

Comparación de métodos de extracción de ADN para mejorar el diagnóstico molecular de *Cryptosporidium* sp. en materia fecal de terneros

*Comparison of DNA extraction methods to improve the molecular diagnosis of *Cryptosporidium* spp. from fecal samples of calves*

Jonathan Toledo¹, Joaquín Lombardelli^{2,4}, Roxana Galarza⁵, Karina Tiranti^{2,4}, Carlos J. Garro³, Mónica Florin-Christensen^{1,2,3}, Leonhard Schnittger^{1,2,3}, Mariela L. Tomazic^{2,3}

¹Facultad de Ciencias Exactas, Químicas y Naturales, Universidad de Morón; ²CONICET, Buenos Aires, Argentina, ³Instituto de Patobiología, CICVyA, INTA, Hurlingham, Argentina, ⁴Departamento de Patología Animal, Facultad de Agronomía y Veterinaria, Universidad Nacional de Río Cuarto, Argentina; ⁵EEA-Rafaela, INTA, Rafaela, Prov. de Santa Fe, Argentina.

Manuscrito recibido: 31 de julio de 2017; aceptado para publicación: 25 de octubre de 2018

Contacto: Dr. Leonhard Schnittger. Instituto de Patobiología, CICVyA, INTA, 1686 Hurlingham, Prov. de Buenos Aires, Argentina.

E-mail: schnittger.leonhard@inta.gob.ar

Resumen

Cryptosporidium sp. es un parásito, protozoo que infecta a una gran variedad de hospedadores vertebrados. Entre las más de 30 especies validadas en el género, la especie zoonótica *Cryptosporidium parvum* es la principal causante de la criptosporidiosis bovina y representa una de las mayores causas de diarrea neonatal bovina. La vía de transmisión es fecal-oral, siendo el ooquiste, eliminado con las heces, el elemento infectante. La extracción de ADN genómico del parásito a partir de materia fecal es esencial para la determinación de la especie o de la subgenotipificación de *Cryptosporidium* spp. y uno de los desafíos actuales es mejorar la sensibilidad de los métodos moleculares de diagnóstico. En este trabajo evaluamos diferentes combinaciones de métodos de lisis de ooquistes y de extracción de ADN específico con el fin de aumentar la sensibilidad de su detección en aplicaciones *downstream* como por ejemplo la PCR diagnóstica, basada en la amplificación del gen ARN ribosomal 18S. Tanto la combinación de lisis alcalina y extracción con fenol-cloroformo-alcohol isoamílico seguida de un kit comercial, como la aplicación directa del kit comercial -sin pasos previos- resultaron efectivas cuando utilizamos materia fecal como punto de partida. Posteriormente, comparamos la detección de ADN de *Cryptosporidium* spp. a partir de materia fecal versus ooquistes enriquecidos, resultando esta última más sensible ya que se incrementa el volumen de muestra procesable. Finalmente, a partir de ooquistes enriquecidos de *Cryptosporidium* spp. comparamos dos métodos para su ruptura y dos de extracción de ADN. Esto incluyó combinaciones de lisis alcalina vs. congelado-descongelado en nitrógeno líquido para la ruptura de ooquistes y la comparación de dos kits comerciales para la

extracción de ADN. La combinación de dos pasos de lisis previos a la utilización del kit comercial no mejora la obtención de ADN específico. De esta manera el método más sensible y adecuado consiste en un paso de enriquecimiento de ooquistes y la aplicación directa del kit comercial. En conclusión, este protocolo optimizado logró mejorar la sensibilidad del diagnóstico molecular de *Cryptosporidium* sp. notablemente, lo cual posibilitará la detección del parásito en muestras con bajo número de ooquistes.

Palabras clave: Criptosporidiosis bovina, *Cryptosporidium parvum*, terneros, aislamiento de ADN, detección molecular

Abstract

Cryptosporidium sp. is a parasitic protozoa that infects a wide range of vertebrates. Among the 30 valid species, the zoonotic species *Cryptosporidium parvum* is the etiological agent of bovine cryptosporidiosis, representing one of the most important causes of neonatal diarrhea of bovines. The transmission route is fecal-oral and the oocyst, excreted with the feces, is the infective stage. Extraction of genomic DNA from oocysts starting from feces is essential for species determination and/or subgenotyping of *Cryptosporidium* spp. A current challenge is the improvement of the sensitivity of molecular diagnostic methods. In order to increase the quantity of isolated DNA and the sensitivity of its detection, we evaluated in this study the efficiency of different lysis and DNA extraction methods for posterior detection by diagnostic PCR, which is based on the amplification of the 18S rRNA gene. The combination of alkaline lysis and extraction by phenol-chloroform followed by the use of a commercial kit as well as the exclusive use of a commercial kit resulted effective when applied to fecal samples directly. On the other hand, the addition of a freeze-thaw step after alkaline lysis did not increase the efficiency of parasite DNA detection in this type of sample. Later, we compared the detection of DNA of *Cryptosporidium* spp. from oocyst-contaminated feces and partially purified oocyst suspensions, showing the latter higher sensitivity as the volume of processable sample is increased. Finally, two protocols for oocyst disruption and two for DNA isolation were compared from purified oocysts. These included combinations of alkaline lysis and freeze-thaw. The combination of two lysis methods did not improve the extraction of specific DNA. Thus, the most sensitive and adequate method consists of an oocyst enrichment step followed by the direct application of the commercial kit. In summary this optimized protocol significantly improved the sensitivity of *C. parvum* molecular diagnosis which could allow parasite detection in samples contaminated with low numbers of oocysts.

Keyword: Bovine cryptosporidiosis, *Cryptosporidium parvum*, calves, isolation of DNA, molecular detection

Introducción

Cryptosporidium spp. es un parásito, protozoo perteneciente al phylum *Apicomplexa* que infecta a una gran cantidad de hospedadores vertebrados incluyendo al hombre y a los animales domésticos (Šlapeta 2013).

La criptosporidiosis causa diarreas de leves a severas y ganó especial atención en los últimos años debido a que es una infección oportunista que puede llegar a ser mortal en pacientes inmunosuprimidos. Sin embargo, también puede afectar a personas inmunocompetentes aunque es autolimitada. Es una enfermedad relevante y emergente tanto en países desarrollados como en vías de

desarrollo, generando numerosos brotes en todo el mundo y representado una importante causa de diarrea en niños menores de cinco años (Kotloff *et al.*, 2013; Widmer *et al.*, 2012). La infección por *Cryptosporidium* spp. en animales de producción no solo causa diarrea acuosa y retardo en el crecimiento, generando importantes pérdidas económicas, sino que es considerada una potencial fuente zoonótica de la enfermedad (Abeywardena *et al.*, 2015). Específicamente en el ganado bovino *C. parvum* es la especie infectante, zoonótica más importante y es considerado su reservorio. La unidad infectiva del parásito es el ooquiste, el cual contiene cuatro esporozoitos (Del Coco *et al.*, 2009). La

forma de transmisión es por la vía fecal-oral; el ooquiste es excretado en las heces del animal infectado el que se disemina en el ambiente y reinicia el ciclo vital cuando es consumido por un hospedador susceptible.

