



UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS

ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS

COMPARACIÓN DE LA INHIBICIÓN DE LA REACCIÓN
EN CADENA DE LA POLIMERASA SEGÚN LA
EXTRACCIÓN DE DNA DE *Cryptosporidium* spp.

CAMILA PAZ SEPÚLVEDA ANSALDO

Memoria para optar al Título
Profesional de Médico Veterinario
Departamento de Medicina
Preventiva Animal

PROFESORA GUÍA: RUBÉN MERCADO PEDRAZA

PROYECTOS FONDECYT 1121035, 1110255 Y U. DE CHILE-DI-MULT

06/17-2

SANTIAGO, CHILE

2014



UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS

ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS

COMPARACIÓN DE LA INHIBICIÓN DE LA REACCIÓN
EN CADENA DE LA POLIMERASA SEGÚN LA
EXTRACCIÓN DE DNA DE *Cryptosporidium* spp.

CAMILA PAZ SEPÚLVEDA ANSALDO

Memoria para optar al Título
Profesional de Médico Veterinario
Departamento de Medicina
Preventiva Animal

NOTA FINAL:

	NOTA	FIRMA
PROFESOR GUÍA : RUBÉN MERCADO P.
PROFESOR CORRECTOR: FERNANDO FREDES M.
PROFESOR CORRECTOR: PATRICIO RETAMAL M.

SANTIAGO, CHILE

2014

“COMPARACIÓN DE LA INHIBICIÓN DE LA REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA SEGÚN LA EXTRACCIÓN DE DNA DE *Cryptosporidium* spp”.

“COMPARISON OF POLYMERASE CHAIN REACTION INHIBITION ACCORDING *Cryptosporidium* spp. DNA EXTRACTION”

Camila Paz Sepúlveda Ansaldo*

*Departamento de Medicina Preventiva Animal, Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias, Universidad de Chile, Santiago, Chile.

Financiamiento

Este trabajo ha sido financiado por los Proyectos FONDECYT 1121035, 1110255 Y U. DE CHILE-DI-MULT 06/17-2

*A mis papas, que desde pequeña me inculcaron el amor y cuidado hacia los animales,
y a todos los que me acompañaron en este camino, entregándome su apoyo
incondicional.*

RESUMEN

Cryptosporidium spp, es un protozoo causante de diarrea en bovinos, principalmente terneros. El objetivo del estudio fue comparar la inhibición de la Reacción en Cadena de la Polimerasa para *Cryptosporidium* spp en muestras de DNA obtenidas desde dos métodos de extracción, y determinar su efecto en la positividad y rendimiento diagnóstico. Se procesaron 40 muestras de heces de terneras de plantales lecheros de la Región Metropolitana, Chile. Todas las muestras eran positivas para *Cryptosporidium* spp según técnica Ziehl Neelsen modificada. De cada muestra se realizó extracción mediante los métodos cloroformo-fenol y *kit* ZR Fecal DNA Miniprep, Zymo Research®. La Reacción en Cadena de la Polimerasa fue positiva en 32 (80%) y 40 (100%) de las muestras de DNA extraídas mediante cloroformo-fenol y *kit* Zymo® respectivamente. En las ocho muestras extraídas mediante cloroformo-fenol que no amplificaron a la Reacción en Cadena de la Polimerasa para *Cryptosporidium*, se realizó una Reacción en Cadena de la Polimerasa control para descartar la presencia de inhibidores, resultando solo una de estas muestras inhibida. No hubo diferencias significativas al comparar la inhibición de la prueba molecular según cada método de extracción. El DNA (ng/μL) obtenido de extraídos mediante *kit* Zymo® fue mayor en el 95% de las muestras, en relación a cloroformo-fenol, siendo esta diferencia estadísticamente significativa ($p \leq 0,05$). Los resultados sugieren la importancia de realizar una Reacción en Cadena de la Polimerasa control de inhibición en muestras que no amplifiquen, evitando informar falsos negativos.

Palabras claves: *Cryptosporidium*, Reacción en Cadena de la Polimerasa, inhibidores, bovinos.

SUMMARY

Cryptosporidium spp. is a protozoan parasite that causes diarrhea in cattle, especially calves. The objective of this study was to compare the inhibition of Polymerase Chain Reaction for *Cryptosporidium* spp. in DNA samples obtained from two extraction methods and determine their effect on positivity and diagnostic performance. 40 stool samples from two dairy farms calves from Metropolitan Region, Santiago, Chile were processed. All samples were positive for *Cryptosporidium* spp. according to the modified Ziehl-Neelsen procedure. Each sample extraction was performed using the phenol chloroform method and commercial kit ZR Fecal DNA Miniprep Zymo

Research®. The positive Polymerase Chain Reaction was performed in 32 (80%) and 40 (100%) of the DNA samples extracted by phenol chloroform method and Zymo® respectively. In the eight samples drawn by phenol chloroform method which not amplified at the Polymerase Chain Reaction for *Cryptosporidium*, a Polymerase Chain Reaction control was performed to discard the presence of inhibitors in the sample, showing only one as inhibited. There was no significant difference comparing the molecular test inhibition between the two extraction methods. DNA (ng/μL) produced from Zymo® was higher in 95 % of samples compared to phenol chloroform method, and this difference was statistically significant ($p \leq 0.05$). The results suggest the importance of a Polymerase Chain Reaction inhibition control in samples that not amplified, avoiding the report of false negative results.

Keywords: *Cryptosporidium*, Polymerase Chain Reaction, inhibitors, cattle.

INTRODUCCIÓN

El género *Cryptosporidium* pertenece al *Phylum* Apicomplexa y es un parásito protozooario intracelular que infecta a las células epiteliales del borde de las microvellosidades del tracto gastrointestinal, causando cuadros de enteritis y diarrea en vertebrados, siendo los individuos inmunodeprimidos los más susceptibles a presentar enfermedad crónica severa, incluyendo la muerte (Xiao *et al.*, 2004). Está distribuido mundialmente y alrededor de 150 especies de mamíferos, entre ellos el ser humano, así como aves, reptiles, anfibios y peces, son parasitados por miembros de este género. Dependiendo de la especie de *Cryptosporidium* que esté presente, variarán los efectos de la infección, número de especies animales afectadas, localización primaria de la infección (gástrica o intestinal), duración (autolimitante, aguda o crónica) y patogenicidad (Fayer, 2008).

