

DESARROLLO DE UNA TÉCNICA BASADA EN PCR PARA LA DETECCIÓN DE CYCLOSPORA

Informe Final

4 de Enero de 2000

RESUMEN EJECUTIVO

El objetivo de esta parte del proyecto fue la implementación de la técnica de detección por PCR de *Cyclospora cayetanesis* en frambuesas y de un paquete (kit) con los reactivos necesarios para efectuarla. La técnica se basa en la detección de la región de un gene solo presente en *Cyclospora* de acuerdo a un método de alta sensibilidad revisado por la Food and Drug Administration (FDA). Esta técnica y el paquete o "kit" de reactivos están destinados al monitoreo de la contaminación en productos hortofrutícolas. El desarrollo del proyecto fue del todo satisfactorio y de acuerdo a lo programado. Se obtuvieron los diversos reactivos requeridos para la prueba, incluyendo muestras positivas para *Cyclospora* no disponibles en Chile. Estas últimas consisten en muestras de heces positivas para este parásito obtenidas de Perú y de una cepa bacteriana, obtenida desde Estados Unidos, que contiene el gene de *Cyclospora* que se detecta en la prueba, introducido en la bacteria por ingeniería genética.

Utilizando estos reactivos se implementó el método, junto con algunas modificaciones para aumentar su sensibilidad. Por este método modificado se determinó que es posible detectar hasta 10-20 moléculas del gene de *Cyclospora* y una contaminación de 0.0005 ml de las heces positivas en 250 g de frambuesa. Se analizaron 32 muestras de frambuesas, provenientes de diferentes productores, sin detectar presencia de *cyclospora*. Los reactivos necesarios para realizar la técnica, incluyendo controles positivos y negativos, fueron incorporados en un paquete para cincuenta pruebas que estará accesible al público a través de la Fundación para el Desarrollo Frutícola de acuerdo a un convenio específico.

Responsable

Romilio Espejo T.

INTA, U. de Chile.

Macul 5540, Santiago.

respejo@uec.inta.uchile.cl

Propuesta original y modificaciones realizadas.

El objetivo de esta parte del proyecto fue la implementación de la detección de *cyclospora* en lavados de frutas por la técnica de PCR y el armado de un "kit" o paquete de reactivos para efectuarla. Esta técnica consiste en amplificar millones de veces, mediante procedimientos bioquímicos, un gene específico del microorganismo para su posterior detección e identificación en función de su tamaño por electroforesis en geles de poliacrilamida. La técnica para detección de *Cyclospora* basada en este método fue inicialmente desarrollada para el diagnóstico de infección en humanos, por análisis de las heces (1), posteriormente se describió un procedimiento para el análisis en frambuesa revisado por la FDA (2). Para lograr el objetivo señalado, se decidió implementar la prueba revisada por la FDA, con modificaciones para simplificar el procedimiento y aumentar la sensibilidad, sin cambiar sus fundamentos.

El desarrollo e implementación de esta técnica contemplaba las siguientes etapas u objetivos:

1. Implementación de la detección de *Cyclospora* según técnica de PCR ya descrita en la literatura. Se incluía aquí la obtención de muestras de parásitos y reactivos específicos.
2. Determinación de la sensibilidad de la técnica implementada, definiendo el número mínimo de microorganismos detectables.
3. Discriminación entre *Cyclospora* y *Eimeria* por hibridación o RFLP
4. Determinación de la sensibilidad en frambuesa contaminada artificialmente.
5. Perfeccionamiento de la técnica para aumentar sensibilidad
6. Determinación de la sensibilidad de la técnica perfeccionada al analizar frambuesa.
7. Verificación del método por análisis de muestras.
8. Informe final.

No se realizaron cambios sustantivos de estas actividades, excepto por modificaciones en el cronograma donde la técnica para la discriminación entre *Cyclospora* e *Eimeria* se realizó al final y donde además se incluyó una segunda etapa de verificación con muestras obtenidas de la producción de frambuesa en primavera-verano 1999.

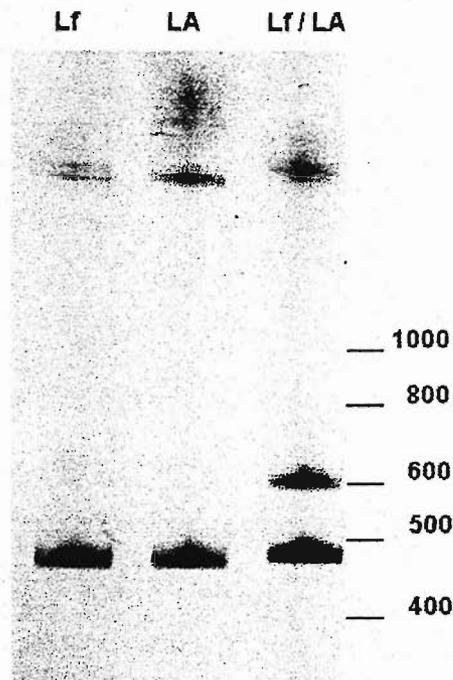
Cumplimiento de los objetivos del proyecto.

