WHO Global Salm Surv

Manual de Procedimientos

Aislamiento, identificación y caracterización de *Vibrio cholerae*

2007

AUTORES

María Inés Caffer

Raquel Terragno

Sol González Fraga

María Rosa Viñas

Mariana Pichel

Norma Binsztein

Departamento Bacteriología

Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas

A.N.L.I.S. "Dr. Carlos G. Malbrán"

Centro Regional de Referencia del WHO Global Salm Surv

para América del Sur

AISLAMIENTO, IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE *Vibrio cholerae*

Este Manual contiene

- SECCION I: Introducción
- SECCION II: Guía para el Procesamiento de Muestras.
- SECCION III: Protocolos para la Identificación y Caracterización de *V. cholerae* por métodos fenotípicos
- SECCION IV: Protocolos para la Identificación y Caracterización de *V. cholerae* por PCR

SECCION I.- INTRODUCCION

El cólera es una de las enfermedades infecciosas que se conocen de más larga data, existiendo reportes de esta patología desde 1817 (Colwell et al, 1996). El agente etiológico del cólera es *Vibrio cholerae*. Este bacilo Gram negativo, anaerobio facultativo y móvil, fue descripto por primera vez en 1854 por Pacini en Italia y en 1883 por Robert Koch. El cólera se ha manifestado como una enfermedad epidémica desde la antigüedad y las manifestaciones clínicas de la infección varían desde una infección asintomática hasta una diarrea severa. La patología en su forma más severa se caracteriza por una profusa diarrea acuosa (deposiciones como "agua de arroz"), vómitos y deshidratación con gran pérdida de sales y agua; si no es adecuadamente tratada podría desencadenarse un shock hipovolémico, acidosis metabólica, falla renal y la muerte. Estas manifestaciones clínicas fueron atribuidas a la presencia de la toxina de cólera (CT) en *Vibrio cholerae*, que fue demostrada en 1959 por científicos de la India (De SN, 1959). En 1987 se identificó un factor de virulencia adicional, implicado en la adherencia de *V. cholerae* a células intestinales que se denominó "toxin coregulated pilus" (TCP) (Taylor et al., 1987).

En base a diferencias en el antígeno somático "O", *V. cholerae* ha sido clasificado en numerosos serogrupos, siendo reconocidos al menos 200 hasta el año 1997 (Yamai et al, 1997). De estos serogrupos, sólo el O1 y, más recientemente, el O139 (Kaper, 1995) han causado epidemias de cólera. Sin embargo, cepas pertenecientes a serogrupos no-O1, no-O139, han sido aisladas de pacientes con síntomas que van desde diarrea leve hasta deshidratación severa semejante a cólera (Levine, 1988). Por otra parte, *Vibrio cholerae* no-O1 puede causar infecciones tales como: apendicitis aguda, colecistitis aguda, otitis media, celulitis, neumonía, meningoencefalitis y septicemia (Sanyal et al, 1992) Estas lesiones indicarían que estas cepas podrían tener propiedades invasivas en adición a su enterotoxicidad.

La mayoría de los aislamientos de serogrupos O1 y O139 producen CT y han sido asociados con el cólera epidémico, aunque se han aislados cepas de estos serogrupos

que no producen dicha toxina y no estuvieron involucrados en epidemias (Faruque, 1998; Pichel, 2003).

Transmisión del cólera

La infección por *V. cholerae* es adquirida por la ingestión de agua o alimentos contaminados consumidos crudos o insuficientemente cocidos. Uno de los tipos de alimento involucrados son los moluscos bivalvos que se contaminan en el medio marino. Las almejas, ostras, mejillones se suelen consumir crudos o con un tratamiento de calor mínimo, en los cuales, *V. cholerae* puede ser no sólo contaminante de superficie, sino estar presentes en su tracto intestinal, ya que estas especies son filtradoras y concentran el microorganismo (Costagliola, 2000).

La posibilidad que se desencadene un brote de cólera en una región dada depende de varios factores: el número de individuos susceptibles, la exposición a aguas cloacales o agua no tratada y alimentos contaminados, y la presencia de un reservorio acuático de *V. cholerae.* La interacción de estas variables podría explicar la aparición del cólera endémico en forma estacional o el surgimiento del cólera epidémico (Fig. 1).

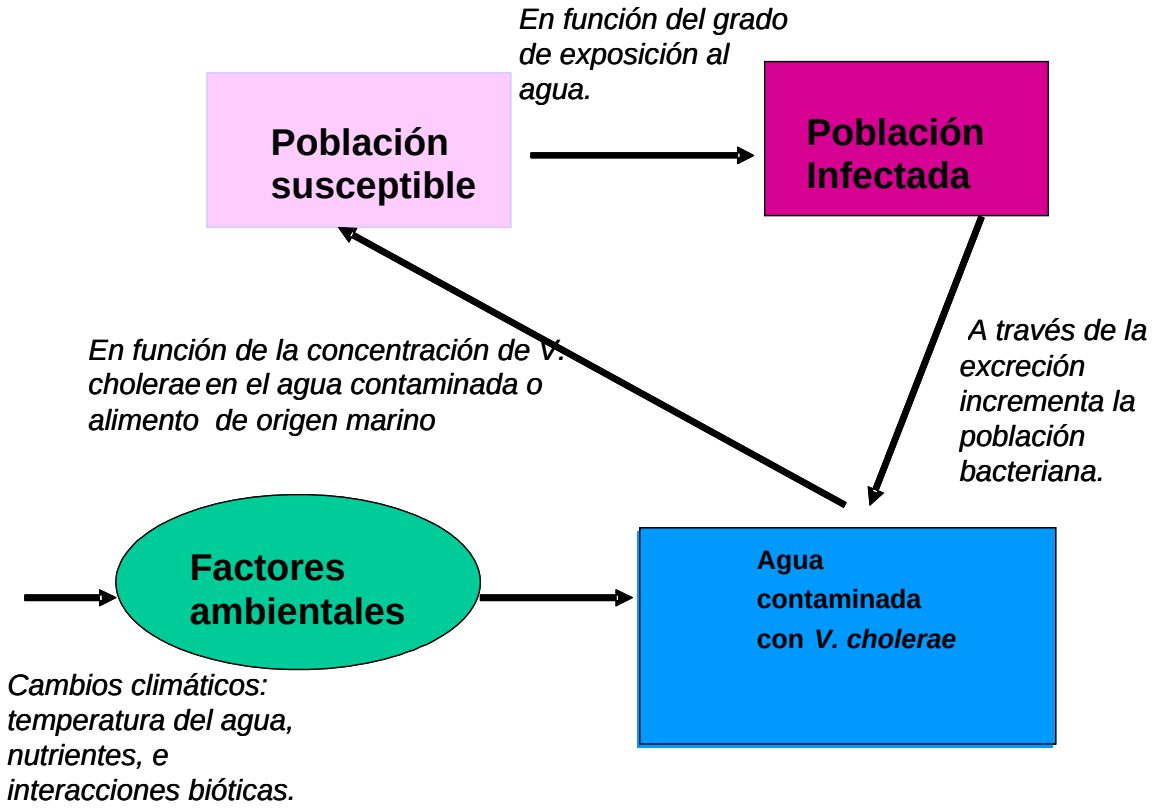


Figura 1. **Diagrama modelo de la dinámica del cólera**. Adaptado de Torres Codeço, 2001.

Ecología del cólera

V.cholerae es un habitante autóctono de los ecosistemas acuáticos, tanto en ríos, como en estuarios y en ambientes marinos. Tanto en áreas endémicas como epidémicas, los brotes de cólera siguen un patrón estacional, apareciendo de forma explosiva en varios focos simultáneamente, indicando un posible rol de factores ambientales en la aparición de las epidemias. El medio acuático ha sido reconocido como reservorio y vehículo para la transmisión de *V. cholerae* en numerosos estudios (Colwell, 1996).

Durante el curso de un brote, es posible aislar *V. cholerae* O1 de pacientes y de muestras ambientales. Así, se ha determinado la presencia del microorganismo en aguas superficiales, de río, estanque y pozo (Tamplin, 1991). Sin embargo, en los períodos inter-epidémicos no es posible recuperar *V. cholerae* O1 empleando los métodos de cultivo tradicionales. (Colwell, 2000). Rita Colwell y col han demostrado la existencia de la forma “durmiente” viable pero no cultivable (VNC) a la cual “entra” *V.cholerae* en respuesta a condiciones desfavorables de nutrientes y ambientales: baja concentración de nutrientes, temperatura, pH o salinidad distintos a los óptimos (Colwell ,1994). Se postula que las formas VNC explicarían la manera en que *V. cholerae* se mantiene en el ambiente durante los períodos inter-epidémicos. La asociación con el fito y zooplancton, en particular con copépodos, a través de la actividad quitinasa de *Vibrio cholerae*, facilitaría la sobrevida del microorganismo en el ambiente acuático, asegurando su persistencia por largo tiempo en condiciones adversas. El florecimiento de las distintas especies de plancton, relacionado a su vez con cambios climáticos, explicaría la estacionalidad de los brotes de cólera. En condiciones adecuadas, las formas VNC pueden revertir al estado cultivable, manifestando plenamente su capacidad de infección, patogenicidad y transmisibilidad.

Mecanismos de patogénesis de *Vibrio cholerae*

Los principales factores de virulencia asociados a cepas epidémicas O1 y O139, incluyen la enterotoxina (CT) y el factor de colonización (TCP), que confiere la habilidad de colonizar el intestino delgado. Este factor de colonización esencial, actúa además como receptor para el fago *ctx*φ, que contiene los genes para la síntesis de CT (Waldor, 1996). La proteína estructural de la fimbria TCP está codificada en el gen *tcpA,* que presenta alta variabilidad según lo descripto recientemente (Nandi et al, 2000). Esta hipervariabilidad en la superficie de la bacteria le permite escapar del reconocimiento por el sistema inmune del huésped.

Además de CT y TCP, otros factores de virulencia han sido identificados en aislamientos de *V. cholerae* como: hemolisinas, proteína reguladora (ToxR), citotoxinas (RTX) y toxina termoestable (ST) entre otros. Por lo tanto el estudio de la distribución de los distintos genes asociados a virulencia en cepas de *V. cholerae* permite evaluar el potencial patogénico de las mismas. La toxina ST actúa estimulando la actividad de guanilato ciclasa, promoviendo la secreción de Cl^- y/o inhibiendo la absorción de Na^+ y agua (Forte et al., 1992, Vicente A., 1997).

Emergencia de nuevas cepas toxigénicas

A nivel molecular, los principales genes patogénicos de *V. cholerae* se encuentran en regiones del cromosoma en forma de "clusters" o islas de patogenicidad, teniendo la capacidad de ser propagados horizontalmente (Karaolis et al. 1998, Heidelberg 2000). Esto sugiere que cepas ambientales pueden volverse más virulentas para el hombre a través de la adquisición de genes de patogenicidad.