El ooquiste, elemento de resistencia del parásito, es la forma infectiva y el único estado exógeno de *Cryptosporidium*. Este está conformado por tres capas de composición lipídica y glicoproteica, lo que le otorga las características de supervivencia en el medio ambiente y de ácido alcohol resistencia (Fayer, 2008). Cuando es ingerido por el hospedador, en las células blanco se inicia un ciclo evolutivo que incluye las fases de merogonia, gametogonia y esporogonia, concluyendo con la eliminación y diseminación de grandes cantidades de ooquistes a través de las heces, persistiendo en el medio ambiente a condiciones adversas y a los tratamientos de potabilización de agua (Smith *et al.*, 2005).

Hasta la fecha se han definido 19 especies de *Cryptosporidium* y el triple de este número ha sido identificado como genotipos. No obstante, gran parte de los estudios se han realizado sobre la especie *Cryptosporidium parvum*, debido a su importancia tanto en la salud humana como veterinaria, su distribución mundial, la variedad de especies a las que afecta y por la gran producción de ooquistes que conlleva, lo que la hace la especie más analizada *in vitro* y a partir de modelos animales (Fayer, 2008).

Uno de los mayores problemas al realizar el diagnóstico microscópico mediante métodos como los de Ziehl Neelsen (ZN) y Aureamina, es la escasa diferenciación morfológica, entre una especie de *Cryptosporidium* con respecto a otras. Es producto de lo anterior que distintas técnicas de diagnóstico molecular han sido utilizadas en la diferenciación de especies y genotipos de *Cryptosporidium*, así como en subtipos de *Cryptosporidium parvum* y *Cryptosporidium hominis*. Debido a esto, se pueden conocer con más detalle el número de especies involucradas, la estacionalidad de la

enfermedad (casos aislados y brotes) atribuible a diferentes especies o genotipos y el rol de estos mismos en la virulencia o transmisión en seres humanos (Fayer, 2008).

Dentro de las técnicas de diagnóstico molecular se encuentra el método basado en la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR). Costa (2004) señala que uno de los problemas más importantes de esta técnica se debe al riesgo de contaminación cruzada originando falsos positivos y por otro lado, a la presencia en algunas muestras de sustancias que inhiben la PCR, originando falsos negativos. Otras teorías que se relacionan a la obtención de resultados negativos a partir de la PCR, corresponden a la inadecuada extracción del DNA desde los ooquistes del parásito y a su degradación (Wilson, 1997).

Una gran cantidad de sustancias de origen natural introducidas durante el mismo proceso de la PCR, así como solventes químicos utilizados en el laboratorio para los procesos de extracción de DNA, son reconocidas como inhibidores. Los contaminantes que inhiben la amplificación de ácidos nucleicos en la PCR, tienen un modo de acción que se puede deber a la precipitación o a la desnaturalización del DNA o a la interacción con iones Mg^{2+} , impidiendo por tanto su unión con cualquier DNA polimerasa (Peist *et al.*, 2001). Además, estos compuestos inhibitorios pueden interferir a distintos niveles de la reacción, dando lugar a diferentes grados de atenuación, siendo el grado de inhibición final dependiente de su concentración. (Moreira, 1998; Thornton y Passen, 2004).

En nuestro país existen recientes reportes sobre la prevalencia de *Cryptosporidium* en terneros menores del mes de vida, provenientes de planteles lecheros de la Región Metropolitana (Díaz-Lee *et al.*, 2011; Muñoz *et al.*, 2011). No obstante, existen escasos estudios sobre la presencia de inhibidores de la PCR, en este caso según el método de extracción de DNA de *Cryptosporidium* y como éstos pueden afectar el rendimiento de la técnica diagnóstica, teniendo en cuenta la dificultad que representa el proceso de extracción debido a las características del ooquiste del parásito. Respecto a lo anterior, existe el antecedente del estudio de Muñoz *et al.*, (2011), quienes detectaron que de una selección de 58 muestras positivas a *Cryptosporidium* a la microscopía, un 36% de éstas resultaron negativas al ensayo molecular, lo que se atribuyó a una posible inhibición, degradación o inadecuada extracción del DNA.

Dado lo anterior, el objetivo de esta memoria consistió en comparar la inhibición de la PCR según la extracción de DNA de *Cryptosporidium* spp. a partir de los métodos cloroformo-fenol (C-F) y *kit* comercial ZR Fecal DNA Miniprep de Zymo Research®

(ZR), y a su vez conocer como en realidad influyen, en la pureza del DNA, algunos de los compuestos utilizados en las etapas de digestión y extracción. Lo anterior aumentará el rendimiento de la PCR como una prueba molecular diagnóstica de criptosporidiosis, facilitando la evaluación de la importancia en salud pública que esta enfermedad representa en las especies animales.

MATERIAL Y MÉTODOS.

1.- Muestras. Se trabajó con 40 muestras fecales de terneras diarreicas de entre 1-30 días de edad, de un total de 102 muestras positivas a *Cryptosporidium* spp. mediante el método de ZN, provenientes de dos planteles lecheros de la Región Metropolitana (Fundo La Macarena, El Monte, 33°38'S, 70°59'O y Fundo Pahuilmo, Mallarauco, 33°34'S 71°06'O). Estas muestras fueron utilizadas en el estudio de Muñoz *et al.*, (2011), siendo recolectadas durante el año 2008 desde el recto de cada animal, encontrándose almacenadas actualmente a -20° C en etanol 70% en el Laboratorio de Parasitología de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias, Universidad de Chile. El número de muestras utilizadas se explica ya que solo 40 de ellas contenían la cantidad suficiente para llevar a cabo ambas extracciones. El desarrollo de esta investigación tuvo lugar en el Laboratorio de Parasitología de la Facultad de Medicina, Universidad de Chile, Laboratorio de Parasitología y Laboratorio Biotecnológico Veterinario de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias, Universidad de Chile, durante el año 2013.