Si bien algunas drogas han logrado una eficacia parcial en la disminución de los síntomas, no existe un tratamiento efectivo. Debido a esto, el control de la enfermedad se basa en la prevención, la cual se apoya fuertemente en estudios epidemiológicos (Ryan *et al.*, 2014). Por lo tanto, y dado que las especies y los genotipos del género no pueden identificarse por microscopía, el peso de la caracterización de los aislamientos recae en las técnicas moleculares. Se han desarrollado numerosas herramientas moleculares para tal fin. Entre ellas se puede mencionar el estudio de la variabilidad de ciertas regiones de los genes que codifica para: ARN ribosomal 18S (ARNr 18S), la glicoproteína de 60 kDa (GP60), la proteína de la pared del ooquiste de *Cryptosporidium* (COWP), la proteína de shock térmico de 70 kDa (HSP-70), la proteína β -tubulina (Skotarczak, 2010) y también una región de microsatélites del locus 1 y 2 (ML1 y 2). Dichas secuencias son usadas como marcadores moleculares y permiten determinar la especie o subespecie de *Cryptosporidium* infectante.

Para dichos estudios de diagnóstico molecular, la extracción de ADN de buena calidad es un requisito indispensable. No obstante, la extracción de ADN de *Cryptosporidium* a partir de materia fecal presenta algunas dificultades (Hawash, 2014). Entre ellas, se puede mencionar la naturaleza compleja de las muestras de materia fecal, dada la gran cantidad de microorganismos simbioses presentes en el aparato digestivo, así como ADN de células epiteliales o restos vegetales. Por lo tanto, la cuantificación del ADN extraído no es indicativa de la cantidad de ADN específica de *Cryptosporidium*, sobre todo en muestras en las cuales no se realizó un paso previo de purificación. Asimismo, otros factores en el síndrome diarreico como la consistencia de la materia fecal pueden afectar la eficiencia de extracción de ADN. Otro aspecto relevante es la dureza y resistencia del ooquiste, cuya pared de tres capas y rica en puentes disulfuro, es una barrera protectora que protege a los esporozoítos infectantes del medio exterior (Del Coco *et al.*, 2009). La capa externa está formada por glicoproteínas ácidas, y es insensible al hipoclorito de sodio. La capa

central es de composición lipídica y glicoproteica, y es la responsable de la propiedad de ácido alcohol resistencia del ooquiste, particularidad que es utilizada para el diagnóstico por microscopía. Finalmente, la capa interna está formada por glicoproteínas y aporta rigidez y elasticidad al ooquiste. Dicha pared resulta excepcionalmente robusta y son necesarios métodos especiales para su lisis (Adamska *et al.*, 2011).

Dado que la PCR es una reacción enzimática, es susceptible a la acción de diversos inhibidores que disminuyen su sensibilidad, pudiendo causar falsos negativos. La materia fecal posee diversas sustancias dependiendo de la nutrición, ambiente y flora comensal del organismo del que se extrajo, algunas de las cuales pueden ser inhibidoras de la PCR. Entre estas pueden mencionarse los polisacáridos, clorofila derivada de hierbas y vegetales, sales biliares, urea, glicolípidos, hemoglobina y heparina (Schrader *et al.*, 2012). Para sortear algunas de las dificultades mencionadas, se desarrollaron varios pasos preparatorios previos a la extracción de ADN (Hawash, 2014). Entre ellos se pueden mencionar métodos de purificación de ooquistes (Elwin *et al.*, 2012; Fayer *et al.*, 2000) y de lisis, tales como digestión alcalina, ciclos de CD y sonicado entre otros (Adamska *et al.*, 2011; Rosely *et al.*, 2004; Peng *et al.*, 2001).

Este trabajo compara distintos métodos de extracción de ADN a partir de muestras de materia fecal de terneros infectados con *Cryptosporidium* spp. El objetivo es la optimización del método de lisis de ooquistes y extracción de ADN para obtener una máxima sensibilidad en la detección de este parásito, permitiendo el diagnóstico molecular en muestras con bajo número de ooquistes.

Materiales y métodos

1. Muestras

Se recolectaron cuatro muestras de materia fecal (**Tabla I**) de cuatro terneros provenientes de dos establecimientos: Tubicha Mini (Gral. Belgrano, Buenos Aires) y Ruiz SA (Vicuña Mackenna, Córdoba). Las muestras de materia fecal fueron conservadas a 4°C en dicromato de potasio al 2,5%. La muestra 3420 fue evaluada por 3 métodos de extracción de ADN partiendo directamente de materia fecal. Luego, para el resto de las muestras de materia fecal infectada (8302, 8299 y 9675) se realizó un paso de enriquecimiento de

ooquistes. Las mismas fueron sometidas a dos métodos de lisis distintas y se usó un kit de extracción como se detallan en los ítems 5 y 6 (**Tabla I**).

Tabla I. Identificación, tipo de muestra y protocolos utilizados en el trabajo

ID de muestra		3420			8302 ¹	8299 ¹	9675	
Tipo de muestra		MF	MF	MF	Ooq	Ooq	Ooq	Ooq
Protocolos		1	2	<u>3</u>	3b	4	5	6
Lisis	LA	-	x	-	-	x	x	x
	CD	x		-	-	-	-	x
Extracción de ADN	FCl	x	x	-	-	-	-	-
	Ch100	-	-	-	-	x	-	-
	SK	x	x	x	x	-	x	x

ID: identificación; MF: materia fecal; Ooq; ooquistes enriquecidos; LA: lisis alcalina; CD: método de lisis con congelado-descongelado; FCl: método de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico; Ch100: método de extracción con Chelex 100; SK: QuiAmp DNA Stool Mini Kit (Quiagen). ¹ Muestras con la misma cantidad de ooquistes totales ($1,2 \times 10^7$). Se muestra en negrita y subrayado el protocolo elegido para los pasos de comparación subsiguientes.

