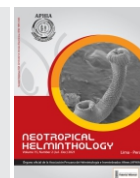




Neotropical Helminthology



ORIGINAL ARTICLE / ARTÍCULO ORIGINAL

STANDARDIZATION OF THE PCR TECHNIQUE FOR THE DETECTION OF THE ITS-1 SEQUENCE OF *NECATOR AMERICANUS* (STILES, 1902) AND CLONING OF THE PRODUCT FOR USE AS A CONTROL

ESTANDARIZACIÓN DE LA TÉCNICA DE PCR PARA LA DETECCIÓN DE LA SECUENCIA ITS1 DE *NECATOR AMERICANUS* (STILES, 1902) Y CLONACIÓN DEL PRODUCTO PARA SU USO COMO CONTROL

Alberto Frango-Ramos¹; Ronaldo Delgado¹; Emily Catalano-Donaire¹; Jhon Jesús-Arzapalo²; Renzo Nino Incani-Cotognini²; María Jesús Perteguer-Prieto³ & Elizabeth Ferrer-Jesús^{1*}

¹Instituto de Investigaciones Biomédicas “Dr. Francisco J. Triana Alonso” (BIOMED) y Departamento de Parasitología, Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad de Carabobo Sede Aragua, Venezuela.

²Departamento de Parasitología, Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad de Carabobo Sede Carabobo, Venezuela.

³Instituto de Salud Carlos III, Centro Nacional de Microbiología, Servicio de Parasitología, Majadahonda, Madrid, España.

Alberto Frango-Ramos: <https://orcid.org/0000-0002-8301-8374>

Ronaldo Delgado: <https://orcid.org/0000-0001-6585-0573>

Emily Catalano-Donaire: <https://orcid.org/0000-0002-6580-2077>

Jhon Jesús-Arzapalo: <https://orcid.org/0000-0003-1805-8289>

Renzo Nino Incani-Cotognini: <https://orcid.org/0000-0001-8709-8108>

María Jesús Perteguer-Prieto: <https://orcid.org/0000-0002-7533-5134>

Elizabeth Ferrer-Jesús: <https://orcid.org/0000-0002-4173-6642>

*Corresponding author: E-mail: elizabeth.ferrer@gmail.com

ABSTRACT

Hookworm is generally caused by *Necator americanus* (Stiles, 1902), causing digestive symptoms and anemia. The diagnosis by coprology can have low sensitivity, especially in light parasite loads. The Polymerase Chain Reaction (PCR) is a sensitive and specific technique, which must be adapted to laboratory conditions and positive controls are necessary. The objective of this work was the standardization of the PCR technique for the amplification of the ITS-1 sequence of *N. americanus* in stool samples and its cloning for its use as a control. Three DNA extraction protocols were standardized (Phenol/chloroform, Saline Precipitation, and Chelex® 100 Resin). Optimal reagent concentrations (MgCl₂, BSA, dNTP, primers, and Taq polymerase) were determined, as well as the hybridization temperature and number of cycles. The analytical sensitivity and specificity of the technique was determined. For cloning, the ITS-1 sequence amplified by PCR was purified and ligated with the vector pGEM-T-Easy. Competent *E. coli* XL1Blue MRF⁺ cells were transformed with the ligation mixture (pGEM-T-easy-Na-ITS1), recombinant colonies were identified and plasmid DNA was extracted from them. The best DNA extraction protocol was phenol / chloroform, the optimal conditions for PCR were;

1.5 mM MgCl₂, 0.5 mg/mL BSA, 100 μM dNTP, 0.6 μM primers, and 1 U *Taq* polymerase, 56 °C hybridization temperature and 40 cycles. The optimal amounts of reagents were less than the amounts used by other authors, allowing saving of reagents. 100% specificity and an analytical sensitivity of 10 pg of DNA (extracted from stool samples), and 10 ag of the plasmid (with the cloned sequence) were obtained, which worked very well as positive control.

Keywords: Cloning – Diagnosis – ITS-1 – *Necator americanus* – PCR – Standardization

RESUMEN

La anquilostomiasis generalmente se produce por *Necator americanus* (Stiles, 1902), y ocasiona síntomas digestivos y anemia. El diagnóstico por coprología tiene sensibilidad baja en las cargas parasitarias leves. La Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) es una técnica sensible y específica, que debe ser adaptada a las condiciones de laboratorio, donde se necesitan controles positivos. El objetivo de este trabajo fue la estandarización de la técnica de PCR para la amplificación de la secuencia ITS-1 de *N. americanus* en muestras de heces y su clonación para el uso como control. Se estandarizaron tres protocolos de extracción de ADN (Fenol/cloroformo, Precipitación salina, y Resina Chelex® 100). Se determinaron las concentraciones óptimas de reactivos (MgCl₂, BSA, dNTP, cebadores, y *Taq* polimerasa), así como, la temperatura de hibridación y número de ciclos. Se determinó la sensibilidad y especificidad analítica de la técnica. Para la clonación, la secuencia ITS-1 amplificada por PCR, se purificó y se ligó con el vector pGEM-T-Easy. Se transformaron células competentes *E. coli* XL1Blue MRF' con la mezcla de ligación (pGEM-T-easy-Na-ITS1), se identificaron las colonias recombinantes y luego se extrajo el ADN plasmídico. El mejor protocolo de extracción de ADN fue el fenol/cloroformo, las condiciones óptimas de la PCR fueron; MgCl₂ 1,5 mM, BSA 0,5 mg/mL, dNTP 100 μM, cebadores 0,6 μM, y *Taq* polimerasa 1 U, 56 °C de temperatura de hibridación y 40 ciclos. Las cantidades óptimas determinadas de los reactivos permitieron ahorro de los mismos. Se obtuvo 100% de especificidad y una sensibilidad analítica de 10 pg de ADN (extraído de muestras de heces) y 10 ag del plásmido (con la secuencia clonada), que funcionó como control positivo.

Palabras clave: Clonación – Diagnóstico – Estandarización – ITS-1 – *Necator americanus* – PCR

INTRODUCTION

La anquilostomiasis es una geohelminthiasis producida principalmente por las especies *Necator americanus* (Stiles, 1902) y *Ancylostoma duodenale* (Dubini, 1843). Se estima que existen alrededor de 500 M de personas infectadas por anquilostomídeos en todo el mundo, donde estos parásitos causan una pérdida de 3,2 M de años de vida ajustados por discapacidad anualmente (Mourão-Dias-Magalhães *et al.*, 2021; WHO, 2020). En la República Bolivariana de Venezuela, no existen datos recientes oficiales sobre infección por anquilostomídeos; sin embargo, algunos estudios demuestran su presencia en poblaciones diversas con prevalencias que van desde 9 hasta 72% siendo *N. americanus* la especie

predominante (Verhagen *et al.*, 2013; Uzcátegui *et al.*, 2016; Incani *et al.*, 2017).