2.- Extracción de DNA. El método C-F se realizó de acuerdo a lo descrito por Muñoz *et al* (2011), con modificaciones. Las muestras se descongelaron a temperatura ambiente, previo tamizaje. Para la digestión de la muestra se utilizó 150µL de heces, a las que se les añadió 450µL de buffer TE (10Mm TRIS-HCL, 1Mm EDTA pH 8,0). Se sometieron a ebullición durante un minuto, dejándose enfriar a temperatura ambiente. De esta mezcla se tomaron 200µL y se agregaron a un nuevo tubo con 200µL de SDS 10% más 10uL de proteinasa K 20mg/mL. Las muestras se incubaron 18 horas a 65° C, para posteriormente realizar la extracción con cloroformo y fenol. Para esto último se tomaron 300µL de la muestra y se colocaron en un nuevo tubo con 300µL de fenol cloroformo isoamilico básico. La muestra se sometió a un vórtex y se centrifugó a 16.200g por 20 min. De la fase acuosa se extrajeron 200µL, con cuidado para no mezclar las fases, y se colocaron en un nuevo tubo con 200µL de fenol cloroformo isoamilico básico, sometiéndose a los procesos de vórtex y centrifugación

mencionados anteriormente. De la fase acuosa se extrajeron 100µL, con cuidado de no mezclar las fases, los que se añadieron con equivalentes cantidades de cloroformo y fenol, repitiendo los mismos procesos de vórtex y centrifugación. De este sobrenadante se extrajeron 70µL, a los que se le agregaron 7µL de acetato de sodio y 70µL de isopropanol para precipitar el DNA que posteriormente fue lavado con 500µL de etanol 70%. El DNA obtenido fue disuelto en 50µL de agua libre de nucleasas. La extracción con el *kit* ZR se realizó de acuerdo a las instrucciones del fabricante.¹ La concentración del DNA extraído por los dos métodos anteriores fue cuantificada mediante la medición de absorbancia a 260nm (A_{260}). A su vez, la contaminación del DNA fue evaluada a través de la comparación de la relación A_{260}/A_{280} , siendo aceptable un valor igual o mayor a 1,7.

3.- Reacción en Cadena de la Polimerasa. Para la PCR se utilizaron partidores género-específico, que amplifican un segmento de la subunidad 18S del gen RNA ribosomal de *Cryptosporidium* spp. denominados CR18S3543F 5'-GTTAAGTATAAACCCCTTTACAAGTATC-3' y CR18S31078R 5'-CCTCCAATCTCTAGTTGGC-3 (Muñoz *et al.*, 2011). Las muestras a analizar fueron amplificadas en un volumen de 20µL con la adición de: 20ng/µL de cada primer, 250µM de cada dNTPs, una unidad de DNA Polimerasa (RBC Taq DNA Polymerase 5U/µL) en buffer 10X (+ 15mM Mg^{2+}) provisto por el fabricante. La amplificación de la PCR fue realizada en un termociclador 2720Thermal Cycler (Applied Biosystems). El DNA fue inicialmente desnaturado a 94° C por cinco minutos y luego sometido a 35 ciclos de 94° C por 30 segundos, 55° C por 30 segundos y 72° C por 30 segundos. La extensión final fue de 72° C por 5 minutos. El volumen de DNA que se utilizó para electroforesis fue de 10µL. Una PCR positiva se consideró por la presencia de una banda de 520pb en un gel de agarosa al 1% en buffer TAE 1X y teñido con Gel Red®. Para descartar la presencia de inhibidores de la PCR y demostrar la integridad del DNA se realizó, en las muestras que no amplificaron, una PCR control del gen *cyb*, que codifica para el citocromo b en el DNA mitocondrial bovino, mediante el uso de los partidores CYB1 5'-CCATCCAACATCTCAGCATGATGAAA-3' y CYB2 5'GCCCTCAGAATGATATTTGTCCTCA-3' (Estrada-Chávez *et al.*, 2004). El DNA fue inicialmente desnaturado a 94° C por cinco minutos y luego sometido a 35 ciclos de 94° C por 30 segundos, 58° C por 30 segundos y 72° C por 30 segundos. La extensión final fue de 72° C por 5 minutos. Los productos de la amplificación se

¹ <http://www.zymoresearch.com/> .Se añadieron, según recomendación del fabricante, 500uL de mercaptoetanol a los 100mL de Fecal DNA Binding Buffer.

visualizaron en un gel de agarosa al 1% en buffer TAE 1X y teñido con Gel Red®. Una PCR positiva se consideró por la presencia de una banda de 375pb.

4. Análisis Estadístico. Los resultados relacionados a la concentración de DNA (ng/μL) obtenida a partir de ambos métodos, se analizaron mediante la prueba t de Student (Tomás-Sábado, 2009).

RESULTADOS

De las 40 muestras extraídas mediante C-F, 80% de ellas amplificaron a la PCR de la subunidad 18S del gen RNA ribosomal de *Cryptosporidium* spp. De estas mismas 40 muestras, pero extraídas mediante el *kit* ZR, 100% amplificaron a la misma técnica molecular (Figura 1).

De las ocho muestras (20%) extraídas mediante C-F que no amplificaron a la PCR de la subunidad 18S del gen RNA ribosomal de *Cryptosporidium* spp. solo una de estas resultó inhibida, al ser sometidas al protocolo para descartar la presencia de inhibidores de la PCR y demostrar la integridad del DNA (Figura 2). Esta última muestra se diluyó con el fin de evaluar si era posible eliminar los inhibidores, lo que fue confirmado, al observar amplificación de DNA de esa muestra, al repetir la PCR control de inhibición. Esta amplificación no fue obtenida al repetir la PCR de la subunidad 18S del gen RNA ribosomal de *Cryptosporidium* spp (Figura 3 y 4). La comparación de los resultados obtenidos no demostró diferencias en relación a la inhibición de la PCR según cada método de extracción.