1. Implementación de la detección de *Cyclospora* según técnica de PCR ya descrita en la literatura. Se obtuvieron sin dificultad los diversos reactivos requeridos, incluyendo los oligonucleotidos específicos para la prueba. Estos fueron sintetizados en el laboratorio de la Fundación para Estudios Biomédicos Avanzados de la Universidad de Chile. Debido a las dificultades iniciales para lograr muestras de heces positivas para *Cyclospora*, sólo disponibles en algunos laboratorios del Perú, se obtuvo un sustituto consistente en una bacteria, conteniendo un plasmidio en el cual se ha insertado el gene de *Cyclospora* que se detecta en esta prueba. Este gene corresponde al RNA pequeño que forma parte del ribosomal (rDNA) El plasmidio corresponde al vector PCR2.1 conteniendo el trozo de DNA amplificado en la primera etapa de la prueba de PCR, descrita en metodología. Fue obtenido en el Laboratorio de D. Relman en Palo Alto Health Care System, Palo Alto, California, U.S.A. El contar con este plasmidio representó un gran logro, pues además de permitirnos iniciar la implementación de la prueba, nos proveyó de un control positivo inagotable, solucionando el problema que se presenta con las heces positivas. Posteriormente, y después de largo trámite; con la ayuda de Ynés Ortega, investigadora Peruana que se desempeña en U.S.A., obtuvimos aproximadamente 0.2 ml de heces positivas de R. Gilman (Asociación Benéfica PRISMA, Lima, Perú). Con esto se cumplió la obtención de todos los reactivos necesarios. El plasmidio fue utilizado para implementar la técnica de detección que fue posteriormente validada con la muestra de heces. Los protocolos de las pruebas están descrito en la sección metodología.
2. Determinación de la sensibilidad de la técnica implementada. Utilizando el procedimiento implementado se determinó la sensibilidad de la amplificación para la detección del plasmidio conteniendo el rDNA de *Cyclospora cayetanensis*. Para este objeto se realizaron amplificaciones con distintas cantidades de plasmidio. Se determinó que la cantidad mínima detectable es de 500 a 1000 moléculas por mililitro de muestra final, considerada una sensibilidad excelente ya que corresponde a solo 10-20 moléculas en la prueba de amplificación. Posteriormente se determinó la sensibilidad de la amplificación para detectar *Cyclospora*. Para este objeto se extrajo DNA desde las heces obtenidas según el protocolo descrito al final del informe y éste se amplificó usando distintas diluciones. Se encontró que es posible detectar por esta forma, hasta el equivalente en DNA contenido en 0.05 microlitros de la muestra de heces positiva para *Cyclospora*.
3. Determinación de la sensibilidad en frambuesa contaminada artificialmente. La determinación de la sensibilidad en frambuesas contaminadas se realizó contaminando artificialmente 250 g de frambuesa con 50 ul de las heces conteniendo *Cyclospora*. Estas frambuesas fueron posteriormente tratadas según el protocolo descrito en la sección metodología, basado en el procedimiento descrito en la referencia 2. El DNA obtenido de esta muestra artificialmente contaminada fue amplificado a diferentes diluciones y se encontró que resultaban positivas hasta una dilución 1/100, equivalente a una cantidad de heces de 0.5 microlitros en los 250 g de frambuesa.

4. Perfeccionamiento de la técnica para aumentar sensibilidad. Se introdujeron cambios en la técnica original descrita en la referencia 2, que la simplifican y aumentan su sensibilidad. La principal modificación está en la forma de detección del amplificado. En lugar de utilizar geles de agarosa y tinción del producto con "ethidium bromide" como se hace usualmente, en nuestro procedimiento se utilizan geles de poliacrilamida y tinción con nitrato de plata. Al utilizar esta nueva tinción se aumenta la sensibilidad aproximadamente 40 veces. El distinto tipo de gel aumenta la resolución y permite una mejor identificación del producto. Esta es una modificación importante que no cambia la base del método pero que ofrece una mejor sensibilidad y confiabilidad con respecto al método original.
5. Determinación de la sensibilidad de la técnica perfeccionada al analizar frambuesa. Éste objetivo se cumplió en las determinaciones de sensibilidad descritas en los puntos 2 y 3 ya que en todas ellas se utilizó la técnica perfeccionada.
6. Verificación del método por análisis de muestras. La tabla siguiente muestra las diferentes muestras analizadas a la fecha y los resultados obtenidos. En ninguna de las muestras se encontró *Cyclospora*.

