

**COMPARACIÓN DE DOS MÉTODOS DE EXTRACCIÓN DE ADN EN PARÁSITOS
 (*Sarcoptes scabiei*) DE ALPACAS HUACAYA DE LA PROVINCIA DE
 HUANCAVELICA**

COMPARISON OF TWO METHODS OF DNA EXTRACTION IN PARASITES (*Sarcoptes
 scabiei*) OF HUACAYA ALPACAS FROM THE PROVINCE OF HUANCAVELICA

Requena Angy¹  y Paucar-Chanca Rufino¹ 

¹ Laboratorio de Mejoramiento Genético – Universidad Nacional de Huancavelica. Huancavelica. Perú.
rufino.paucar@unh.edu.pe

Recepción: 15 de enero de 2023

Aprobación: 18 de marzo de 2023

Resumen

El objetivo del presente trabajo fue comparar dos métodos de extracción de ADN (Fenol – Cloroformo y Quick-DNA™ 96 Plus Kit) en parásitos (*Sarcoptes scabiei*) de alpacas Huacaya en cuanto a cantidad y calidad (pureza e integridad). Para ello se seleccionaron 18 alpacas, de las cuales se extrajo muestras de las lesiones de la piel producto de la sarna. Posteriormente se realizó el aislamiento de los parásitos y la extracción de ADN con los dos métodos de extracción mencionados. Para el análisis de los datos se utilizó estadística descriptiva y la Prueba U de Mann-Whitney, utilizando el programa estadístico R. Obteniendo los siguientes resultados: la cantidad de ADN para el método Fenol – Cloroformo (F-C) fue de 6.4 ± 1.2 ng/ul y para el método del Kit Quick-DNA™ 96 Plus (Quick) fue de 6.4 ± 1.6 ng/ul, no encontrándose diferencias estadísticas significativas ($P > 0.05$), en cuanto al rango del índice de pureza del ADN (A260/A280), estuvo entre 1.8 ± 0.1 nm y 1.9 ± 0.1 nm para el método F-C y el método Quick respectivamente, no encontrándose diferencias estadísticas significativas ($P > 0.05$); respecto a la integridad, se observaron integridades regulares en ambos métodos. La cantidad de ADN obtenido con los dos métodos de extracción es poca, pero útil para estudios moleculares. En cuanto a calidad, está dentro del rango óptimo. Ambos métodos de extracción son similares con respecto a la cantidad y calidad del ADN.

Palabras clave: alpaca; ADN; *Sarcoptes scabiei*

Summary

The objective of this work was to compare two DNA extraction methods (Phenol – Chloroform and Quick-DNA™ 96 Plus Kit) in parasites (*Sarcoptes scabiei*) of Huacaya alpacas in terms of quantity and quality (purity and integrity). For this, 18 alpacas were selected, from which samples of the skin lesions caused by scabies were extracted. Subsequently, the isolation of the parasites and the extraction of DNA were carried out with the two extraction methods mentioned. For data analysis, descriptive statistics and the Mann-Whitney U Test were used, using the R statistical program. Obtaining the following results: the amount of DNA for the Phenol – Chloroform (F-C) method was 6.4 ± 1.2 ng/ ul and for the Quick-DNA™ 96 Plus Kit (Quick) method it was 6.4 ± 1.6 ng/ul, not finding significant statistical differences ($P>0.05$), regarding the range of the DNA purity index (A_{260}/A_{280}), was between 1.8 ± 0.1 nm and 1.9 ± 0.1 nm for the F-C method and the Quick method respectively, not finding significant statistical differences ($P>0.05$); Regarding completeness, regular completenesses were observed in both methods. The amount of DNA obtained with the two extraction methods is small, but useful for molecular studies. As for quality, it is within the optimal range. Both extraction methods are similar with respect to the quantity and quality of the DNA.

Keywords: alpaca; DNA; *Sarcoptes scabiei*

Introducción

Los Camélidos Sudamericanos (CSA) constituyen un recurso zoogenético importante para las poblaciones altoandinas. Bajo el término CSA se incluyen dos especies domésticas, la alpaca (*Vicugna pacos*) y la llama (*Lama glama*), y a dos silvestres, la vicuña (*Vicugna vicugna*) y el guanaco (*Lama guanicoe*) (FAO, 2005). Perú, es el primer productor de camélidos sudamericanos del mundo, con una población total de 4,288,231 unidades (Brenes *et al.*, 2001).

La crianza de CSA domésticos (alpacas y llamas) constituyen el principal medio de subsistencia para más de un millón de pequeños productores de los andes centrales de Sudamérica (Quispe *et al.*, 2009); en el caso del Perú según la FAO (2005), las alpacas y llamas constituyen el principal medio de subsistencia de un gran sector de la población de las zonas altoandinas, a través del aporte de fibra, carne, energía de trabajo y otros subproductos. Destacándose su eficiencia en el uso de la tierra en un ambiente adverso como lo son las frágiles praderas de los páramos andinos.