Con respecto a las diferencias obtenidas en las relaciones de pureza (relación A_{260}/A_{280}) a partir de cada método, un mayor porcentaje de muestras extraídas mediante C-F obtuvo una relación A_{260}/A_{280} igual o mayor a 1,7 en comparación a las muestras extraídas mediante *kit* ZR (Figura 5 y 6). A su vez, el rango de concentración de DNA (ng/μL) obtenido mediante cada método fue de 10 a 70 ng/μL (promedio: 36,3 ng/μL) en las extracciones con C-F y de 28 a 232 ng/μL (promedio: 102,2 ng/μL) en las extracciones con *kit* ZR (Tabla 1 y 2). La comparación de las concentraciones de DNA (ng/μL) obtenidas mediante cada método evidenciaron una diferencia significativa ($p \leq 0,05$), obteniendo con el *kit* comercial mayores concentraciones de DNA en el 95% de las muestras.

DISCUSIÓN

El principal antecedente para esta memoria, proviene del estudio de Muñoz *et al.*, (2011), quienes usando como método de extracción el C-F, detectaron que de una selección de 58 muestras positivas para *Cryptosporidium* a la técnica de ZN, 21 (36%) resultaron negativas al ensayo molecular, lo que se atribuyó a una posible inhibición, degradación o inadecuada extracción del DNA.

Los inhibidores de la PCR interfieren en el proceso de amplificación del DNA, actuando a diferentes niveles, ya sea mediante la degradación o enlace de ácidos nucleicos o a la interacción con iones Mg^{2+} , impidiendo por tanto su unión con cualquier DNA polimerasa (Peist *et al.*, 2001). Se han descrito una gran cantidad de componentes de origen natural, introducidas durante el mismo proceso de la PCR, como inhibidores. De acuerdo a lo anterior, Moreira (1998) señala que diversas secreciones, alimentos, materia orgánica e incluso muestras con altas concentraciones bacterianas, pueden ocasionar una ineficiente amplificación del DNA. Por otro lado, Peist *et al.*, (2001) indican que varios de los solventes químicos que son utilizados en el laboratorio pueden ser inhibidores, entre los que se incluyen cloroformo, EDTA, fenol, etanol, isopropanol, dodecil sulfato de sodio (SDS), acetato y cloruro de sodio.

En el presente estudio, para determinar el efecto de la inhibición en la positividad de la PCR para *Cryptosporidium*, se trabajó con dos métodos de extracción de DNA desde los ooquistes del parásito. La elección de los métodos de extracción se realizó teniendo en cuenta distintos aspectos: material inicial con el que se esté trabajando; ácido nucleico blanco o diana; tipo de organismo a partir del cual se extraerá el ácido nucleico; resultados deseados y uso posterior. En el caso de un agente como *Cryptosporidium*, se deben utilizar métodos que sean capaces de provocar la ruptura de la resistente pared del ooquiste, preservando el ácido nucleico diana. El método C-F, uno de los más conocidos y utilizados para este agente, se caracteriza por requerir una etapa previa de digestión de la muestra con proteinasa K y detergente iónico SDS con el fin de producir digestión de glicoproteínas de la pared y disociación de membranas respectivamente. Las etapas posteriores con cloroformo y fenol tienen por objeto eliminar proteínas, en tanto que para concentrar ácidos nucleicos se lleva a cabo una precipitación con isopropanol. Para finalizar el proceso se realiza el lavado del DNA con etanol. La elección del *kit* ZR se realizó considerando la muestra original (heces) así como por las características de la pared del ooquiste del parásito. En este método, para provocar la ruptura de esta pared, la muestra de heces es sometida a una solución de lisis y esferas de sílice, los que mediante un prolongado vórtex

permiten la interrupción mecánica necesaria para extraer el DNA. Esto último se lleva a cabo mediante la acción de columnas para aislar el DNA que posteriormente es filtrado para eliminar ácidos y/o polifenoles que puedan estar inhibiendo la PCR.

Tanto los componentes de la muestra inicial con la que se trabajó, así como los compuestos utilizados dentro del método C-F, son reconocidos inhibidores de la PCR. Específicamente, en las muestras fecales, se describe una amplia variedad de inhibidores entre los que es posible encontrar a polisacáridos, ácidos húmicos, bilirrubina y sales biliares (Wilson, 1997; Smith, 2008). A su vez, Thornton y Passen (2004) describen como un importante inhibidor al fitato (myoinositol hexafosfato), sustancia que se encuentra de forma natural y en grandes cantidades en el germen y en cutículas de semillas vegetales, y que está presente en altas concentraciones en las heces de los animales herbívoros. La razón por la cual actúan como inhibidores se debe a que exhiben una solubilidad muy similar al DNA, por lo que no son completamente removidos durante el desarrollo de los protocolos clásicos de extracción, quedando como contaminantes en la preparación final (Moreira, 1998). En cuanto a los contaminantes existentes dentro del mismo proceso de extracción se pueden nombrar a los compuestos fenólicos, los que al ser añadidos durante la purificación del DNA, pueden inhibir a la PCR mediante la unión o desnaturalización de la polimerasa (Wilson, 1997). Con respecto a los detergentes iónicos, se describe en ellos un efecto más inhibitorio que los no iónicos y específicamente en el caso del SDS que al utilizarse en etapas iniciales en la extracción del DNA, las cantidades residuales son removidas en las etapas de lavado subsiguientes. Misma situación ocurre con el acetato de sodio, al cual se le describe una disminución de su efecto inhibitorio posterior a la etapa de lavado con etanol 70% (Peist *et al.*, 2001). El etanol e isopropanol también son compuestos comunes utilizados para la extracción del DNA, aún teniéndose en cuenta su participación como sustancias inhibitorias. No obstante, se señala que ambos son removidos al secar el sedimento antes de la resuspensión en agua libre de nucleasas (Demeke y Jenkins, 2010).

