



ESTANDARIZACIÓN DE UNA PRUEBA DE PCR-RFLP PARA LA IDENTIFICACIÓN DE *Rhodococcus rhodnii* EN INSECTOS TRIATOMINOS

STANDARDIZATION OF A PCR-RFLP TEST FOR IDENTIFICATION OF *Rhodococcus rhodnii* IN TRITOMINE BUGS

J. Rodríguez¹, P. Pavía¹, C. Calderón¹, M. Montilla², R. S. Nicholls², C. J. Puerta¹.

¹ Laboratorio de Parasitología Molecular, Departamento de Microbiología, Facultad de Ciencias, Pontificia Universidad Javeriana. Carrera 7 # 43-82. Bogotá, Colombia.

² Laboratorio de Parasitología, Investigación, Instituto Nacional de Salud, Bogotá, Colombia. cpuerta@javeriana.edu.co

Resumen

Los triatominos son insectos de importancia en salud pública ya que transmiten el parásito *Trypanosoma cruzi*, agente causal de la enfermedad de Chagas. Estos insectos en su flora intestinal contienen bacterias del género *Rhodococcus*, las cuales establecen una relación simbiótica con el triatomino aportándole suplementos nutritivos necesarios para su normal desarrollo y crecimiento. El estudio de estas bacterias tiene gran interés debido tanto a la posibilidad de diseñar estrategias de control paratransgénico, como a las implicaciones de las interacciones que estas bacterias puedan desarrollar con los parásitos dentro del insecto. Dada la dificultad para identificar las bacterias del género *Rhodococcus* por pruebas tradicionales, en este trabajo se estandarizó una prueba de reacción en cadena de la polimerasa (PCR), seguida de un ensayo de longitud de polimorfismo de fragmentos de restricción para la identificación de *Rhodococcus rhodnii* aislado de *Rhodnius prolixus*. Para ello, se amplificó el gen codificante para el ARN 16 S ribosomal bacteriano y los productos obtenidos fueron secuenciados y sometidos a digestión con diversas enzimas de restricción. Los resultados demuestran la aplicabilidad de la prueba de PCR-RFLP para la identificación de *R. rhodnii* al encontrarse una total correspondencia en el número y tamaño de los fragmentos de restricción obtenidos *in vitro* e *in silico*.

Palabras clave: bacterias simbiotas, enfermedad de Chagas, insectos triatominos, *Rhodococcus rhodnii*, *Rhodnius prolixus*.

Abstract

Triatomines are insects of great importance for public health because they transmit the parasite *Trypanosoma cruzi*, etiological agent of Chagas disease. These insects harbour intestinal symbiotic flora from the *Rhodococcus* genus, which provide the nutrients lacking in the insect diet, nutrients which are essential for normal insect development and growth. Study of these bacteria is of special interest due to the possibility of designing paratransgenesis control strategies as well as for implications that interactions between these bacteria and parasites can develop inside triatomine insects. Taking into account the difficulty in identifying bacteria from the *Rhodococcus* genus by traditional methods, in this work a polymerase chain reaction (PCR) followed by a restriction fragment length polymorphism analysis was standardized to identify *Rhodococcus rhodnii* isolated from *Rhodnius prolixus*. Gene coding for bacterial 16 S rRNA was amplified and obtained products were sequenced and digested with several restriction enzymes. Results show a total correlation between number and size of the restriction fragments obtained *in vitro* and *in silico* as well. Therefore, applicability of this PCR-RFLP assay for *R. rhodnii* identification has been demonstrated.

Key Words: Chagas disease, *Rhodococcus rhodnii*, *Rhodnius prolixus*, symbiont bacteria, triatomine insects.

INTRODUCCIÓN

Los triatomíneos son insectos hematófagos pertenecientes a las tribus Rhodnini y Triatomini, las cuales se ubican dentro de la familia Reduviidae, orden Hemiptera. La importancia de estos insectos radica en que son los vectores de *Trypanosoma cruzi*, el agente etiológico de la enfermedad de Chagas, así como también de *Trypanosoma rangeli*, parásito que, aun cuando carece de patogenicidad para el hombre, es de importancia médica por cuanto comparte huéspedes, reservorios y vectores con *T. cruzi* y ambos tripanosomas presentan reacción inmunológica cruzada (Guhl y Vallejo, 2003; D'Alessandro y Saravia, 1992; 1999; D'Alessandro, 1976).

En Colombia, se han detectado 23 especies naturales vectoras de *T. cruzi*, siendo las especies vectoriales de mayor importancia en el domicilio y peridomicilio en orden descendente *Rhodnius prolixus*, *Triatoma dimidiata*, *Triatoma maculata* y *Triatoma venosa* y en el área silvestre y peridomiciliar *Rhodnius pallescens* y *Rhodnius colombiensis*, entre otros (Guhl *et al.*, 2003; Jaramillo *et al.*, 2001). Por su parte, los insectos triatomíneos de los géneros *R. prolixus*, *R. pallescens*, *R. ecuadoriensis*, *Rhodnius dallesandroi*, *Rhodnius pictipes*, *Rhodnius robustus* y más recientemente *R. colombiensis*, han sido reportados como vectores naturales de *T. rangeli* (Guhl y Vallejo, 2003; D'Alessandro y Saravia, 1992; 1999; D'Alessandro, 1976).

Por otra parte, dado que los triatomíneos tienen una dieta restringida, éstos poseen en su intestino la presencia de bacterias simbiotes extracelulares, las cuales le aportan vitaminas y otros nutrientes que son esenciales para el desarrollo y normal crecimiento del insecto (Eichler y Schaub, 2002).