Los huevos del parásito se desarrollan en el suelo y liberan larvas que maduran hasta transformarse en su forma infectante, que pueden penetrar la piel, migrar y evolucionar hasta alcanzar su hábitat en el intestino (Haldeman *et al.*, 2020). Aunque, se pueden producir síntomas digestivos y afectar el estado nutricional, el daño principal se produce por la pérdida de sangre debido a la succión y hemorragia, lo que puede causar anemia, cuando las cargas parasitarias son altas. Debido a esto, se ha reportado retardo en el crecimiento y déficit cognitivo en niños, capacidad reducida para el trabajo en adultos y una variedad de complicaciones en el embarazo (Verhagen *et al.*, 2013; Haldeman *et al.*, 2020; WHO, 2020).

En cuanto al diagnóstico, las técnicas parasitológicas son económicas y de fácil empleo, pero son poco sensibles, especialmente, cuando las cargas parasitarias son bajas. Las técnicas inmunológicas se ven afectadas por reacciones cruzadas, disminuyendo su especificidad y suelen ser poco sensibles debido a la baja respuesta inmunológica del hospedador (Incani *et al.*, 2017). El uso de pruebas moleculares basadas en la amplificación de ADN, como la PCR, son útiles en el diagnóstico por su alta sensibilidad y especificidad y permiten un diagnóstico especie-específico (Dacal *et al.*, 2020). Para la detección de ADN de *N. americanus* han sido usadas varias dianas de amplificación, entre ellas los espaciadores transcritos internos 1 y 2 (ITS-1 e ITS-2, del inglés "Internal Transcribed Spacer" 1 y 2) que demuestran buenos índices diagnósticos (Verweij *et al.*, 2007; Basuni *et al.*, 2011; Phuphisut *et al.*, 2014).

Para la adecuada utilización de toda técnica de PCR, se requiere una previa estandarización para obtener las condiciones óptimas de reacción de cada laboratorio (Ferrer *et al.*, 2015; Romero *et al.*, 2018). Por otro lado, para la técnica se requieren controles positivos, tradicionalmente obtenidos a partir de muestras de heces de pacientes, que son muy variables en cuanto a presencia y cantidad de sustancias que pudiesen ser inhibidoras de la PCR. La tecnología del ADN recombinante permite la clonación de diversas secuencias que posteriormente se pueden utilizar como controles positivos (Camacho *et al.*, 2016; Pacheco *et al.*, 2019). El objetivo de este trabajo fue la estandarización de la técnica de PCR para la amplificación de la secuencia ITS-1 de *N. americanus* en muestras de heces y la clonación de la misma para su uso como control.

MATERIALES Y MÉTODOS

Muestras biológicas

Se empleó, como fuente de ADN del parásito, muestras de heces de pacientes diagnosticados por la identificación de huevos de anquilostomídeos, detectados por coprología, utilizando las técnicas directas con solución salina y lugol, Kato y Kato-Katz, (n=40), para la estandarización y evaluación

de la sensibilidad analítica de la PCR. Asimismo, también se determinó la sensibilidad analítica a partir de ADN plasmídico con el producto de PCR clonado.

Para la determinación de la especificidad analítica de la PCR se utilizaron muestras de ADN de otros helmintos parásitos tales como: *Ascaris lumbricoides* Linnaeus, 1758, *Toxocara canis* Werner, 1782, *Schistosoma mansoni* Sambon, 1907, *Fasciola hepatica* Linnaeus, 1761, *Taenia solium* Linnaeus, 1758 y *Taenia saginata* Goeze, 1782. Además, se empleó ADN de protozoarios (*Trypanosoma cruzi* Chagas, 1909, *Leishmania chagasi* Cunha & Chagas, 1937 y *Toxoplasma gondii* (Nicolle & Manceaux, 1908) y ADN humano.

Técnicas de extracción de ADN

Se colocó 300 µL de una suspensión de heces (con huevos del parásito) en tubos de 1,5 mL, se les agregó 300 µL de tampón de lisis (Tris-HCL 50 mM pH 8, EDTA 10 mM pH 8, SDS 1%, Polivinilpirrolidona 2%) y se mezcló. Posteriormente se añadieron 5 µL de Proteínasa K (20 mg/mL) a cada tubo y se incubó a 55 °C durante 4 h. Se centrifugaron a 14.000 rpm por 15 min, y los sobrenadantes se trasvasaron a tubos nuevos para continuar la extracción, tanto por la técnica del uso de solventes orgánicos (Fenol/Cloroformo), como por la técnica de precipitación salina, ambas descritas por Sambrook & Russell (2001). Por otro lado, también se realizó la extracción usando la resina Chelex®100 (BioRad, USA), para lo cual; se colocó 300 µL de una suspensión de heces en un tubo de 1,5 mL, se añadió 300 µL de tampón de lisis (Tris-HCl 50 mM pH 8, EDTA 10 mM pH 8, SDS 1% Polivinilpirrolidona 2%), 200 µL de Chelex-100® (BioRad, USA) al 5% y 2,5 µL de proteínasa K (20 mg/mL) (Pierce, USA), para continuar la extracción según las instrucciones del fabricante.

Electroforesis de ADN

La electroforesis de ADN fue realizada de acuerdo con el procedimiento descrito por Sambrook & Russell (2001), con las modificaciones descritas por Romero *et al.* (2018).

Estandarización de la PCR para la detección de la secuencia ITS-1 de *N. americanus*

La PCR para la amplificación de la secuencia del

espaciador intergénico 1 (ITS-1, del inglés, Intergenic Transcribed Spacer) del ADN ribosomal de *N. americanus* se realizó, usando muestras de ADN extraídas de heces con huevos del parásito. Las reacciones de amplificación fueron realizadas según Phuphisut *et al.* (2014) empleando los cebadores; directo, Na-ITS1-D 5'-ATGCTTGGCAAGAGTCGTTT-3' y el reverso, Na-ITS1-R 5'-TGTTGGCGTCCACACATATT-3' (Sigma, USA), variando las concentraciones de los diferentes reactivos y las condiciones del programa de PCR, para obtener el producto de PCR esperado de 330 pb de *N. americanus*. Para la estandarización de la técnica se estudiaron las siguientes condiciones:

Cantidad de ADN:

Para obtener las cantidades de ADN a evaluar [100 nanogramos (ng), 10 ng, 1 ng, 100 picogramos (pg), 10 pg, 1 pg, 100 femtogramos (fg), 10 fg, 1 fg] se realizaron diluciones de la mezcla de los ADN extraídos de las muestras de heces con huevos de anquilostomídeos.

Concentración de reactivos:

Cloruro de Magnesio (Mg₂Cl) (Promega, USA), se evaluaron las concentraciones de 1 mM, 1,5 mM, 2 mM y 2,5 mM. Albúmina sérica bovina ó BSA (del inglés, *Bovine Serum Albumin*), se probaron las concentraciones de 0,5 mg/mL, 1 mg/mL, 1,5 mg/mL y 2 mg/mL). Desoxinucleótidos tri-fosfato (dNTPs) (Promega, USA), se analizaron las concentraciones de 100 µM, 150 µM, 200 µM y 250 µM. Cebadores, se estudiaron las concentraciones de 0,2 µM, 0,4 µM, 0,6 µM y 0,8 µM. *Taq* ADN polimerasa (Promega, USA), se utilizaron las cantidades de 0,5 U, 0,75 U, 1 U y 1,25 U.