2. Diagnóstico por microscopía

El diagnóstico de las muestras se realizó mediante la observación de frotis de materia fecal de terneros por microscopía. Dichos frotis fueron obtenidos concentrando la materia fecal mediante el método de Telleman modificado (Allen *et al.*, 1969). Los ooquistes de *Cryptosporidium* spp. fueron visualizados mediante una tinción ácido-resistente modificada denominada Ziehl-Neelsen modificada (Biopack) (Henriksen *et al.*, 1981). La intensidad de la infección

por *Cryptosporidium* se evaluó semicuantitativamente de acuerdo con el número promedio de ooquistes en 20 campos seleccionados al azar y se le asignó un puntaje (Chartier *et al.*, 2013). Todas las muestras utilizadas en este trabajo fueron semicuantificadas (**Tabla II**) por el mismo operador, así el valor de: 3 representa la observación de entre 11 y 15 ooquistes por campo (opc), 2 representa la observación de entre 6 y 10 opc y 1, la de 1 a 5 opc.

Tabla II. Cuantificación de ooquistes de *Cryptosporidium* spp. y ADN luego de la aplicación de los diferentes protocolos

Protocolo ¹	Puntaje	Recuento (ooq/ml)	Ooq tot ²	ADN (ng/μl)
1	3	MF	MF	6,7
2	3	MF	MF	15
3	3	MF	MF	62,2
3b	2	$4,1 \times 10^7$	$1,2 \times 10^7$	3,5
4	2	$2,5 \times 10^7$	$1,2 \times 10^7$	40
5	2	$4,4 \times 10^7$	$3,4 \times 10^7$	2,7
6	2	$4,4 \times 10^7$	$3,4 \times 10^7$	3,2

¹Se describen en Tabla I; ² Ooquistes utilizados para la extracción de ADN. MF: materia fecal.

3. **Aislamiento de ooquistes**

Se trabajó con muestras de materia fecal diagnosticadas previamente por microscopía y se seleccionaron muestras de bajo puntaje de diagnóstico. Se filtraron 50 ml de materia fecal previamente homogeneizada a través de gasa. Se centrifugó a 2.000 *g* por 5 min., se descartó el sobrenadante y se resuspendió el pellet en 10 ml de agua destilada. Luego, se agregaron 5 ml de dietiléter (Sintorgan) en una proporción 2:1 (v/v) y se agitó vigorosamente por vortex durante 1 min. Luego de la agitación, se abrió cuidadosamente el tubo para la liberación de gases. Se centrifugó a 1.000 x *g* por 10 min a 10°C, luego de lo cual se descartaron cuidadosamente el sobrenadante y el tapón lipídico formado para no remover el pellet. Se resuspendió el pellet en 50 ml de agua destilada y se centrifugó a 2.000 *g* por 5 min a 10°C. Se descartó el sobrenadante y se resuspendió el pellet en 10 ml de agua destilada. Se agregaron 20 ml de una solución de sacarosa 1 M y se centrifugó a 2.000 x *g* por 5 min. Finalmente, se colectaron 15 ml de la fase superior que contienen los ooquistes parcialmente purificados. Estos fueron lavados, agregando agua hasta 50 ml y centrifugando a 2.000 *g* por 5 min. Se descartó el sobrenadante y se suspendieron los ooquistes del pellet en 1 ml final en agua calidad biología molecular. Los ooquistes se conservaron a 4°C en una solución de dicromato de potasio al 2,5% hasta su utilización.

4. **Cuantificación de ooquistes**

Los ooquistes de *Cryptosporidium* spp. se purificaron mediante flotación con sacarosa (descrito en el punto 3) y se cuantificaron en cámara de Neubauer. Para mejorar su visualización a una alícuota de 20 μ l de ooquistes purificados se agregaron 4 μ l de verde de malaquita 5%, 4 μ l de SDS 10% y 12 de μ l agua destilada. Las diluciones se ajustaron de tal manera de contar entre 15 y 50 ooquistes por cada cuadrante de la cámara central. Los ooquistes se identificaron en el microscopio según los siguientes criterios: (1) tamaño entre 4-6 μ m; (2) forma esférica y (3) presencia de estructuras internas y cuerpos residuales. Se contaron en el cuadrante central, tanto de la recámara superior como la inferior, normalmente usada para contar glóbulos rojos, se calculó la cantidad de ooquistes por ml y se calculó el promedio, ya que se hizo por duplicado.

5. **Ruptura de ooquistes**

Se ensayaron dos procedimientos: la lisis alcalina y el congelado-descongelado (CD). En el primer caso, se agregaron 170,4 μ l de solución de lisis A (133,2 μ l de 1 M KOH y 37,2 μ l de 1 M ditioneitol (DTT)) a un microtubo de 2 ml con 400 μ l o 400 mg de heces según si la consistencia de la materia fecal era diarreica o no, respectivamente. Luego, se agitó con vortex para homogeneizar, se incubó a 65 °C por 15 min y el pH fue neutralizado por agregado de 17,2 μ l de 25 % (v/v) HCl. Para la lisis por el método de CD se agregaron 300 μ l de buffer de lisis B (50 mM Tris-HCl/1 mM EDTA/0.5% SDS, pH 8.0) a un microtubo de 2 ml con 400 μ l de heces. Se agitó con vortex y se realizaron 10 ciclos de congelado-descongelado, donde cada ciclo consiste en una inmersión por 3 min en nitrógeno líquido seguido de calentamiento a 65°C por 3 min. Posteriormente, se agregaron 70 μ l de 2 mg/ml proteinasa K (Qiagen). Se agitó con vortex por 2 min y se incubó 10 min a 65°C. Finalmente, se agregaron 200 μ l de agua destilada. En los casos en los cuales se combinó este método de ruptura con el de lisis alcalina, no se agregó el buffer B.

6. **Extracción de ADN**

Se ensayaron tres metodologías para la extracción de ADN tanto a partir de heces (muestra 3430) como a partir de ooquistes purificados de materia fecal, las cuales se describirán brevemente a continuación. Cuando se enriquecieron los ooquistes se utilizaron muestras con bajo puntaje (1 o 2) y para que los resultados fueran comparables se partió de la misma cantidad de ooquistes totales, ajustando el volumen a partir de la concentración por centrifugación de ooquistes. El ADN fue cuantificado a 260 nm en un equipo Nanodrop®, modelo ND1000 y se midieron las relaciones 260 vs. 280 nm y 260 vs. 230 nm, para evidenciar la presencia de proteínas o fenoles y guanidina, respectivamente. Una vez cuantificado, el ADN fue congelado hasta su uso.

6.1. Fenol- cloroformo- alcohol isoamílico

A las muestras sometidas a lisis alcalina se les añadieron 320 μ l de 2 M Tris- HCl, pH 8,3 mientras que a las sometidas a CD se agregaron 200 μ l de agua destilada para obtener un volumen final de 900 μ l para ambos tratamientos. Luego se

agregó igual volumen (900 μ l) de fenol/cloroformo/alcohol isoamílico (25:24:1; v/v) (Invitrogen, Carlsbad, Calif.) y se agitó con vortex por 1 min. Seguidamente se centrifugó por 10 min. a 12.000 g, a 10° C. Se tomó el sobrenadante y se procedió a la purificación de ADN mediante el kit comercial para heces.