Es así como se ha reportado la presencia de las bacterias *Rhodococcus rhodnii*, *Nocardia spp.*, *Gordonia spp.* y *Rhodococcus equi*-“like” como simbiotes de los insectos vectores *R. prolixus*, *Triatoma infestans*, *Triatoma sordida* y *Panstrongylus megistus*, respectivamente. Estas bacterias son adquiridas por el vector mediante coprofagia en el primer estadio ninfal de desarrollo (Eichler y Schaub, 2002).

El estudio de estas bacterias simbiotes, aparte del conocimiento básico que aporta, reviste importancia desde varios puntos de vista. El primero de ellos se relaciona con la utilización de los simbiotes de vectores de circulación domiciliar y peridomiciliar, como vehículos para el control de la enfermedad transmitida por los mismos. Lo anterior se logra mediante la creación de bacterias recombinantes que expresan productos que controlan el desarrollo del parásito dentro del vector, de manera que las bacterias son transformadas con genes tales como los codificantes para péptidos antimicrobianos, como las cecropinas, y posteriormente son tomadas por los insectos a través de su alimentación. En este sentido, los trabajos se han centrado en el uso de *R. rhodnii*, la bacteria simbiote de *R. prolixus* (Aksoy y Rio, 2005; Dotson *et al.*, 2003; Aksoy, 2003; Beard *et al.*; 2002; 2001; 1998; 1993; 1992; Durvasula *et al.*, 1999; 1997). También, las interacciones que estas bacterias puedan desarrollar con los parásitos dentro del insecto y las implicaciones de las mismas en la transmisión de la enfermedad, son de especial interés dados los reportes sobre la influencia de la microbiota del vector en el ciclo de vida de los parásitos (Azambuja *et al.*, 2005). Por ejemplo, bacterias Gram negativas como *Serratia marcescens* y *Pseudomonas aeruginosa*, presentes en el intestino de los triatomíneos, son capaces de producir factores tripanolíticos como la prodigiosita (Azambuja *et al.*, 2004).

Por último, dada la dificultad que presentan algunas especies de triatominos para su correcta identificación y diferenciación (Monteiro *et al.*, 2003), el hallazgo de su simbionte puede constituir una forma indirecta de identificación de los mismos así como también puede aportar herramientas para el estudio de su filogenia.

Teniendo en cuenta que la mayoría de los simbiontes de triatominos hasta ahora descritos pertenecen al género *Rhodococcus*, familia *Nocardiaceae* (Stackebrandt, 1988) y dada la dificultad para identificar estas bacterias por pruebas bioquímicas tradicionales, el objetivo de este trabajo fue estandarizar una prueba de reacción en cadena de la polimerasa, seguida de un ensayo de longitud de polimorfismo de fragmentos de restricción (PCR-RFLP), basada en los genes codificantes para el ARN ribosomal 16 S, para la identificación de *Rhodococcus rhodnii* aislado de *Rhodnius prolixus*. Para ello, se comparó el número y tamaño de los fragmentos de restricción obtenidos *in vitro* con los deducidos a partir del análisis de restricción *in silico* de la secuenciación del fragmento amplificado correspondiente al gen codificante para el ARNr.

MATERIALES Y MÉTODOS

Aislamiento de las bacterias

Se disectaron dos ejemplares adultos de *R. prolixus* sanos mantenidos en el laboratorio y el contenido intestinal fue sembrado en medio BHI, agar sangre y agar *Corynebacterium* a 37 y 26 °C por cuatro días. Las colonias aisladas fueron analizadas mediante tinción de Gram, Kinyoun modificada y las pruebas bioquímicas de utilización de carbohidratos (trealosa, xilosa, sacarosa, manitol y sorbitol), además de las pruebas de catalasa, citrato y ureasa. Adicionalmente, como control de la prueba de PCR-RFLP se utilizó *Rhodococcus equi* (CECT 555), cepa amablemente cedida por la Colección

Española de Cultivos Tipo de la Universidad de Valencia, España y *Staphylococcus xylosus*, cepa aislada de un ejemplar de *R. pallescens* en el Laboratorio de Parasitología Molecular de la Pontificia Universidad Javeriana.

Extracción de ADN

Las bacterias fueron recolectadas por centrifugación a 10.000 rpm durante 15 minutos, a partir de un cultivo en medio BHI líquido. El botón bacteriano fue resuspendido en TE 1X (Tris-HCl 10 mM, pH 8,0, EDTA 1mM, pH 8,0) y lavado dos veces en la misma solución. Luego, el botón bacteriano fue resuspendido en 200 µl de TE 1X y tratado con 2 mg/ml de lisozima e incubado a 37 °C por 30 min. Posteriormente, se le adicionó SDS al 1% y 100 µg/ml de Proteinasa K e incubó a 65 °C por 4 horas (h). A continuación, el ADN fue extraído con un volumen de fenol, un volumen de una mezcla de fenol:cloroformo-alcohol isoamílico (25:24:1) volumen a volumen (v:v) y por último con un volumen de cloroformo-alcohol isoamílico (24:1). Finalmente, el ADN fue precipitado con dos volúmenes de etanol absoluto y 0,1 volúmenes de acetato de sodio 3 M pH 6,8 y la madeja de ADN obtenida fue lavada con etanol al 70%, secada a temperatura ambiente (TA) y resuspendida en TE 1X. La concentración del ADN obtenido se midió por espectrofotometría a 260 nm (Puerta y Urueña, 2005).