De acuerdo a los resultados obtenidos en esta investigación, el método basado en el *kit* ZR es capaz de retener contaminantes provenientes de las heces que estén inhibiendo la PCR, ya que permitió en este estudio, la amplificación de todas las muestras de DNA de *Cryptosporidium*. Considerando que las relaciones de pureza (relación A_{260}/A_{280}) medidas mediante espectrofotómetro, no fueron las óptimas en la mayoría de las muestras procesadas mediante el *kit* ZR, aquello no fue un impedimento para la amplificación del DNA del agente (que se denominará de ahora

en adelante como DNA blanco), lo que sugiere que la técnica pudiese estar reteniendo contaminantes que causen inhibición, permaneciendo en la muestra otros contaminantes que no alteran la PCR. Por otro lado, a partir del método C-F el solo hecho de no haber amplificado el 20% de las muestras, permite sospechar en una inhibición de la PCR ya sea por la presencia de sustancias propias de las heces o bien de alguno de los reactivos utilizados en el protocolo de extracción. Al someter estas muestras a la PCR control de inhibición del gen *cyb* del DNA mitocondrial bovino, con tal de esclarecer la causa de la no amplificación, solo una de las muestras no amplificó a la PCR control de inhibición, confirmándose así que al menos esta muestra se encontraba inhibida. Coincide además, que esta muestra fue la que obtuvo la relación de pureza A_{260}/A_{280} más baja (1,353). En este estudio, la dilución de la muestra inhibida y por consecuencia de los contaminantes, permitió refutar posibles causas de degradación o inadecuada extracción de DNA bovino, al amplificar este DNA a la PCR control de inhibición.

A partir de estos resultados se puede demostrar la importancia de realizar una PCR control de inhibición, para evitar informar falsos negativos. Lo anterior coincide con lo mencionado por Estrada-Chavéz et al., (2004) quienes también proponen amplificar un fragmento de DNA mediante una PCR control como medida para descartar inhibidores. A su vez, Costa (2004) describe como medida recomendable, el introducir controles internos en las reacciones de amplificación con el objetivo de detectar a estas sustancias inhibitorias.

Al existir un alto nivel de coincidencias en el rendimiento de la PCR, no hubo diferencias significativas entre ambos procedimientos de extracción respecto a la inhibición de la PCR, sin embargo, la comparación de las concentraciones de DNA (ng/ μ L) obtenidas mediante espectrofotometría desde ambos métodos de extracción, demostró una diferencia significativa ($p \leq 0,05$). La menor intensidad de las bandas de amplificación de DNA obtenidas mediante el método C-F, podría estar relacionada a la menor concentración de DNA (ng/ μ L) en comparación al *kit* ZR, a partir del cual es posible observar bandas de amplificación más notorias.

Es importante señalar que ambos métodos de extracción difieren notablemente en diversos aspectos como tiempo, dificultad, costos, experiencia del operador y riesgos de contaminación. Sin importar el número de muestras con el que se esté trabajando, para la digestión de la muestra y posterior extracción con C-F se requieren dos jornadas de trabajo de laboratorio, a diferencia del *kit* ZR, que requiere de un tiempo

considerablemente menor (para 8 muestras, necesita de tres horas de trabajo aproximadamente). Esto último está asociado a la baja dificultad del método así como a la experiencia del operador, que es menor a la requerida para el método C-F, donde el riesgo de contaminación es mayor. En cuanto a costos, esta última técnica es más económica, rindiendo para más del doble de las muestras que con respecto al *kit* comercial.

Considerando que si bien no hubo diferencias significativas entre ambos métodos de extracción en cuanto a la inhibición de la PCR, los resultados si sugieren que el método de extracción estaría influyendo en la obtención de DNA de *Cryptosporidium* desde el ooquiste del parásito. La no amplificación mediante PCR de muestras positivas a *Cryptosporidium* a través de ZN, como lo observado en el estudio de Muñoz *et al.*, (2011) se podría deber a una ineficiente digestión de la muestra y por lo tanto una inadecuada ruptura de la pared del ooquiste previo a la extracción con C-F, más que a la inhibición propiamente tal de la PCR. Por esta razón, si el propósito de llevar a cabo una PCR es el diagnóstico de infecciones en bovinos, como las causadas por *Cryptosporidium*, se requiere considerar si los procedimientos utilizados permiten la ruptura o destrucción de la pared del ooquiste del parásito para la posterior extracción de DNA. A su vez estos procedimientos deben conservar en óptimas condiciones el DNA requerido para su amplificación. Es importante determinar si en la etapa de digestión, previa a la extracción con C-F, se está liberando el DNA blanco en la muestra procesada. Es debido a esto que muestras que no amplifican a la PCR deben someterse a una PCR control de inhibición. En este estudio se determinó que muestras positivas a la microscopía bajo método de ZN, fueron negativas a la PCR de la subunidad 18S del gen RNA ribosomal de *Cryptosporidium* spp. pero posteriormente positivas a la PCR control de inhibición, lo que demuestra que la razón se puede deber a la carencia de extracción o de conservación de DNA blanco en dichas muestras. Para efectos de diagnóstico de criptosporidiosis y usando como técnica la PCR, las ocho muestras extraídas mediante C-F que no amplificaron, se habrían informado como negativas. No obstante, utilizando otro método de extracción como lo fue el *kit* comercial, las mismas ocho muestras fueron positivas a la PCR para este parásito.

Diversos aspectos técnicos, así como la complejidad de la extracción del DNA blanco y de los procedimientos de la PCR, deben tenerse en cuenta al momento de realizar diagnóstico molecular de criptosporidiosis. Se debe considerar el no contaminar la muestra con los mismos solventes químicos que se utilizan en el proceso de

extracción y hacer un especial énfasis en el pipeteo de la muestra de DNA previo a la prueba molecular, ya que se trabaja frecuentemente con micro volúmenes.

CONCLUSIÓN

Se concluye que no existen diferencias al comparar la inhibición de la PCR según la extracción de DNA de *Cryptosporidium* spp a partir de los métodos cloroformo-fenol y *kit* comercial ZR Fecal DNA Miniprep de Zymo Research®. De acuerdo a lo anterior los compuestos utilizados en las etapas de digestión y extracción, a pesar de ser reconocidos como inhibidores, no actúan significativamente como tales en la muestra. No obstante, ante la eventualidad de que esto ocurra es propicio realizar una PCR control de inhibición. Esta última demostró que, de acuerdo a los resultados obtenidos, en la mayoría de las muestras que no habían amplificado a la PCR del agente, la causa no era la inhibición sino que más bien un inadecuado tratamiento para exponer el DNA blanco. Cuando se empleó el *kit* comercial como método de extracción, las mismas muestras procesadas amplificaron a la PCR. Lo anterior se podría explicar debido al uso de esferas de sílice, que favorecerían la ruptura de los ooquistes de *Cryptosporidium*.

