circular de 8 cm (área total de 50 cm^2) con una flecha para orientar la posición de las colonias y un número o la fecha para identificar el filtro. Se coloca el filtro con la flecha en la porción superior (con el lado rotulado hacia abajo), sobre la placa de caldo de Luria inoculada. Se retiran todas las burbujas de aire atrapado. Se incuba la placa a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 30 minutos a 2 horas. [Nota: Se pueden utilizar filtros de nitrocelulosa, pero se rompen con mayor facilidad que los de nailon. Los filtros de vidrio, como los Whatman 541, no se pueden usar en esta prueba debido a que la digoxigenina se adhiere de manera no específica a ellos.]
- 3) Se saturan dos hojas de papel de cromatografía de 3MM con NaOH 0,5 M en un recipiente de vidrio. Se levanta el filtro de nailon, se retira de la placa y se coloca en el papel de 3MM, con el lado de las colonias hacia arriba. Los parches o inóculos visibles de cada colonia deben adherirse al filtro. Se deja que las células se lisen durante 15 minutos.
- 4) Se saturan dos hojas de papel de cromatografía de 3MM con Tris 1,0 M, pH 8,0, en un recipiente de vidrio. Se transfiere el filtro del papel satu-

rado con NaOH al papel saturado con Tris, otra vez con las colonias hacia arriba. Se permite que se efectúe la neutralización durante 10 minutos.

- 5) Se saturan dos hojas de papel de cromatografía de 3MM con Tris 0,7 M, NaCl 1,5 M, pH 8,0, en un recipiente de vidrio. Se transfiere el filtro del papel saturado con Tris 1,0 M al papel saturado con Tris/NaCl, con las colonias hacia arriba. Se permite que se efectúe la neutralización durante 10 minutos.
- 6) Se enjuaga el filtro brevemente en SSC 2x. Se aplica el filtro sobre papel de cromatografía 3MM seco y se seca con aire a la temperatura ambiente o a 37 °C. Se coloca el filtro en un horno a 80 °C durante 30 minutos a 2 horas. El filtro quedará listo para la hibridación pero se puede almacenar en un recipiente hermético a temperatura ambiente hasta que se requiera.

Hibridación de las improntas de colonias

- 1) Se coloca el filtro en una bolsa de plástico sellable con calor. Se agregan 10 ml (0,2 ml/cm²) de la solución de prehibridación. Se expulsan las burbujas de aire oprimiendo la bolsa con una pipeta de arriba abajo. Téngase cuidado de expulsar el líquido. Se sella la bolsa con un aparato de sellado mediante calor. Se incuba el filtro en la bolsa a 65 °C durante 1 hora en baño de María con agitación.
- 2) Se prepara la sonda de 15 a 20 minutos antes del final del tiempo de prehibridación (véanse en la sección I-1 las instrucciones para la preparación de la sonda). Se diluye la sonda en un volumen total de 100 µl en un tubo de microcentrifuga; se utilizan de 1 a 5 µl de la sonda, dependiendo de la concentración. [Nota: La concentración óptima de la sonda necesita determinarse de manera empírica probando varias concentraciones en filtros replicados.] Se desnaturaliza la sonda incubándola en baño de María hirviendo por 10 minutos. Se enfría rápidamente la sonda colocándola en hielo durante algunos minutos. Se centrifuga la sonda en una microcentrifuga algunos segundos y se mantiene en hielo hasta que se necesite.
- 3) Se retira el filtro del baño de María. Se corta una esquina de la bolsa y se elimina de ella toda la solución de prehibridación. Se agregan 2,5 ml (0,05 ml/cm²) de la solución de prehibridación y la sonda a la bolsa. Se eliminan las burbujas de aire y se sella la bolsa de tal manera que se adapte a la forma del filtro hasta donde sea posible, para así lograr el contacto máximo entre el filtro y la sonda.
- 4) Se hibrida el filtro a 65 °C de 18 a 24 horas en baño de María con agitación.
- 5) Se preparan cerca de 500 ml de solución de lavado (SSC 1x, SDS al 0,1%), y se precalientan a 65 °C. Se retira el filtro de la bolsa de plástico

Detección de la toxina del cólera

y se coloca en un recipiente de vidrio. Se agregan 100 ml de solución de lavado al recipiente de vidrio y se enjuaga brevemente el filtro. Se decanta la solución de lavado ya utilizada.

- 6) Se agregan 200 ml de solución de lavado al recipiente de vidrio y se coloca el filtro en el baño de María con agitación a 65 °C durante 15 minutos. Se retira la solución de lavado. Se agrega la solución de lavado restante y se incuba otra vez a 65 °C durante 15 minutos. El filtro se seca al aire y se conserva para el revelado posterior o se procede directamente a revelarlo.