Epidemiología del cólera en América

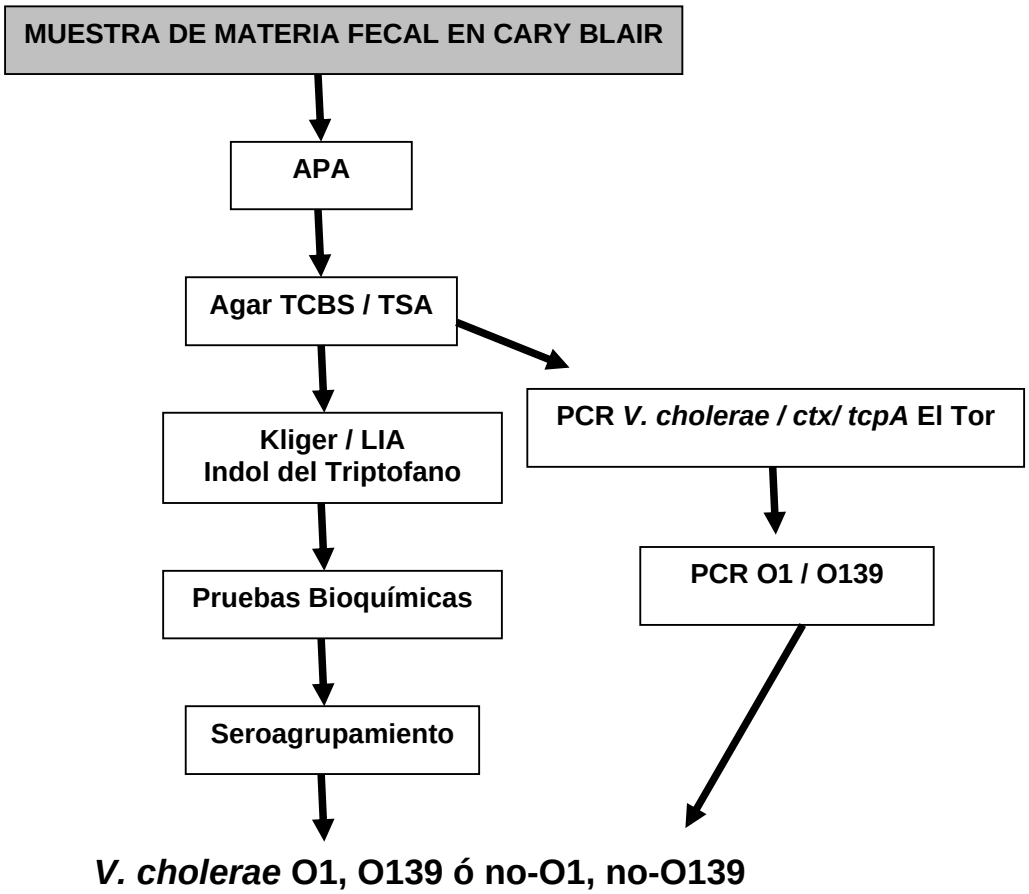
V. cholerae es uno de los principales agentes etiológicos de diarrea en niños y adultos, particularmente en áreas donde el cólera es endémico. El cólera reemergió en América Latina en enero de 1991 (Levine, 1991), luego de 100 años, en forma de una explosiva epidemia que comenzó en Perú. Esta epidemia fue causada por *V. cholerae* O1 biotipo El Tor. En Argentina, entre 1992 y 1998 ocurrieron siete brotes de cólera, principalmente en el norte del país, y en períodos estivales.

En general en el continente Latinoamericano se presentan casos de cólera asociados a brotes epidémicos y que aún no pueden considerarse endémicos.

En los últimos años, se registró una disminución en el número de casos, como también zonas libres de cólera en el continente Americano. Sin embargo, es importante sostener una continua vigilancia para prevenir futuros brotes, especialmente ante la evidencia de la presencia de reservorios de *V. cholerae* O1 viable no cultivable, según lo observado en Argentina, en el Río de la Plata y en la plataforma marina bonaerense (Binsztein 2004).

SECCION II.- GUIA PARA EL PROCESAMIENTO DE MUESTRAS DE MATERIA FECAL

FLUJOGRAMA PARA LA IDENTIFICACION *DE V. cholerae*



APA: Agua Peptonada Alcalina
TCBS: Agar Tiosulfato Citrato sales Biliares Sacarosa
TSA: Agar Tripticasa de Soja
LIA: Agar Lisina Hierro

1. RECOLECCIÓN Y TRANSPORTE DE MUESTRAS

1.1. MATERIALES

Equipamiento
- Hisopos
- Recipiente estéril para recolección de material biológico
- Refrigerador (4ºC)

Medios
- Medio de transporte Cary Blair

Materia fecal
La muestra debe obtenerse en el período agudo de la enfermedad, antes de iniciar el tratamiento con antimicrobianos. Con un hisopo estéril, se recoge una pequeña cantidad de una evacuación espontánea reciente, seleccionando las partes mucosas o sanguinolentas. En caso de no poder obtener esta muestra, se hace un hisopado rectal. Si la muestra puede ser procesada dentro de las dos horas de la extracción se debe depositar en un recipiente estéril. Las muestras que no se pueden procesar dentro de las dos horas, se deben colocar en medio de transporte. Como medio de transporte se usa Cary–Blair, que tiene la ventaja de ser estable hasta 18 meses después de su preparación, cuando las condiciones de almacenamiento son correctas. En este medio de transporte se puede conservar la muestra hasta 5 días, siempre en refrigeración.

2. AISLAMIENTO

2.1.- MATERIALES

Equipamiento
- Ansas rulo
- Placas de petri descartables (9 cm. diámetro) estériles
- Balanza
- Estufa a 37ºC/42ºC
- Mechero bunsen
- Hisopos de algodón
- Pinzas

Medios de cultivo
- Agua peptonada alcalina (APA)
- Agar tripticasa de soja (TSA) (placas)
- Agar tiosulfato-citrato-sales biliares-sacarosa (TCBS) (placas)

2.2. PROCEDIMIENTO PARA EL AISLAMIENTO

Procedimiento	Comentarios
Día 1:	
Cultivo primario en placas de agar y enriquecimiento selectivo **I.** Cultivar el hisopo en un tubo de agua peptonada alcalina (APA). El APA se incuba a 37ºC durante 6 a 8 horas. Con un ansa, tomando de la película superficial se siembran las placas de TCBS y agar TSA.	

3.- IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN

3.1.- MATERIALES

Se describen en forma detallada en la Sección II

3.2.- PROCEDIMIENTO PARA LA IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN

Procedimiento	Comentarios
Día 2:	
I. Leer las placas de agar TSA Leer las placas de agar TCBS (ver Anexo I)	Las colonias típicas son convexas Las colonias típicas son amarillas planas o ligeramente convexas.
II. Subcultivar 2 colonias sospechosas de *Vibrio cholerae* de las placas de agar TSA y/o TCBS en estrías de agar TSA, agar Kligler, agar LIA y en caldo triptofano.	El subcultivo de colonias sospechosas de *Vibrio cholerae* en estrías de agar TSA al mismo tiempo que la inoculación en Kligler o TSI y LIA permite ganar un día en la identificación y serotipificación

Día 3:	
I. Leer las reacciones bioquímicas: Kligler, LIA e indol del triptofano, si son compatibles con *Vibrio cholerae*., realizar la prueba de la oxidasa y si esta es positiva, se siembran las pruebas bioquímicas complementarias y se hace la serotipificación. (ver Anexo II).	

SECCION III. PROTOCOLOS PARA LA IDENTIFICACION Y CARACTERIZACION DE *Vibrio cholerae* POR METODOS FENOTIPICOS

1. IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE *VIBRIO CHOLERAE*

MATERIALES

Equipamiento

- Ansas descartables (1 µl)
- Ansa aguja
- Mechero Bunsen
- Estufa a 37°C

Soluciones, reactivos y medios de cultivo (Anexo 5 y 6)

- Agar Kligler
- Agar LIA
- Caldo triptofano
- Medio para la prueba LDC, ODC, ADH
- Medio control para las pruebas con aminoácidos.
- Vaselina estéril
- Medio triptona para la prueba de indol
- Reactivo de Erlich para la prueba de indol
- Medio RM/VP para la prueba de Rojo de metilo
- Medio RM/VP para la prueba de Voges-Proskauer
- Solución de KOH 40% para la prueba de Voges-Proskauer
- Solución alcohólica de alfa-naftol para la prueba de Voges Proskauer
- Solución de rojo de metilo
- Discos para reacción de oxidasa
- Caldo nutritivo adicionado de NaCl al 0,1,6,8 y 10 %

Procedimiento	Comentarios
Día 2 - 3:	
Siembra de pruebas bioquímicas De un cultivo puro en placas o estrías de agar nutritivo, inocular los siguientes medios: • Medio para LDC, ADH y ODC y el medio control. Cubrir con una capa de vaselina estéril. • Caldo triptofano para indol. • Medio RM/VP para la prueba de Rojo de metilo y para la prueba de Voges-Proskauer • Caldo nutritivo adicionado de NaCl al 0,1,6,8 y 10 % Incubar todas las pruebas bioquímicas a 37°C por 18 - 24 horas.	

Día 3 - 4:	
Lectura de pruebas bioquímicas Agregar el reactivo correspondiente a la prueba de indol. (Ver Anexo II). Leer los resultados de acuerdo a las Tablas 1 y 2.	

TABLA 1. Pruebas bioquímicas de *Vibrio cholerae.* Interpretación de los resultados

Medio	Reacciones/enzimas	Resultados	
		Negativo	**Positivo**
Kligler	Producción de ácido (si el fondo es amarillo y la estría es roja, (la producción de ácido es sólo a partir de glucosa).	Fondo rojo	Fondo amarillo
Kligler	Producción de ácido a partir de lactosa.	Estría roja	Estría amarilla
Kligler	Producción de gas	No hay burbujas en el fondo	Burbujas de aire en el fondo
Kligler	Producción de H_2S	No hay color negro	Color negro
LIA	La decarboxilación de la lisina produce una reacción alcalina (color violeta) en el medio. Los organismos que no decarboxilan la lisina producen una estría alcalina y un fondo ácido (color amarillo).	Botón purpura/Superficie amarilla	Botón púrpura/Superficie púrpura
LIA	Producción de H_2S	No hay color negro	Color negro
LDC test	Lisina decarboxilasa	Color amarillo/marrón	Color púrpura y color amarillo/marrón en el medio control.
ODC test	Ornitina decarboxilasa	Color amarillo/marrón	Color púrpura y color amarillo/marrón en el medio control
ADH test	Arginina dihidrolasa	Color amarillo/marrón	Color púrpura y amarillo /marrón en el medio control
Indol	Producción de Indol	Anillo amarillo	Anillo rojo/rosado

Tabla 2. Resultados de las pruebas bioquímicas para *Vibrio cholerae*

Prueba Bioquímica	Porcentaje de Positividad
Oxidasa	100
Kligler glucosa (ácido)	100
Kligler glucosa (gas)	0
Kligler lactosa (ácido)	7
Reacción del Indol	99
Lisina decarboxilasa (1% Na Cl)	99
Ornitina decarboxilasa (1% Na Cl)	99
Arginina dehidrolasa (1% Na Cl)	0
Rojo de metilo (1% NaCl)	99
Voges Proskauer (1% Na Cl)	75
Crecimiento en caldo nutritivo con 0% NaCl	100
Crecimiento en caldo nutritivo con 1% NaCl	100
Crecimiento en caldo nutritivo con 6% NaCl	53
Crecimiento en caldo nutritivo con 8% NaCl	1
Crecimiento en caldo nutritivo con 10% NaCl	0