Al emplear una prueba molecular con fines diagnósticos de criptosporidiosis utilizando cloroformo-fenol como método de extracción de DNA, es preciso considerar a la microscopía como un método de detección complementario que validaría los resultados obtenidos al ensayo molecular.

BIBLIOGRAFÍA

- COSTA, J.** 2004. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) a tiempo real. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.* 22 (5): 299-305.
- DEMEKE, T.; JENKINS, R.** 2010. Influence of DNA extraction methods, PCR inhibitors and quantification methods on real-time PCR assay of biotechnology-derived traits. *Anal. Bioanal. Chem.* 396:1977-1990.
- DÍAZ-LEE, A.; MERCADO, R.; ONUOHA, E.; OZAKI, L.; MUÑOZ, P.; MUÑOZ, V.; MARTÍNEZ, F.; FREDES, F.** 2011. *Cryptosporidium parvum* in diarrheic calves detected by microscopy and identified by immunochromatographic and molecular methods. *Vet. Parasitol.* 176: 139-144.
- ESTRADA-CHÁVEZ, C.; DÍAZ, F.; ARRIAGA, C.; VILLEGAS-SEPÚLVEDA, N.; PÉREZ, R.; GONZALEZ, D.** 2004. Concordancia de la PCR y métodos rutinarios para el diagnóstico de tuberculosis bovina. *Vet. Mex.* 35 (3): 225-236.
- FAYER, R.** 2008. General Biology. In: *Cryptosporidium* and Cryptosporidiosis 2nd ed. CRC Press. Florida, USA. pp. 1-35.
- MOREIRA, D.** 1998. Efficient removal of PCR inhibitors using agarose-embedded DNA preparations. *Nucleic Acids Res.* 26 (13): 3309-3310.
- MUÑOZ, P.; FREDES, F.; DÍAZ-LEE, A.; MERCADO, R.; OZAKI, L.** 2011. Detección de *Cryptosporidium* spp. en terneras de lecherías de la Región Metropolitana mediante Ziehl Neelsen y confirmada por inmunocromatografía y ensayo molecular. *Arch. Med. Vet* 43: 111-116.
- PEIST, R.; HONSEL, D.; TWIELING, G.; LOFFERT, D.** 2001. PCR inhibitors in plant DNA preparations. *Qiagen news* 3:7-9.
- SMITH, H.; NICHOLS, R.; GRIMASON, M.** 2005. *Cryptosporidium* excystation and invasion: getting the guts of the matter. *Trends. Parasitol.* 21:133-142.
- SMITH, H.** 2008. Diagnostics In: Fayer. R y Xiao. L (Eds.). *Cryptosporidium* and Cryptosporidiosis. 2nd ed. CRC Press. Florida, USA. pp. 174-203.
- THORNTON, CG.; PASSEN, S.** 2004. Inhibition of PCR amplification by phytic acid, and treatment of bovine fecal specimens with phytase to reduce inhibition. (Abstract). *J. Microbiol. Methods.* 59 (1):43.

TOMÁS-SÁBADO, J. 2009. Fundamentos de bioestadística y análisis de datos para enfermería. 1ªed. Barcelona, España. pp. 89-92.

WILSON, IG. 1997. Inhibition and facilitation of nucleic acid amplification. Applied and Environmental Microbiology. 63 (10): 3741-3751.

XIAO, L.; FAYER, R.; RYAN, U.; UPTON, S. 2004. *Cryptosporidium* Taxonomy: Recent advances and implications for public health. Clin. Microbiol. Rev. 17 (1): 72-97.

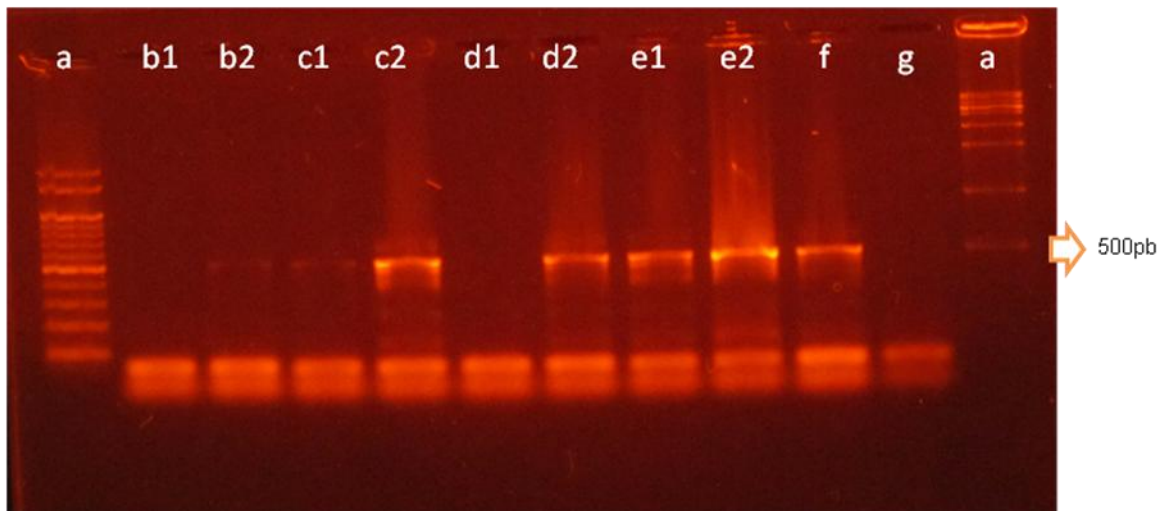


Figura 1: Electroforesis en gel de agarosa de ocho productos PCR para la detección del gen 18S rRNA de *Cryptosporidium* en muestras de heces de terneras diarreicas sometidas a diferentes métodos de extracción: cloroformo-fenol y *kit* ZR Fecal DNA Miniprep, Zymo Research® (C-F y *kit* ZR respectivamente). Los productos se ven amplificados en bandas de 520 pb aproximadamente. **a:** marcador molecular. **b1; c1; d1; e1:** muestras extraída mediante C-F. **b2; c2; d2; e2:** misma muestra extraída mediante *kit* ZR. **f:** control positivo (muestra de heces positiva a *Cryptosporidium* spp). **g:** control negativo (muestra de heces negativa a *Cryptosporidium* spp). Como se aprecia en la figura, las muestras b1 y d1 no amplificaron.