Condiciones (temperatura de hibridación y número de ciclos) del Programa de amplificación:

Las condiciones ensayadas fueron la desnaturalización inicial a 95 °C por 5 min, y 30/35/40 ciclos de los procesos de: desnaturalización (95 °C, 40 seg), hibridación (50/53/56 °C, 30 seg) y extensión (72° C, 1 min). Finalizando con una extensión a 72°C por 5 min. La PCR se llevó a cabo en un termociclador C1000 Thermal Cycler (BioRad, USA). Se incluyó controles negativos (mezcla de reactivos sin ADN) y controles positivos (ADN del parásito). Los productos de PCR fueron visualizados en geles de

agarosa al 2 % y el tamaño de las bandas obtenidas, fue comparado con el tamaño de las bandas de los marcadores moleculares.

Determinación de la sensibilidad analítica y la especificidad de la PCR

Se hicieron curvas de titulación con diferentes cantidades de ADN (de 100 ng a 1 fg), para determinar la sensibilidad analítica (menor cantidad de ADN en la que se obtiene amplificación). La especificidad se determinó utilizando ADN humano, y de diferentes helmintos y protozoarios parásitos (*A. lumbricoides*, *T. canis*, *S. mansoni*, *F. hepatica*, *T. solium*, *T. saginata*, *T. cruzi*, *L. chagasi* y *T. gondii*).

Purificación de los productos de PCR

Las bandas de ADN obtenidas fueron cortadas del gel y purificadas utilizando el estuche comercial Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega Corporation, Madison, Wisconsin, USA) siguiendo las indicaciones del fabricante.

Formación de los ADN recombinantes

Los productos de PCR purificados se ligaron con el vector pGEM®-T Easy utilizando 1 U de ADN ligasa de T4. Se empleó una relación plásmido-inserto de 1:5 y 1:10. La incubación se realizó a 4 °C durante 12 h.

Preparación y transformación de células competentes *E. coli* XL1-Blue MRF'

Las células competentes *E. coli* XL1Blue se prepararon según el protocolo descrito por Pacheco *et al.* (2019). Posteriormente, a alícuotas de 200 µL de células competentes se les agregaron las mezclas de ligación para transformarlas mediante choque térmico (30 min 4°C, 90 seg 42 °C, 2 min 4 °C). Se agregó 800 µL de medio Luria Bertani (LB) precalentado a 42 °C. Los tubos se incubaron a 37°C, 200 rpm durante 1 h y se sembraron 200 µL de las células transformadas en placas de LB agar-Ampicilina (100 µg/mL), las cuales se incubaron a 37°C durante 12 h, para posteriormente observar el crecimiento de las colonias.

Identificación de las colonias recombinantes mediante PCR de colonias

Una pequeña porción de cada colonia se colocó en 25 µL de mezcla de reacción para PCR, empleando los cebadores del vector y las condiciones de reacción determinadas como óptimas en la

estandarización. El resultado se evidenció por electroforesis en gel de agarosa como se mencionó anteriormente.

Extracción del ADN plasmídico de las colonias recombinantes y su uso como control positivo en la PCR estandarizada.

Las colonias que dieron positivas a la PCR se cultivaron en medio LB con ampicilina (100 µg/mL) para la extracción del ADN plasmídico (ADNp), según el protocolo descrito por Pacheco *et al.* (2019). Posteriormente, se realizó la PCR con las condiciones de reacción determinadas como óptimas en la estandarización y utilizando como ADN molde 1 µL de los ADN plasmídicos obtenidos. El resultado se analizó en geles de agarosa de la forma mencionada anteriormente.

Aspectos éticos

El proyecto fue aprobado por el Comité de Bioética del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la Universidad de Carabobo (BIOMED-UC), siguiendo los “Lineamientos Operativos de los Comités de Ética que Revisan la Investigación Biomédica (TDR/PRD /ETHICS/2000.1). Se firmó un consentimiento informado por escrito por parte de los participantes y de los padres o tutores (en el caso de los niños) para la obtención de muestras de heces siguiendo pautas éticas, en el que todos firmaron estar de acuerdo en que el remanente de sus muestras de heces se usara para fines de investigación.

RESULTADOS

Extracción de ADN

En cuanto a los procedimientos de extracción de ADN, se hicieron a partir de 40 muestras de heces de pacientes infectados por anquilostomídeos detectados mediante coprología, con las técnicas directas con solución salina y lugol, Kato y Kato-Katz (las muestras tenían desde 20 hasta 560 huevos/g de heces). Se evaluó cantidad, pureza e integridad del ADN de cada extracción. En comparación con las técnicas de precipitación salina y resina Chelex 100[®] se observó que con la técnica Fenol-Cloroformo se obtuvo una mayor cantidad, mejor grado de pureza y una mejor integridad del ADN, ya que se observó poca degradación y ADN de gran tamaño, mientras que

con la técnica de precipitación salina se obtuvo ADN en poca cantidad y mediante la extracción con resina Chelex 100[®] se obtuvo ADN de poca pureza y muy degradado (Datos no mostrados).

Estandarización de la Técnica de PCR

En la estandarización de la PCR para amplificar la secuencia ITS-1 de *N. americanus* se usó como molde el ADN extraído a partir de la técnica Fenol-Cloroformo (se hizo una mezcla de las muestras de ADN para tener una muestra homogénea y en suficiente cantidad para toda la estandarización y clonación).

Para la determinación de la concentración óptima del cloruro de magnesio (MgCl₂), se obtuvieron bandas del tamaño esperado, nítidas y bien definidas para las concentraciones 1,5 mM, 2 mM y 2,5 mM (Figura 1A), a diferencia de la concentración de 1mM donde la banda es tenue. Para los ensayos posteriores se decidió usar la concentración de 1,5 mM. En la estandarización de la concentración óptima de BSA, se obtuvieron bandas nítidas para la concentración de 0,5 mg/mL, siendo esta la concentración óptima, en comparación con las concentraciones de 1 mg/mL; 1,5 mg/mL y 2 mg/mL donde se observaron bandas poco definidas (Figura 1B).

Para la estandarización de los dNTPs se observó mejor amplificación para la concentración de 100 µM, a diferencia de las bandas observadas en las concentraciones de 150 µM, 200 µM y 250 µM, con amplificación incipiente (Figura 1C). En cuanto a la concentración de cebadores, usando 0,6 µM se obtuvieron las bandas bien definidas, intensas, siendo esta la concentración óptima para la PCR. Por el contrario, para las concentraciones 0,2 µM y 0,4 µM las bandas fueron tenues, mientras que no hubo amplificación a 0,8 µM (Figura 2A). Para la estandarización de la *Taq* polimerasa se obtuvieron bandas poco definidas para 0,5 U; 0,75 U y 1,25 U, observándose mejor amplificación para 1 U, siendo esta la concentración a usar para la PCR (Figura 2B).

En la estandarización de la temperatura de hibridación se obtuvieron bandas óptimas a 53 °C, en comparación con las bandas observadas a las temperaturas de 50 °C y 56 °C (Figura 2C). Para la estandarización del número de ciclos, las mejores bandas se observaron con 40 ciclos, ya que se

evidencia bandas tenues a 35 ciclos, mientras que para 30 ciclos no hubo amplificación (Figura 2D).