Uno de los factores limitantes en la producción de CSA es la presencia de enfermedades parasitarias, que afectan la salud del animal y en consecuencia disminuyen el rendimiento productivo de la

fibra y la carne. Dentro de los problemas parasitarios más comunes en los camélidos sudamericanos se encuentra la sarna. Esta enfermedad causa pérdidas cuantiosas para los productores disminuyendo la calidad y el peso del vellón. Actualmente, el tratamiento de la sarna se realiza de manera tradicional, utilizando principalmente productos naturales (aceite quemado, grasa de cerdo, etc.) y la ivermectina. Para el tratamiento y diagnóstico desde un enfoque molecular todavía no se han desarrollado estudios, lo cual aportaría mucho para un control más eficaz de esta enfermedad. Para desarrollar estudios respecto al diagnóstico y tratamiento de una enfermedad desde un enfoque molecular, el primer paso es optimizar un protocolo de extracción de ADN. Por ello, la finalidad del presente trabajo fue comparar dos métodos de extracción de ADN en parásitos (*Sarcoptes scabiei*) de alpacas respecto a cantidad y calidad, con el fin de optimizar un protocolo de extracción de ADN como base para futuros estudios en el campo molecular.

Material y métodos

Muestras

Se trabajó con muestras de las lesiones de la piel de 18 alpacas enfermas con sarna de la provincia de Huancavelica, obtenidas por muestreo de tipo no probabilístico intencionado. Las muestras fueron

transportadas en un cooler y confirmadas por microscopía en el Laboratorio de Mejoramiento Genético (LAMG) de la Universidad Nacional de Huancavelica, luego fueron almacenadas a -20 °C hasta su proceso.

Aislamiento de los parásitos

En una placa Petri se colocó una pequeña porción de la muestra de piel con sarna (costra), luego se le añadió etanol al 80% y se examinó con un estereoscopio, y con la ayuda de una micropipeta se absorbieron los ácaros que se iban desprendiendo de la muestra de piel.

Extracción de ADN

La extracción de ADN se realizó a través del método Fenol-Cloroformo (Sambrook y Russell, 2006) y el protocolo del kit comercial Quick-DNA™ 96 Plus Kit.

Cuantificación de ADN

La concentración y pureza de las muestras de ADN extraídas, se midió mediante espectrofotometría. Las muestras fueron cuantificadas con un nanofotómetro (P-

Class – Implen), de igual manera la calidad del ADN se evaluó con el mismo equipo, por la proporción entre las absorbancias 260 nm / 280 nm para cada método de extracción de ADN.

Electroforesis

La integridad (calidad) del ADN extraído, se analizó con la técnica de electroforesis en gel de agarosa al 1%.

Análisis estadístico

Para el análisis de los datos se utilizó estadística descriptiva y la Prueba U de Mann-Whitney, utilizando el programa estadístico R (The R Project for Statistical Computing).

Resultados y discusión

De acuerdo a la Tabla 01, los resultados obtenidos para el método Fenol – Cloroformo, muestra una concentración media de ADN de 6.4 ± 1.2 ng/ul y para el método Quick-DNA™ 96 Plus Kit una concentración media de ADN de 6.4 ± 1.6 ng/ul.

Tabla 01. Concentración (ng/ul) de ADN en los dos métodos de extracción.

Métodos	N	Mínimo	Máximo	Media	Desviación estándar
F-C	9	4.5	8.0	6.4 ^a	± 1.2
Quick	9	4.0	8.5	6.4 ^a	± 1.6

* Letras iguales en la misma columna indican que no existe diferencias estadísticas significativas (P>0.05)

En la Tabla 02 observamos los valores de pureza, los cuales fueron de 1.8 ± 0.1 nm y 1.9 ± 0.01 para el método Fenol –

Cloroformo y Quick-DNA™ 96 Plus Kit respectivamente.

Tabla 02. Pureza (A260/A280 nm) de ADN en los dos métodos de extracción.

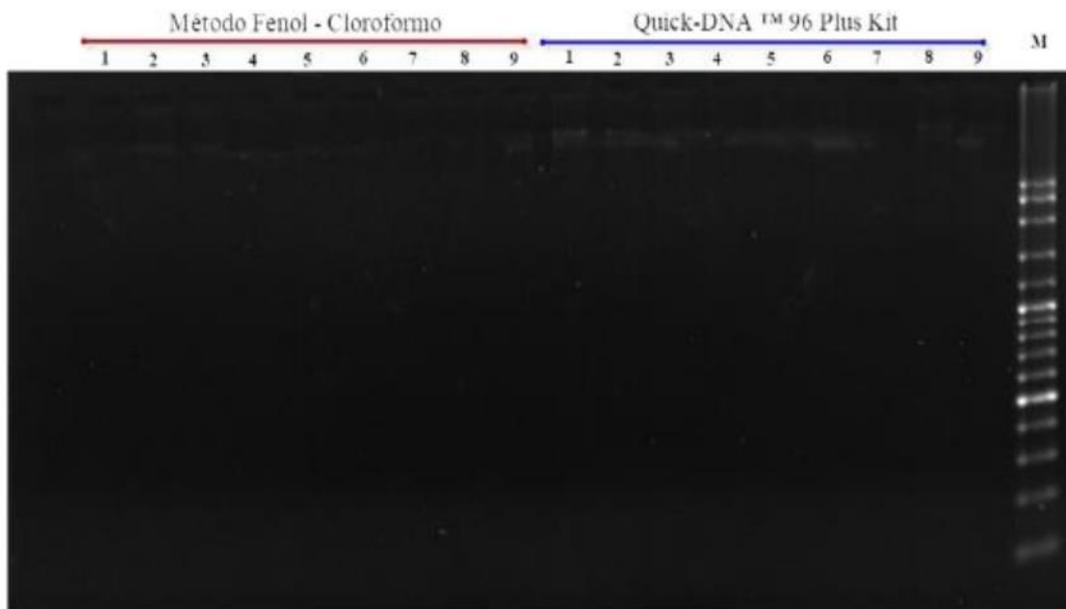
Métodos	N	Mínimo	Máximo	Media	Desviación estándar
F-C	9	1.7	2.0	1.8 ^a	± 0.1
Quick	9	1.6	2.0	1.9 ^a	± 0.1