6.2. Resina Chelex 100

La resina Chelex 100 (Sigma-Aldrich) fue preparada al 5% utilizando agua de calidad para biología molecular, autoclavada para inactivar las ADNasas contaminantes. En un tubo de 2 ml, se añadieron 200 μ l de la suspensión de ooquistes lisados con KOH (punto 5) a 1.500 μ l de la resina previamente preparada. Se incubó a 56°C durante 20 min, seguido de 8 min a 100°C. Luego, se agitó intensamente en vortex por 10 min y se centrifugó a 10.000 g durante 2 min. Se conservó el sobrenadante a -20°C.

6.3. Kit comercial

Se utilizó una alícuota de 400 μ l de materia fecal o 200 μ l de suspensión de ooquistes con o sin tratamientos de lisis previos para la purificación de ADN utilizando el kit QiAamp® DNA Stool Mini Kit (Qiagen). Se siguieron las instrucciones del fabricante exceptuando el tiempo de incubación con el buffer de lisis del kit (buffer ASL), el cual se aumentó a 10 min, en lugar de 5 min, como recomienda el proveedor, para asegurar una ruptura más efectiva de los ooquistes. El ADN fue eluído en 150 μ l de buffer AE, provisto por el kit.

7. PCR diagnóstica

Para la detección de ADN de *Cryptosporidium* spp. se realizó una PCR diagnóstica que consiste en la amplificación directa de un segmento de 838 pb de la región hipervariable del gen ARNr 18S. Los oligonucleótidos utilizados fueron: P2F (5´ GGAAGGGTTGTATTATTAGATAAAG3´) y P2R (5´ AAGGAGTAAGGAACAACCTCCA3´) según se describe en Xiao *et al.*, (1999). La mezcla de reacción de PCR (volumen total: 25 μ l) consistió en 2,5 μ l de buffer de reacción 10X, 5 mM MgCl₂, 0,1 mM de dNTPs, cada primera concentración de 4,8 μ M, 1,5 U de ADN Taq polimerasa (Dream taq, ThermoFisher Scientific) y de 0,5 a 4 μ l de ADN. El programa consistió en: un paso de desnaturalización inicial a 94 °C por

3 min., 35 ciclos de desnaturalización a 94 °C por 30 seg., hibridación a 62 °C por 45 seg. y extensión a 72 °C por 45 seg.; y un paso de extensión final a 72 °C, 5 min. Finalmente, se corrieron 5 μ l del producto de PCR en un gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio y visualizado bajo luz UV. Se utilizó ADN de *C. parvum*, genotificado previamente (Tomazic *et al.*, 2013) como control positivo. Como control negativo de reactivos se utilizó agua de calidad para biología molecular como templado. El marcador de tamaño de ADN utilizado fue GeneRuler™ 1 kb Plus DNA ladder (ThermoFischer Scientific). Para expresar los resultados de ooquistes totales agregados a la PCR se dividieron los ooquistes totales (Tabla II) por el volumen de elución de ADN (150 μ l) y se multiplicó por el volumen utilizado en la PCR (4 μ l).

Resultados

1. Diagnóstico y recuento de ooquistes de *Cryptosporidium* spp.

La tinción ácido-resistente modificada es utilizada para el diagnóstico de la criptosporidiosis. Así, la presencia de ooquistes de *Cryptosporidium* spp. en las heces de las 5 muestras de terneros utilizadas (Tabla I) se observaron con su forma y color característicos, es decir esférica y de color fucsia en contraste con el fondo azul (Fig. 1A). Dichas muestras fueron semicuantificadas y utilizadas para los ensayos posteriores de extracción de ADN. La figura 1B muestra una suspensión enriquecida en ooquistes de *Cryptosporidium* spp., aislados por flotación con sacarosa, en la cámara de Neubauer, la cual fue utilizada para el recuento de estos. Dichos resultados se muestran en la Tabla II.

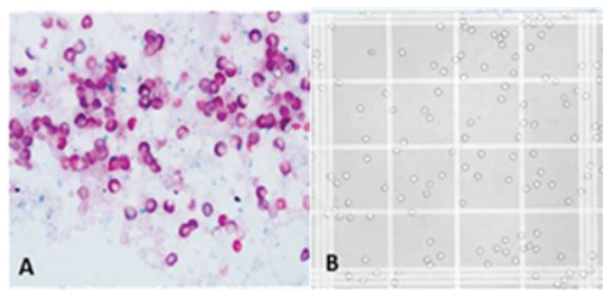


Figura 1. Ooquistes de *Cryptosporidium* spp. de muestras de materia fecal de terneros. (A) Tinción de Ziehl-Neelsen modificada, aumento 1.000 ×; (B) Micrografía de ooquistes de *Cryptosporidium* spp. en suspensión, contados en el recuadro central de la cámara de Neubauer, aumento 400 ×

2. Lisis de ooquistes y extracción de ADN.

En el presente trabajo se evaluaron seis protocolos, tal como se describió en M&M, **Tabla I**, que incluyeron tanto la lisis como la extracción de ADN a partir de materia fecal y a partir del enriquecimiento de ooquistes de *Cryptosporidium* spp. Con la finalidad de lograr la detección en muestras de bajo puntaje (1 y 2), se realizó un enriquecimiento de ooquistes, ya que, muestras con baja carga parasitaria no pudieron ser amplificadas desde la materia fecal (datos no mostrados). En los casos en que utilizamos distintas muestras (8302 y 8299) partimos de la misma cantidad de ooquistes totales para comparar las distintas metodologías. La **Tabla II** muestra los resultados del puntaje de diagnóstico, el recuento de ooquistes posterior al enriquecimiento y la concentración de ADN. Puede verse que, dependiendo de la combinación de métodos empleados, se extraen cantidades muy variables de ADN total a partir de las mismas muestras. Así por ejemplo con el protocolo 3 se obtiene 4 veces más ADN que con el protocolo 2 para la misma muestra.