Muestra	Resultado	Fecha Análisis
Agrícola Pichilemu	-	09-Enero
Agrícola Pichilemu	-	09-Enero
Hortifrut 16/01	-	09-Enero
Hortifrut 21/01	-	09-Enero
Hortifrut	-	14-Mar
Hortifrut	-	"
Fr. Paine 1012	-	"
Vitalberries 8/3	-	"
Vitalberries Linares	-	17-Mar
Vitalberries Linares	-	17-Mar
Vberries: F5-1972/F81975	-	07-Abr
Vberries:F9-1975/F6-1973/F7-1974	-	07-Abr
Vberries 2037/2041	-	06-Abr
Vberries F1	-	18-May
Vberries F3-F4	-	18-May
Hortifrut F5/F2	-	18-May
Hortifrut	-	09-Jun
Hortifrut	-	09-Jun
Hortifrut congeladas, Muestras 1 y 2	-	21-Julio
Huerto Curicó, Muestras 1 y 2	-	11-Agosto
Hortifrut Nogales	-	30-Nov
Vitalberries Malleco 4004	-	14-Dic
Vitalberries Linares 3075	-	14-Dic
Southern Sun Los Angeles	-	14-Dic
Hortifrut Suncell, Colina	-	14-Dic

3. Discriminación entre Cyclospora y Eimeria por hibridación o RFLP. En algunos casos parásitos del género Eimeria pueden dar productos de amplificación por PCR iguales en tamaño a los obtenidos de *Cyclospora cayentanensis* y por lo tanto indistinguibles por electroforesis. Sin embargo, en estos casos el producto de amplificación puede diferenciarse porque contiene una secuencia de nucleótidos diferentes. El método descrito por la FDA para distinguir *Cyclospora* de Eimeria por la secuencia de nucleótidos se basa en que los amplificados de estos parásitos al contener secuencias de nucleótidos diferentes son cortados por enzimas de restricción en sitios distintos generando productos de distinto tamaño. Debido a la dificultad general y alto precio de las enzimas de restricción se ha implementado un método de hibridación para distinguir amplificados de un mismo tamaño con diferentes secuencias nucleotídicas. Este método está basado en la diferente movilidad electroforética de los híbridos generados entre productos con diferente secuencia. Como resultó imposible obtener muestras de Eimeria, el método fue probado con productos de amplificación con las diferencias en secuencias de nucleótidos entre *Cyclospora* y Eimeria. La figura siguiente muestra los resultados obtenidos cuando el producto es de igual secuencia nucleotídica y cuando la diferencia entre ellos es la descrita entre *Cyclospora* y Eimeria.



Línea Lf muestra el resultado obtenido con dos amplificados de igual secuencia, como ocurriría al comparar *Cyclospora-Cyclospora*. LA muestra el producto con dos amplificados de igual secuencia pero diferentes a la de Lf, como ocurriría al comparar Eimeria-Eimeria. Lf/LA muestra los productos obtenidos con los amplificados Lf y LA que difieren en secuencia tal como los productos de *Cyclospora* y Eimeria. Si una muestra diera un resultado positivo después de la amplificación, el producto se combinará con el amplificado obtenido en el control positivo. Se obtendrá el resultado en LA si es realmente positivo para *cyclospora* o el mostrado en Lf/LA si es un parásito del género Eimeria.

Paquete (kit) de reactivos y protocolo par su uso.

Una vez validado el procedimiento se definió el paquete de reactivos necesario para su aplicación. En la sección anexos se incluye el manual de instrucciones para su uso que contiene una breve descripción de las bases del método, los componentes y un protocolo detallado para su uso detallado.

Aspectos metodológicos.

A continuación entregamos los detalles de la metodología implementada, tanto de los procedimientos como de la preparación de reactivos, incluyendo los proveedores.

Preparación de plasmidio PCR 2.1 (lisis alcalina)

Este protocolo describe la preparación de DNA del plasmidio PCR 2.1, mantenido en *Escherichia coli*, que contiene una región del 18 S rRNA (600 pares de bases) de *Cyclospora cayetanensis*, obtenida por amplificación del DNA de este parásito con los partidores o "primers" Cyc1FE y Cyc2RB, descritos mas abajo. Este protocolo se basa en la técnica descrita en Molecular cloning. A laboratory manual. T. Maniatis et al. Cold Spring Harbor Laboratory. U.S.A. Esta preparación de DNA constituirá el control positivo incluido en el paquete final para realizar la determinación.

1. Crecer un cultivo de *E. coli* con el plasmidio hasta la saturación en medio de crecimiento.
2. Centrifugar 1.5 ml del cultivo a 14000 rpm por 20 seg.
3. Resuspender pellet en 100 µl de solución GTE y dejar reposar 5 min. a temperatura ambiente
4. Agregar 200 µl de solución NaOH/SDS mezclar y dejar 5 min. en hielo
5. Agregar 150 µl de solución de acetato de potasio 3M, agitar con vortex 2 seg. y poner en hielo 5 min.
6. Centrifugar a 14000 rpm por 3 min. y transferir 0.4 ml de sobrenadante a un tubo nuevo.
7. Agregar 0.8 ml de etanol al 95% y dejar 2 min. a temperatura ambiente
8. Centrifugar a 14000 rpm. por 3 min. y lavar el pellet con 1 ml de etanol al 70%, secar con vacío.
9. Resuspender pellet en 30 µl de TE y luego guardar a -20°.

