

BM-6

EXTRACCIÓN DE ADN E IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE PROTOZOARIOS
PATÓGENOS EN MUESTRAS DE AGUA

Muñiz-Salazar R, Baptista-Rosas RC, Sánchez-Brambila CH, Salas-Vargas DS, Radilla-Chávez P, Arreola-Cruz A. Laboratorio de Epidemiología Molecular, Escuela de Ciencias de la Salud, Universidad Autónoma de Baja California. Ensenada, B.C. Blvd. Zertuche y Blvd. de los Lagos s/n. Fracc. Valle Dorado. C.P. 22890, Ensenada, B.C. Correo electrónico: ramusal@uabc.mx

Palabras claves: Extracción ADN, protozooario, PCR.

Introducción: Protozoarios parásitos como *Cyclospora cayetanensis*, *Cryptosporidium parvum* y otras microsporidias han sido reportadas como patógenos humanos emergentes en los últimos años, causando desde diarreas autolimitantes hasta enfermedades crónicas dependiendo del sistema inmune del individuo. Existe evidencia que fuentes de agua son el primer factor para la transmisión, así como también frutas y alimentos contaminados. El diagnóstico de laboratorio para estos parásitos se basan en la identificación morfológica por examen directo en fresco de materia fecal, preparaciones teñidas, y observación microscópica. Sin embargo, el uso de estas técnicas requiera de la observación de un experto. Recientemente se han desarrollado técnicas de biología molecular para la identificación de estos patógenos con alta sensibilidad.¹⁻³ Un problema para la detección morfológica o molecular es la concentración de los organismos a partir de la muestra ya sea de agua o fecal.

Objetivo: Optimizar un método de extracción de ADN a partir de muestras concentradas por el método de floculación para identificación molecular de protozoarios patógenos en muestras de agua.

Metodología: Se colectaron 4 L de agua de cuatro localidades diferentes en la ciudad de Ensenada, B.C. 1) Arroyo el Gallo, 2) Arroyo los Españoles, 3) Arroyo Aguajito, 4) Presa Emilio López Zamora (ELZ). Las muestras se transportaron al Laboratorio de Epidemiología Molecular de la Escuela de Ciencias de la Salud. Para concentrar los ooquistes se utilizó el método de floculación⁴ con modificaciones. De cada localidad se tomaron 3 alícuotas de 1L, agregando 10 mL de CaCl₂, 10 mL de NaHCO₃ y ajustando pH 10. Las alícuotas se analizaron con diferentes tiempos de floculación, 4, 6 y 12 h a temperatura ambiente. Se eliminó el sobrenadante y se agregó 1M HCl para disolver los floculos. Se centrifugó a 4,000 rpm 15 min, eliminando el sobrenadante y conservando los pellets formados. Para la extracción de DNA, se siguió el método CTAB/PVP⁵ con modificaciones. Se agregó 2000 µL de CTAB/PVP, 16 µL de β-mercaptoetanol, 20 µL de Proteasa E y 6 µL de ARNasa, se agitó en vortex y se incubó a 56°C por 2 horas en agitación. Se agregó 1000 µL de cloroformo:alcohol isoamílico 24:1, se agitó en vortex 15 min, se centrifugó 15 min a 5000 rpm y se transfirió el sobrenadante a un tubo nuevo. Se agregó 0.7 volúmenes de isopropanol y se dejó toda la noche a -20 °C. Se centrifugó a 13,000 rpm por 30 min. se descartó el sobrenadante y los pellets de ADN se lavaron con etanol 80 % y se conservaron en 1X TE. Se corrió un gel de 1.4 % de agarosa para verificar la cantidad y calidad del ADN. La identificación molecular se realizó utilizando los primers F1-R2B³ para amplificar el gen 18S rARN de *Cyclospora*, *Eimeria* y *Cryptosporidium*. Se utilizaron primers especí-

ficos para identificar *C. cayetanensis* (CC719-CRP999), *C. cercopithecii*, *C. colobi*, *C. paipnis* (PDCL661-CRP999), *Eimeria* spp. (ESSP841-CRP999) y *C. parvum* (CPB-DIAGF) descritos por^{1,2}. Los productos se visualizaron un gel de 1.4 % de agarosa.

Resultados: Se logró optimizar el método de concentración de ooquistes, determinándose que con 6 h de floculación se logró extraer la mayor concentración de ADN (850 ng/µL) en comparación con 4 h (60 ng/µL) y a 12 h (380 ng) en las muestras de agua. Por otro lado, se observó que el tiempo de 12 h, el ADN extraído resultó estar degradado. Se logró identificar la presencia de *C. cayetanensis* y de *Eimeria* spp. en la localidad de la Presa ELZ.

Discusión: *C. cayetanensis* es un patógeno parásito humano emergente que ha estado asociado con la contaminación de fuentes de agua y de parásitos. Los resultados de este trabajo demuestran que se puede extraer ADN de calidad de microsporidias en muestras de agua, el cual puede ser utilizado para su identificación molecular.

Conclusiones: La optimización del método de concentración de ooquistes por floculación, demostró que 6 h es el tiempo óptimo para obtener ADN de calidad el cual puede ser utilizado para realizar identificación molecular por reacción en cadena de la polimerasa.

Agradecimientos: A los alumnos de Servicio Social del Programa de Parasitología Molecular de la Esc. de Cs. de la Salud: Guzmán-Lemus A, Nuñez-Baptista MJ, Escalante-Díaz I, Perea-Jacobo R, Castañeda-Ramírez E.

REFERENCIAS

1. Orlandi PA, Carter L, Brinker AM and da Silva AJ. Targeting Single-Nucleotide Polymorphisms in the 18S rRNA Gene to Differentiate *Cyclospora* Species from *Eimeria* Species by Multiplex PCR. *App Env Micro*. 2003; 69: 4806-13.
2. Orlandi PA, Lampel KA. Extraction-free, filter-based template preparation for the rapid and sensitive PCR detection of pathogenic parasitic protozoa. *J Clin Microbiol*. 2000; 38: 2271-77.
3. Yoder KE, Sethabutr O, Relman DA. PCR-based detection of the intestinal pathogen *Cyclospora*. In Persing DH: *PCR protocols for emerging infectious diseases, a supplement to diagnostic molecular microbiology: principles and applications*. Washington, D.C.: ASM Press; 1996.p. 169-76.
4. Vesey G, Slade JS, Byrne M, Shepherd MK, Fricker CR. A new method for the concentration of *Cryptosporidium* oocysts from water. *J App Bact*. 1993; 75: 82-6.
5. Muñiz-Salazar R, Talbot SL, Sage GK, Ward DH, Cabello-Pasini A. Population genetic structure of annual and perennial populations of *Zostera marina* L. along the Pacific coast of Baja California and the Gulf of California. *Mol Ecol*. 2005; 14: 711-22.