3. Comparación de diferentes métodos de lisis y extracción de ADN de *Cryptosporidium* spp. a partir de materia fecal

La muestra 3420 de materia fecal de ternero diagnosticada por microscopía como positiva a *Cryptosporidium* spp. fue dividida en tres alícuotas, cada una de las cuales fue sometida a un protocolo diferente de extracción de ADN genómico (**Tabla I**). Una alícuota se lisó por medio de CD en nitrógeno líquido seguido de extracción con fenol-cloroformo- alcohol isoamílico y luego con kit comercial para materia fecal SK (protocolo 1); a otra alícuota se le aplicó lisis alcalina (protocolo 2), en lugar de CD, y la última alícuota fue extraída directamente con el kit SK (protocolo 3). La amplificación por PCR diagnóstica mostró una banda nítida del tamaño esperado (838 pb) en las muestras sometidas a los protocolos 2 y 3. Además, se observa un

producto inespecífico de entre 300 y 400 pb en el producto de PCR del protocolo 2 (**Fig. 2**).

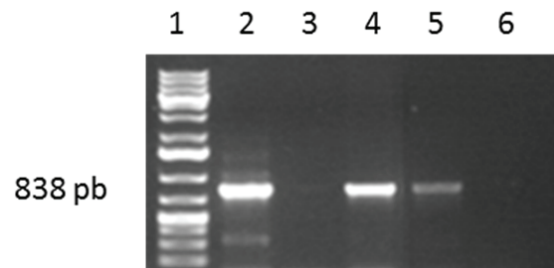


Figura 2. PCR diagnóstica de *Cryptosporidium* sp. La misma fue realizada a partir de ADN genómico extraído de materia fecal con distintos protocolos (1) marcador de tamaño de ADN; (2) protocolo 2; (3) protocolo 1; (4) protocolo 3; (5) control positivo; (6) control negativo.

4. Comparación de la sensibilidad en la detección de ADN de *Cryptosporidium* spp. a partir de materia fecal y de ooquistes purificados

Se eligió el protocolo 3 dada su sencillez (menor cantidad de pasos) y por tanto su menor tiempo de procesamiento para comparar la sensibilidad en la detección de ADN específico. Para ello, se aislaron los ooquistes mediante flotación con sacarosa de una alícuota de la muestra 8302 con bajo puntaje (**Tablas I y II**) y se contaron en cámara de Neubauer, previo al aislamiento del ADN con SK (protocolo 3b). Dado que en la muestra 3430 de materia fecal, no se pueden cuantificar los ooquistes agregados a la PCR, se comparó la cantidad de ADN total agregada. Para ello, se realizaron diluciones seriadas (1:4) del ADN de ambas muestras desde 6,25 ng hasta 1,52 pg de ADN y se utilizaron 4 μ l como templado para la PCR diagnóstica (**Fig. 3A**). A partir del ADN extraído de materia fecal se observó amplificación hasta 0,40 ng de ADN total (**Fig. 3A**, calle 3) mientras que se observó amplificación hasta 0,025 ng de ADN total en la muestra con aislamiento previo de ooquistes (**Fig. 3A**, calle 13), siendo 16 veces más sensible. Es decir, se logró aumentar la cantidad de ADN específico, extraído en la muestra enriquecida.

Dado que la extracción de ADN con el kit comercial SK encarece el proceso, se procedió a evaluar la extracción de ADN a partir de ooquistes purificados utilizando una resina

de Chelex 100 luego de una lisis alcalina (protocolo 4, **Tabla I**). En este caso se realizaron diluciones seriadas al medio de la solución de ADN extraída con este protocolo partiendo desde 100 ng hasta 6,5 ng de ADN, utilizándose 4 μ l como templado para la PCR. Se observó amplificación hasta 12,5 ng (**Fig. 3B**, calle 5). A pesar de que la utilización de la resina Chelex 100 es atractiva por ser un método sencillo, rápido y económico, este método resultó ser mucho menos sensible (520 veces menor que el protocolo 3b), si se considera la sensibilidad de detección de *Cryptosporidium* spp. con respecto a la masa de ADN utilizada como templado.

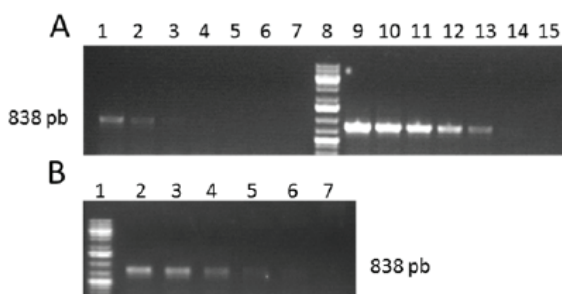


Figura 3 Curva de sensibilidad en la detección de ADN de *Cryptosporidium* spp. usando PCR diagnóstica a partir de muestras de materia fecal y oocistos enriquecidos. A, Amplicones generados a partir de ADN genómico extraído de materia fecal con el protocolo 3 (calles 1 a 7) y de oocistos enriquecidos con el protocolo 3b (calles 9 a 15). Diluciones seriadas 1:4 de ADN 6,22 ng (calles 1 y 9); 1,55 ng (calles 2 y 10); 0,40 ng (calles 3 y 11); 0,10 ng (calles 4 y 12); 0,025 ng (calles 5 y 13); 6,25 pg (calles 6 y 14) y 1,55 pg (calles 7 y 15); marcador de tamaño de ADN 1 kb Plus (calle 8). B, Amplicones generados a partir de diluciones seriadas al medio del ADN extraído de oocistos enriquecidos con el protocolo 4, cantidad inicial de ADN usado en PCR 100 ng; (calle 2) 50 ng (calle 3); 25 ng (calle 4); 12,5 ng (calle 5); 6,5 ng (calle 6); control negativo (calle 7); marcador de tamaño de ADN (calle 1).

5. Evaluación de métodos de lisis y kits de extracción de ADN a partir de oocistos purificados de *Cryptosporidium* spp.

Con el objetivo de mejorar la sensibilidad del protocolo 3b

(aislamiento de oocistos y extracción de ADN con SK), se incrementaron los pasos de lisis previos a la aplicación del kit para la extracción de ADN. Para ello, se aislaron los oocistos de *Cryptosporidium* sp. de una muestra de materia fecal (muestra 9675). Alícuotas iguales de esta suspensión con $3,4 \times 10^7$ oocistos (**Tabla II**) fueron lisadas con: un paso de lisis alcalina (protocolo 5) o dos pasos de lisis: alcalina y CD (protocolo 6). Se realizaron diluciones seriadas 1:4 del ADN y se utilizaron 4 μ l como templado para la amplificación por PCR diagnóstica. Para comparar los resultados, estos se expresaron según la cantidad de oocistos agregados a la PCR (ver Sección 7 de M&M). Es decir, conociendo la cantidad total de oocistos previa a la extracción de ADN y el volumen de su elución, se calculó el volumen necesario para usar como templado en la reacción de PCR. De esta manera, se observó amplificación en aquellas muestras que contenían hasta $2,12 \times 10^3$ y $1,28 \times 10^3$ oocistos en los protocolos 5 y 6, respectivamente. Es decir, el paso adicional de ruptura (CD) de oocistos aumentó 4 veces la sensibilidad de la detección (**Fig. 4**). De esta manera, el límite de detección alcanzado con el protocolo 6 fue de $1,28 \times 10^3$ oocistos.