2. SEROTIPIFICACION DE *VIBRIO CHOLERAE*

MATERIALES

Equipamiento

- Estufa de cultivo a 37ºC
- Heladera a 4ºC
- Ansas
- Tubos de ensayo
- Cajas de Petri
- Láminas de vidrio de 20x20 cm
- Gradillas
- Mechero
- Lámpara para leer aglutinaciones
- Palillos de madera
- Frascos gotero para los antisueros

Medios de Cultivo y Reactivos

- Estrías de agar tripticasa de soya (TSA)
- Antisueros diagnósticos
- Solución salina al 2%

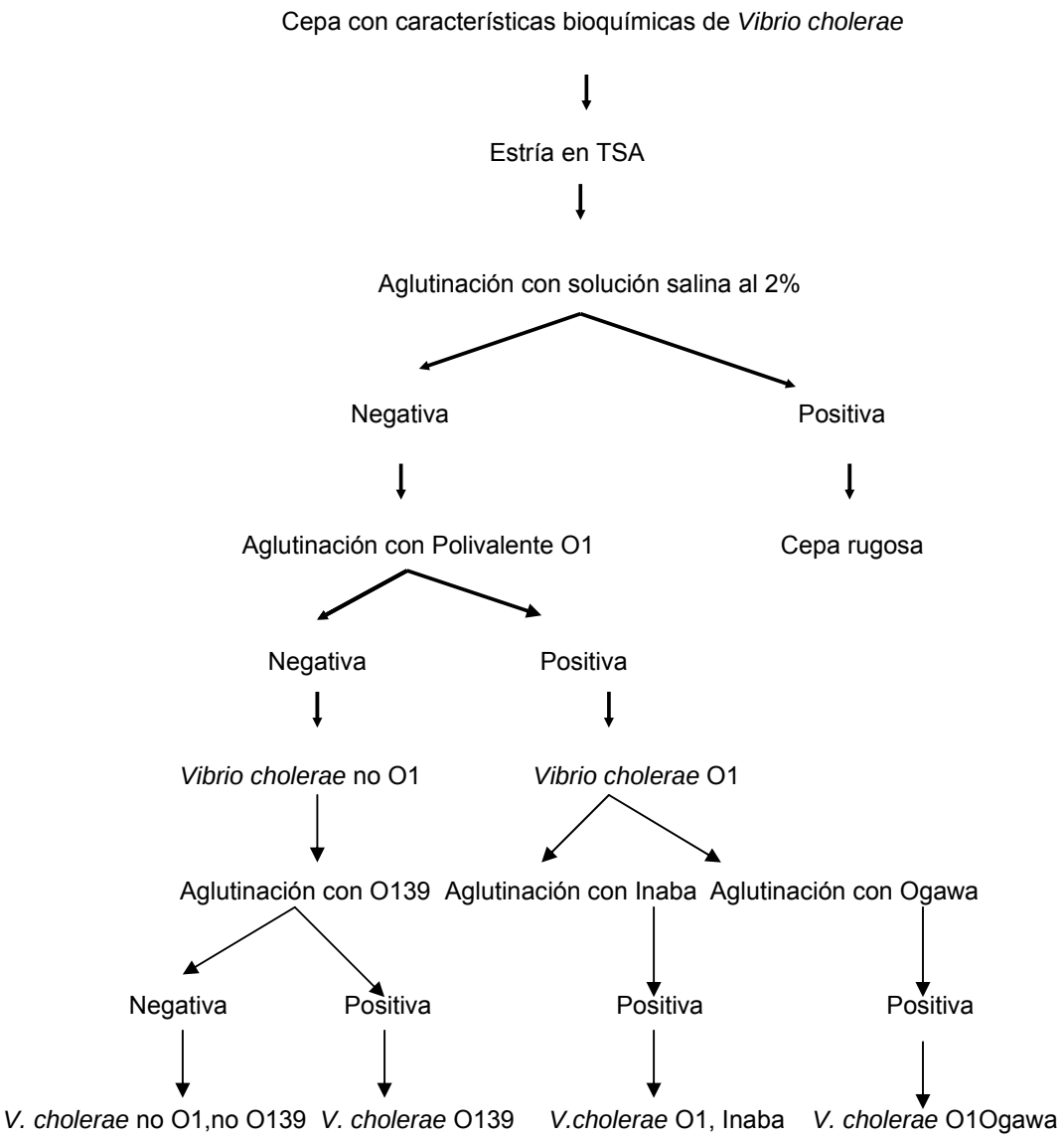
Antisueros Diagnósticos

Para este estudio se utilizan los siguientes antisueros:

1) Antisuero polivalente *Vibrio cholerae* O1
2) Antisuero monovalente Ogawa
3) Antisuero monovalente Inaba
4) Antisuero monovalente O139

Procedimiento	Comentarios
Día 1	
La determinación del antígeno O de *Vibrio cholerae* se hace en lámina, a partir de un cultivo en agar TSA de 18 hs a 37ºC (Ver flujograma adjunto). Verificar que el cultivo se encuentre en forma lisa: la aglutinación con solución salina al 2% debe dar negativa Una ansada de cultivo puro se mezcla con una gota de solución salina al 2%, rotando suavemente la lámina, durante 2 minutos. Se observa la presencia o ausencia de grumos. a) Si hay grumos la cepa está rugosa.	Los anticuerpos en el suero específico aglutinan con la bacteria cuando el antígeno correspondiente está presente. Es importante que el aislamiento esté en forma lisa. Si la cepa esta rugosa, se deben relizar subcultivos de la cepa en agar sangre o en agar Mueller Hinton, de manera de recuperar la forma lisa y poder continuar con la serotipificación somática O.
b) Si no presenta grumos se realiza la serotipificación somática O Sobre una lámina de vidrio se enfrenta una ansada del cultivo con una gota del antisuero polivante O1. Se mezcla rotando suavemente la lámina, durante 2 minutos, para favorecer la reacción antígeno-anticuerpo y se observa presencia o ausencia de aglutinación, con luz indirecta a) Si hay aglutinación con el antisuero polivalente O1, se prueban los antisueros monovalentes Inaba y Ogawa b) Si no hay aglutinación con el antisuero polivalente O1, se prueba el antisuero monovalente O139 Lectura e interpretación de resultados El grado de aglutinación se registra de la siguiente manera: • 4+: 75 a 100% de microorganismos aglutinados • 3+: 75% aproximadamente de microorganismos aglutinados • 2+: 50% aproximadamente de microorganismos aglutinados • 1+: menos de 25% de microorganismos aglutinados Negativo: ausencia de aglutinación. Se observa una suspensión homogénea	

Flujograma de Serotipificación para *Vibrio cholerae*



ANEXO Nº I

MEDIOS DE CULTIVO

1. DESCRIPCIÓN DE LOS MEDIOS DE CULTIVO DE ENRIQUECIMIENTO Y DE AISLAMIENTO

MEDIOS DE ENRIQUECIMIENTO

Agua Peptonada Alcalina

La viabilidad de *Vibrio* spp. se mantiene intacta a pH alcalino y el uso de agua peptonada alcalina ha sido recomendado para incrementar la recuperación de *Vibrio* spp. de materia fecal y de otras muestras.
El medio contiene peptona de carne, cloruro de sodio y el pH final es de 8.6 ± 0.2 a 25ºC.
Se incuba 6 a 8 horas y se siembra en los medios de cultivo.

MEDIOS DE CULTIVO DE AISLAMIENTO

Agar TSA

Es un medio utilizado para propósitos generales que favorece el desarrollo y el aislamiento de una gran variedad de microorganismos aerobios, anaerobios facultativos y extrictos.
Se prepara según las recomendaciones del fabricante. Se autoclave 15 minutos a 121ºC

Agar TCBS

Es un medio selectivo para el aislamiento de *Vibrio cholerae.*
El medio contiene: tiosulfato, citrato, sales biliares y sacarosa y está disponible comercialmente.
Se prepara según las indicaciones del fabricante. No se debe autoclavar.
Por su doble indicador (azul de timol y azul de brotimol) vira al amarillo con pequeñas variaciones de pH por la acidificación de la sacarosa.
Aspecto de las colonias y crecimiento

Escherichia coli	Translúcidas	de ninguno a escaso
Proteus	Pequeña, amarilla	de ninguno a escaso
Sterptococcus feacalis	Pequeña amarilla	de ninguno a escaso
Vibrio cholerae	Amarillas	Bueno
Virio fluviales	Amarillas	Bueno
Vibrio parahaemolytivus	Azul	Bueno
Vibrio vulnficus	Amarillas o translúcidas	Bueno

ANEXO Nº II

PRUEBAS BIOQUIMICAS PARA LA IDENTIFICACIÓN DE *VIBRIO CHOLERAE*

Prueba de la Oxidasa

I. Principio
La citocromo oxidasa es una enzima de la cadena respiratoria perteneciente al grupo de las hierro porfirinas. Se encuentra presente en los géneros *Pseudomonas, Vibrio, Aeromonas*, etc, pero no en los miembros de la familia *Enterobacteriaceae*. Cuando oxida el citrocromo C reducido y se reduce a una forma inactiva. La enzima reducida es reconvertida a su forma activa por la transferencia de electrones al oxígeno molecular. En presencia de oxígeno molecular los electrones pueden ser transferidos por el sistema citocromo oxidasa/citroctromo C a un gran número de compuestos orgánicos, entre ellos la p-aminodimetilanilina.

II. Materiales
Se dispone de discos comerciales embebidos es una solución estabilizada de oxalato de la p- aminodimetilanilina. Son estable spor un año en oscuridad de 4ºC.

III. Procedimiento
A. En un tubo de hemólisis preparar una suspensión espesa del microorganismo en estudio en aproximadamente 0.2 ml de agua destilada, colocar un disco del reactivo.
B. Si hay escaso número de colonias sospechosas, se puede humedecer el disco con una gota de agua y luego colocar sobre el mismo material de una de las colonias en estudio.

IV. Resultados
Ensayo positivo: desarrollo de color rojo
Ensayo negativo: no hay desarrollo de color.

V. Control de Calidad
Vibrio cholerae +
Escherichia coli -

VI. Consideraciones
La reacción de la oxidasa no puede ser realizada a partir de medios que contienen azucares fermentables o sangre por la posibilidad de obtener resultados falsamente negativos.

Agar Hierro Tres Azucares (TSI) y Agar Kligler

I. Principio
El medio fue diseñado para determinar la habilidad de las bacterias de fermentar hidratos de carbono y producir sulfuro de hidrógeno (SH_2). El medio contiene 1 parte (0.1%) de glucosa y 10 partes (1.0%) de lactosa y sacarosa. El indicador de pH es el rojo fenol y el sulfato ferroso pone en evidencia la formación de SH_2. Si el microorganismo fermenta glucosa, tanto la punción como la estría aparecerán de color amarillo. Si el organismo fermenta lactosa y/o sacarosa, la estría permanecerá ácida (amarilla). Si no fermenta lactosa, la estría se vuelve alcalina (roja). Los organismos que no fermentan glucosa no producen cambios en

el pH del medio o producirán productos alcalinos y el medio TSI permanecerá rojo. La producción de
SH_2 se manifiesta por un ennegrecimiento del medio.
El agar de Kligler contiene dos azúcares: lactosa (1%) y glucosa (0.1%). Este medio puede reemplazar al TSI, la diferencia entre ambos es la ausencia de sacarosa. Los fundamentos bioquímicos y la interpretación de los resultados son los mismos para ambos medios.