Ensayo de PCR-RFLP

125 ng de ADN bacteriano fueron amplificados con los iniciadores 16F (5'- GCT TAA CAC ATG CAA G -3') y 16R (5'- ACG GGC AGT GTG TAC AAG ACC -3'), correspondientes a las posiciones 45-61 y 1386-1406, respectivamente, del gen codificante para el ARN ribosomal 16S de *Escherichia coli* (O'Neill *et al.*, 1993). La PCR se realizó en un volumen final de 50

μl, según lo descrito por Hypsa y Dale, (1997) y el producto de amplificación fue visualizado mediante electroforesis horizontal en geles de agarosa al 1% coloreados con bromuro de etidio (Puerta y Urueña, 2005). Posteriormente, los productos de amplificación fueron sometidos a digestión con las endonucleasas *Bam*HI, *Hind*III, *Pst*I y *Sac*I según especificaciones de la casa comercial para cada enzima. Los perfiles de restricción obtenidos fueron visualizados mediante electroforesis en geles de poliacrilamida al 6% coloreados con nitrato de plata de acuerdo con lo descrito por Sambrook y Russell (2001).

Clonación y secuenciación

El producto de amplificación obtenido mediante PCR, de aproximadamente 1360 pares de bases, fue clonado en el plásmido comercial pGEM[®]-T Easy (Promega), mediante reacción con la enzima “T4 DNA Ligase”, según recomendaciones de la casa comercial. El producto de ligación fue posteriormente introducido en bacterias electrocompetentes JM-109 de *E. coli*. Finalmente, las bacterias recombinantes se seleccionaron en medio Luria Bertani con 100 μg/ml de ampicilina tras realizar el test de blancas y azules (Puerta y Urueña, 2005). El ADN plasmídico de los clones recombinantes se extrajo haciendo uso del estuche comercial “Wizard[®] Plus SV Minipreps DNA Purification System” (Promega) y la secuenciación de ambas cadenas del inserto de ADN clonado se realizó según los procedimientos estándares del servicio suministrado por la compañía Macrogen (Corea), usando los oligonucleótidos universales M13F/M13R y los cebadores internos SF (5′- CCG CAA GGC TAA AAC TCAA -3′) y SR (5′- AAT TAA TCC ACA TGC TCC GC -3′). La búsqueda de identidad con otras secuencias reportadas en la base de datos de GenBank se realizó usando el programa BLAST de NCBI (Altschul *et al.*, 1997), los alineamientos

se realizaron a través del programa LALIGN (Pearson, 1990).

Análisis *in silico*

En primer lugar se determinó el sitio de anillamiento de los cebadores 16 F y 16 R en la secuencia estudiada de *R. rhodnii* y en las previamente reportadas de *R. rhodnii* (n° de acceso al GenBank X80623), *R. equi* (n° de acceso al GenBank AF490539) y *S. xylosus* (n° de acceso al GenBank EU019195), seguido de la determinación del perfil de restricción mediante el uso del programa TAGC del servidor <http://workbench.edu.sdsc>.

RESULTADOS

Aislamiento de las bacterias

A partir de los dos ejemplares de *R. prolixus*, se aisló un solo tipo de colonia redonda, irregular, lisa y pigmentada de color rosado (figura 1), correspondiente a cocobacilos Gram positivos, ácido alcohol resistentes negativos, asimiladores de manitol y sorbitol, catalasa y ureasa positivo y citrato

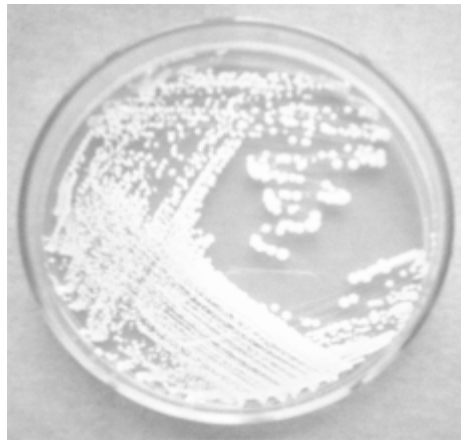


FIGURA 1. Aislamiento de bacterias del intestino del insecto vector *R. prolixus* sembradas en agar BHI.

negativo, propiedades características de *R. rhodnii* (Yassin, 2005).

Ensayo de PCR-RFLP

A partir del ADN de las bacterias previamente aisladas, se amplificó un único fragmento de aproximadamente 1360 pb, tamaño similar al del fragmento amplificado con el ADN de *E. coli* utilizado como control positivo (figura 2). La digestión del producto amplificado evidenció perfiles diferentes de restricción para *R. rhodnii* (figura 3A), *R. equi* (figura 3B) y *S. xylosum* (figura 3C). Es así como para el caso de *R. rhodnii*, con las enzimas *Bam*HI, *Pst*I y *Sac*I se obtuvieron dos fragmentos de restricción de tamaños diferentes, en tanto que no se

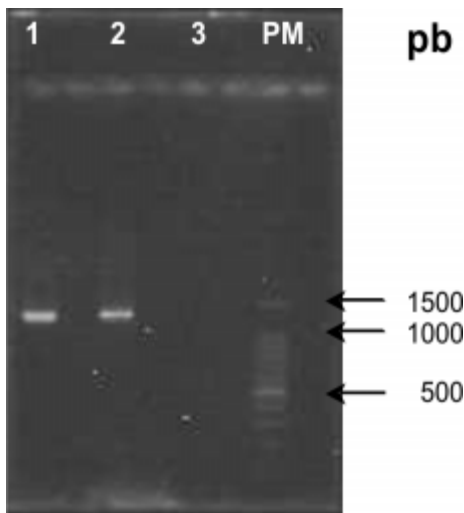


FIGURA 2. Amplificación del gen codificante para el ARNr 16 S de bacterias aisladas de *R. prolixus*. 10 μ l de cada PCR fueron resueltos en un gel de agarosa al 0,8 % y los productos amplificados fueron visualizados tras ser coloreados con bromuro de etidio. 1: ADN de bacterias aisladas de *R. prolixus* 2: ADN de *E. coli*, 3: Reacción sin ADN, como control negativo de la reacción de PCR y MP: marcador de peso molecular 100 pb (Promega).

obtuvo digestión con la endonucleasa *Hind*III. En relación a *R. equi*, todas las enzimas digieren el producto amplificado. Finalmente, el producto amplificado de *S. xylosum* mostró digestión solamente con las endonucleasas *Hind*III y *Pst*I.