El protocolo 3b (extracción de ADN utilizando SK a partir de oocistos) permitió la amplificación de ADN desde un límite inferior de 0,025 ng (**Fig. 3A**, calle 13) que equivale a $7,8 \times 10^2$ oocistos. De esta manera, el agregado de pasos adicionales de lisis no mejoró la sensibilidad.

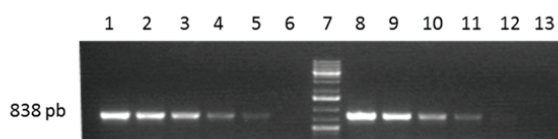


Figura 4. Curva de sensibilidad realizada con PCR diagnóstica de oocistos enriquecidos de *Cryptosporidium* spp. A. Productos de amplificación a partir de ADN genómico extraído de oocistos con pasos adicionales de ruptura de oocistos con protocolo 6 (calles 1 a 6) y con protocolo 5 (calles 8 a 13). Diluciones seriadas 1:4 de templado expresado en oocistos totales por reacción de PCR: $3,30 \times 10^5$ (1 y 8); $8,20 \times 10^4$ (2 y 9); $2,05 \times 10^4$ (3 y 10); $2,12 \times 10^3$ (4 y 11); $1,28 \times 10^3$ (5 y 12) y $3,20 \times 10^2$ (6 y 13); marcador de tamaño de ADN (7).

Discusión

Dado que en la actualidad no hay un tratamiento eficaz contra la criptosporidiosis bovina la única estrategia de control recae en la prevención. Por esta razón en nuestro país tanto la prevalencia de este patógeno como las especies circulantes están siendo estudiadas con el objetivo de mejorar el control (Tomazic *et al.*, 2013; Maidana *et al.*, 2014; Garro *et al.*, 2016; Lombardelli *et al.*, manuscrito en preparación). En este sentido, el presente trabajo mediante la comparación de diferentes estrategias permitió mejorar la sensibilidad en la detección del parásito.

Se comprobó que, dependiendo de la combinación de métodos, se obtienen cantidades variables de ADN y que esto no es indicativo de la presencia de ADN específico, ya que el ADN extraído directamente a partir de materia fecal proviene no solo de *Cryptosporidium* spp. sino también de otras fuentes adicionales. Por ello, es indispensable el uso de métodos moleculares adicionales para la detección del parásito. Los protocolos 2 y 3 resultaron efectivos respecto del protocolo 1. Este protocolo incluyó un paso de lisis de CD previo a la extracción de ADN con el Kit comercial. Posiblemente, durante este proceso el ADN se degradó dada la exposición a enzimas y a contaminantes presentes en la materia fecal. Aunque la aplicación de CD directamente en muestras de materia fecal no fue reportada, procedimientos similares a CD han sido descritos para la lisis de ooquistes en muestras de agua concentradas (Nichols *et al.*, 2003; Nichols *et al.*, 2004) y también en muestras de ooquistes purificados a partir de materia fecal (Nichols *et al.*, 2006). Por otro lado, en algunos trabajos de caracterización molecular de *Cryptosporidium* spp. se ha usado una combinación de métodos de lisis de ooquistes y extracción de ADN que abarcan la lisis alcalina, extracción con fenol-cloroformo-alcohol isoamílico y el SK (Peng *et al.*, 2001). En este estudio, la misma combinación de métodos (protocolo 2) no aportó diferencias significativas en la extracción de ADN específico comparado con la aplicación de un solo método (protocolo 3). Esto puede deberse a que el kit es altamente eficiente en la recuperación de ADN presente en las heces, sugiriendo que para este tipo de muestras no es necesaria la aplicación adicional de extracción con solventes ni lisis. Por esta razón y dada su sencillez el protocolo 3 fue elegido para comparar la sensibilidad de amplificación

de ADN de *Cryptosporidium* spp. a partir de materia fecal (MF) y a partir de una preparación enriquecida en ooquistes (protocolo 3b). Se observó que en el paso de purificación de ooquistes se produjo un aumento de 16 veces en la detección de ADN del parásito a partir de MF. Es importante destacar que muestras con puntaje de diagóstico 1 o 2 no pudieron ser detectadas anteriormente a partir de materia fecal directa (datos no mostrados). De esta manera, al aumentar el volumen de muestra procesable (se partió de un volumen mayor respecto al usado para la extracción de ADN en MF directamente), se logró la detección del parásito. El paso adicional de enriquecimiento de ooquistes no se puede realizar en muestras de MF congeladas, dado que una fracción de ooquistes se rompe en este proceso. Es importante considerar que por un lado el paso de enriquecimiento de ooquistes aumenta el costo y el tiempo de la extracción y por el otro hace posible la cuantificación del número total de ooquistes a partir de los cuales se extrae el ADN. El recuento de ooquistes a su vez nos permitió comparar posteriormente distintos métodos de ruptura de ooquistes y aislamiento de ADN.

La resina Chelex 100 es un método rápido, sencillo y económico que ha demostrado ser efectivo en la extracción de ADN a partir de diversas muestras biológicas (Santurde *et al.*, 1996; Yang *et al.*, 2008). Por ello, comparamos este método respecto del SK, que encarece los costos del proceso. Sin embargo, obtuvimos una muy baja sensibilidad de detección cuando se aplicó la resina Chelex 100 (protocolo 4). Esto podría deberse a la poca eficacia del paso de ruptura elegido (lisis alcalina) o bien a la presencia de inhibidores. La resina Chelex 100 está compuesta por polímeros con agentes quelantes de dicaciones como el magnesio, que al ser cofactores de las ADNasas son inactivadas (por ejemplo, a las ADNasas remanentes que pudieron resistir la desnaturalización provocada por el hervor). Dichos quelantes no ejercen ningún efecto específico sobre otros posibles contaminantes e inhibidores de la PCR en la suspensión de ooquistes parcialmente purificados. Por su parte, el SK posee varios pasos de eliminación de contaminantes y utiliza una tableta que absorbe impurezas e inhibidores además de tener varios pasos de lavados. Posiblemente, esta sea la razón por la cual el protocolo 3b resultó en una sensibilidad sustancialmente mayor respecto

del protocolo 4.