II. Materiales

El medio está disponible comercialmente. Disolver en agua destilada y dispensar volúmenes de 5.0 ml en tubos con tapa a rosca; autoclavar a 121ºC por 15 minutos y enfriar inclinado dejando un fondo de 5 a 10 mm. El sustrato es estable por 3 meses. Rotular indicando fecha de preparación y de expiración.
Guardar en heladera; si hay cambio de color no usar.

III. Procedimiento

A. Con un ansa estéril tomar material.
B. Punzar el fondo en el centro.
C. Retirar el ansa y estriar sobre la superficie del agar.
D. Dejar la tapa floja para permitir intercambio de aire.
E. Incubar a 37ºC por 18 a 24 horas.

IV. Resultados

Estría ácida/fondo ácido (amarillo/amarillo): fermentación de glucosa, sacarosa y/o lactosa (*E. coli*).
Estría alcalina/fondo ácido (rojo/amarillo): fermentación de glucosa solamente (*Shigella* spp.).
Estría alcalina/fondo alcalino (rojo/rojo): no fermentador (*Pseudomonas aeruginosa).*
Precipitado negro en el fondo: producción de SH_2 (*Salmonella* spp).
Burbujas o roturas: producción de gas (*E. coli, Salmonella* spp.).

V. Control de Calidad

Bacteria	**Estría**	**Punción**	**SH_2**
Salmonella Typhi	K	A	+ (*)
Salmonella Paratyphi A	K	Ac/g	-
Salmonella spp.	K	A	+
Shigella spp.	K	A	-
Enterobacter aerogenes	A	Ac/g	-
Enterobacter cloacae	A	Ac/g	-
Escherichia coli	A	Ac/g	-
Citrobacter	A	Ac/g	+
Klebsiella	A	Ac/g	-
Proteus vulgaris	A	A oAc/g	+(sucio)
Proteus mirabilis	K	Ac/g o A	+ (sucio)
Klebsiella pneumoniae	A	Ac/g o A	-

(*) sólo en la parte superior de la punción o formación de un anillo.
A:ácido; K:alcalino; c/g: cn gas

VI. Consideraciones

Cuando se agrupan los miembros de la familia *Enterobacteriaceae*, las reacciones del TSI y KIA pueden variar ligeramente. Algunos no fermentadores de lactosa pueden fermentar sacarosa.

El test se debe leer entre las 18 y 24 horas. Lecturas tempranas pueden dar falsos resultados ácido/ácido, mientras que lecturas tardías pueden dar falsos resultados alcalino/alcalino.

Una gran producción de SH_2 enmascara la reacción de la glucosa. Sin embargo la glucosa fue fermentada aunque no se vea el cambio de color. Observar si hay producción de gas.

En el TSI, la utilización de sacarosa puede suprimir el mecanismo enzimático que resulta en la producción de SH2. Por esta razón, algunos organismos pueden demostrar producción de SH_2 en KIA pero no en TSI.

Agar Lisina Hierro (LIA)

I. Principio

La decarboxilación de la lisina a cadaverina produce una alcalinización del medio y un viraje al violeta del indicador púrpura de bromocresol. Como la reacción tiene lugar en medio ácido, es necesario la fermentación previa de la glucosa.

Los microorganismos que no decarboxilan lisina, pero fermentan la glucosa producen un viraje al amarillo en todo el medio.

La formación de SH_2 produce una coloración negra debido al sulfuro de hierro producido.

Las bacterias del grupo *Proteus-Providencia*, con excepción de *Morganella morganii*, desaminan la lisina a ácido α-cetocarbónico que forma compuestos pardo-rojizos en el medio de cultivo con la sal de hierro y en aerobiosis.

II. Materiales

El medio está disponible comercialmente. Disolver el polvo en agua destilada y dispensar en volumenes de 3 ml en tubos con tapa a rosca. Esterilizar a 121ºC por 15 minutos. Enfriar de manera de tener estría y fondo. Guardar en heladera.

III. Procedimiento

A) Inocular punzando el fondo y luego estriar la superficie del agar.

Incubar a 37ºC por 18 a 24 horas (a veces pueden ser necesarias 48 horas).

IV. Resultados

Los microorganismos que descarboxilan la lisina producen un viraje al violeta.

Los microorganismos que no descarboxilan la lisina y fermentan glucosa producen un viraje al amarillo.

La formación de SH_2 se indica por la aparición de una coloración negra.

V. Control de Calidad

Bacteria	Estría	Punción	SH_2
Salmonella spp.	K	K	+
Proteus mirabilis	R	A	+
Proteus vulgaris	R	A	+
Morganella morganii	K	A	-
PrProv. Rettgeri	R	A	-
Providencia spp.	R	A	-
Citrobacter spp.	K	A	+
Escherichia coli	K	A	-
Shigella spp.	K	A	-
Klebsiella spp.	K	A	-

A.ácido; K.alcalino; R: desaminación de la lisina
Este medio no es un sustituto del método standard de Moeller.

VI. Consideraciones

Dado que descarboxilación de la lisina ocurre únicamente a pH ácido, este medio sólo puede utilizarse para diferenciar cultivos que fermenten glucosa.

Prueba del Indol

I. Principio

El indol es uno de los productos del metabolismo del aminoácido triptofano. Con un medio rico en triptofano, el indol se puede detectar por su habilidad para combinarse con ciertos aldehidos para formar un compuesto coloreado. El ensayo constituye un método rápido para detectar organismos productores de indol. Como indicador de la presencia del aldehído se usa el reactivo de Erlich. Es especialmente útil en la identificación preliminar de *Escherichia coli*, y para diferenciar *Edwardsiella* (+) de *Salmonella* (-).

II. Materiales

A. Caldo triptofano

- Peptona 20.0 gr
- Cloruro de sodio 5.0 gr
- Agua destilada 1000 ml

A este caldo se le incorpora triptofano en una concentración del 1%. El medio se esteriliza a 121ºC durante 15 minutos. Dejar enfriar antes de su empleo y guardar a 4-10ºC para su conservación.

B. Reactivo de Erlich

- p-dimetilaminobenzaldehido 1.0 g
- alcohol etílico, 95% 95.0 ml
- ácido clorhidríco, concentrado 20.0 ml

Se disuelve el aldehído en el alcohol (puede requerir un calentamiento suave), luego se agrega lentamente el ácido. El reactivo de color amarillo es estable por un año. Identificar el reactivo con una etiqueta y guardar refrigerado en botellas color caramelo.

III. Procedimiento

1) Con un ansa tomar material de una colonia aislada e inocular el caldo que contiene triptofano.
2) Incubar a 37ºC por 18 a 24 horas.
3) Transferir 2 ml de la suspensión de caldo a un segundo tubo.
4) Agregar 5 gotas del reactivo de Erlich por la pared del tubo.
5) Agitar el tubo y observar un color rosado en la interfase entre el caldo y el reactivo.
6) Si el ensayo es negativo, el cultivo se debe reincubar otras 24 horas.

IV. Resultados

Ensayo positivo: desarrollo de un color rojo en la interfase del reactivo y el caldo, segundos después de agregar el reactivo.
Ensayo negativo: no hay cambio de color o hay un color amarillo en la interfase.

V. Control de Calidad

Cualquiera de los reactivos debe ser controlado con cultivos positivos y negativos conocidos, antes de su empleo general. Como controles resultan convenientes cepas de fácil obtención y que su conservación en cultivos madre no ofrezca problemas.
Escherichia coli +
Enterobacter aerogenes -
Klebsiella pneumoniae –

VI. Consideraciones

El pH óptimo para la actividad de la triptofanasa es ligeramente alcalino (7.4-7.8). La disminución del pH provoca una reducción en la producción de indol y una reacción falsamente negativa o débilmente positiva.
Los cultivos a los cuales se les efectúa la prueba del indol deben ser incubados aerobicamente. El descenso en la tensión de oxígeno disminuye la producción de indol.
No debe emplearse un medio de peptona que contenga glucosa porque la elevada acidez producida por la fermentación del azúcar puede inhibir la actividad de la triptofanasa. El agregado de triptofano estimula la producción de indol, mientras que la glucosa la inhibe.

Test de Decarboxilasa-Dihidrolasa

I. Principio

La descarboxilación es un proceso en el cual las decarboxilasas atacan el extremo carboxilo de los aminoácidos, formando la correspondiente amina. Los tres aminoácidos que se ensayan en la identificación de Enterobacterias son arginina, lisina y ornitina. La decarboxilación de lisina y ornitina da cadaverina y putrescina (diaminas), mientras que arginina da citrulina por acción de una dihidrolasa. El test se debe acompañar con un tubo control que contiene el medio base sin aminoácido. Como la decarboxilación es una reacción anaeróbica, se debe cubrir el medio con una capa de aceite mineral estéril. El proceso ocurre en dos etapas: por fermentación de la glucosa se produce una acidificación del medio (pH < 6.0), apareciendo color amarillo. La acidificación es necesaria para que ocurra la decarboxilación. Este último proceso de lugar a la formación de las aminas que elevan el pH con el consiguiente viraje del indicador al color violeta.
La prueba de la lisina ayuda en la diferenciación de *Edwardsiella* (+), y *Salmonella* (+) de *Citrobacter* (-); de *Enterobacter aerogenes* (+) de *Enterobacter cloacae* (-) y *Enterobacter agglomerans (-)*

La prueba de ornitina ayuda a diferenciar *Klebsiella* (-), *Proteus mirabilis* (+) de *Proteus vulgaris* (-); *Morganella morganii* (+) de *Providencia rettgeri* (-); *Yersinia enterocolitica* (+) de *Yersinia pestis* y *Yersinia pseutuberculosis* (-).

II. Materiales

El medio basal más comúnmente utilizado es el medio de decarboxilasa de Moeller. El medio está disponible comercialmente. Las concentraciones de aminoácidos a usar son: 1% para la forma L y 2% para la forma DL. Fraccionar el medio base en 4 porciones de 250 ml cada una. Agregar los aminoácidos a 3 porciones del medio. El pH se debe ajustar después de agregar el aminoácido y antes de esterilizar a 6 – 6,2. Fraccionar en volúmenes de 3 a 4 ml en tubos con tapa a rosca y autoclavar a 121ºC por 10 minutos. El sustrato es estable por 3 meses. Rotular los tubos y guardar en heladera.

III. Procedimiento

A. Tomar material con un ansa e inocular el tubo control y los tubos con los aminoácidos.
B. Cubrir todos los tubos con una capa de vaselina estéril.
C. Incubar a 37ºC
D. Efectuar las lecturas día por día hasta 4 días, registrando los resultados día por día.

IV. Resultados

Ensayo positivo: medio turbio y púrpura a púrpura amarillento.
Ensayo negativo: color amarillo
Tubo control: permanece con su color original o se vuelve amarillo si el organismo es un fermentador de glucosa (se debe ver turbidez en el tubo).V. Control de calidad

Bacteria	Arginina	Lisina	Ornitina
Proteus vulgaris	-	-	-
Morganella morganii	-	-	+
Enterobacter cloacae	+	-	+
Enterobacter aerogenes	-	+	+
Salmonella Typhimurium	+	+	+
Klebsiella spp.	-	+	-

VI. Consideraciones

Inocular siempre un tubo control.
Debe haber desarrollo para que el resultado sea válido.
Si se observan capas de color amarillo y violeta, agitar suavemente el tubo antes de interpretar la reacción.
Comparar todos los tubos positivos con el tubo control. Un color grisáceo puede indicar reducción del indicador más que formación de productos alcalinos. Se debe agregar más indicador antes de interpretar el resultado.
Si la reacción es difícil de interpretar, comparar el tubo con un tubo sin inocular. Luego de 24 horas cualquier traza de color púrpura indica un resultado positivo.
Si se usa el medio de Moeller, se debe incubar por lo menos 18 horas ante de interpretar los resultados.
Si no se agrega el aceite mineral, las reacciones se deben leer sólo a las 24 horas.
Un pequeño precipitado floculento en la ornitina no interfiere con su uso.