Clonación y secuenciación

El fragmento amplificado a partir del ADN bacteriano, fue clonado en el plásmido pGEM[®]-T Easy (Promega). Entre los clones obtenidos se seleccionó el denominado RPRO-3, el cual fue secuenciado en su totalidad, secuencia depositada en la base de datos GenBank con el número de acceso EF108418. Los resultados obtenidos evidenciaron en primer lugar un fragmento de 1339 pb, en cuyos extremos 5' y 3' se encuentra la secuencia correspondiente a los cebadores 16F y 16R, respectivamente (figura 4). El análisis BLAST/n de dicha secuencia confirmó la identidad de la misma como los genes codificantes para el ARN ribosomal 16 S de *R. rhodnii*, con porcentajes de identidad de 99% con las cepas DSM43959, DSM43336T, DSM43337T y ATCC 35071T, secuencias con números de acceso al GenBank de X80623, X80621, X80622 y X81935, respectivamente.

Análisis *in silico*

Los sitios de anillamiento de los cebadores 16 F/R para el caso de la secuencia codificante para el ARN ribosomal 16 S de *R. rhodnii*, fueron las posiciones 21-36 y 1338-1358, para *R. equi* las posiciones 20-34 y 1333-1353 y para *S. xylosum* las posiciones 11-26 y 1295-1316; generando productos de amplificación de 1338, 1333 y 1284 pb, respectivamente. Se ubicaron los sitios de restricción de las enzimas *Bam*HI, *Hind*III, *Pst*I y *Sac*I en cada uno de los productos de amplificación respectivos y se determinaron los fragmentos generados *in silico*, los cuales coinciden con los obtenidos *in vitro* mediante análisis de

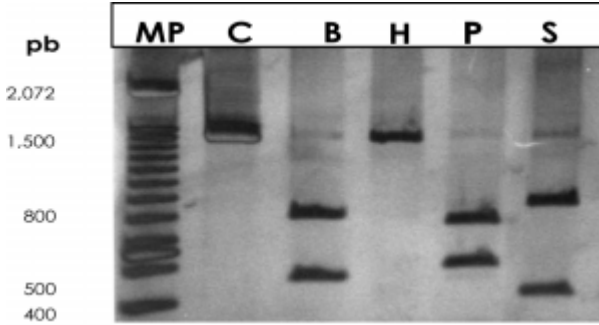


FIGURA 3A.

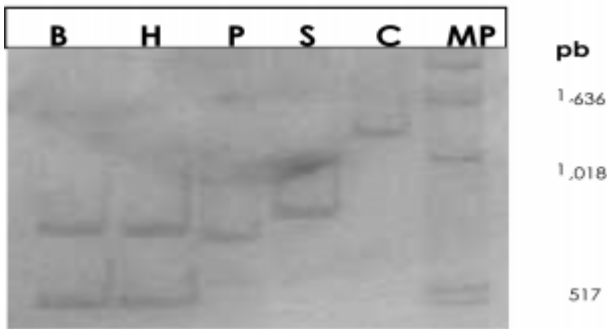


FIGURA 3B.

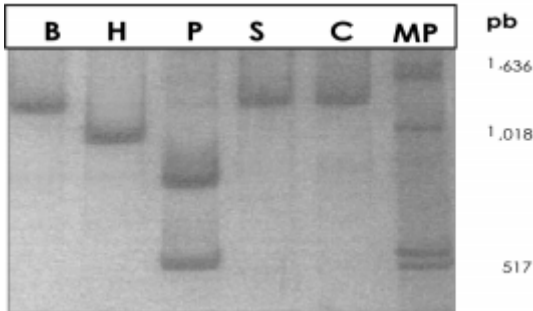


FIGURA 3C.

FIGURA 3. Ensayo de PCR-RFLP de los productos de amplificación obtenidos con la PCR 16F/R. Electroforesis en gel de poliacrilamida al 6% teñido con plata que muestra el perfil de digestión de los genes codificantes para el ARN 16 S ribosomal de *R. rhodnii* aislada del insecto *Rhodnius prolixus* (A), *R. equi* (B) y *S. xylosus* (C). MP: marcador de peso molecular 100 pb (Invitrogen), C: ADNr sin digerir, B: ADNr digerido con *BamHI*, H: ADNr digerido con *HindIII*, P: ADNr digerido con *PstI* y S: ADNr digerido con *SacI*. Nótese que los fragmentos de más bajo peso molecular, generados por las enzimas *HindIII* para el caso de *S. xylosus* (286 pb), *PstI* (419 y 170 pb) y *SacI* (132 y 373 pb) para el caso de *R. equi*, no se observan debido a que migraron por fuera del gel.