Asimismo, se comparó el efecto de los pasos adicionales de ruptura en muestras de ooquistes enriquecidos. Observamos que ni el paso adicional de lisis alcalina (protocolo 5) como la combinación de dos métodos de ruptura (lisis alcalina más ciclos de congelado y descongelado, protocolo 6) no mejoró la sensibilidad respecto del protocolo 3b. Por el contrario, el protocolo 3b, es decir la aplicación directa del SK resultó ser más sensible ya que amplificó hasta 780 ooquistes por PCR. Es posible que el incremento de pasos de lisis resulte en una recuperación de ADN menos eficiente o bien que durante los pasos de lisis se degrade el ADN.

En algunos trabajos de análisis molecular de las especies de *Cryptosporidium* se reportó la utilización de un kit comercial para sangre y tejidos (TK) para la extracción de ADN de ooquistes (Santín *et al.*, 2008; Santín *et al.*, 2004). Es por ello por lo que comparamos la eficiencia de este kit respecto al SK, específico para ADN de materia fecal. Cuando se realizó la extracción de ADN de una misma muestra partiendo de igual cantidad de ooquistes se obtuvo una diferencia de tres veces en la cantidad de ADN cuando utilizamos TK. Sin embargo, no se logró la detección de *Cryptosporidium* spp. por PCR aun utilizando mayor cantidad de ooquistes que el límite de detección establecido de $7,8 \times 10^3$ ooquistes (datos no mostrados). Esto demuestra además que, a pesar del paso previo de enriquecimiento la muestra puede contener material genético de otras fuentes, aunque en mucha menor proporción. De esta manera, la utilización del kit comercial Qiamp® DNA stool kit, diseñado para muestras de materia fecal, es eficiente y apropiada para el procesamiento de este tipo de muestras. Una posible causa podría ser que el TK no tiene un paso de eliminación de inhibidores de la PCR como el SK, que además de contener una tableta que absorbe impurezas, posee un buffer de lisis diferente que parece ser más eficiente que el del kit TK. Por último, el agregado de seroalbúmina bovina (BSA) a la mezcla de reacción de PCR en las concentraciones adecuadas ha demostrado mejorar la especificidad del producto obtenido en numerosas ocasiones (Garland *et al.*, 2010; Jiang *et al.*, 2013; Oikarinen *et al.*, 2009; Strien *et al.*, 2013) y por ello evaluamos su agregado a la reacción de PCR. En este trabajo, no observamos mejoras en la robustez ni en la especificidad de la reacción (datos no mostrados).

Si bien observamos que el enriquecimiento de ooquistes mejora la sensibilidad en la detección al aumentar el volumen de muestra procesable, es necesario mencionar que este paso adicional aumenta el costo, el tiempo y el trabajo invertido en la extracción de ADN. Es por eso que cada método de extracción de ADN debe adecuarse a los objetivos del proyecto y a la importancia que se le asigne a la sensibilidad respecto a otros factores como pueden ser el tiempo disponible para realizar el diagnóstico, la disponibilidad de personal capacitado y recursos, o el tipo de preservación de la muestra.

Conclusiones

Este trabajo estableció un protocolo mejorado para la extracción de ADN a partir de muestras de materia fecal, adecuado para el diagnóstico molecular de *Cryptosporidium* sp. Observamos que el protocolo más eficiente es el aislamiento de ooquistes por flotación con solución de sacarosa seguido la utilización directa del kit comercial para heces (SK). El enriquecimiento de ooquistes posibilita el procesamiento de volúmenes mayores de muestra, lo cual puede ser determinante en aislamientos con baja carga parasitaria. Así por ejemplo es posible el diagnóstico molecular de aquellas muestras con puntaje 1 y 2 que no han podido ser detectadas con anterioridad. En conjunto, la mejora en la sensibilidad lograda es relevante para el diagnóstico molecular de *Cryptosporidium* spp. en muestras de MF, especialmente en muestreos longitudinales que incluyen períodos de baja excreción del parásito, contribuyendo así al desarrollo de estudios epidemiológicos y a la implementación efectiva de medidas preventivas.

Agradecimientos

Este trabajo fue apoyado por las siguientes subvenciones: Fundación Universidad de Morón: PID8-2015; FonCyt: PICT-0695-2012 y PICT-2013-1708; INTA: PNSA-1115053.

Bibliografía

- Abeywardena, H., Jex, A.R., Gasser, R.B. (2015). A perspective on *Cryptosporidium* and *Giardia*, with an emphasis on bovines and recent epidemiological findings. *Advanced Parasitology*, 88, 243-301. doi:

10.1016/bs.apar.2015.02.001.