Ensayo del Rojo de Metilo

I. Principio

El test se usa para determinar la presencia de iones hidrógeno cuando un microorganismo fermenta glucosa. Todos los miembros de la familia *Enterobacteriaceae* convierten glucosa en ácido pirúvico por el camino de Embden-Meyerhof. Los organismos que metabolizan ácido pirúvico producen ácido y bajan el pH a menos de 4.4. Los organismos que utilizan, en cambio, el camino del butilenglicol producen acetoína y butanodiol (diacetilo). El indicador del medio, rojo de metilo, es rojo a pH < 5.0 y amarillo a pH > 5.8. El test es útil para la diferenciación de *Escherichia coli* (rojo metilo positivo) de *Klebsiella* (rojo metilo negativo). La mayoría de las *Enterobacteriaceae* tienen uno u otro camino metabólico, pero raramente ambos.

II. Materiales

A. Preparación del medio

El medio está disponible comercialmente. Disolver en agua destilada, dispensar 5 ml en tubos con tapa a rosca y autoclavar a 121ºC por 15 minutos. El sustrato es estable por 2 a 3 meses. Rotular los tubos, indicando fecha de preparación y de expiración. Guardar en heladera.

B. Preparación del reactivo

Disolver 0.1 gr de rojo de metilo en 300 ml de etanol y diluir con 200 ml de agua destilada, para alcanzar un volumen total de 500 ml. El reactivo es estable por 1 año. Rotular y guardar en heladera.

III. Procedimiento

A. Con un ansa estéril tomar material e inocular un tubo con caldo RM/VP.
B. Incubar a 35ºC por un mínimo de 48 horas.
C. Transferir 2.5 ml de la suspensión a un tubo.
D. Agregar 5 gotas del indicador y observar si hay cambio de color.

IV. Resultados

Ensayo positivo: el reactivo permanece rojo.
Ensayo negativo:el reactivo se torna amarillo-naranja.
Si el resultado es negativo continuar la incubación de la bacteria por 24 horas más.

V. Control de Calidad

Escherichia coli +
Enterobacter aerogenes –

VI. Consideraciones

Variaciones en la cantidad de peptona del medio puede afectar el resultado.
Aumentando la concentración de glucosa en el medio no se acelera la reacción del rojo de metilo.
No sobreinocular, el crecimiento bacteriano se inhibe cuando el inóculo es grande.
Una incubación de 48 horas es suficiente para la mayoría de los cultivos; pero el ensayo no se debe realizar con cultivos que tengan menos de 48 horas de incubación.

Ensayo de Voges-Proskauer

I. Principio

El piruvato es un intermediario en el metabolismo de la glucosa. A partir del ácido pirúvico un microorganismo puede seguir varios caminos. Algunos lo rompen para formar como productos finales ácidos láctico, acético o fórmico. Otros metabolizan el piruvato por el camino del butilenglicol para formar como productos finales acetoína (acetilmetilcarbinol) y 2,3-butanodiol (diacetilo). El ensayo de Voges-Proskauer (VP) detecta estos productos metabólicos. En presencia de oxígeno e KOH, la acetoína se oxida a diacetilo, que da un complejo rojo .La sensibilidad del ensayo se aumenta por el agregado de α-naftol antes del agregado de KOH.

II.Materiales

A. Preparación del medio

El medio está disponible comercialmente. Para la preparación del caldo RMVP, ver el procedimiento indicado para el test de rojo de metilo.

B. Preparación de solución de α-naftol

Disolver 5.0 gr de α- naftol en una pequeña cantidad de alcohol absoluto y luego llevar el volumen a 100 ml. La solución debe ser incolora. El reactivo es estable por 1 año. Rotular indicando fecha de preparación y de expiración. Guardar en heladera en frascos color caramelo.

C. Preparación de la solución de KOH

Disolver los pellets de KOH en agua destilada y luego llevar el volumen final a 100 ml (trabajar sobre baño de agua fría para evitar recalentamiento). El reactivo es estable por 1 año. Rotular indicando fecha de preparación y de expiración.

III. Procedimiento

A. Con un ansa estéril tomar material e inocular un tubo de caldo RM/VP.
B. Incubar a 37ºC por un mínimo de 48 horas.
C. Transferir 2.5 ml de la suspensión a otro tubo.
D. Agregar 0.6 ml del reactivo de α-naftol.
E. Agregar 0.2 ml del reactivo de KOH.
F. Agitar el tubo y dejar descansar 10 a 15 minutos.
G. Observar la formación de un color rosado a rojo.

IV. Resultados

Ensayo positivo: desarrollo de color rojo dentro de los 15 minutos.
Ensayo negativo: no hay desarrollo de color.

V. Control de Calidad

Klebsiella pneumoniae –
Escherichia coli +

VI. Consideraciones

Cuando hay una incubación prolongada (más de 3 días) algunos organismos VP + pueden producir un aumento de la acidez del medio, dando reacciones positivas débiles o falsas reacciones negativas.

La mayoría de los miembros de la familia *Enterobacteriaceae* dan reacciones opuestas entre el rojo de metilo y VP, sin embargo algunos organismos como *Hafnia alvei* pueden dar ambas reacciones positivas.
Los reactivos se deben agregar en el orden indicado. Una inversión del orden puede dar un resultado positivo débil o un falso negativo.
No se debe agregar KOH en exceso, porque se puede enmascarar una reacción positiva débil por la formación de un color cobrizo por la reacción del KOH con el α-naftol. No leer el ensayo después de 1 hora; puede aparecer una coloración cobriza dando un resultado falso positivo.

Crecimiento en NaCl

I. Principio
Es una prueba que se usa para diferenciar distintas especies del género *Vibrio.*

II. Materiales
Peptona 20g
Agua destiladaCompletar a 100ml
Ajustar el pH a 8-8,2 con solución de NaOH al 30%
Agregar NaCl al 1, 6, 8 y 10% y fraccionar 3 ml en tubos de 13x100, con tapa a rosca, esterilizar 15 minutos a 121ºC.

III. Procedimiento
A) Hacer una suspensión del gérmen en un tubo de agua peptona sin NaCl.
B) Con esa suspensión, se siembran los tubos con 0,1,6,8,10% de NaCl

IV. Resultados
Ensayo positivo: desarrollo de turbidez por crecimiento
Ensayo negativo: ausencia de turbidez por falta de crecimiento

V. Control
Vibrio cholerae al 0% y 1% de NaCl +
Vibrio cholerae al 8 y 10% de NaCl -

VI. Consideraciones
No hay

SECCION IV. PROTOCOLOS PARA LA IDENTIFICACION Y CARACTERIZACION DE *Vibrio cholerae* POR PCR

1 - Fundamentos y variables de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

El fundamento de la técnica es imitar la replicación de ADN celular donde hay helicasas que producen la separación de las cadenas de ADN, seguida de una ARN polimerasa que sintetiza una secuencia corta de ARN o "primer". Luego, una ADN polimerasa reconoce estos oligonucleótidos y sintetiza las cadenas complementarias de ADN.

La técnica de PCR amplifica un fragmento de ADN, en forma exponencial, utilizando una enzima ADN polimerasa termoestable durante ciclos sucesivos donde se utiliza la desnaturalización por calor. El segmento de ácidos nucleicos amplificado es específico ya que sus extremos son reconocidos por oligonucleótidos sintéticos diseñados especialmente que se unen a secuencias complementarias en el extremo 5´ de cada hebra de ADN a amplificar (Persing D. 1993). Se utiliza como molde una muestra de ADN o ARN, que puede estar presente en un bajo número de copias.

A partir de la PCR se puede obtener distintos tipos de información, que básicamente se puede resumir en: 1) presencia o ausencia de las secuencias complementarias a los oligonucleótidos, y 2) distancia a la que se encuentran los cebadores o "primers" en el ADN templado.

Etapas de la PCR

En primer lugar, hay una etapa de desnaturalización inicial para separar las hebras de ADN, seguida de un número variable de ciclos de PCR que consiste en tres etapas:

- Desnaturalización: se produce la separación de las hebras de ADN por calentamiento a 92-96 ºC. El tiempo va a depender del tamaño del fragmento y el contenido de G+C.

- Hibridación o "annealing": los "primers" se unen a los sitios complementarios en el ADN simple cadena a la temperatura óptima de hibridación (Ta). Esta depende de la composición de bases, el largo y la concentración de los "primers". La Ta ideal se encuentra generalmente 5ºC por debajo de la verdadera temperatura de melting (Tm) de los "primers". La Tm es la temperatura a la cual el 50% de las cadenas primers-target se encuentra separadas en solución. El uso de una Ta

inapropiada modifica la especificidad y sensibilidad de la reacción. El tiempo de annealing afecta la especificidad de la hibridación.

- Polimerización: luego del "annealing" de los primers se produce la extensión por acción de la polimerasa. Comenzando a partir del "primer" la enzima lee la hebra de templado e incorpora los nucleótidos complementarios. Se utiliza una ADN polimerasa termoestable que no se desnaturaliza por la alta temperatura y cuya temperatura óptima de polimerización es 72ºC. El tiempo de extensión depende de la concentración y del tamaño del fragmento a amplificar.

El número de ciclos utilizados depende del grado de especificidad y del grado de amplificación que se desee obtener, aconsejándose entre 25 y 35 ciclos.

Al final de los ciclos se realiza una extensión final que le da tiempo a la polimerasa para terminar todos los fragmentos para obtener bandas más definidas.

En los primeros ciclos se sintetizan productos de diferentes longitudes, recién a partir del cuarto ciclo se van acumulando los productos específicos del tamaño esperado, cuya longitud estará comprendida entre los dos sitios de unión a los "primers". Después de 30 ciclos, donde en cada uno se duplica el número de moléculas de ADN, se obtienen del orden de 10^8 copias del ADN blanco. Hay que tener en cuenta que éste no es un proceso ilimitado ya que los reactivos utilizados en la reacción se agotan. Por otra parte, a medida que aumenta el número de copias del fragmento específico, es más frecuente el reannealing entre las cadenas complementarias del fragmento, que el annealing de los primers, por lo que también aumenta la hibridación no específica de éstos.

Los reactivos necesarios para realizar la PCR

- Buffer de enzima: Es necesario para la adecuada actividad enzimática. En general contiene Tris-HCl 20mM y 50mM KCl pH 8.3-8.9, aunque los fabricantes pueden modificar su composición para optimizar el rendimiento de la enzima. Lo importante es que se mantenga un pH alcalino a lo largo de la reacción ya que así se favorece la amplificación.
- Cloruro de Magnesio: es indispensable como cofactor de la enzima (Taq polimerasa) y afecta la hibridación entre cadenas de ADN tanto la interacción entre los "primers" y el templado como la estabilidad del ADN doble cadena. Por lo tanto, altas concentraciones disminuyen la

especificidad y sensibilidad de la reacción y bajas concentraciones disminuyen la eficiencia de la reacción. Los rangos de concentración utilizados son de 1 -3 mM según cada protocolo.