RPR0-3	GCTTAACACATGCAAGT CGAGCGGTAAAGGCCCTTTCGGGGGTACACGAGCGGGCAACGGG	60
X80623	GCTTAACACATGCAAGT CGAGCGGTAAAGGCCCTTTCGGGGGTACACGAGCGGGCAACGGG	80
RPR0-3	TGAGTAACACGTGGGTGATCTGCCCTGCACCTCTGGGATAAGCCTGGGAAACTGGGTCTAA	120
X80623	TGAGTAACACGTGGGTGATCTGCCCTGCACCTCTGGGATAAGCCTGGGAAACTGGGTCTAA	140
RPR0-3	TACTGGATATGACCACCTGGTTCATGGCCCTGGTGGTGGAAAGATTATCGGTCCAGGATG	180
X80623	TACTGGATATGACCACCTGGTTCATGGCCCTGGTGGTGGAAAGATTATCGGTCCAGGATG	200
RPR0-3	GGCCCGCGCCCTATCAGCTTGTGTGGTGGGTAATGGCCCTACCAAGCGCACGACGGGTAGC	240
X80623	GGCCCGCGCCCTATCAGCTTGTGTGGTGGGTAATGGCCCTACCAAGCGCACGACGGGTAGC	260
RPR0-3	CGACCTGAGAGGGTGTATCGGCCACACTGGGACTGAGACACCGCCAGACTCTACGGGAG	300
X80623	CGACCTGAGAGGGTGTATCGGCCACACTGGGACTGAGACACCGCCAGACTCTACGGGAG	320
RPR0-3	CGACAGTGGGGAATATGACACAATGGGCCAAGCCCTGATGACGACCGCCCGGTGAGGG	360
X80623	CGACAGTGGGGAATATGACACAATGGGCCAAGCCCTGATGACGACCGCCCGGTGAGGG	380
RPR0-3	ATGACCGCCCTTCGGGTTGTAAACCTCTTTCGGTAGGGACGAAGCGCAAGTGACGGTACT	420
X80623	ATGACCGCCCTTCGGGTTGTAAACCTCTTTCGGTAGGGACGAAGCGCAAGTGACGGTACT	440
RPR0-3	ATAGAAGAAGCACCGGCCAACTACGTGCCAGCAGCCGGTAATACGTAGGTTGCGAGCG	480
X80623	ATAGAAGAAGCACCGGCCAACTACGTGCCAGCAGCCGGTAATACGTAGGTTGCGAGCG	500
RPR0-3	TTGTCCGGAATTACTGGCGTAAAGAGCTCGTAGGGGTTTGTCCGCTGCTGTGAAAT	540
X80623	TTGTCCGGAATTACTGGCGTAAAGAGCTCGTAGGGGTTTGTCCGCTGCTGTGAAAT	560
RPR0-3	CCACAGCTCAACTGTGGCGTGCAGCCGATACGGCCAGACTTGGTACTGCAGGGGAGA	600
X80623	CCACAGCTCAACTGTGGCGTGCAGCCGATACGGCCAGACTTGGTACTGCAGGGGAGA	620
RPR0-3	CTGGAAATCCGGTGTAGCGGTGAAATGGCAGATATCAGGAGGAACACCGGTGGCGAAG	660
X80623	CTGGAAATCCGGTGTAGCGGTGAAATGGCAGATATCAGGAGGAACACCGGTGGCGAAG	680
RPR0-3	CGGGTCTCTGGGCACTAAGTACGCTGAGGAGCGAAGCCGTGGGTAGCGCAACAGGATTA	720
X80623	CGGGTCTCTGGGCACTAAGTACGCTGAGGAGCGAAGCCGTGGGTAGCGCAACAGGATTA	740
RPR0-3	GATACCCCTGGTAGTCCACGCCCTAAACGGTGGCGCTAGGTGTTGGTTTCCCTCCACGGG	780
X80623	GATACCCCTGGTAGTCCACGCCCTAAACGGTGGCGCTAGGTGTTGGTTTCCCTCCACGGG	800
RPR0-3	ATCCGTGCCGTAGCTAACGCATTAAGCGCCCGCCTGGGGATACGGCCGCAAGGCTAAA	840
X80623	ATCCGTGCCGTAGCTAACGCATTAAGCGCCCGCCTGGGGATACGGCCGCAAGGCTAAA	860
RPR0-3	ACTCAAAGGAATTGACGGGGCCCGCACAAAGCGCCGGAGCATGTGGATTAATTCGATGCA	900
X80623	ACTCAAAGGAATTGACGGGGCCCGCACAAAGCGCCGGAGCATGTGGATTAATTCGATGCA	920
RPR0-3	ACGGGAAGAACCTTACCTGGGTTGACATACACCGGATCGCCTCAGAGATGGGTTTCCC	960
X80623	ACGGGAAGAACCTTACCTGGGTTGACATACACCGGATCGCCTCAGAGATGGGTTTCCC	980
RPR0-3	TTGTGGTCCGGGTACAGGTGGTGCATGGCTGTCTCAGCTCGTGTGGTGGATGTTGGGT	1020
X80623	TTGTGGTCCGGGTACAGGTGGTGCATGGCTGTCTCAGCTCGTGTGGTGGATGTTGGGT	1040
RPR0-3	TAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTTGTCTGTGTGGCCAGCACGTAATGGTGGGACTC	1080
X80623	TAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTTGTCTGTGTGGCCAGCACGTAATGGTGGGACTC	1100
RPR0-3	CGAGGAGACTGCCGGGTCAACTCGAGGGAAGGTGGGATGACGTCAAGTCATCATGCC	1140
X80623	CGAGGAGACTGCCGGGTCAACTCGAGGGAAGGTGGGATGACGTCAAGTCATCATGCC	1160
RPR0-3	CTTATGTCCAGGGCTTCACACATGCTACAATGGCCGTACAGAGGGCTGGATACCCTGA	1200
X80623	CTTATGTCCAGGGCTTCACACATGCTACAATGGCCGTACAGAGGGCTGGATACCCTGA	1220
RPR0-3	GGTGGAGCGAATCCCTTAAAGCCGGTCTCAGTTCGGATCGGGTCTGCAACTCGACCCCG	1260
X80623	GGTGGAGCGAATCCCTTAAAGCCGGTCTCAGTTCGGATCGGGTCTGCAACTCGACCCCG	1280
RPR0-3	TGAAGTGGGAGTGCCTAATGTCAGATCAGCAAGCTGCGGTGAATACGTTCCCGGGT	1320
X80623	TGAAGTGGGAGTGCCTAATGTCAGATCAGCAAGCTGCGGTGAATACGTTCCCGGGT	1340
RPR0-3	CTTGTACACACTGCCCGT 1338	
X80623	CTTGTACACACTGCCCGT 1358	

