

Estandarización de PCR-RFLP para la caracterización molecular de genotipos de *Blastocystis* spp. en muestras de heces humanas

Maria Vethencourt^{1,2}, Carmen Guzmán², Anaibeth Nessi², Mónica Galindo², Carolina wagner², (1) Escuela de de Medicina. Universidad Latina de Costa Rica, San José Costa Rica, (2) Escuela de Bioanálisis Universidad Central de Venezuela, Caracas, Venezuela

Antecedentes

Blastocystis spp. es el único *Stramenopile* que parasita el intestino humano. Se han identificado 17 subtipos (STs) en distintos hospederos, de los cuales del ST 1 al 9 se han encontrado en humanos, con o sin síntomas. Aunque su morfología es similar independientemente del hospedero y St, su diversidad genética ha sido demostrada mediante Técnicas de Biología Molecular. Estas técnicas deben ser estandarizadas para preservar la integridad del ADN, durante el proceso de extracción a partir de heces, para así asegurar la genotipificación del parásito.

Objetivo

Estandarizar la PCR-RFLP para la caracterización molecular de los subtipos de *Blastocystis* spp. en muestras de heces humanas.

Metodología

63 muestras
33 heces totales (HT),
22 heces lavadas (HL)
8 sedimentos cultivos de Boeck (CL)

Extracción de ADN:
Wizard®, Wizard Genomic® y
DNAzol®, solos o combinados.

Evaluación de la calidad del ADN
Pureza: 260/280
Concentración: 260 nm
Contaminantes: 230 nm

PCR SSU 18S
1780 pb y 310 pb
(Sensibilidad y especificidad)

RFLP (1780 pb)
Hinf I, *Rsa* I
(Yoshikawa *et al.*, 2000)

Resultados

Se observó el mejor índice 260/280 (alrededor de 2) y una absorbancia menor de 0,5 a 230 nm, al extraer el ADN a partir de CL, con el método de Wizard®, solo o combinado.

La PCR de 1780 pb tuvo una sensibilidad de 0,3125 ng/μL de ADN y detectó hasta 1 *Blastocystis* /μL: La especificidad fue del 62,5%, corregida por la especificidad del 100% de la PCR de 310 pb.

La amplificación por PCR de 1780 pb fue mayor ($p < 0,001$) en las CL (87,5%; 7/8) y HL (68,2%; 15/22), con respecto a las HT (21,2%; 7/33).

Luego del RFLP de 20 amplificados, se obtuvo un 45% (9/20) para el St1, un 30% (6/20) para el St3, 10% (2/20) para el St4 y un 15% de infecciones mixtas (3/20).

Conclusiones/ Recomendaciones

El método de extracción de Wizard®, con columna de sílica, permitió la obtención de un ADN de mejor calidad, a partir de los CL y HL, ya que los procesos de lavado previos, a la extracción, favorecen la eliminación de componentes que degradan la muestra de ADN y pueden inhibir la PCR.

La estandarización del PCR-RFLP permite identificar los Sts de *Blastocystis* sp. del 1 al 4, en infecciones únicas o mixtas, facilitando su estudio epidemiológico molecular, en diferentes poblaciones humanas.

Contacto: maria.vethencourt@ulatina.cr
Conflicto de interés: ninguno