Composición de soluciones:

Medio de crecimiento: Consiste en Caldo Luria, que contiene los siguientes elementos:

Triptona	10 g. (Merck, DIFCO, Winkler)
Extracto de Levadura	5 g. (Merck, DIFCO, Winkler)
NaCl	5 g.
NaOH 1N	1 ml.

Agregar agua destilada para 1 L y esterilizar en autoclave.

GTE:

Glucosa	50 mM (Merck, DIFCO, Winkler)
Tris HCl	25 mM pH 8.0
EDTA	10 mM

NaOH/SDS:

NAOH	0.2 M
SDS	10 % (Sigma, Merck)

TE: Tris HCl, 10 mM pH 8.0; EDTA, 1 mM

Extracción de DNA desde heces.

1. Se mezclan 50µl de muestra de heces con 100µl de solución CLB y se incuba a 75°C por 3 horas.
2. Luego se somete a 4 tratamientos sucesivos de congelamiento (nitrógeno líquido o hielo seco por 5 min.-) y descongelamiento (75°C por 5 min.)
3. Se centrifuga a 15000g por 5 min.
4. El sobrenadante se purifica utilizando el kit Glass max (Gibco BRL, Cat.Nº 15590-060) de acuerdo a las instrucciones del proveedor:
 - Mantener baño a 65°C para calentar TE
 - Agregar 4.5 vol. de solución de unión del kit (NaI) a la muestra
 - Vaciar mezcla DNA/sol de unión al spin cartridge y centrifugar a 13000g por 20 seg. Guardar la solución hasta recuperar el DNA
 - Agregar 400µl de buffer de lavado incluido en el kit, (a 4°C) y centrifugar a 13000g por 20 seg. Vaciar el tubo y repetir dos veces.
 - Después de remover el buffer de lavado por última vez, centrifugar a 13000g por 1min.
 - Transferir el spin cartridge al tubo de recuperación de muestra. Agregar 40µl de TE (a 65°C) al spin cartridge. Centrifugar a 13000g por 20 seg. para eluir el DNA.
 - Guardar a -20°C

Composición de soluciones:

CLB:

Nonidet P-40	1% (BioRad)
SDS	0.1%(BioRad)
NaOH	0.05M
proteinasas K	1 mg/ml; (Gibco, BiosChile)
RNAsa A)	1mg/ml Gibco, BiosChile)

TE:

Tris HCl	10 mM pH 8.0
EDTA	1 mM

Solución de Unión: (GlassMAX™)

NaI 6 M

Buffer de Lavado: (GlassMAX™)

Diluir 4ml del concentrado en :

Agua destilada	71 ml
Etanol Absoluto	85 ml

Protocolo para la obtención de DNA de *Cyclospora* desde frambuesa.

1. Poner 250 gr de berries en 250 ml agua destilada estéril y filtrada .
2. Agitar suavemente durante 20 minutos
3. Distribuir el líquido en tubos.
4. Centrifugar a 1000 x g por 10 min.
5. Aspirar sobrenadante.
6. Juntar los pellets y dejar aprox. 1 ml de sobrenadante
- 7.- Centrifugar a 1000 x g por 10 min. Aspirar el sobrenadante.
- 8.- Resuspender el pellet en 50 a 100 μ l.
- 9.- Agregar 2 volúmenes de CLB e incubar a 75° C por 3 horas.
- 10.- Continuar desde el punto 2.- del protocolo de extracción de DNA desde heces.

Composición de soluciones:**CLB:**

Nonidet P-40	1%
SDS	0.1%
NaOH	0.05M
proteinasas K	1 mg/ml;
RNasa A)	1mg/ml

Protocolo de amplificación de un fragmento del gene rRNA pequeño de *Cyclospora cayetanensis*.

Los DNAs obtenidos en la forma indicada arriba se utilizan para la detección del gene 18SrRNA de *Cyclospora* por amplificación por medio de la Reacción en cadena de la Polimerasa (PCR) y posterior detección del producto en los casos positivos por electroforesis en geles de poliacrilamida y tinción con nitrato de plata.

Inicialmente se prepara la solución con los reactivos y enzima para realizar el PCR. Ésta se prepara de acuerdo al siguiente Cuadro, según el número de muestras a analizar.

Primera amplificación (número de reacciones)				
Componentes mezcla PCR	4X	8X	16X	24X
Agua estéril	59	118	237	355
Buffer 10X	15	30	60	90
Nucleotidos (0.2 mM)	12	24	48	72
Mg (2.0 mM)	12	24	48	72
Primer CYCF1E (0.4 uM)	6	12	24	36
Primer CYCR2B (0.4uM)	6	12	24	36
BSA (10mg/ml)	6	12	24	36
Taq (2.5 U)	0,8	1,6	3,2	4,8

Posteriormente se distribuyen 23 µl de esta mezcla en cada tubo y se agregan 6.6 ul de las muestras de DNA, diluidas 1/100, 1/10 en agua destilada y sin diluir. Adicionalmente se preparan :

- Control negativo conteniendo 23 µl de agua destilada
- Control positivo conteniendo plasmido PCR 2.1. diluído 1/10⁶.