Determinación de la sensibilidad y especificidad de la técnica de PCR estandarizada

Una vez estandarizada la técnica de PCR, se determinó la sensibilidad y especificidad analítica empleado las condiciones óptimas obtenidas. La sensibilidad analítica se evaluó a partir de diferentes cantidades de ADN extraído de las

muestras de heces de pacientes infectados por anquilostomídeos, siendo la concentración mínima de ADN que produjo amplificación de 10 pg, el equivalente a dos huevos del parásito, aproximadamente (Pilotte *et al.*, 2016) (Figura 3A). Al realizar una PCR para la secuencia ITS-1 de *N. americanus* usando como muestras ADN de *N. americanus* y otros parásitos relacionados, así como ADN humano, se obtuvo una especificidad analítica del 100% (Figura 3B).

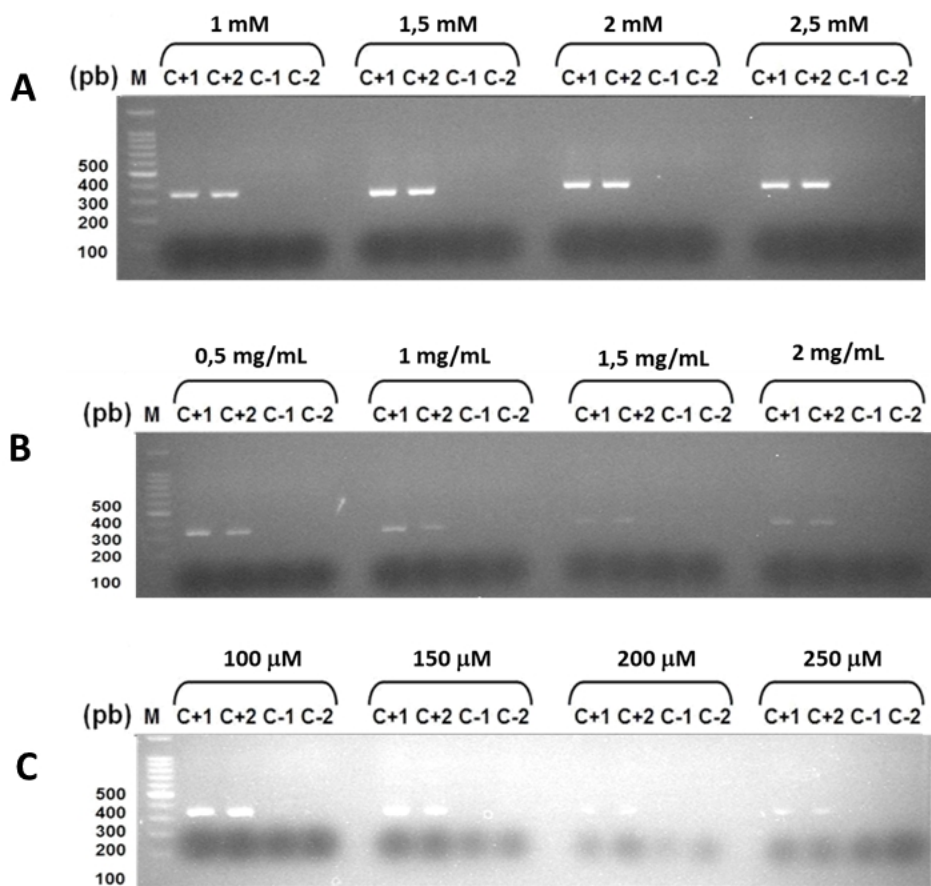


Figura 1. Electroforesis en gel de agarosa de la amplificación de ADN de *N. americanus* en muestras controles. (A) Evaluación de las concentraciones de MgCl₂, (B) Evaluación de las concentraciones de BSA (C) Evaluación de las concentraciones de dNTPs. (M) Marcador de tamaño molecular 100 pb plus DNA ladder, Promega. (C+1) Control positivo 1 y (C+2) Control positivo 2, ADN de muestras de heces de pacientes con huevos de anquilostomídeos. (C-1) Control negativo 1 y (C-2) Control negativo 2, mezclas de reacción sin ADN.

Clonación de la secuencia ITS-1 de *N. americanus*

Se realizó la purificación del producto de PCR ITS-1 de *N. americanus* (330 pb) para su clonación, una vez purificado el producto, se observó su calidad en gel de agarosa al 2% (Figura 3C). Posteriormente se realizó la ligación con el vector pGEM-T-Easy, la cual fue exitosa, al igual que la transformación de las células competentes, ya que crecieron 10 colonias. Al verificar la presencia del inserto por PCR de colonias, se observó la banda del tamaño esperado (aproximadamente 500 pb, correspondiente a la suma de 330 pb del inserto y

170 pb de la secuencia del sitio de policlonaje del vector, ya que se emplearon los cebadores del vector), en 8 de ellas, mientras que en las 2 colonias restantes, en una se obtuvo un producto de amplificación de un tamaño menor y en la otra no hubo amplificación, indicando que no poseían la secuencia ITS1 insertada (Figura 3D). Se extrajo ADN plasmídico de las ocho colonias recombinantes, y se utilizó el ADN plasmídico para determinar la sensibilidad analítica de la PCR estandarizada y se obtuvo una sensibilidad analítica de 10 attogramos (ag) (Figura 3E).