FIGURA 4. Alineamiento de las secuencias de nucleótidos del gen codificante para el 16 ARN ribosomal de *R. rhodnii* aislado de *R. prolixus* y de la cepa DSM43959 (n° de acceso al GenBank EF108418 y X80623, respectivamente). En negrilla se denotan las secuencias de los cebadores 16F y 16R. Los números indican la posición en la secuencia y los dos puntos identidad entre éstas.

PCR-RFLP (figura 3, tabla 1). Asimismo, los resultados del análisis *in silico* de la secuencia 16 S de *R. rhodnii* aislado de *R. prolixus* (n° de acceso al GenBank EF108418) fueron los mismos que aquellos con la secuencia X80623, previamente reportada en el GenBank.

DISCUSIÓN

El género *Rhodococcus* está constituido por bacterias Gram positivas, ricas en un alto contenido de guaninas y citocinas en su genoma (Goodfellow, 1986), filogenéticamente relacionadas con el grupo de *Corynebacterium-Mycobacterium-Nocardia*, bacterias que contienen ácidos micólicos en su pared celular (Rayney *et al.*, 1995).

La identificación y diferenciación de las especies del género *Rhodococcus* por los métodos tradicionales de cultivo y subsiguiente caracterización fenotípica mediante los ensayos clásicos de morfología y pruebas bioquímicas, se dificulta por las

siguientes razones: (i) característicamente, estas bacterias presentan pleomorfismo según las condiciones de cultivo y la fase de crecimiento en que se encuentren. Así por ejemplo, bacterias crecidas en medios sólidos se presentan usualmente como formas cocoides mientras que aquéllas cultivadas en medios líquidos forman largos bacilos e incluso llegan a formar filamentos cortos con ramificaciones rudimentarias (Weinstock y Brown, 2002), (ii) los resultados de las coloraciones ácido alcohol resistente son altamente variables (Weinstock y Brown, 2002), (iii) siendo microorganismos poco reactivos desde el punto de vista bioquímico, el metabolismo de diversos azúcares tales como manitol, sacarosa, galactosa y sorbitol, es de naturaleza igualmente variable (Goodfellow, 1986), (iv) aun cuando sistemas de identificación como el API Coryne (bio-Merieux) incluyen en su base de datos a *Rhodococcus equi* por ejemplo, la utilización de los mismos es limitada para la correcta identificación de estas bacterias (Funke *et al.*, 1997; Soto *et al.*,

Tabla 1
Perfil de restricción obtenido *in silico* del gen codificante para el ADNr 16 S

Especie	Enzima	Sitio de corte (nt)*	Fragmentos generados (pb)
<i>R. rhodnii</i>	<i>BamHI</i>	780	780, 560
	<i>HindIII</i>	-	1339
	<i>PstI</i>	594	745, 594
	<i>SacI</i>	510	829, 510
<i>R. equi</i>	<i>BamHI</i>	775	775, 558
	<i>HindIII</i>	553	553, 780
	<i>PstI</i>	419, 589	419, 170, 744
	<i>SacI</i>	132, 505	132, 373, 828
<i>S. xylosus</i>	<i>BamHI</i>	-	1284
	<i>HindIII</i>	1004	1004, 286
	<i>PstI</i>	745	745, 545
	<i>SacI</i>	-	1284

* Corresponde al sitio de corte dentro del producto amplificado

1994) y (v) estas son bacterias de crecimiento lento, que una vez aisladas requieren de un mayor tiempo para su correcta identificación y diferenciación por ensayos fisiológicos y nutricionales (Bell *et al.*, 1999).

Las anteriores razones, llevaron a nuestro grupo de investigación a desarrollar una prueba de PCR-RFLP para la identificación y diferenciación de estas bacterias basada en la amplificación de los genes codificantes para el ARN ribosomal 16 S (Pavía *et al.*, 2005). Esta prueba combina la ventaja de la elevada conservación de los genes ribosomales entre distintos géneros bacterianos, con la especificidad de los polimorfismos de restricción, los cuales evidencian la variabilidad entre las secuencias amplificadas, permitiendo la identificación a nivel de género y de especie. Es así como con este ensayo de PCR-RFLP se pudo determinar un perfil de restricción diferencial entre *R. equi*, *R. rhodnii* y otros coccobacilos como *Acinetobacter baumani* y *E. coli*.

Continuando con el análisis de la aplicabilidad de dicha prueba de PCR-RFLP, en este estudio se procedió a la caracterización de bacterias presentes en la flora intestinal de *R. prolixus*, triatomino vector de la enfermedad de Chagas, mediante este ensayo, a la vez que se secuenciaron y analizaron *in silico* los fragmentos amplificados correspondientes al gen codificante para el ARNr 16 S, con la finalidad de corroborar la correspondencia entre los perfiles de restricción obtenidos *in vitro* e *in silico*.