- Adamska, M., Leońska-Duniec, A., Maciejewska, A., Sawczuk, M., Skotarczak, B. (2011). PCR and real time PCR for the detection of *Cryptosporidium parvum* oocyst DNA. *Folia biologica*, 59(3–4), 115–120.
- Allen, A.V.H., y Ridley, D.S. (1970). Further observations on the formol-ether concentration technique for faecal parasites. *Journal of Clinical Pathology*, 23(6), 545–546.
- Chartier, C., Rieux, A., Delafosse, A., Lehebel, A., Paraud, C. (2013). Detection of *Cryptosporidium* oocysts in fresh calf faeces: Characteristics of two simple tests and evaluation of a semi-quantitative approach. *The Veterinary Journal*, 198, 148–152. contribuyendo así al desarrollo de estudios epidemiológicos y a la implementación efectiva de medidas preventivas. Criptosporidiosis: una zoonosis emergente. *Revista Argentina de Microbiología*, 41(3), 185–196.
- Elwin, K., Robinson, G., Hadfield, S.J., Fairclough, H.V., Iturriza-Gómara, M., y Chalmers, R.M. (2012). A comparison of two approaches to extracting *Cryptosporidium* DNA from human stools as measured by a Real-Time PCR assay." *Journal of Microbiological Methods*, 89(1), 38–40. doi: 10.1016/j.mimet.2012.02.006.
- Fayer, R., Trout J.M., Graczyk, T.M., y Lewis, E.J. (2000). Prevalence of *Cryptosporidium*, *Giardia* and *Eimeria* infections in post-weaned and adult cattle on three Maryland Farms. *Veterinary Parasitology*, 93(2), 103–112.
- Garland, S., Baker, A., Phillott, A.D., y Skerratt, L.F. (2010). BSA reduces inhibition in a TaqMan assay for the detection of *Batrachochytrium dendrobatidis*. *Diseases of Aquatic Organisms* 92(2–3), 113–16. doi: 10.3354/dao02053.
- Garro, C.J., Morici, G.E., Utgés, M.E., Tomazic, M.L., y Schnittger, L. (2016). Prevalence and risk factors for shedding of *Cryptosporidium* spp. oocysts in dairy calves of Buenos Aires Province, Argentina. *Parasite Epidemiology and Control*, 1(2), 36–41. doi: org/10.1016/j.parepi.2016.03.008
- Hawash, Y. (2014). DNA extraction from protozoan oocysts/cysts in feces for diagnostic PCR. *Korean Journal of Parasitology*, 52(3), 263–271. doi: 10.3347/kjp.2014.52.3.263
- Henriksen S.A., y Pohlenz, J.F. (1981) Staining of *Cryptosporidia* by a modified Ziehl-Neelsen technique. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 22(3–4), 594–596.
- Jiang, C., Cui, Z.H., Yuan, Y., y Huang, L.Q. (2013). Effect of PCR Enhancer in Molecular Authentication of Chinese Herbal Medicine. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi*, 38(16), 2571–2576.
- Kotloff, K.L., Nataro, J.P., Blackwelder, W.C., Nasrin, D., Farag, T.H., Panchalingam, S., y Wu, Y. (2013). Burden and aetiology of diarrhoeal disease in infants and young children in developing countries (the Global Enteric Multicenter Study, GEMS): a prospective, case-control study. *Lancet*, 382(9888), 209–222. doi: 10.1016/S0140-6736(13)60844-2.
- Lombardelli, J., Tomazic, M.L., Schnittger, L., y Tiranti, K.I. (2017), *Cryptosporidium parvum* prevalence and molecular typing in dairy calves with diarrhea in Córdoba, Argentina", manuscrito en preparación.
- Maidana, J., Tomazic, M., Domínguez, M., Louge, E., Galarza, R., Garro, C. Florin-Christensen, M., Schnittger, L. (2014). Tipificación molecular de *Cryptosporidium* sp. en terneros de la provincia de Buenos Aires. *Revista de la Facultad de Ciencias Exactas, Químicas y Naturales de la Universidad de Morón*, 12, 51–70.
- Nichols, R.A., Campbell, B.M., Smith, H.V. (2003). Identification of *Cryptosporidium* spp. oocysts in United Kingdom noncarbonated natural mineral waters and drinking waters by using a modified nested PCR-restriction fragment length polymorphism assay. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(7), 4183–4189.
- Nichols, R.A., Moore, J.E., y Smith, H.V. (2006). A rapid method for extracting oocyst DNA from *Cryptosporidium*-positive human faeces for outbreak investigations. *Journal of Microbiological Methods*, 65(3), 512–524.

- Nichols, R.A., y Smith, H.V. 2004. Optimization of DNA extraction and molecular detection of *Cryptosporidium* oocysts in natural mineral water sources *Journal of Food Protection*, 67(3), 524–532.
- Oikarinen, S., Tauriainen, S., Viskari, H., Simell, O., Knip, M., Virtanen, S., y Hyöty, H. (2009). PCR inhibition in stool samples in relation to age of infants. *Journal of Clinical Virology*, 44(3), 211–214. doi: 10.1016/j.jcv.2008.12.017.
- Peng, M.M., Matos, O., Gatei, W., Das, P., Stantic-Pavlinic, M., Bern, C., Sulaiman, I.M., Glaberman, S., Lal, A.A., y Xiao, L. (2001). A comparison of *Cryptosporidium* subgenotypes from several geographic regions. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 48(Supplement s1), 28s–31s.
- Ryan, U., Fayer, R., y Xiao, L. (2014). *Cryptosporidium* species in humans and animals: current understanding and research needs. *Parasitology*: 141(13), 1667–1685. doi: 10.1017/S0031182014001085.
- Santín, M., Trout, J.M., Xiao, L., Zhou, L., Greiner, E., y Fayer, R. (2004). Prevalence and age-related variation of *Cryptosporidium* species and genotypes in dairy calves. *Veterinary Parasitology*, 122(2), 103–117. doi: 10.1016/j.vetpar.2004.03.020.
- Santín, M., Trout, J.M., y Fayer, R. (2008). A longitudinal study of cryptosporidiosis in dairy cattle from birth to 2 years of age. *Veterinary Parasitology*, 155(1–2), 15–23. doi: 10.1016/j.vetpar.2008.04.018.
- Santurde, G., Da Silva, N., Villares, R., Tabares, E., Solana, A., y Bautista, J.M., Castro, J.M. (1996). Rapid and high sensitivity test for direct detection of Bovine Herpesvirus-1 genome in clinical samples. *Veterinary microbiology*, 49(1–2), 81–92. /doi.org/10.1016/0378-1135(95)00169-7.
- Schrader, C., Schielke A., Ellerbroek L., y Johne R. (2012). PCR inhibitors - occurrence, properties and removal. *Journal of Applied Microbiology*, 113(5), 1014–1026. doi: 10.1111/j.1365-2672.2012.05384.x.
- Skotarczak, B. (2010). Progress in the molecular methods for the detection and genetic characterization of *Cryptosporidium* in water samples. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine*, 17(1), 1–8.
- Šlapeta, J. (2013). Cryptosporidiosis and *Cryptosporidium* species in animals and humans: a thirty colour rainbow? *International Journal for Parasitology*, 43(12–13), 957–970. doi: 10.1016/j.ijpara.2013.07.005.
- Strien, J., Sanft, J., y Mall, G. (2013). Enhancement of PCR Amplification of moderate GC-containing and highly GC-rich DNA sequences. *Molecular biotechnology*, 54(3): 1048–1054. 10.1007/s12033-013-9660-x.
- Tomazic, M.L., Maidana, J., Dominguez, M., Uriarte, E.L., Galarza, R., Garro, C., Florin-Christensen, M., y Schnittger, L. (2013). Molecular Characterization of *Cryptosporidium* Isolates from Calves in Argentina. *Veterinary Parasitology*, 198(3–4): 382–386. doi: 10.1016/j.vetpar.2013.09.022.
- Widmer, G. y S. Sullivan. (2012). Genomics and population biology of *Cryptosporidium* species. *Parasite immunology*, 34(2–3), 61–71. doi: 10.1111/j.1365-3024.2011.01301.x.
- Xiao, L., Escalante, L., Yang, C., Sulaiman, I., Escalante, A.A., Montali, R.J., Fayer, R., y Lal, A.A. (1999). Phylogenetic analysis of *Cryptosporidium* parasites based on the small-subunit rRNA gene locus. *Applied and environmental microbiology*, 65(4), 1578–1583.
- Yang, J.L., Wang, M.S., Cheng, A.C., Pan, K.C., Li, C.F., y Deng, S.X. (2008). A Simple and Rapid Method for Extracting Bacterial DNA from Intestinal Microflora for ERIC-PCR Detection. *World journal of gastroenterology*, 14(18), 2872–2876. doi: 10.3748/wjg.14.2872.