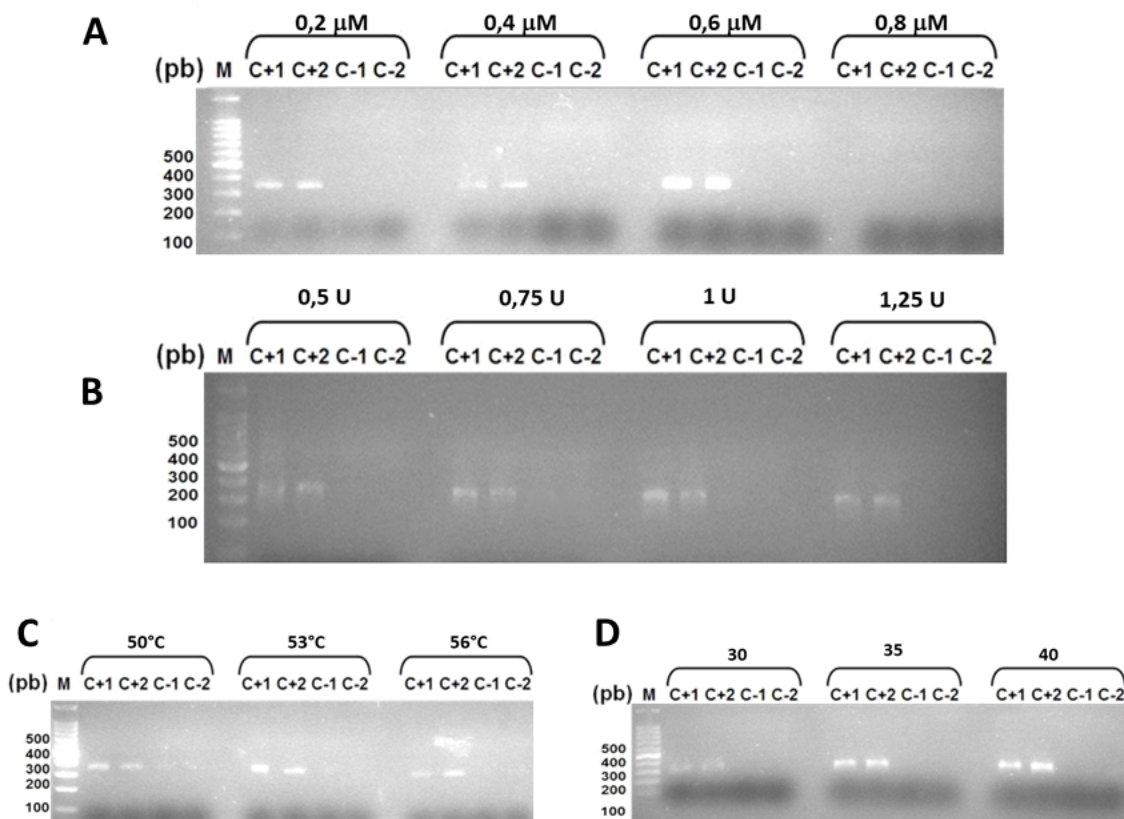


Figura 2. Electroforesis en gel de agarosa de la amplificación de ADN de *N. americanus* en muestras controles. (A) Evaluación de las concentraciones de Cebadores. (B) Evaluación de las concentraciones de *Taq* polimerasa. (C) Evaluación de la temperatura de hibridación. (D) Evaluación del número de ciclos. (M) Marcador de tamaño molecular 100 pb plus DNA ladder, Promega. (C+1) Control positivo 1 y (C+2) Control positivo 2, ADN de muestras de heces de pacientes con huevos de anquilostomídeos. (C-1) Control negativo 1 y (C-2) Control negativo 2, mezclas de reacción sin ADN.

Detección de ADN de *N. americanus* en muestras de heces de pacientes infectados mediante la técnica de PCR estandarizada

Se utilizaron los ADN plasmídicos extraídos en la PCR estandarizada para el diagnóstico de la secuencia ITS-1 de *N. americanus*. Nuevamente se obtuvo las bandas diagnósticas características que

presentaban el fragmento del tamaño esperado, tanto para el ADN extraído de muestras de heces de pacientes infectados por anquilostomídeos, como para las diluciones 1/100, 1/1000 y 1/10000 de los controles positivos (Plásmidos pGEM-T-Easy-ITS1).

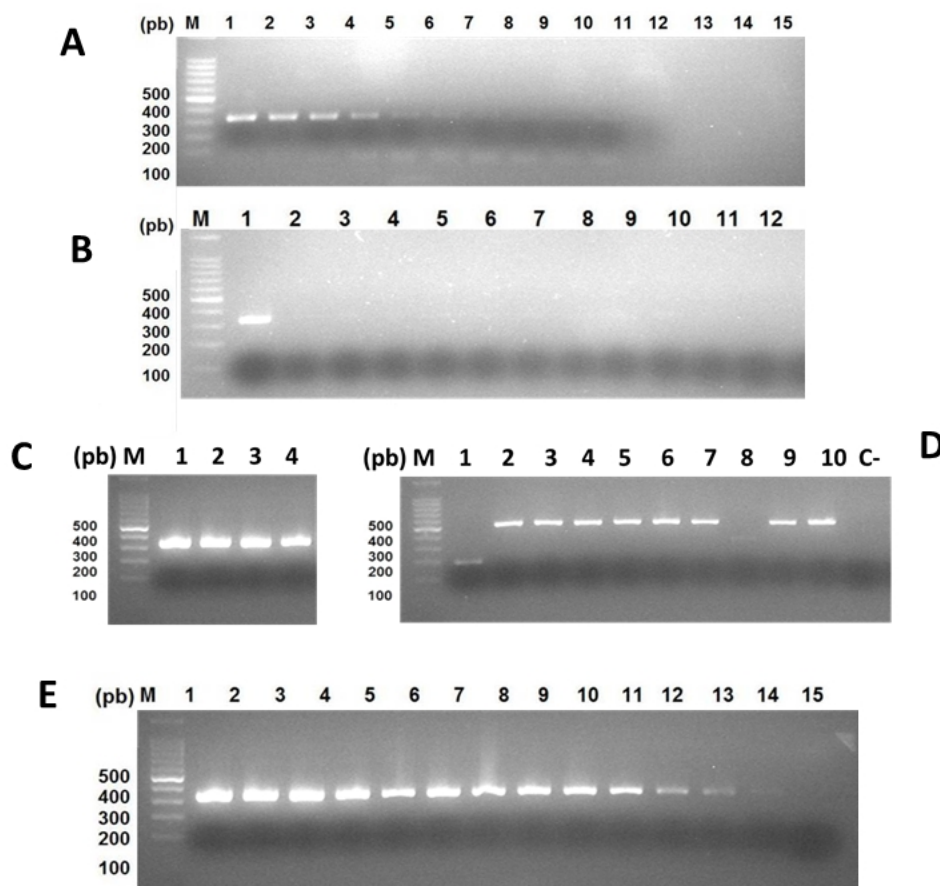


Figura 3. Electroforesis en gel de agarosa de la amplificación de ADN de *N. americanus*. (A) Sensibilidad analítica de la técnica de PCR utilizando muestras de heces de pacientes con huevos de anquilostomídeos. (1-9): Concentración de ADN; 100 ng, 10 ng, 1 ng, 100 μ g, 10 μ g, 1 μ g, 100 fg, 10 fg, 1 fg, (10) control negativo. (B) Especificidad de la técnica de PCR usando muestras de ADN de diferentes fuentes (1) *Necator americanus*, (2) *Ascaris lumbricoides*, (3) *Toxocara canis* (4) *Schistosoma mansoni*, (5) *Fasciola hepatica*, (6) *Taenia solium*, (7) *Taenia saginata*, (8) *Trypanosoma cruzi*, (9) *Leishmania chagasi*, (10) *Toxoplasma gondii* (11) *Homo sapiens*, (12) Control negativo. (C) ADN purificado a partir de gel. (D) PCR de las colonias recombinantes. (E) Sensibilidad analítica de la técnica de PCR utilizando la secuencia clonada. (M) Marcador de tamaño molecular 100 pb plus DNA ladder, Promega. (1-14): Concentración de ADN; 1 μ g, 100 ng, 10 ng, 1 ng, 100 μ g, 10 μ g, 1 μ g, 100 fg, 10 fg, 1 fg, 100 ag, 10 at, 1 ag, (15) control negativo.

DISCUSIÓN

A nivel mundial, las técnicas coprológicas para el diagnóstico de anquilostomiasis son las más utilizadas; sin embargo, presentan baja sensibilidad, especialmente en los casos de infecciones ligeras, donde al haber menor cantidad de huevos en las heces, hay menos probabilidad de detectarlos por las técnicas coprológicas. Asimismo, las técnicas inmunológicas presentan una baja especificidad debido a reacciones cruzadas con otros parásitos relacionados. Una alternativa son los ensayos de PCR, donde múltiples investigaciones demuestran que es una técnica que presenta una mayor sensibilidad que las técnicas coprológicas y mayor especificidad que las técnicas inmunológicas (Wang *et al.*, 2012; Arndt *et al.*, 2013; Dacal *et al.*, 2020).