- Desoxirribonucléotidos trifosfato: dATP, dCTP, dGTP y dTTP. Deben ser agregados en iguales proporciones para minimizar falsas incorporaciones en la polimerización. Se debe ajustar la concentración para optimizar la especificidad y fidelidad de la reacción. Generalmente se utiliza una concentración de 200µM en el ensayo.
- Primers: preferentemente tienen entre 15 a 30 pb de longitud. No deben ser complementarios entre sí y deben tener similar contenido de G+C. No deben contener estructuras secundarias. Altas concentraciones disminuyen la especificidad de la reacción y bajas concentraciones la eficiencia de amplificación. El rango de concentración en el ensayo varía desde 0.3 a 1 µM.
- Enzima ADN polimerasa: Se utiliza normalmente Taq polimerasa aislada de una bacteria termófila *Thermus aquaticus*, cuya temperatura óptima de extensión es 72ºC. La enzima tiene una vida media de 40 minutos a 95ºC, de manera que puede soportar aproximadamente hasta 40 ciclos repetitivos de PCR. El rango habitual en cada ensayo es de 0.5 - 2.5 U de enzima. A baja concentración disminuye el rendimiento de la reacción y a altas concentraciones genera productos inespecíficos. En la preparación de la mezcla de reacción, la enzima debe agregarse al final.
- Seroalbúmina bovina: Solamente se utiliza cuando el ADN templado corresponde a muestras con inhibidores (como agua de río, plancton). Se utiliza en concentraciones variables entre 10 y 600 ng/µl y tiene la función de favorecer la actividad de la polimerasa, y por otro lado impedir que distintos tipos de compuestos inhiban la reacción de PCR, ya que tiene alta afinidad por compuestos fenólicos, proteínas y lípidos (Kreader, 1996).
- ADN blanco, la secuencia a amplificar debe contener desde < 0.1 a unas pocas kilobases. La cantidad total de ADN usado normalmente es de 0.05 a 1.0 µg. Lo que es realmente importante es la concentración molar del ADN, por lo que la cantidad a agregar depende del tamaño de las moléculas en el templado.
- Control negativo: se utiliza un tubo de reacción solo con reactivos, sin templado.

- Control positivo: se utiliza un templado de una cepa patrón o donde el perfil a amplificar sea conocido en ella.

Todos los reactivos deben ser conservados a -20ºC.

Precauciones a tener en cuenta en la realización de la PCR

Uno de los inconvenientes más importantes de esta técnica es la contaminación, ya sea de ADN proveniente del entorno, contaminación cruzada entre muestras de una misma reacción, o por el producto amplificado y contaminación por DNasas.

Existen medidas de control para minimizar estos inconvenientes, para ello es necesario contar con distintas áreas dentro del laboratorio:

a) Área de preparación de la mezcla de reacción (zona limpia)
b) Área de manipulación de muestras, cultivo y extracción del ADN (zona semisucia)
c) Área de amplificación y análisis del producto de la reacción (área contaminada)

En lo posible cada área debe tener dos entradas, circulación de aire para recontaminación de aerosoles y lámparas de luz UV. El movimiento de las muestras y del personal tiene que ser de un área libre de amplicones hacia áreas contaminadas con ellos y nunca en sentido contrario. Es necesario que los reactivos se almacenen en áreas libres de contaminación, fraccionados en pequeñas alícuotas, y preferentemente que sean reactivos grado Biología Molecular. Hay que utilizar material nuevo y descartable, y prevenir la contaminación por aerosoles usando tips con filtro. Por las mismas razones es importante asignar los juegos de pipetas para cada área, como también descontaminar frecuentemente las mesadas, pipetas y equipos.

Variantes de la PCR

- PCR simple: se utiliza un solo par de primers y se obtiene un único fragmento.

- PCR-Multiplex: en la misma reacción de amplificación se utiliza más de 1 par de primers específicos para diferentes secuencias blanco. La coamplificación de diferentes targets sirve para diferentes propósitos: escaneo de largas regiones de DNA, para incluir controles internos de amplificación, y principalmente para buscar simultáneamente diferentes patógenos o factores de virulencia presentes en la muestra de ADN. Esta variante tiene la ventaja de disminuir los costos y el tiempo de trabajo. Lo más crítico es optimizar la reacción tal que los diferentes fragmentos puedan ser amplificados en forma óptima en una sola reacción, principalmente los primers deben tener secuencias y Tm compatibles.

- Nested- Heminested: Se basa en amplificar con primers internos un fragmento ya amplificado para aumentar tanto la especificidad como la sensibilidad.

- RT-PCR: Se utiliza para amplificar secuencias de ARN.

Protocolo general de PCR

Se prepara la mezcla de reactivos descriptos anteriormente en la concentración óptima de cada uno, de acuerdo al número de muestras a analizar. Todos los reactivos deben permanecer en frío y mezclarse bien antes de dispensarlos. El procedimiento debe hacerse en un área limpia de amplicones o cabina de flujo laminar. Se realiza la mezcla añadiendo primero los reactivos de mayor volumen y por último la enzima Taq polimerasa. Una vez homogenizada la mezcla, se fracciona en tubos de PCR. En otra área, se añade el ADN templado en cada tubo y luego se introducen en el termociclador. Es importante mantener los tubos en frío hasta el momento de introducirlos en el ciclador.

2 - Extracción de ADN bacteriano

Para realizar PCR es necesario contar con una muestra que contenga el ADN libre en solución, lo menos degradado posible, y con la menor cantidad de inhibidores de la amplificación.
Al partir de un aislamiento o cultivo puro, el ADN bacteriano se encuentra en altas concentraciones, y por lo tanto obtener ADN apto para PCR es sencillo, se deben lisar las células y separar el ADN, que es soluble en agua, de los detritos celulares.

Cuando el objetivo es estudiar bacterias presentes en muestras más complejas, como por ejemplo alimentos, materia fecal, sangre y muestras ambientales, la concentración de microorganismos es mucho menor, y por lo tanto la separación de ADN de interés mucho más compleja. Cuando se quieren estudiar microorganismos que son cultivables, la estrategia más simple es diluir la muestra en un medio de enriquecimiento (selectivo o no, de acuerdo al objetivo de la PCR) e incubar en las condiciones adecuadas para aumentar la concentración de las bacterias que se desea estudiar, y luego proceder a la lisis celular.

Pero existen casos en los que no se puede adoptar esta metodología: cuando los microorganismos no son cultivables; cuando se quiere estudiar la totalidad la comunidad microbiana, cuando el

enriquecimiento no es posible para el microorganismo de interés. En estos casos, se debe extraer la totalidad del ADN bacteriano desde la muestra en estudio.

Básicamente toda extracción de ADN se puede separar en dos estrategias: purificar las células y luego extraer el ADN, o realizar una lisis dentro de la matriz y luego realizar la purificación del ADN. Esta última opción es la que permite la mayor recuperación, pero a su vez el templado tiene una mayor concentración de inhibidores (Miller, 1999).
Para extraer el ADN total se pueden adoptar alguna o varias de las siguientes alternativas:

- disrupción física: uso de morteros, homogenizadores, sonicadores, perlas de vidrio, congelado - descongelado y hervido. Todas estas alternativas sirven para la lisis celular.
- lisis química:
  - uso de detergentes como SDS, laurel sarcosina, tritón X-100 para la romper la pared celular
  - uso de sales como NaCl para aumentar la osmolaridad
  - buffers Tris-ClH y PBS, y para mantener el pH entre 7 y 8.
  - NaOH
- lisis enzimática: proteinasa K, lisozima, pronasa E y acromopeptidasa para lisis de la pared celular y degradación de proteínas.
- extracción con solventes orgánicos: El uso de fenol – cloroformo- alcohol isoamílico o cloroformo-isoamílico sirve para separar las proteínas presentes en la muestras, para remover las enzimas utilizadas durante la extracción.
- purificación del ADN con resinas o reactivos que tienen afinidad por el ADN o los componentes contaminantes: columnas de sílica, sephadex, sepharosa, resinas chelex, CTAB y otras alternativas comerciales.
- precipitación del ADN con un alcohol: etanol o isopropanol.

No es necesario que la muestra conteniendo la secuencia a amplificar esté altamente purificada, aunque ciertas impurezas presentes en la muestra como ácidos húmicos, polifenoles, heparina, grupo hemo, Mg^{2+}, agentes quelantes, detergentes y metales pesados como el hierro inhiben la reacción de PCR.

Extracción de ADN a partir de un aislamiento bacteriano

Para la extracción rápida de ADN de *V. cholerae*, se toma a partir de un aislamiento en una placa de TSA, 3-4 colonias y se prepara una suspensión de 500 ul en agua de calidad molecular en un microtubo de 1.5 ml. Esta suspensión es sometida a 100ºC durante 10 min. Se deja enfriar y se realiza una breve centrifugación para precipitar los detritos celulares. Luego se trasvasa el sobrenadante donde se encuentra el ADN a un nuevo microtubo, y este se utiliza como templado de la reacción de PCR. Los templados así preparados pueden conservarse a -20ºC. El mismo procedimiento debe realizarse con las cepas de referencia a utilizar como controles positivos.

Si se quiere estandarizar el inóculo, se leerá la densidad óptica de la solución a 620nm y se ajustará a una DO= 0.3 para 500ul.

Los cálculos se realizan: DOi x Vi = DOf x Vf

Entonces: DOleída x Vi = 0.3 x 500 ul.

3 - Protocolos de procedimiento para la detección de los genes específicos de especie, serogrupos O1 y O139, y genes de virulencia de *V. cholerae*

Las cepas utilizadas como controles positivos para las reacciones de PCR de *Vibrio cholerae* son: *V. cholerae* O1 Classical O425 (*ctxAB*$^{+}$), *V. cholerae* O139 RC138, *V. cholerae* no-O1 83-7771 (NAG-ST^{+}).

Se presentan en la tabla 1 las secuencias de los primers utilizadas en las diferentes reacciones de PCR:

Tabla 1: PRIMERS O CEBADORES

primers	Secuencia de primers (5´- 3´)	Amplicon (pb)	Referencia
VCO1-F2	5´ - CAACAGAATAGACTCAAGAA - 3´	647 (O1)	**O1/O139**
VCO1-R2	5´ - TATCTTCTGATACTTTTCTAC - 3´		(Multiplex PCR -
VCO139-F2	5´- TTACCAGTCTACATTGCC - 3´	741 (O139)	Rivera et al, 2003)
VCO139-R2	5´- CGTTTCGGTAGTTTTTCTGG - 3´		
pVC-F2	5´- TTAAGCSTTTTCRCTGAGAATG - 3´	300	**VC 16S-23S** rRNA
pVCm-R1	5´- AGTCACTTAACCATACAACCCG - 3´		(Chun et al, 1999)
CT 94F	5´- CGCGCAGATTCTAGACCTCCTG - 3´	564	***ctxA***
CT 614R	5´- CGATGATCTTGGAGCATTCCCAC - 3´		
TCP 72F	5´- CACGATAAGAAAACCGGTCAAGAG - 3´	451	***tcpA*** El Tor
TCP 477R	5´- CGAAAGCACCTTCTTTCACGTTG - 3´		(Rivera et al, 2003)
stn/o 67F	5´ -TCGCATTTAGCCAAACAGTAGAAA - 3´	172	***stn/o***
stn/o 194F	5´- GCTGGATTGCAACATATTTCGC -3´		(Rivera et al, 2001)
rtxA-F	5´- CTGAATATGAGTGGGTGACTTACG -3´	417	***rtxA***
		(Chow et al,	
rtxA-R	5´- GTGTATTGTTCGATATCCGCTACG -3´	2001)	
*tcpI*132-F	5´- TAGCCTTAGTTCTCAGCAGGCA -3´	862	***tcpI***
*tcpI*951-R	5´- GGCAATAGTGTCGAGCTCGTTA -3´		(Rivera et al, 2001)

3.1- Identificación y caracterización por PCR de *V. cholerae*: especie *V. cholerae* / toxina de cólera (CT)/ factor de colonización (TCP).