Los tubos son finalmente cerrados cuidadosamente y se someten a los ciclos de temperatura necesarios para amplificación con el siguiente programa:

1 ciclo a 94 °C por 3 min.

45 ciclos de 94°C por 30 seg., 55°C por 30 seg. y 72°C por 90 seg.

1 ciclo de 72 °C por 9 min.

Una vez llevada a cabo esta amplificación, se preparan los reactivos para la segunda amplificación, en la forma indicada en el siguiente cuadro.

Segunda amplificación				
Componentes mezcla PCR	4X	8X	16X	24X
Agua estéril	81,6	146,9	277	400
Buffer 10X	18,8	33,8	63,8	93,75
Nucleotidos (0.2 mM)	15	27	51	75
Mg (2.0 mM)	15	27	51	75
Primer CYCF3E (0.4 uM)	7,5	13,6	25,5	37,5
Primer CYCR4B (0.4uM)	7,5	13,6	25,5	37,5
Taq (1.25 U)	0,5	0,9	1,7	2,5

Se distribuyen 29 μ l de esta mezcla en los tubos para amplificación y se agrega 1 μ l de amplificado del DNA anterior a cada tubo. Se incluye además un control negativo conteniendo 1 μ l de agua destilada en lugar de muestra. Estos tubos se someten a los ciclos en forma indicada anteriormente excepto que se utilizan 60°C en los casos que se utilizaron 55°C anteriormente. Guardar las muestras a 4°C hasta realizar la electroforesis.

Composición de soluciones:

Buffer 10X.

KCl 0.5 M,

Tris-HCl 0.1 M, pH 8.3

Nucleótidos.

dATP, dCTP, dGTP, dTTP 2.5 mM cada uno. (Promega, Fermelo; Gibco, BiosChile)

Mg.

Mg Cl₂ 25 mM

Primer CYCF1E. Oligonucleotido TACCCAATGAAAACAGTTT, 10 mM en agua

Primer CYCR2B Oligonucleotido CAGGAGAAGCCAAGGTAGG 10 mM en agua

Primer CYCF3E Oligonucleotido CCTTCCGCGCTTCGCTGCGT 10 mM en agua.

Primer CYCR4B Oligonucleotido CGTCTTCAAACCCCTACTG 10 mM en agua.

(Fabricado a pedido por Centro de Síntesis y Análisis de Macromoléculas. Universidad de Chile. Fono 7357139)

Taq. Enzima Taq polimerasa (2.5 U/ μ l) (Promega, Fermelo; Gibco, BiosChile)

Protocolo para detección del amplificado por electroforesis en geles de poliacrilamida y tinción con nitrato de plata.

1. Armar cámara de electroforesis para geles de 10 x 12 cm y de 0,7 mm de grosor, aproximadamente, según las indicaciones del proveedor.
2. Mezclar las siguientes soluciones (cantidades para un gel):

Agua destilada	3.25 ml
Acril-Bis	6.6 ml
TBE5X	2.5 ml
APS 15%	65 µl (BioRad)
TEMED	12.5 µl
3. Vaciar la mezcla en la cámara de electroforesis, evitando la formación de burbujas, y colocar la peineta para la formación de los pozos para muestras, según las indicaciones del manual del aparato.
4. Lavar los pocillos con TBE 1X
5. Mezclar 5 µl de muestra con 3 µl de Tampón de Carga y cargar las muestras en los pocillos del gel.
6. Terminar el armado de la cámara, llenando recipientes inferior y superior con TBE, y correr la electroforesis por 1 hr a 150 V.

Soluciones:

Acril-bis.

Acrilamida 15%/ bisacrilamida 0.4% en agua destilada. (BioRad)

TBE5X.

Tris (base)	56 g,
Ácido Bórico	27.5 g, (Merck)
EDTA (sal disódica)	3.7 g (Merck)

en un litro de agua destilada.

TBE1X.: TBE5X diluido 1/5 con agua destilada.

Tampón de Carga.

Azul de bromophenol	0.025 g (Merck)
Xylene cyanol	0.025 g. (Merck)

en 50 ml de TBE más 50 ml de glicerol.

Tinción.

1. Retirar el gel de la cámara y fijarlo en un recipiente con 50 ml de etanol-ac. acético, diluido 10 veces por 20 minutos.
2. Retirar solución fijadora y reemplazarla por 50 ml de solución AgNO_3 , diluida 100 veces, manteniéndola por 20 minutos.
3. Retirar solución de AgNO_3 y lavar el gel dos veces con agua destilada, agitando suavemente y manteniendo el agua de lavado por solo 5 a 10 segundos.
4. Agregar la solución de Revelado y mantener agitando hasta observar bandas bien teñidas (15 a 30 minutos).
- 5.- Fijar en etanol-ác. acético para detener la reacción.