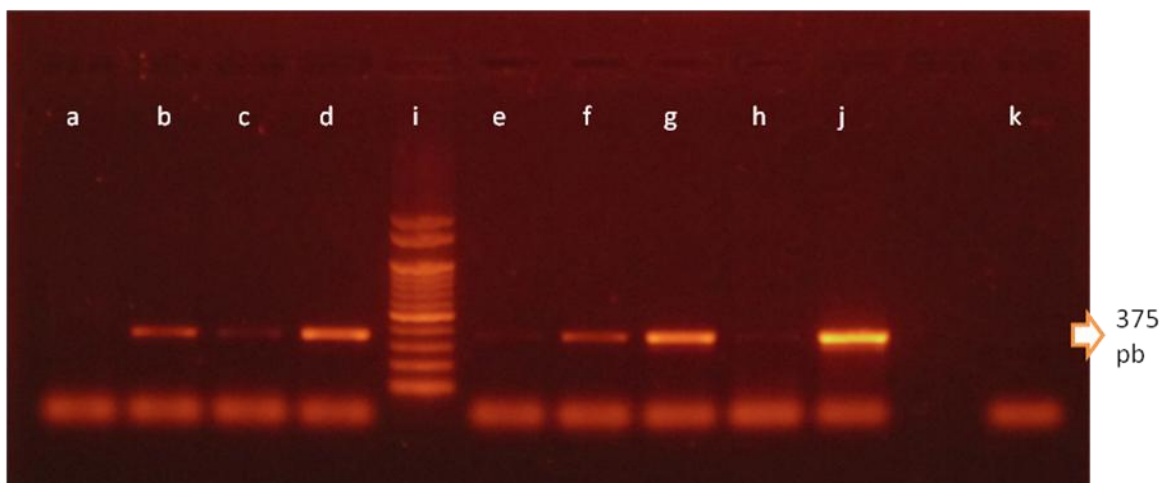


Figura 2: Electroforesis en gel de agarosa de los productos de PCR para la detección del gen *cytb* del DNA mitocondrial bovino en muestras extraídas mediante C-F que previamente no habían amplificado a la PCR para la detección del gen 18S rRNA de *Cryptosporidium* spp. Los productos se ven amplificados en bandas de 375pb

aproximadamente. **a; b; c; d; e; f; g; h:** muestras extraídas mediante C-F. **i:** marcador molecular. **j:** control positivo. **k:** control agua.

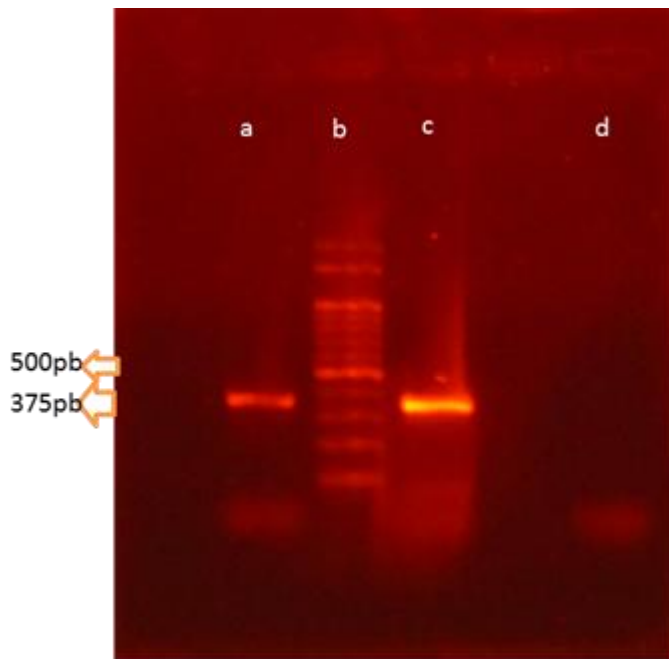


Figura 3: Electroforesis en gel de agarosa de los productos de PCR para la detección del gen *cyb* del DNA mitocondrial bovino, luego de la dilución de la muestra extraída mediante C-F que no había amplificado inicialmente a esta PCR control de inhibición. Los productos se ven amplificados en bandas de 375pb aproximadamente. **a:** muestra diluida. **b:** marcador molecular. **c:** control positivo. **d:** control agua. Como se aprecia en la imagen, los inhibidores se diluyeron permitiendo la amplificación del DNA bovino.

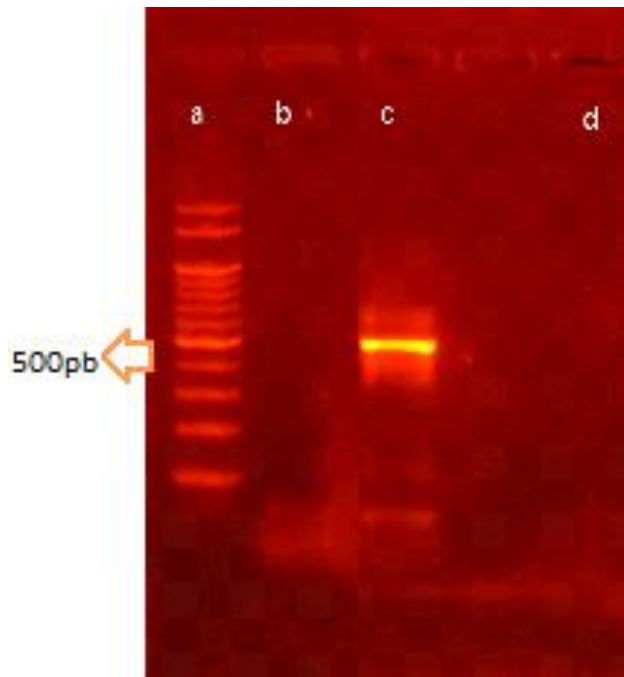


Figura 4: Electroforesis en gel de agarosa de los productos de PCR para la detección del gen 18S rRNA de *Cryptosporidium*, luego de la dilución de la muestra extraída mediante C-F que no había amplificado inicialmente a la PCR control de inhibición. Los productos se ven amplificados en bandas de 520pb aproximadamente. **a:** marcador molecular. **b:** muestra diluida. **c:** control positivo (muestra de heces positiva a *Cryptosporidium* spp). **d:** control negativo (muestra de heces negativa a *Cryptosporidium* spp).