Los resultados obtenidos evidenciaron, en primer lugar, cómo efectivamente con los cebadores utilizados se amplificó el gen codificante para el ARNr 16 S en las tres especies bacterianas estudiadas, ya que se observó una total correspondencia entre los resultados obtenidos *in vitro* con aquéllos

obtenidos *in silico*. En segundo lugar, se comprobó que la secuencia amplificada corresponde a la secuencia del ARN ribosomal 16 S de la bacteria *Rhodococcus rhodnii*, simbionte presente en la flora intestinal del insecto *R. prolixus*, al obtenerse porcentajes de identidad del 99% con otras secuencias del ADNr de las cepas DSM43959, DSM43336T, DSM43337T y ATCC 35071T, reportadas en el GenBank. Finalmente, se observó una total correspondencia entre los perfiles de restricción obtenidos con la prueba de PCR-RFLP y los generados mediante análisis *in silico* de la secuencia amplificada y de la secuencia X80623, previamente reportada en el GenBank; perfiles que fueron característicos de esta especie.

En conjunto, los anteriores resultados sustentan la aplicabilidad del ensayo de PCR-RFLP propuesto para la identificación de *R. rhodnii*, hecho que sin duda alguna facilitará el estudio de la presencia de estas bacterias en otras especies de *Rhodnius* que intervienen en la transmisión de la enfermedad de Chagas, así como también el análisis de las interacciones entre las bacterias simbiotes y el insecto vector.

CONCLUSIONES

Se demostró la aplicabilidad del ensayo de PCR-RFLP basado en la amplificación del gen codificante para el ARNr 16 S para la identificación de *R. rhodnii*. Lo cual facilitará el estudio de la presencia de estas bacterias en otras especies de *Rhodnius* que intervienen en la transmisión de la enfermedad de Chagas.

AGRADECIMIENTOS

A Claudia Cuervo, por su asistencia técnica en el proceso de clonación de los fragmentos de amplificación.

LITERATURA CITADA

- AKSOY, S., GIBSON, W.C. y LEHANE, M.J. Interactions between tsetse and trypanosomes with implications for the control of trypanosomiasis. *Advances in Parasitology*, 2003, 53, 1-83.
- AKSOY, S. y RIO, R.V. Interactions among multiple genomes: tsetse, its symbionts and trypanosomes. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 2005, 35, 691-8.
- ALTSCHUL, S.F., MADDEN, T.L., SCHAFFER, A.A., ZHANG, J., ZHANG, Z., MILLER, W. y LIPMAN, D.J. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research*, 1997, 25, 3389-402.
- AZAMBUJA, P., FEDER, D. y GARCÍA, E.S. Isolation of *Serratia marcescens* in the midgut of *Rhodnius prolixus*: impact on the establishment of the parasite *Trypanosoma cruzi* in the vector. *Experimental Parasitology*, 2004, 107, 89-96.
- AZAMBUJA, P. y GARCÍA, E.S. *Trypanosoma rangeli* interactions within the vector *Rhodnius prolixus*: a mini review. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 2005, 100, 567-72.
- BEARD, C.B., CORDON-ROSALES, C. y DURVASULA, R.V. Bacterial symbionts of the triatominae and their potential use in control of Chagas disease transmission. *Annual Review of Entomology*, 2002, 47, 123-41.
- BEARD, C.B., DOTSON, E.M., PENNINGTON, P.M., EICHLER, S., CORDON-ROSALES, C. y DURVASULA, R.V. Bacterial symbiosis and paratransgenic control of vector-borne Chagas disease. *International Journal of Parasitology*, 2001, 31, 621-27.
- BEARD, C.B., DURVASULA, R.V. y RICHARDS, F.F. Bacterial symbiosis in arthropods and the control of disease transmission. *Emerging Infectious Disease*, 1998, 4, 581-91.
- BEARD, C.B., MASON, P.W., AKSOY, S., TESH, R.B. y RICHARDS, F.F. Transformation of an insect symbiont and expression of a foreign gene in the Chagas' disease vector *Rhodnius prolixus*. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 1992, 46, 195-200.
- BEARD, C.B., O'NEILL, S.L., TESH, R.B., RICHARDS, F.F. y AKSOY, S. Modification of arthropod vector competence via symbiotic bacteria. *Parasitology Today*, 1993, 9, 179-83.
- BELL, K.S., KUYUKINA, M.S., HEIDBRINK, S., PHILP, J.C., AW, D.W., IVSHINA, I.B. y CHRISTOFI, N. Identification and environmental detection of *Rhodococcus* species by 16S rDNA-targeted PCR. *Journal of Applied Microbiology*, 1999, 87, 472-80.
- D'ALESSANDRO, A. Biology of *Trypanosoma (Herpetosoma) rangeli* Tejera, 1920, en: Lumsden, W.H.R. y Evans, E. (eds.). *Biology of Kinetoplastida*, vol. 1. Arnold Publisher. London, U.K. 1976, 328-80.
- D'ALESSANDRO, A. y SARAVIA, N. *Trypanosoma rangeli*, en: Kreier, J.P. y Baker, J.R. (eds.). *Parasitic protozoa*, vol. 2. Academic Press, Inc. New York, USA, 1992, 1-54.
- D'ALESSANDRO, A. y SARAVIA, N. *T. rangeli*, en: Giles, H.M. (ed.). *Protozoal Diseases*, Oxford University Press, London, UK, 1999, 398-412.