Soluciones:Etanol-Ac. Acético. 10X

Etanol 95 ml (Merck)
Ac. Acético 5ml (Merck)
agua destilada 900 ml.
Se debe diluir 1/10 en agua antes de usar.

 AgNO_3 . 100X

AgNO_3 0.9 g (Merck)
agua destilada 500 ml.
Guardar protegido de la luz.
Se debe diluir 1/100 antes de usar

Solución reveladora.

Formaldehído al 37% 0.5 ml (Merck)
NaOH 7.5% 20 ml (Merck)
de agua destilada 30 ml.
Usar inmediatamente.

Problemas enfrentados durante la ejecución del proyecto. El principal problema consistió en la obtención de muestras positivas de *Cyclospora* y *Eimeria* pues éstas solo están disponibles en escasos laboratorios, todos fuera de Chile. La obtención de muestras de *Cyclospora* fue resuelta exitosamente, como se describió en aspectos metodológicos. No fue posible, sin embargo, obtener muestras de *Eimeria* a pesar de numerosos intentos. Por este motivo la implementación de la prueba para distinguir *Cyclospora* de *Eimeria* se realizó con amplificadores de regiones de similar función y también de similar diferencia en secuencia de nucleótidos. Pero esta prueba solo es necesaria en caso que se obtenga alguna muestra positiva por PCR. Debido a que todas las muestras examinadas a la fecha han sido negativas es poco probable que sea requerida. En caso de necesitarse, por resultar alguna muestra positiva al utilizar nuestro kit, estamos comprometidos a efectuar esta prueba en nuestro laboratorio si así es requerido.

Calendario de ejecución. El calendario sufrió pequeñas modificaciones, consistente en la prolongación de las pruebas de verificación para incluir la temporada primavera-verano 1999, y la postergación de la implementación del método para discriminar *cyclospora* de *Eimeria* en caso de obtenerse resultados positivos por PCR. La modificación de estas actividades están indicadas en la siguiente tabla

1	Capacitación de personal técnico	15 Agosto	15 de Sept.
2	Implementar método de discriminación entre <i>Cyclospora</i> y <i>Eimeria</i>	15 Octubre	15 Noviembre
3	Expositores dan charlas a técnicos empresas.	15 Sep.	15 Nov.
4	Ejecución de test de validación	5 Dic. 99	30 Dic. 99
5	Análisis de resultados	15 Dic. 99	10 Enero 00
6	Verificación de resultados finales. Informe final	15 Dic. 99	15 Enero 00

Difusión.

Se capacitó personal en la ejecución del método descrito y se expuso el avance a técnicos de empresas en el taller y en las reuniones descritas en otra sección de este informe. El taller consistió en una sesión teórica de 3 horas realizada el 1° de Octubre y dos sesiones prácticas de 8 horas cada una realizadas el 7 y 8 de Octubre.

Conclusiones y recomendaciones.

Se implementó un método sensible para la detección de *Cyclospora cayetanensis* en frambuesa y se armaron kits prototipos para su aplicación en otros laboratorios interesados. Estos kits estarán disponibles a través de FDF para su compra por los interesados, de acuerdo a un convenio previamente establecido. El kit puede también ser utilizado para la detección de *Cyclospora* en heces de humanos y en agua, introduciendo simples modificaciones al método. Se recomienda que el uso de este kit sea realizado por técnicos con experiencia en análisis bioquímico en laboratorios bien equipados.

Anexo. Se incluye modelo de guías para el uso del kit de reactivos

PAQUETE DE REACTIVOS PARA LA DETECCIÓN DE *CYCLOSPORA CAYETANENSIS* EN FRAMBUESA

Este paquete contiene los reactivos específicos para detectar *Cyclospora cayetanensis* en frambuesa por un método moderno de biología molecular. Se basa en la detección de una región del gene del RNA ribosomal pequeño específica de *C. cayetanensis*. Los parásitos potencialmente presentes en la frambuesa son inicialmente concentrados para extraer su DNA. Desde este DNA se amplifica posteriormente la región indicada por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y ésta es luego detectada en geles teñidos con nitrato de plata.

Equipo y materiales de laboratorio necesario para efectuar la prueba.

Centrífuga con capacidad para tubos de 50 ml o más y de alcanzar una fuerza centrífuga de 1000 g

Centrífuga para tubos eppendorf capaz de alcanzar 15.000g

Agitador recíproco u orbital

Baño termoregulable hasta 70 °C

Cámara de electroforesis para geles de 8X10X0.75 cm.

fuelle de poder de 150 Volts

Termociclador para PCR

Micropipetas

Propipeta para pipetas de 10 ml

Pipetas serológicas de varios tamaños

Reactivos y materiales generales necesarios

Agua destilada

Tubos eppendorf de 1.5 o 2.0 ml

Tubos de centrifuga de 50 ml

hielo seco

Reactivos o materiales específicos no proveídos

kit Glass max (Gibco BRL, Cat.Nº 15590-060)

Paquete amplificación.