El aislamiento de ADN de alta calidad es esencial para realizar un buen diagnóstico mediante la técnica de PCR, ya que cualquier análisis basado en el ADN requiere una previa extracción, de ahí a que la optimización de una técnica donde se obtenga ADN puro e íntegro sea importante (Mikaeili *et al.*, 2013; Ayana *et al.*, 2019).

Las extracciones de ADN, de las muestras de heces, con Fenol-Cloroformo, proporcionó mayor calidad y cantidad de ADN en comparación con las otras técnicas, estos resultados concuerdan con lo reportado por Incani *et al.* (2017) en un trabajo de PCR en Tiempo Real, donde las extracciones de ADN a partir de heces, se realizaron por la técnica de Fenol-Cloroformo. Mediante la técnica de precipitación salina se obtuvo menor cantidad de ADN con degradación media, mientras que con Chelex®100 se obtuvo ADN en mayor proporción, pero degradado y contaminado con proteínas y otros elementos orgánicos; así mismo, la naturaleza de la muestra de heces es un factor importante, debido a que presenta gran variabilidad y muchas sustancias que pueden causar interferencia en las técnicas de PCR (Bosch *et al.*, 2005; Paul *et al.*, 2020; Mthethwa *et al.*, 2021).

Los estudios en general recomiendan la utilización de otras técnicas de extracción debido a que el fenol es una sustancia que se oxida con rapidez, produciendo vapores tóxicos (Ferrer *et al.*, 2008; Ayana *et al.*, 2019, Mthethwa *et al.*, 2021). Sin

embargo, mediante Fenol-Cloroformo se obtuvo menor degradación en comparación con las otras técnicas, además de que la calidad del ADN extraído permitió obtener fragmentos de gran tamaño, favorables para lograr una buena amplificación de la secuencia ITS-1 de *N. americanus*. Por ende, para la estandarización de la técnica de PCR se usó el ADN extraído mediante la técnica de Fenol-Cloroformo.

Es importante que para la técnica de PCR exista una previa estandarización, adaptación y evaluación, ya que dependiendo del laboratorio varían las condiciones de reacción, marcas de los reactivos y equipos (Nguí *et al.*, 2012; Phosuk *et al.*, 2013; Phuphisut *et al.*, 2014; Incani *et al.*, 2017). Para la estandarización de la técnica de PCR para la amplificación de la secuencia ITS-1 de *N. americanus* se variaron las concentraciones de los diferentes reactivos, temperaturas de hibridación y número de ciclos, con lo cual se logró obtener las condiciones óptimas de la reacción.

En cuanto a la concentración de MgCl₂, se obtuvo en el presente trabajo que la concentración óptima es de 1,5 mM, mientras que fueron mayores para Nguí *et al.* (2012), Phosuk *et al.* (2013) y Phuphisut *et al.* (2014), las cuales fueron de 2,5 mM, 1,8 mM y 2 mM, respectivamente. En la presente investigación, se decidió usar la concentración de 1,5 mM, ya que las bandas obtenidas con 1,5 mM, 2 mM y 2,5 mM fueron muy similares y al no haber diferencias en los resultados de las tres concentraciones y usar la menor cantidad de reactivo, se ahorra y se disminuyen, a su vez, los costos del ensayo. Por otro lado, en las reacciones de amplificación siempre es mejor usar la concentración necesaria, porque mientras menos moléculas sobrantes, menos interferencia y se da mejor la reacción (Sambrook & Russel, 2001).

La concentración de BSA óptima fue de 0,5 mg/mL, menor que la obtenida por Incani *et al.* (2017) de 8 mg/mL, que empleó mayor concentración del reactivo respecto a la presente investigación. El BSA cumple la función de bloquear posibles contaminantes que estén presentes en las muestras de ADN, pero al ser una proteína, su exceso en el medio de la reacción, podría también afectar la actividad de la ADN polimerasa (Garland *et al.*, 2010), de allí la importancia de determinar su concentración

óptima para cada sistema en particular.

Por otra parte, la mejor concentración obtenida para dNTPs fue de 100 μ M, menor que la utilizada por Ngui *et al.* (2012), Phosuk *et al.* (2013) y Phuphisut *et al.* (2014) que fue de 250 μ M, 200 μ M y 400 μ M. En cuanto a la concentración de cebadores se obtuvo que 0,6 μ M fue la óptima para la amplificación, mientras que Sato *et al.* (2010) y Wang *et al.* (2012) emplearon 0,8 μ M. La mejor concentración obtenida de Taq polimerasa fue de 1 U, mientras que para Phuphisut *et al.* (2014) fue de 1,25 U, empleando mayor cantidad de enzima, lo cual puede deberse a las diferentes marcas comerciales empleadas, que pudiesen tener mayor o menor actividad. Las concentraciones óptimas de los diferentes reactivos de la PCR, obtenidas en el presente trabajo, fueron en menor proporción que las empleadas en los otros estudios, lo que permite ahorro de los mismos, disminuyendo el costo de la técnica.

En cuanto a la temperatura de hibridación la óptima fue de 53 °C, mientras que, para Wang *et al.* (2012) y Hung *et al.* (2016) fue de 56 °C y 55 °C, respectivamente. Se obtuvo que 40 ciclos es lo óptimo, con respecto a Wang *et al.* (2012) no hubo variación, mientras que, para Sato *et al.* (2010) y Basuni *et al.* (2011) fue de 45 y 50 ciclos respectivamente. Es muy importante determinar estas condiciones debido a las diferentes marcas de termocicladores, que puede alcanzar los cambios de temperatura con mayor o menor rapidez y esto afecta estos parámetros. El presente caso, al ser menor el número de ciclos, reduce el tiempo empleado en el desarrollo de la técnica.

Con respecto a la sensibilidad analítica de la técnica de PCR para la amplificación de la secuencia ITS-1 de *N. americanus*, se ensayó un rango que fue de 100 ng (nanogramos) a 1 fg. Al utilizar muestras de heces de pacientes que contenían huevos de anquilostomídeos, la mínima cantidad de material genético amplificado fue de 10 pg, lo equivalente aproximadamente a dos huevos del parásito (Pilotte *et al.*, 2016). Estos resultados concuerdan con las investigaciones realizadas por Monti *et al.* (1998), Verweij *et al.* (2001), y Phuphisut *et al.* (2014) quienes obtuvieron resultados similares, demostrando que la diana ITS1 es muy sensible para el diagnóstico de *N. americanus*.

De igual manera, también se determinó la sensibilidad analítica utilizando el producto de PCR de *N. americanus* clonado (plásmido pGEM-T-easy-ITS1), en este caso la sensibilidad del ensayo fue de 10 ag (equivalente a la millonésima parte de un huevo del parásito), siendo un millón de veces más sensible. Esta diferencia tan grande se debe a que en el ADN plasmídico extraído todas las moléculas contienen la secuencia ITS1 de *N. americanus*, mientras que en el ADN extraído a partir de muestras de heces hay ADN de células epiteliales descamadas, de bacterias y de todos los microorganismos que pudiesen estar en las heces, con lo cual una mínima cantidad correspondería a *N. americanus*, en caso de estar presente. El rendimiento de la secuencia clonada permite su uso para evaluar una gran cantidad de muestras, lo cual es un gran ahorro, evitando extracciones frecuentes de ADN a partir de heces para tener controles disponibles para los ensayos. Otro aspecto importante que representa mayor ventaja es la reproducibilidad, al ser una muestra homogénea (secuencia clonada), evita la variabilidad por las interferencias que pudiesen estar causadas por diversos componentes de las heces que pueden estar en menor o mayor proporción.