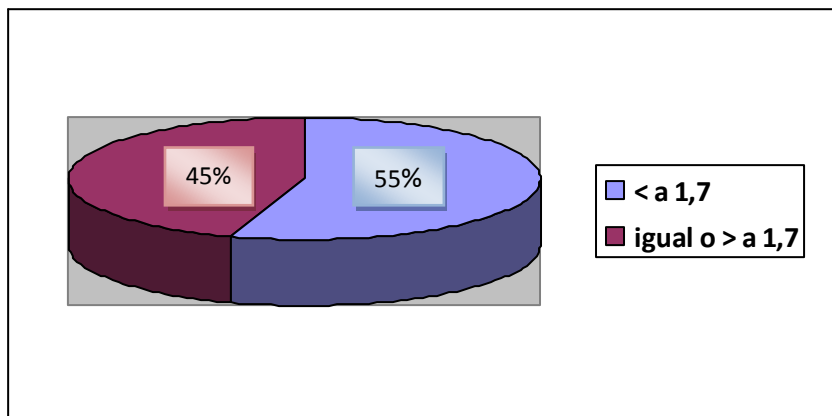


Figura 5: Porcentaje de muestras de DNA de *Cryptosporidium* extraídas mediante método cloroformo-fenol que presentaron una relación $A_{260/280}$ inferior a 1,7 versus las que presentaron una relación igual o superior a 1,7.

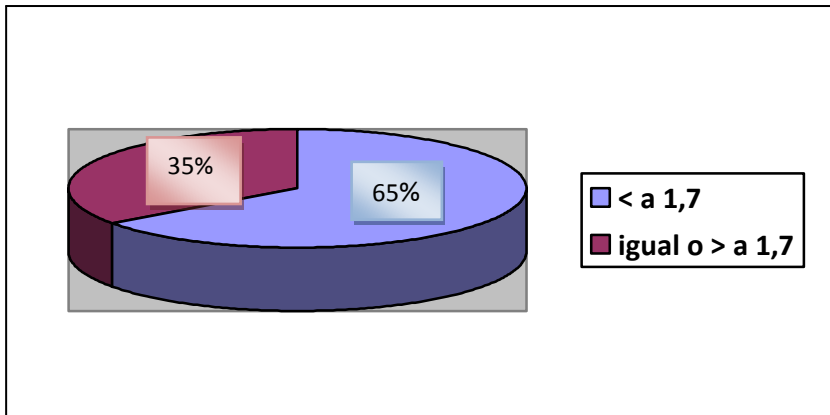


Figura 6: Porcentaje de muestras de DNA de *Cryptosporidium* extraídas mediante *kit* ZR Fecal DNA Miniprep, Zymo Research® que presentaron una relación $A_{260/280}$ inferior a 1,7 versus las que presentaron una relación igual o superior a 1,7.

Tabla 1: Resultados espectrofotometría de las muestras de DNA de *Cryptosporidium* extraídas mediante método cloroformo-fenol.

Nº Muestra	Relación A260/ 280	Concentración ng/uL	Relación A260/A230
13	1,500	45	0,200
24	1,692	55	0,087
26	1,800	23	0,450
29	2,000	10	0,400
35	1,800	23	0,333
52	1,800	23	0,209
54	1,357	48	0,594
64	1,625	32	0,116
68	1,667	25	0,312
70	1,571	28	0,478
81	1,667	50	0,351
84	2,000	15	0,250
90	2,000	30	0,750
102	2,500	13	1,000
105	1,800	23	0,692
111	1,375	28	0,611
114	1,500	38	0,375
115	1,615	53	0,344
116	1,467	55	0,550
117	1,769	58	0,219
137	1,625	32	0,481
139	2,000	20	0,471
149	2,000	30	0,600
150	1,625	32	0,619
153	1,700	43	0,500
154	1,545	43	0,680
161	1,667	38	0,536
165	1,500	53	0,429
166	1,750	35	0,500
168	1,625	32	0,765
169	1,400	53	0,362
171	2,000	25	0,714
172	1,474	70	0,438
173	1,444	65	0,433
187	2,000	25	1,000
191	1,667	38	0,517
194	2,000	30	0,800
198	1,750	35	0,700
199	1,600	40	0,457
201	1,875	38	0,938

Tabla 2: Resultados espectrofotometría de las muestras de DNA de *Cryptosporidium* extraídas mediante *kit* ZR Fecal DNA Miniprep, Zymo Research®.

Nº Muestra	Relación A260/ 280	Concentración ng/uL	Relación A260/A230
13	2,125	43	0,066
24	1,742	135	0,192
26	1,625	65	0,433
29	2,167	32	0,333
35	1,375	28	0,379
52	1,333	190	0,514
54	1,462	48	0,422
64	1,533	115	0,474
68	0,976	102	0,471
70	1,889	128	0,607
81	1,294	55	0,468
84	1,800	113	0,511
90	1,500	68	0,435
102	1,300	195	0,538
105	1,321	185	0,532
111	1,333	190	0,531
114	1,524	80	0,485
115	1,525	153	0,508
116	1,525	153	0,517
117	1,842	88	0,449
137	1,576	232	0,505
139	1,618	222	0,500
149	1,800	45	0,500
150	2,625	53	0,488
153	3,000	45	0,474
154	2,714	48	0,487
161	1,815	123	0,510
165	1,821	128	0,510
166	1,793	130	0,525
168	1,429	50	0,500
169	1,667	50	0,500
171	1,320	82	0,418
172	1,773	65	0,591
173	1,688	68	0,614
187	1,375	110	0,550
191	1,400	105	0,525
194	1,333	110	0,530
198	1,303	108	0,512
199	1,524	80	0,471
201	1,556	70	0,436