CLB

TE

Agua estéril

Buffer 10X

Nucleotidos

Mg

Primer 1

Primer 2

Primer 3

Primer 4

BSA

Taq

Plasmido

Paquete de electroforesis y tinción

Acril-bis.

TBE5X.

TBE1X:

APS.

TEMED

Buffer de carga

Etanol-Ac. Acético.10X

Ag NO₃. 100X

Solución reveladora.

MÉTODOS**Concentración de parásitos**

1. Poner 250 gr. de berries en 250 ml agua destilada estéril y filtrada .
2. Agitar suavemente durante 20 minutos
3. Distribuir el líquido en tubos.
4. Centrifugar a 1000 x g por 10 min.
5. Aspirar sobrenadante.
6. Juntar los pellets y dejar aprox. 1 ml de sobrenadante
7. Centrifugar a 1000 x g por 10 min. Aspirar el sobrenadante.
8. Resuspender el pellet en 50 a 100 µl de agua destilada

Extracción de DNA.

9. Agregar 2 volúmenes de CLB e incubar a 75° C por 3 horas.
5. Esta solución se somete a 4 tratamientos sucesivos de congelamiento (en hielo seco por 5 min.) y descongelamiento (75°C por 5 min.)
6. Se centrifuga a 15000g por 5 min.
7. El sobrenadante se purifica utilizando el kit Glass max (Gibco BRL, Cat.N° 15590-060) de acuerdo a las instrucciones del proveedor, en la siguiente forma:
 - Mantener baño a 65°C para calentar TE
 - Agregar 4.5 vol. de solución de unión del kit (NaI) a la muestra
 - Vaciar mezcla DNA/sol de unión al spin cartridge y centrifugar a 13000g por 20 seg. Guardar la solución hasta recuperar el DNA
 - Agregar 400µl de buffer de lavado incluido en el kit, (a 4°C) y centrifugar a 13000g por 20 seg. Vaciar el tubo y repetir dos veces.
 - Después de remover el buffer de lavado por última vez, centrifugar a 13000g por 1min.
 - Transferir el spin cartridge al tubo de recuperación de muestra. Agregar 40µl de TE (a 65°C) al spin cartridge. Centrifugar a 13000g por 20 seg. para eluir el DNA.
 - Guardar a -20°C

Amplificación por PCR

Prepare la mezcla para las reacciones de PCR según el número de reacciones a realizar de acuerdo a la tabla adjunta. Requiere en total realizar tres reacciones por muestra, más otras dos correspondientes a un control positivo y a otro negativo.

Primera amplificación (número de reacciones)			
Componentes mezcla PCR	8X	16X	24X
Agua estéril	118	237	355
Buffer 10X	30	60	90
Nucleotidos (0.2 mM)	24	48	72
Mg (2.0 mM)	24	48	72
Primer CYCF1E (0.4 uM)	12	24	36
Primer CYCR2B (0.4uM)	12	24	36
BSA (10mg/ml)	12	24	36
Taq (2.5 U)	1,6	3,2	4,8

Posteriormente se distribuyen 23 μ l de esta mezcla en cada tubo y se agregan:

7 μ l de las muestras de DNA, sin diluir y diluidas 1/10 y 1/100 en agua destilada

7 μ l de agua destilada

7 μ l de plasmido

Los tubos son finalmente cerrados cuidadosamente y se someten a los ciclos de temperatura necesarios para amplificación con el siguiente programa:

1 ciclo a 94 °C por 3 min.

45 ciclos de 94°C por 30 seg., 55°C por 30 seg. y 72°C por 90 seg.

1 ciclo de 72 °C por 9 min.

Una vez llevada a cabo esta amplificación, se preparan los reactivos para la segunda amplificación, en la forma indicada en el siguiente cuadro.

Segunda amplificación			
Componentes mezcla PCR	8X	16X	24X
Agua estéril	146,9	277	400
Buffer 10X	33,8	63,8	93,75
Nucleotidos (0.2 mM)	27	51	75
Mg (2.0 mM)	27	51	75
Primer CYCF3E (0.4 uM)	13,6	25,5	37,5
Primer CYCR4B (0.4uM)	13,6	25,5	37,5
Taq (1.25 U)	0,9	1,7	2,5

Se distribuyen 29 μ l de esta mezcla en los tubos para amplificación y se agrega 1 μ l del primer amplificado a cada tubo. Se incluye nuevamente un control negativo conteniendo 1 μ l de agua destilada en lugar de muestra. Estos tubos se someten a los siguiente ciclos de amplificación

1 ciclo a 94 °C por 3 min.

45 ciclos de 94°C por 30 seg., 60°C por 30 seg. y 72°C por 90 seg.

1 ciclo de 72 °C por 9 min.

Finalmente las muestras son guardadas a 4°C hasta realizar la electroforesis.

Electroforesis

Armar cámara de electroforesis para geles de 10 x 12 cm y de 0,7 mm de grosor, aproximadamente, según las indicaciones del proveedor.