Los resultados de los ensayos utilizando ADN de otros parásitos relacionados y ADN humano demostraron que la técnica posee una especificidad del 100%, ya que sólo hubo amplificación para la secuencia ITS-1 de *N. americanus*, al igual que lo demostrado por otros investigadores (Monti *et al.*, 1998; Verweij *et al.*, 2001; Sato *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2012; Phuphisut *et al.*, 2014) quienes obtuvieron resultados similares, demostrado ser una diana muy específica. Aunque la especificidad era ya conocida por reportes previos, siempre es importante verificarla por la posible variabilidad genética que pudiese estar presente en diferentes áreas geográficas.

La técnica de PCR estandarizada en la presente investigación permite identificar pequeñas cantidades de material genético de *N. americanus*, por lo que la PCR es una herramienta valiosa y de utilidad para el diagnóstico molecular de la anquilostomiasis.

Tanto para la estandarización, validación y uso de técnicas moleculares se requiere el uso de controles positivos, los cuales son un elemento esencial en la

interpretación de los resultados. Estos controles positivos pueden ser obtenidos a partir de heces de individuos parasitados, sin embargo, puede haber gran variabilidad por presencia de interferentes en las muestras, afectado la reproducibilidad del ensayo. Por ello, la tecnología de ADN recombinante es una alternativa útil, que permite clonar secuencias específicas del genoma de diferentes organismos, que posteriormente se pueden utilizar como controles en el diagnóstico molecular (Chan *et al.*, 2016). Al respecto, se han clonado secuencias para el diagnóstico de virus (Acevedo *et al.*, 2009; Camacho *et al.*, 2016; Navarrete *et al.*, 2016), bacterias (Sohni *et al.*, 2008; Gokduman *et al.*, 2016) y parásitos (Pacheco *et al.*, 2019).

Otro aspecto relevante a destacar en la presente investigación, es la clonación de la secuencia ITS-1 de *N. americanus* en el plásmido pGEM®-T-Easy que es un vector que permite la clonación directa de productos de PCR, estrategia sencilla, que puede ser verificada mediante PCR de las colonias recombinantes, como ha sido descrito por otros autores (Camacho *et al.*, 2016; Pacheco *et al.*, 2019).

Los plásmidos recombinantes se probaron en los ensayos de la PCR estandarizada obteniéndose una buena amplificación en todos los casos, lo que significa que el producto clonado puede ser usado como control positivo de manera exitosa, además de obtener un suministro constante de material genético del parásito lo que mejora la reproducibilidad de la técnica.

Los resultados obtenidos demuestran que la PCR estandarizada es sensible y específica, y que los controles positivos funcionan adecuadamente. Cabe destacar que es la primera vez que se reporta en Venezuela la estandarización de una técnica molecular para la identificación de *N. americanus*. La PCR estandarizada puede ser empleada en laboratorios de referencia, así como en los programas de control que se realicen en el país.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue financiado por los Proyectos DIPISA-PG-2017-004, Universidad de Carabobo,

Venezuela y Proyecto PI17CIII/00019 del Instituto de Salud Carlos III, Madrid, España. Agradecimiento a la Fundación "Tierra Blanca", Valencia Venezuela, y a la Lcda. Nayeska Méndez, por su colaboración para la obtención de las muestras.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ayana, M, Cools, P, Mekonnen, Z, Biruksew, A, Dana, D, Rashwan, N, Prichard, R, Vlaminc, J, Verweij, JJ & Levecke, B. 2019. *Comparison of four DNA extraction and three preservation protocols for the molecular detection and quantification of soil-transmitted helminths in stool*. PLoS Neglected Tropical Diseases, vol.13, e0007778.
- Acevedo, AM, Santana, E, Díaz de Arce, H, Pérez, LJ, Caballero, A, Suárez, L & Sánchez, O. 2009. *Desarrollo de controles positivos para métodos moleculares de detección de virus de influenza aviar*. Revista Salud Animal, vol. 31, pp. 50-54.
- Arndt, M, John, G, Richardson, B, Singa, B., Van Lieshout, L., Verweij J, Sangaré, LR, Mbogo, LW, Naulikha, JM, Walson, JL. 2013. *Impact of helminth diagnostic test performance on estimation of risk factors and outcomes in HIV-positive adults*. PLoS One, vol. 8, e81915.
- Basuni, M, Muhi, J, Othman, N, Verweij, JJ, Ahmad, M, Noorizan, M, Rahumatullah, A, Abdul Aziz, F, Shazalina Zainudin, N & Noordin, R. 2011. *A Pentaplex Real-Time Polymerase Chain Reaction assay for detection of four species of soil-transmitted helminths*. The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, vol. 84, pp. 338-343.
- Bosch, M., Marmi, J., Ferrando, A., López-Giraldez, F., Andrés, O., García, E, Ponsà, M, Kellermann, T, Guallar, B, Bisbal, F & Domingo-Roura, X. 2005. *Genotipar sin capturar*. Galemys, vol.17, pp.102.
- Camacho, D, Reyes, J, Franco, L, Comach, G & Ferrer, E. 2016. *Clonación de secuencias de alfavirus y flavivirus para su uso como controles positivos en el diagnóstico*