El fragmento específico para *Vibrio cholerae* pertenece a una región del operón rRNA, de las regiones espaciadoras intergénicas (IRSs) localizadas entre 16S y 23S del rDNA (Chun et al, 1999). Para detectar la presencia de la toxina CT se amplifica un fragmento del gen *ctxA* que codifica para la subunidad A de la toxina. Por otro lado se amplifica un fragmento del gen *tcpA* que codifica para la proteína efectora (subunidad del pili) específico del Biotipo El Tor, ya que esta proteína es polimórfica.

Tabla 2. PCR- Multiplex *V. cholerae* / *ctxA* / *tcpA*

Reactivos	Volumen (µl)	Concentración
H_2O	9,3	
Buffer Tris-HCl 10X	2,5	1 X
Cl_2Mg 50mM	1	2 Mm
dNTP (mix) 2.5 mM	2	0.2mM
primer VC-F2 10uM	2	0.8 µM
primer VC-mR1 10uM	2	0.8 µM
primer CT 94-F 10uM	1	0.4 µM
primer CT 614-R 10 uM	1	0.4 µM
primer TCP 72-F	1	0.4 µM
primer TCP 477-R	1	0.4 µM
Taq DNA polimerasa 5U/µl	0,2	1 U
ADN	2	
Vol Final (µl)	25	

Condiciones de ciclado			
Etapa 1	94ºC	2 min	
Etapa 2	94ºC	45 seg	30 ciclos
Etapa 3	60ºC	45 seg	
Etapa 4	72ºC	45 seg	
Etapa 5	72ºC	10 min	
Etapa 6	14 ºC		

Gel de agarosa al 2 %		
Tamaño de fragmento	**300 pb**	Vc-m (16S-23S)
Esperado	**451 pb**	*tcpA* ElTor
	564 pb	*ctxA*

3.2- Identificación de *V. cholerae* O1 y O139.

La biosíntesis del antígeno O en *V. cholerae* es controlado por los genes del locus *rfb*, de 22 kb para O1 y 35 kb para O139. La diferencia de secuencia de ADN entre los serogrupos está dada por una región específica para O139 de 13 kb., tal que con el uso de primers específicos se pueden definir claramente los diferentes serogrupos. Se implementó la reacción de PCR-multiplex para la determinación de los serogrupos O1 y O139 (Rivera et al, 2003).

Tabla 3. PCR- Multiplex O1/O139

Reactivos	Volumen (µl)	Concentración
H_2O dest.	13,6	
Buffer Tris-HCl-10X	2,5	1 X
Cl_2Mg 50mM	0,75	1.5 mM
dNTP (mix) 2.5 mM	2	0.2mM
primer VCO1-F2	1	0.4 µM
primer VCO1-R2	1	0.4 µM
primer VCO139-F2	1	0.4 µM
primer VCO139-R2	1	0.4 µM
Taq DNA polimerasa 5U/µl	0,15	0.75 U
ADN	2	
Vol Final (µl)	25	

Condiciones de ciclado			
Etapa 1	94ºC	2 min	
Etapa 2	94ºC	1 min	30 ciclos
Etapa 3	52ºC	1 min	
Etapa 4	72ºC	90 seg	
Etapa 5	72ºC	10 min	

Gel de agarosa al 2 %		
Tamaño de fragmento	**647 pb**	O1
esperado	**741 pb**	O139

3.3- Identificación por PCR Multiplex de dos factores de virulencia: toxina termoestable ST y toxina formadora de poros RTX.

Tabla 4. PCR- Multiplex para detección de los genes *stn/o y rtxA*

Reactivos	**Volumen (µl)**	**Concentración**
H_2O	8,55	
Buffer Tris-HCl-10X	2,5	1 X
Cl_2Mg 50mM	0,75	1.5mM
dNTP (mix) 2.5 mM	2	0.2mM
primer *stn/o* 67-F	2,5	1 µM
primer *stn/o* 194 -R	2,5	1 µM
primer *rtxA*-F	2	0.8 µM
primer *rtxA*-R	2	0.8 µM
Taq DNA polimerasa 5U/µl	0,2	1U
ADN	2	
Vol Final (µl)	25	
Condiciones de ciclado		
Etapa 1	94ºC	2 min
Etapa 2	94ºC	45 seg } 30 ciclos
Etapa 3	55ºC	45 seg } 30 ciclos
Etapa 4	72ºC	45 seg } 30 ciclos
Etapa 5	72ºC	10 min
Gel de agarosa al 1.5 %		
Tamaño de fragmento	**172pb**	*stn/o*
esperado	**417pb**	*rtxA*

3.4- Identificación por PCR del gen regulador *tcpI*

Dentro del operón que lleva los genes para la síntesis de TCP, el gen regulador *tcpI* está sometido a menor presión de selección que el gen estructural *tcpA*, por lo que tiene una variabilidad mucho menor. La detección de este gen es de especial utilidad como indicador de la presencia de TCP en cepas que tienen variantes del gen *tcpA* diferentes al alelo “EL Tor”.

Tabla 5. PCR para detección del gen *tcpI*

Reactivos	Volumen (µl)	Concentración
H_2O dest.	13,63	
Buffer Tris-HCl-10X	2,5	1 X
Cl_2Mg 50mM	0,75	1.5 mM
dNTP (mix) 2.5 mM	2	0.2mM
primer *tcpI* 132-F	2	0.8 µM
primer *tcpI* 951-R	2	0.8 µM
Taq DNA polimerasa 5U/µl	0,125	0.6U
ADN	2	
Vol Final (µl)	25	
Condiciones de ciclado		
Etapa 1	94ºC	2 min
Etapa 2	94ºC	1 min } 30 ciclos
Etapa 3	60ºC	1 min } 30 ciclos
Etapa 4	72ºC	2 min } 30 ciclos
Etapa 5	72ºC	10 min
Gel de agarosa al 1.5 %		
Tamaño de fragmento esperado	**862pb**	*tcpI*

4- Detección de los productos de PCR

- Preparación del gel de agarosa

Se pesa la agarosa según el porcentaje y el tamaño del gel que se desea preparar, se agrega el volumen de buffer TAE correspondiente y se funde en el horno microondas a 40% de potencia. La concentración de agarosa (0.7-2%) se calcula en función del tamaño de los fragmentos, tal que para fragmentos de bajo peso molecular se empleará la mayor concentración y viceversa. (En las tablas 2 a 8 se especifica la concentración adecuada para cada corrida electroforética). La agarosa fundida se coloca en el soporte armado con su peine, que es retirado una vez solidificado el gel.

- Electroforesis

Una vez solidificado el gel, se coloca en la cuba electroforética que contiene suficiente cantidad de buffer TAE 1X de tal modo que el gel quede cubierto. Se mezcla el buffer de siembra con la muestra en una proporción de 1 parte y 5 partes respectivamente, y se cargan 10-20µl de cada dilución por pocillo. Se siembra también el marcador de peso molecular. A la par de las muestras, se siembran el control positivo y el control negativo. Se conecta la cuba a la fuente de poder teniendo la precaución de que la línea de siembra se encuentre en el polo negativo ya que las moléculas de ADN migran hacia el polo positivo. Las condiciones de la corrida electroforética recomendadas para las PCRs descriptas son 100 voltios durante 30 minutos.

- Tinción del gel

Finalizada la corrida electroforética se procede a la tinción del gel en una solución de bromuro de etidio en una concentración de 1µg/ml durante 30 minutos. Luego se enjuaga el gel en agua destilada.

Precaución: el bromuro de etidio es un reactivo cancerígeno por lo cual debe manipularse con extremo cuidado y el operador debe estar protegido con guantes.

- Observación de los fragmentos

El gel teñido es colocado en el transiluminador de UV que permite la visualización de las bandas de las diferentes muestras. Comparando la distancia recorrida de los fragmentos obtenidos de las muestras con el marcador de peso molecular se puede estimar el tamaño de los fragmentos. Para documentar esta reacción puede obtenerse una fotografía.

5.- Referencias

- Binsztein N., Costagliola M., Pichel M., Jurquiza V., Ramírez, F., Akselman, R., Vacchino M., Huq A. and Colwell R. 2004. Viable but nonculturable *Vibrio cholerae* O1 in the aquatic environment of Argentina. Appl. Environ. Microbiol. 70: 7481-7486.
- Chun J., Huq A. Colwell R. 1999. Analysis of 16S-23S rRNA Intergenic Spacer Regions of Vibrio *cholerae* and *Vibrio mimicus*. App. Environ. Microbiol. 65: 2202-2208.
- Chow IK., Yuen K. and Yam W. 2001. Detection of RTX Toxin Gene in Vibrio *cholerae* by PCR. J. Clin. Microbiol. 39: 2594-2597.
- Colwell R. Global climate and infectious disease: the cholera paradigm. Science, 1996, 274: 2025-2031.
- Colwell RR, Grimes J. Semantics and strategies. Non-culturable microorganisms in the environment. Ed. Colwell RR and Grimes J, American Society for Microbiology Press, Washington D. C., 2000: p 1-6.
- Colwell RR, Huq A. Vibrios in the environment: viable but nonculturable *Vibrio cholerae.* En *Vibrio cholerae* and cholera: molecular to global perspectives. Ed. Wachsmuth K, Blake P, and Olsvik O. American Society for Microbiology Press, Washington D. C., 1994, p: 117-133.
- Costagliola M., Malaspina A., Guerrero R., Ma D., Odizzio M., Abelenda A., De Kereki C. Estudio de la presencia de *Vibrio cholerae* en la Zona Común de Pesca Argentina-Uruguaya. Periodo 1992-1996. Frente Marítimo, 2000; 18: 53-58.
- De SN. Enterotoxocity of bacteria-free culture-filtrate of *Vibrio cholerae*. Nature (London), 1959; 183: 1533-1534.
- Faruque S., Albert J. and Mekalanos J. Epidemiology, Genetics, and Ecology of Toxigenic *Vibrio cholerae*. Microbiol. Mol. Biol. Rev., 1998; 62: 1301-1314.
- Forte L., Thorne P., Eber S. Stimulation of intestinal Cl^- transport by heat stable enterotoxin activation of cAMP-dependent protein kinase by cGMP. Am. J. Phisiol., 1992; 263: 607-615.
- Fullner K. and Mekalanos J. Vivo covalent cross-linking of cellular actin by the *Vibrio cholerae* RTX toxin. EMBO J., 2000; 19: 5315-5323.
- Guglielmetti P, Bravo L., Zanchi A., Montè R., Lombardi G. and Rossolini G.Detection of *Vibrio cholerae* heat-stable enterotoxin gen by polymerase chain reaction. Mol Cell. Probes, 1994; 8: 101-106.
- Heidelberg J. et al. DNA sequence of both chromosomes of the cholera pathogen *Vibrio cholerae*. Nature, 2000; 406: 477-483.