7. Mezclar las siguientes soluciones (cantidades para un gel):

Agua destilada	3.25 ml
Acril-Bis	6.6 ml
TBE5X	2.5 ml
APS	65 μ l (BioRad)
TEMED	12.5 μ l

8. Vaciar la mezcla en la cámara de electroforesis, evitando la formación de burbujas, y colocar la peineta para la formación de los pozos para muestras, según las indicaciones del manual del aparato.

9. Lavar los pocillos con TBE 1X

10. Mezclar 5 μ l de muestra con 3 μ l de Tampón de Carga y cargar las muestras en los pocillos del gel.

11. Terminar el armado de la cámara, llenando recipientes inferior y superior con TBE, conectar la fuente de poder con el polo positivo en la cámara inferior y correr la electroforesis por 1 hr a 150 V.

Tinción.

5. Retirar el gel de la cámara y fijarlo en un recipiente con 50 ml de etanol-ac. acético acético, diluido 10 veces por 20 minutos.

6. Retirar solución fijadora y reemplazarla por 50 ml de solución AgNO_3 diluida 100 veces, manteniéndola por 20 minutos.

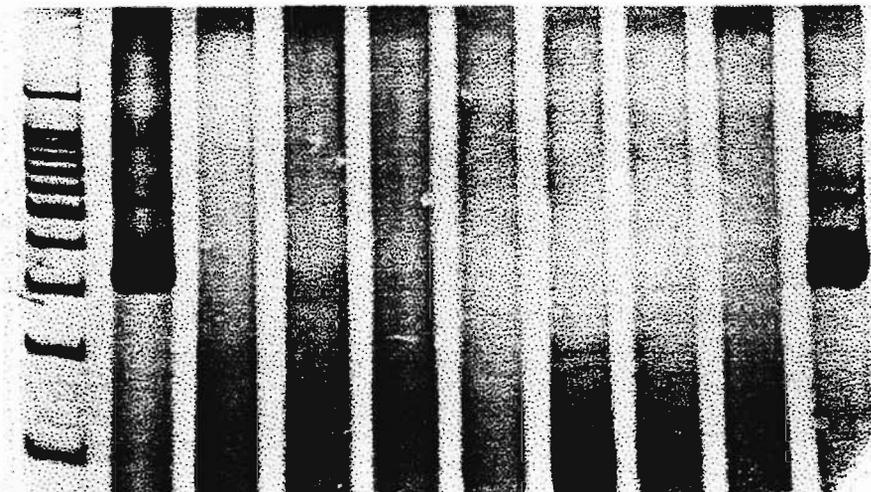
7. Retirar solución de AgNO_3 y lavar el gel dos veces con agua destilada, agitando suavemente y manteniendo el agua de lavado por solo 5 a 10 segundos.

8. Agregar la solución de Revelado y mantener agitando hasta observar bandas bien teñidas (15 a 30 minutos).

5.- Fijar en etanol-ác. acético para detener la reacción.

Una vez teñido el gel deberá verse como el ejemplo mostrado

M C+ 2 3 4 5 6 7 C(-) C(+)



M.- Marcador de Peso Molecular; C(-), Control negativo de amplificaciones; C(+), Control positivo de amplificaciones; 2 a 7.- Muestras negativas.

Bibliografía Consultada.

1. Pieniazek, N.J., et al. PCR confirmation of infection with *Cyclospora cayetenensis*. *Emerg. Infect. Dis* 2 :357-359(1996).
2. *Cyclospora cayetanensis* Protocol: Concentration and preparation of oocysts from produce for the polymerase chain reation (PCR) and Microscopy. Protocolo revisado por la FDA y publicado en <http://vm.cfsan.fda.gov/~mow/cyclmet.html>.
3. Relman D. et al. Molecular phylogenetic analysis of *Cyclospora*, the human intestinal pathogen, suggests that it is closely related to *Eimeria* species. *J. Inf. Dis.*

173 :440-445 (1996)

4. Jinneman K et al. Differentiation of *Cyclospora* sp and *Eimeria* spp. Using PCR and RFLP. Laboratory Information Bulletin LIB N° 4044. U.S. Food and drug Administration.
5. Cryptosporidium, enterocytozoon, and cyclospora infections in pediatric and adult patients with diarrhea in Tanzania. Cegielski JP, Ortega YR, McKee S, Madden JF, Gaido L, Schwartz DA, Manji K, Jorgensen AF, Miller SE, Pulipaka UP, Msengi AE, Mwakyusa DH, Sterling CR, Reller LB *Clin Infect Dis* 1999 Feb 28;27:314-21
6. The return of *Cyclospora* in 1997: another outbreak of cyclosporiasis in North America associated with imported raspberries. *Cyclospora Working Group* [see comments. Herwaldt BL, Beach MJ. *Ann Intern Med* 1999 Feb 2;130:3:210-20
7. *Cyclospora* species as a cause of diarrhoea in humans [letter]. Casemore DP *Br J Biomed Sci* 1999 56:1:78
8. *Cyclospora*: an enigma worth unraveling. Sterling CR, Ortega YR *Emerg Infect Dis* 1999 Jan-Feb 5:1:48-53.