- molecular*. Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Publica, vol. 33, pp. 269-273.
- Chan, M, Jiang, B, Tan, TY. 2016. *Using Pooled Recombinant Plasmids as Control Materials for Diagnostic Real-Time PCR*. Clinical Laboratory, vol. 62, pp.1893-1901.
- Dacal, E, Köster, PC & Carmena, D. 2020. *Diagnóstico molecular de parasitosis intestinales*. Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica, vol. 38, pp. 24-31.
- Ferrer, E, Da Conceição, F, Campioli, P, Rivera, MG, López, M, Lares, M, Medina, M, Morocoima, A & Herrera, L. 2008. *Estandarización de técnicas moleculares para la identificación y caracterización de Trypanosoma cruzi*. VI Congreso de Investigación, Universidad de Carabobo. Valencia, Venezuela. Tomo I. pp. 363-367.
- Ferrer, E., Pérez, F., Bello, I., Bolívar, A., Lares, M., Osorio, A., León L, Amarista M & Incani, RN. 2015. *Polymerase chain reaction for the amplification of the 121-bp repetitive sequence of Schistosoma mansoni: a highly sensitive potential diagnostic tool for areas of low endemicity*. Journal of Helminthology, vol. 89, pp. 769-773.
- Garland, S, Baker, A, Phillott, AD & Skerratt, LF. 2010. *BSA reduces inhibition in a TaqMan assay for the detection of Batrachochytrium dendrobatidis*. Diseases of aquatic organisms, vol. 92, pp.113-116.
- Gokduman, K, Avsaroglu, MD, Cakiris, A, Ustek, D & Gurakan, GC. 2016. *Recombinant plasmid-based quantitative Real-Time PCR analysis of Salmonella enterica serotypes and its application to milk samples*. Journal of Microbiological Methods, vol. 122, pp. 50-58.
- Haldeman, MS, Nolan, MS & Ng'habi, KRN. 2020. *Human hookworm infection: Is effective control possible? A review of hookworm control efforts and future directions*. Acta Tropica, vol. 201, pp. 105214.
- Hung, B, Van De, N & Le Van Duyet, J. 2016. *Prevalence of soil-transmitted helminths and molecular clarification of hookworm species in ethnic Ede primary schoolchildren in Dak Lak province, southern Vietnam*. The Korean Journal of Parasitology, vol. 54, pp. 471-476.
- Incani, R, Ferrer, E, Hoek, D, Ramak, R, Roelfseman, J, Mughini-Gras, L, Kortbeek, T & Pinelli E. 2017. *Diagnosis of intestinal parasites in a rural community of Venezuela: advantages and disadvantages of using microscopy or RT-PCR*. Acta Tropica, vol. 167, pp. 64-70.
- Mikaeili, F, Kia, E, Sharbatkhori, M, Sharifdini, M, Jalalizand, N, Heidari, Z, Zarei, Z, Stensvold, CR & Mirhendi H. 2013. *Comparison of six simple methods for extracting ribosomal and mitochondrial DNA from Toxocara and Toxascaris nematodes*. Experimental Parasitology, vol. 134, pp. 155-159.
- Monti, J, Chilton, N, Bao-Zhen, Q & Gasser, R. 1998. *Specific amplification of Necator americanus or Ancylostoma duodenale DNA by PCR using markers in ITS-1 rDNA, and its implications*. Molecular and Cellular Probes, vol. 12, pp. 71-78.
- Mourão-Dias-Magalhães, L, Silva-Araújo-Passos, L, Toshio-Fujiwara, R & Lacerda-Bueno, L. 2021. *Immunopathology and modulation induced by hookworms: From understanding to intervention*. Parasite Immunology, vol. 43, e12798.
- Mthethwa, NP, Amoah, ID, Reddy, P, Bux, F & Kumari, S. 2021. *A review on application of next-generation sequencing methods for profiling of protozoan parasites in water: Current methodologies, challenges, and perspectives*. Journal of Microbiological Methods. vol.187, 106269.
- Navarrete-Castro, J, Martínez-Rodríguez, M, Siria-Torreblanca, N & Calderón-Rodríguez, GM. 2004. *Clonación de una secuencia representativa de la región no traducible 5' (5'-UTR) del virus de la hepatitis C*. Bioquímica, vol. 29, pp. 11-17.
- Ngui, R, Ching, L, Kai, T, Roslan, M & Lim, Y. 2012. *Molecular Identification of Human Hookworm Infections in Economically Disadvantaged Communities in Peninsular Malaysia*. The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, vol. 86, pp. 837-842.
- Pacheco, C, Ferrer, E & Herrera, F. 2019. *Clonación de secuencias de Plasmodium para su uso como controles en el diagnóstico molecular*. Revista Saber UDO, vol. 31, pp.

- 363-371.
- Paul, R, Ostermann, E & Wei, Q. 2020. *Advances in point-of-care nucleic acid extraction technologies for rapid diagnosis of human and plant diseases*. Biosensors & bioelectronics, vol.169, 112592.
- Phosuk, I, Intapan, P, Thanchomnang, T, Sanpool, O, Janwan, P, Laummaunwai, P, Aamnart, W, Morakote N & Maleewong W. 2013. *Molecular detection of Ancylostoma duodenale, Ancylostoma ceylanicum, and Necator americanus in humans in northeastern and southern Thailand*. The Korean Journal of Parasitology, vol. 51, pp. 747-749.
- Phuphisut, O, Yoonuan, T, Sanguankiat, S, Chaisiri, K, Maipanich, W & Pubampen, S. 2014. *Triplex polymerase chain reaction assay for detection of major soil-transmitted helminths, Ascaris lumbricoides, Trichuris trichiura, Necator americanus, in fecal samples*. Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health, vol. 45, pp. 267-275.
- Pilotte, N, Papaikovou, M, Grant, JR, Bierwert, LA, Llewellyn, S, McCarthy, JS & Williams, SA. 2016. *Improved PCR-based detection of soil transmitted helminth infections using a next-generation sequencing approach to assay design*. PLoS Neglected Tropical Diseases, vol.10, e0004578.
- Romero, A, Romero, A, Lares, M, Catalano, E, Martínez, M & Ferrer, E. 2018. *Estandarización de la técnica de PCR para la detección de ADN de Toxocara canis en muestras de tierra*. Neotropical Helminthology, vol. 12, pp. 9-20.
- Sambrook, J & Russel, D. 2001. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 3^a ed. Cold Spring Harbor, New York.
- Sato, M, Sanguankiat, S, Yoonuan, T, Pongvongsa, T, Keomoungkhoun, M, Phimmayoi, I, Boupa, B, Moji, K & Waikagul J. 2010. *Copro-molecular identification of infections with hookworm eggs in rural Lao PDR*. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene, vol. 104, pp. 617-622.
- Sohni, Y, Kanjilal, S & Kapur, V. 2008. *Cloning and development of synthetic internal amplification control for Bacillus anthracis real-time polymerase chain reaction assays*. Diagnostic Microbiology and Infectious Disease, vol. 61, pp. 471-475.
- Uzcátegui, Y, Cordero, A, Blanco, Y, Amaya, I & Requena, I. 2016. *Anquilostomosis en niños de una comunidad indígena del estado Bolívar, Venezuela*. VITAE Academia Biomédica Digital, vol. 65, pp. 1-12.
- Verhagen, L, Incani, R, Franco, C, Ugarte, A, Cadenas, Y, Sierra, C, Hermans, PWM, Hoek, D, Campos Ponce, M, de Waard, JH & Elena Pinelli. 2013. *High Malnutrition Rate in Venezuelan Yanomami compared to Warao Amerindians and Creoles: significant associations with intestinal parasites and anemia*. PLoS ONE, vol. 8, pp. 1-12.
- Verweij, J, Pit, D, Van Lieshout, L, Baeta, S, Dery, G, Gasser, R & Polderman AM. 2001. *Determining the prevalence of Oesophagostomum bifurcum and Necator americanus infections using specific PCR amplification of DNA from faecal samples*. Tropical Medicine & International Health, vol. 6, pp. 726-731.
- Verweij, J, Brienen, E, Ziem, J, Yelifari, L, Polderman, A & Van Lieshout, L. 2007. *Simultaneous detection and quantification of Ancylostoma duodenale, Necator americanus, and Oesophagostomum bifurcum in fecal samples using multiplex real-time PCR*. The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, vol. 77, pp. 685-690.
- Wang, J, Pan, C & Cui, L. 2012. *Application of a real-time PCR method for detecting and monitoring hookworm Necator americanus infections in Southern China*. Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine, vol. 2, pp. 925-929.
- World Health Organization (WHO). 2020. *Soil-transmitted helminth infections*. Fact sheet, Geneva. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/soil-transmitted-helminth-infections>

Receive June 17, 2021.
Accepted July 30, 2021.