- Kaper J. B., Morris J. G. Jr. Levine M. M. Cholera. Clin. Microbiol. Rev., 1995, 8: 48-86
- Karaolis D. And Kaper J. Pathogenecity Islands and Other Mobile Virulence Elements of *Vibrio Cholerae*. Ed. Kaper J and Hacker J. Washington, 1999; Cap 9: 167-188.
- Kreader A. C. 1996. Relief of amplification inhibition in PCR with bovine albumin or T4 gene 32 protein. App. Environ. Microbiol. 62: 1102-1106
- Levine M., Kaper J. B., Herrington D., Losonsky G., Morris J.G., Clements M. L., Black R. E., Tall B. and Hall R. Volunteer studies of deletion mutants of Vibrio cholerae O1 prepared by recombinant techniques. Infect. Immun. 1988, 56: 161-67
- Levine M., South America: the return of cholerae, Lancet, 1991; 338: 45-46.
- Miller D. N., Bryant J.E., Madsen E.L., Ghiorse, W. C. 1999. Evaluation and optimization of DNA extraction and purification procedures for soil and sediment samples. App. Environ. Microbiol. 65: 4715 – 4724.
- Nandi B., Nandy R., Vicente A., and Ghose A. Molecular Characterization of a new variant of toxin-coregulated pilus protein (TcpA) in a toxigenic Non-O1/ Non-O139 Strain of *Vibrio cholerae.* Infect. Immun., 2000, 68: 948-952.
- Persing D., Smith T., Tenover F. and White T. En Diagnostic Molecular Microbiology. Principles and Applications.Ed., 1993. Part I ; 51-104.
- Pichel M, Rivas M, Martin F, Ibarra C Binsztein N. Genetic diversity and emergence of a new variant of *Vibrio cholerae* O1 isolated in Argentina. J Clin Microbiol, 2003; 41:124-134.
- Rivera I.,Chun J.,Huq A.,Sack R, and Colwell R. Genotypes Associated with Virulence in Environmental Isolates of *Vibrio cholerae.* App. Environm. Microbiol., 2001; 67: 2421-2429.
- Rivera I., Lipp E., Gil A., Choopun N., Huq A., and Colwell R. Method for extraction and application of Multiplex PCR to detect Toxigenic *V, cholerae* O1 and O139 from aquatic ecosystems. Environm. Microbiol., 2003; 5: 599-606.
- Sanyal S. Epidemiology and Pathogenicity of Non-O1 Vibrio Species and related Organisms. Current Topics in Infectious Disease. Cholera. Ed. Barua D., Grwwnough III W.,N York 1992; Cap 3 : 57-67.
- Shangkuan Y., Show Y., and Wang T. Multiplex polymerase chain reaction to detect toxigenic *V. cholerae* and to biotype *V. cholerae* O1.J. Appl. Bacteriol., 1995; 79: 264-273.
- Tamplin M., Carrillo P. Environmental spread of *Vibrio cholerae* in Perú. Lancet, 1991; 338:1216-17.

- Taylor R.K., Miller V.L., Furlong D.B., Mekalanos J.J. 1987. Use of phoA gene fusions to identify a pilus colonization factor co-ordinately regulated with cholera toxin. Proc. Natl. Acad. Sci. USA; 84: 2833-2837.
- Torres Codeço C. Endemic and epidemic dynamics of cholera: the role of aquatic reservoir. BMC Infec. 2001; Dis.1: 1
- Vicente A., Cohelo A and Salles C. Detection of *Vibrio cholerae* and *Vibrio mimicus* heat-stable toxin gene sequence by PCR. 1997; 46: 398-402.
- Waldor M.K. Mekalanos. Lysogenic conversion by a filamentous phage encoding cholera toxin. Science 1996, 272: 1910- 1914
- *Yamai S., Okitsu T., Shimada T. Katsube Y. Distribution of serogroups of* Vibrio cholerae *non -O1 non- O139 with specific reference to their ability to produce cholera toxin, and addition of novel serogroups. Jpn. J. Assoc. Infect. Dis.,1997; 71:1037-1045.*
- Zizter A., Palmer M., Weller U., Wassenaar T., Biermann C. Mode of primary binding to target membranes and pore forming Vibrio cholerae cytolisin (hemolysin). Eur. J. Biochem, 1997;247: 209-216.

Anexo NºIII

Preparación de Soluciones y listado de materiales e insumos para extracción de ADN y PCR

- **Buffer SET (Sacarosa, EDTA y Tris-ClH)**
  Preparado con 20% de sacarosa, 50 mM de EDTA y 50 mM de Tris-ClH pH 8.

- **Solución stock de Tris-ClH 1M, pH 8.0**
  Pesar 121.1g de Tris base y disolver en 800 ml de agua tridestilada. El pH debe ser ajustado con adición de ácido clorhídrico para pH 8.0 y completar el volumen ajustado a 1L de agua destilada.

- **Solución stock de EDTA 0.5M, pH 8.0**
  Pesar 186.1g de sal sódica de EDTA y disolverlo en 800 ml de agua tridestilada con ayuda de un agitador magnético. El pH debe ser ajustado con NaOH 10N, y finalmente el volumen completado a 1 L.

- **Solución stock de NaCl 5M**
  Disolver 292.2 g de NaCl en 1000 ml de agua destilada con ayuda de un agitador mágnetico y placa caliente.

- **Solución de Lisozima**
  Concentración de 5 mg/ml en 10mM TrisClH, pH 8.0, 1 mM EDTA y 10 mM NaCl.

- **Proteinasa K**
  Concentración de 20 mg/ml en agua tridestilada

- **Solución de Bromuro de Hexadeciltrimetilamonio (CTAB 10%)**
  Pesar 4.1g de NaCl en 80 ml de agua tridestilada, y agregar 10 g de CTAB. Disolver con agitación y calor. Ajustar a 100 ml.

- **Buffer Tris-Acetato (TAE) 50X**
  Para 250 ml pesar 60.5 g Tris base y disolver por agitación en 150 ml de agua tridestilada. Adicionar 14.2 ml de ácido acético glacial y 25 ml de una solución 0.5M EDTA pH 8.0. Agregar agua tridestilada hasta completar 250 ml. Homogenizar y autoclavar. Se conserva a temperatura ambiente

- **Buffer de Siembra 6X**
  Xileno cianol ó Azul de bromofenol 0.25% (P/V)
  Glicerol 30% (V/V)
  Agua destilada estéril. Conservar a 4ºC

- **Solución de bromuro de etidio**
  A partir de una solución stock de 10 mg/ml se realiza una dilución 1/10,000 para obtener una concentración final de 1µg/ml.
  Para 1 litro se agregan 100µl de la solución stock. Esta solución se conserva a temperatura ambiente a resguardo de la luz.

- **Decontaminación de la solución de bromuro de etidio**
  Para decontaminar la solución se agregan 200 mg de carbón activado cada 100 ml de solución de bromuro de etidio. Dejar 24 hs a temperatura ambiente con agitación intermitente. Filtrar con papel de filtro Whatman Nº 1 y descartar el filtrado y eliminar el filtro y el carbón remanente en envases para residuos patológicos.

Insumos necesarios para extracciones de ADN y PCR

Material y equipamiento para extracción de ADN a partir de un aislamiento bacteriano

- Reactivos

- Agar tripticasa soja
- Agua Calidad Biología Molecular estéril

- Insumos descartables

- Placas de Petri
- Cubetas para espectrofotómetro
- Tips estériles (200 y 1000 µl)
- Microtubos nuevos y estériles de 1.5 ml
- Hisopos, escarbadientes o ansas plásticas estériles.
- Guantes de látex

- Equipos

- Micropipetas de 1000µl
- Estufa de 37ºC
- Espectrofotómetro
- Bloque Térmico o baño a 100ºC
- Microcentrífuga
- Pipetas para 100ul y 1000ul (común de la mesada)
- Mechero

Material y equipamiento para extracción de ADN a partir de muestras de agua y plancton

- Reactivos

- Agua Calidad Biología Molecular estéril
- Buffer SET
- Lisozima
- SDS 10%
- Proteinasa K 20 mg/ml
- NaCl 5M
- CTAB-NaCl 10%
- Fenol-Cloroformo-Isoamílico
- Cloroformo
- Alcohol Isoamílico
- Isopropanol
- Etanol 70%

- Insumos descartables

- Congeladora con hielo
- Tips amarillos y azules estériles
- Tubos falcon 15 ml de polipropileno con tapa a rosca
- Tubos de vidrio 13x100 para precipitar DNA
- Microtubos de 2 ml (resistentes) estériles para centrífuga
- Pipetas Pasteur estériles 3ml
- Papel absorbente
- Guantes de látex

- Equipos

- Centrífuga refrigerada para tubos de 15 ml
- Microcentrífuga
- Pipetas 0.5-10, 5-40 40-200 y P1000
- Homogenizadores (1)
- Gradilla para homogenizadores
- Gradillas
- 2 Baños con agitación (37ºC y 65ºC)
- Vortex
- Cámara de extracción de químicos
- Cámara de vacío/ desecador
- Espectrofotómetro
- Cubeta de cuarzo
- Heladera y freezer
- Pipetas de vidrio de 10ml (varias) y 2 de 25ml estériles
- Recipientes de vidrio para descartar pipetas

4. Reactivos para PCR

- Reactivos

- Agua Calidad Biología Molecular estéril
- Buffer de la enzima, incluido en el equipo comercial de la enzima
- Cloruro de magnesio, incluido en el equipo comercial de la enzima
- Primers o cebadores: Se reconstituyen con agua tridestilada o buffer TE (Tris-EDTA) según la recomendación del fabricante para obtener una concentración de 100 µM. Se realiza una dilución 1/10 para obtener la solución de trabajo (10 µM).
- Desoxirribonucleótidos trifosfato (dNTPs). Se prepara una mezcla de los cuatro dNTPs juntos en concentración final de 2.5mM para cada uno.
- Enzima polimerasa termoestable (Taq DNA polimerasa) de origen comercial
- Seroalbúmina bovina (BSA). Se prepara una solución 5 mg/ml que se esteriliza por filtración.
- Muestra: ADN templado

- Insumos descartables

- Microtubos nuevos y estériles de 1.5 ml.
- Tubos para reacción de PCR de 0.2 ml nuevos, libres de DNasas.
- Tips de barrera ART (aerosol resistant tips)
- Bloque térmico refrigerado o hielo
- Guantes de látex

- Equipos

- Termociclador
- Cabina de bioseguridad (área limpia)
- Micropipetas (10 µl, 100µl, 200µl y 1000µl)
- Pipeta para cargar ADN 10 ul

5 - Detección de los productos de PCR

- Reactivos

- Agarosa
- Buffer TAE 1 X
- Buffer de siembra 6X (xilene-cyanol o azul de bromofenol)
- Marcador de peso molecular de 100pb.
- Bromuro de etidio

- Agua destilada

- Insumos descartables

- Probetas de 50 y 1000 ml
- Erlenmeyers
- Tips

- Equipos

- Micropipetas de 20µl
- Balanza
- Horno microondas o equivalente
- Cubas electroforéticas y accesorios
- Fuente de poder
- Transiluminador UV
- Cámara fotográfica