Detección de sondas marcadas con digoxigenina

- 1) Se enjuaga el filtro con 40 ml de amortiguador A en una caja de Petri sobre un agitador de plataforma durante 1 minuto.
- 2) Se retira el filtro del amortiguador A, dejando que el exceso de solución escurra durante algunos segundos. Se coloca el filtro en otra caja de Petri que contenga 40 ml del amortiguador A con 5% de leche descremada en polvo (solución de bloqueo). Se incuba con agitación suave durante una hora.
- 3) Se decanta la solución de bloqueo y en su lugar se agrega conjugado de antidigoxigenina/fosfatasa alcalina en dilución de 1:5.000 en 10 ml de amortiguador A que contenga 5% de leche descremada en polvo. Se incuba durante 30 minutos con agitación suave.
- 4) Se transfiere el filtro a una caja de Petri que contenga 40 ml de amortiguador A. Se incuba durante 15 minutos con agitación suave. Se repite una vez el paso de lavado.
- 5) Se enjuaga el filtro en una caja de Petri que contenga 40 ml de amortiguador C en una bandeja de agitación durante 2 minutos.
- 6) Se retira el filtro del amortiguador C, dejando que el exceso de solución escurra durante algunos segundos. Se coloca el filtro en una caja de Petri que contenga 10 ml de amortiguador C con 45 μ l de NBT (75 mg/ml) y 35 μ l de BCIP (175 μ g/ml). Se cierra la caja con cinta selladora Parafilm, se coloca en un lugar oscuro y se revisa periódicamente. Los resultados se pueden observar en algunas horas, pero puede requerirse la exposición de un día para otro para el revelado completo.

Interpretación de los resultados

Los aislamientos positivos para *ctxA* aparecerán como manchas o parches de un color entre morado oscuro y café sobre los filtros de nailon (Figura VII-7). Los aislamientos y los testigos negativos pueden aparecer como parches débilmente teñidos.

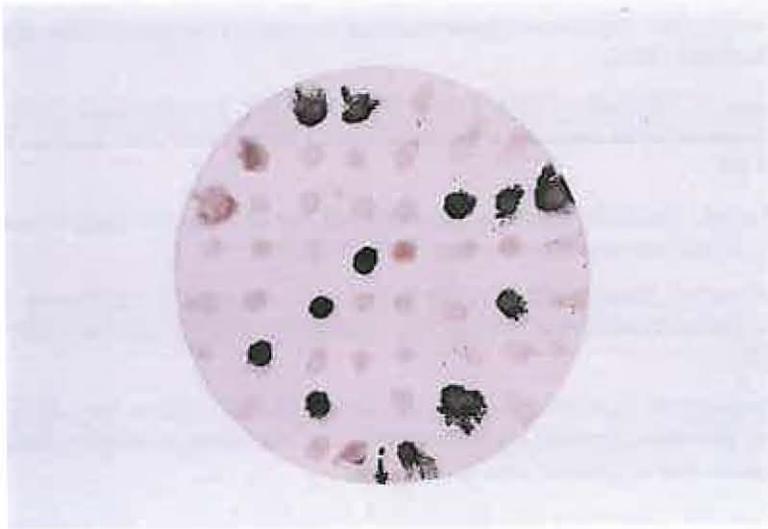


Figura VII-7. Resultados de la hibridación con una sonda marcada con digoxigenina para *ctxA*; el color morado oscuro indica una reacción positiva.

Bibliografía

Almeida RJ, Hickman-Brenner FW, Sowers EG, Puhr ND, Farmer JJ III, Wachsmuth IK. Comparison of a latex agglutination assay and an enzyme-linked immunosorbent assay for detecting cholera toxin. *J Clin Microbiol* 1990;28:128-130.

Craig JP. A permeability factor (toxin) found in cholera stools and culture filtrates and its neutralization by convalescent cholera sera. *Nature* 1965;207:614-616.

De SN, Chatterje DN. An experimental study of the mechanism of action of *Vibrio cholerae* on the intestinal mucous membrane. *J Pathol Bacteriol* 1953;66:559-562.

Erllich HA, Gelfand D, Sninsky JJ. Recent advances in the polymerase chain reaction. *Science* 1991;252:1643-1651.

Fields PI, Popovic T, Wachsmuth K, Olsvik O. Use of polymerase chain reaction for detection of toxigenic *Vibrio cholerae* O1 strains from the Latin American cholera epidemic. *J Clin Microbiol* 1992;30:2118-2121.

McIntyre OR, Feeley JC. Passive serum protection of the infant rabbit against experimental cholera. *J Infect Dis* 1964;114:468-475.

Detección de la toxina del cólera

Pershing DH. Polymerase chain reaction: trenches to benches. *J Clin Microbiol* 1991;29:1281-1285.

Rapley R, Theophilus BDM, Bevan IS, Walker MR. Fundamentals of the polymerase chain reaction: a future in clinical diagnostics? *Med Lab Sci* 1992;49:119-128.

Sack DA, Sack RB. Test for enterotoxigenic *Escherichia coli* using Y1 adrenal cells in miniculture. *Infect Immun* 1975;11:334-336.

Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*. 2nd ed. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.

Wachsmuth K. Laboratory detection of enterotoxins. En: Ellner PD, editor. *Infectious diarrheal diseases; current concepts and laboratory procedures*. New York & Basel: Marcel Dekker, Inc. 1984:93-115.

Yolken RH, Greenberg HB, Merson MH, Sack RB, Kapikian AZ. Enzyme-linked immunosorbent assay for detection of *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin. *J Clin Microbiol* 1977;6:439-444.