- DOTSON, E.M., PLIKAYTIS, B., SHIN-NICK, T.M., DURVASULA, R.V. y BEARD, C.B. Transformation of *Rhodococcus rhodnii*, a symbiont of the Chagas disease vector *Rhodnius prolixus*, with integrative elements of the L1 mycobacteriophage. *Infection Genetics and Evolution*, 2003, 3, 103-9.
- DURVASULA, R.V., GUMBS, A., PANACKAL, A., KRUGLOV, O., TANEJA, J., KANG, A.S., CORDON-ROSALES, C., RICHARDS, F.F., WHITHAM, R.G. y BEARD, C.B. Expression of a functional antibody fragment in the gut of *Rhodnius prolixus* via transgenic bacterial symbiont *Rhodococcus rhodnii*. *Medical and Veterinary Entomology*, 1999, 13, 115-9.
- DURVASULA, R.V., GUMBS, A., PANACKAL, A., KRUGLOV, O., AKSOY, S., MERRIFIELD, R.B., RICHARDS, F.F. y BEARD, C.B. Prevention of insect-borne disease: an approach using transgenic symbiotic bacteria. *Proceedings of the National Academic of Science of United States of America*, 1997, 94, 3274-8.
- EICHLER, S. y SCHAUB, G.A. Development of symbionts in triatomine bugs and the effects of infections with trypanosomatids. *Experimental Parasitology*, 2002, 100, 17-27.
- FUNKE, G., RENAUD, F.N., FRENEY, J. y RIEGEL, P. Multicenter evaluation of the updated and extended API (RAPID) Coryne database 2.0. *Journal of Clinical Microbiology*, 1997, 35, 3122-6.
- GOODFELLOW, M. Genus *Rhodococcus*, en: Sneath, P.H.A., Mair, N.S., Sharpe, M.E. y Holt, J.G. (eds.). *Bergey's manual of systematic bacteriology*, vol. 4, The William & Wilkins, Baltimore, USA, 1986, 2362-71.
- GUHL, F., ANGULO, V.M., RESTREPO, M., NICHOLLS, S. y MONTOYA, R. Estado del arte de la enfermedad de Chagas en Colombia y estrategias de control. *Biomédica*, 2003, 23 (suppl. 1): 31-3.
- GUHL, F. y VALLEJO, G. *Trypanosoma (Herpetosoma) rangeli* Tejera, 1920 – An updated review. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 2003, 98, 435-42.
- HYPISA, V. y DALE, C. *In vitro* cultura and phylogenetic análisis of “*Candidatus Arsenophonus triatominarum*” an intracellular bacterium from the triatomine bug, *Triatoma infestans*. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 1997, 47, 1140-4.
- JARAMILLO, C., MONTAÑA, M.F., CASTRO, L.R., VALLEJO, G.A. y GUHL, F. Differentiation and genetic analysis of *Rhodnius prolixus* and *Rhodnius colombiensis* by rDNA and RAPD amplification. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 2001, 96, 1043-8.
- MONTEIRO, F.A., BARRETT, T.V., FITZPATRICK, S., CORDON-ROSALES, C., FELICIANGELI, D. y BEARD, C.B. Molecular phylogeography of the Amazonian Chagas disease vectors *Rhodnius prolixus* and *R. robustus*. *Molecular Ecology*, 2003, 12, 997-1006.
- O'NEILL, S.L., GOODING, R.H. y AKSOY, S. Phylogenetically distant symbiotic microorganisms reside in Glossina midgut and ovary tissues. *Medical and Veterinary Entomology*, 1993, 7, 377-83.
- PAVÍA, P., CALDERÓN, C. y PUERTA, C. Diferenciación de especies de *Rhodococcus* mediante una prueba de PCR-

- RFLP basada en los genes codificantes para la subunidad 16S ribosomal. *Nova*, 2005, 3, 14-20.
- PEARSON, W.R. Rapid and sensitive sequence comparison with FASTP and FASTA. *Methods in Enzymology*, 1990, 183, 63-98.
- PUERTA, C. Y URUEÑA, C.P. *Prácticas de biología molecular*, 1ª edición, Editorial Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, DC, 2005, 104.
- RAINEY, F.A., BURGHARDT, J., KROP-PENSTED, R.M., KLATTE, S. y STACKEBRANDT, E. Phylogenetic analysis of the genera *Rhodococcus* and *Nocardia* and evidence for the evolutionary origin of the genus *Nocardia* from within the radiation of *Rhodococcus* species. *Microbiology*, 1995, 141, 523-8.
- SAMBROOK, J.F. y RUSSELL, D.W. Gel electrophoresis of DNA and pulsed-field agarose electrophoresis, en: *Molecular cloning. A laboratory manual*, Third ed., Cold Spring Harbor Laboratory, New York, USA, 2001, 5.40-51.
- SOTO, A., ZAPARDIEL, J. y SORIANO, F. Evaluation of API Coryne system for identifying coryneform bacteria. *Journal of Clinical Pathology*, 1994, 47, 756-9.
- STACKEBRANDT, E. Phylogenetic relationships vs. phenotypic diversity: how to achieve a phylogenetic classification system of the eubacteria. *Canadian Journal of Microbiology*, 1998, 34, 552-6.
- WEINSTOCK, D.M. y BROWN, A.E. *Rhodococcus equi*: an emerging pathogen. *Clinical and Infection Disease*, 2002, 34, 1379-85.
- YASSIN, A.F. *Rhodococcus triatomae* sp. nov., isolated from a blood-sucking bug. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 2005, 55(Pt 4), 1575-9.

Recibido: 15-02-2007

Aprobado: 30-08-2007