* Letras iguales en la misma columna indican que no existe diferencias estadísticas significativas (P>0.05)

En la Imagen 01 se observa la migración de ADN, utilizando la técnica de electroforesis. Donde se puede apreciar y ratificar en primer lugar la baja

concentración de ADN obtenido con los dos métodos de extracción de ADN, también se observa una regular integridad del ADN en ambos métodos de extracción de ADN.

Imagen 01. Integridad del ADN en los dos métodos de extracción.



Los resultados respecto a cantidad y calidad de ADN son similares a los reportados por Dedhia *et al.* (2007) y Anon (2008). Por otro lado, los resultados respecto a la concentración de ADN son inferiores a los obtenidos por Díaz-Cano y Brady (1997) y Fowler (2011) quienes extrajeron ADN en otros parásitos (*Cyclospora cayetanensis* y

Trypanosoma cruzi), estas diferencias probablemente se deben al tipo de parásito, cantidad de parásitos para la extracción y método de extracción. Respecto a la calidad de ADN tanto en pureza e integridad son similares a lo reportados por varios autores (Khokhar *et al.* (2012), Lehmann y Kreipe (2001), Mahaisavariya *et al.* (2005), Sato *et*

al. (2001) y Rivero *et al.* (2006)). Cabe resaltar que estudios de extracción de ADN exclusivamente en *Sarcoptes scabiei* en alpacas no se han reportado hasta la fecha.

Conclusiones

La cantidad (6.4 ± 1.2 y 6.4 ± 1.6 ng/ul.) de ADN obtenido con los dos métodos de extracción es poca, pero útil para realizar estudios moleculares. En cuanto a la calidad respecto a la pureza (1.8 ± 0.1 y 1.9 ± 0.1 nm) del ADN se encuentra dentro del rango óptimo y respecto a la integridad estas presentan integridades regulares. Ambos métodos de extracción son similares respecto a la cantidad y calidad de ADN.

Agradecimientos

Los autores agradecen el apoyo económico y logístico del Programa Presupuestal 0066 de la Universidad Nacional de Huancavelica, que fomenta la investigación formativa.

Bibliografía

Anon, (2008). Northern Ireland disease surveillance october to december, 2007. *Vet.Rec.* 162, 393-396.

Brenes, E. R., Madrigal, K., Pérez, F., & Valladares, K. (2001). El cluster de los camélidos en Perú: diagnóstico competitivo y recomendaciones estratégicas. Instituto Centroamericano de Administración de Empresas.

Dedhia, P., Tarale, S., Dhongde, G., Khadapkar, R., y Das, B. (2007). Evaluation of DNA extraction methods and real time PCR optimization on formalin-fixed paraffin-embedded tissues. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 8(1), 55-59. https://journal.waocp.org/article_24559_of31e7de3594e2e8805a5a50350ce5b3.pdf.

Díaz-Cano, S. J., & Brady, S. P. (1997). Limiting Step for Retrieval of High-quality DNA. *Diagn Mol Pathol*, 6(6), 342-346.

FAO (2005). Global forest cover mapping for the United Nations Food and Agriculture Organization forest resources assessment 2000 program. *Forest science*, 49(3), 369-380.

Fowler, M. (2011). *Medicine and surgery of camelids*. John Wiley & Sons.

Khokhar, S. K., Mitui, M., Leos, N. K., Rogers, B. B., & Park, J. Y. (2012). Evaluation of Maxwell® 16 for automated DNA extraction from whole blood and formalin-fixed paraffin embedded (FFPE) tissue. *Clinical chemistry and laboratory medicine*, 50(2), 267-272.

Lehmann, U., & Kreipe, H. (2001). Real-time PCR analysis of DNA and RNA extracted from formalin-fixed and paraffin-embedded biopsies. *Methods*, 25(4), 409-418.

Mahaisavariya, P., Chaiprasert, A., Manonukul, J., Khemngern, S., & Tingtoy, N. (2005). Detection and identification of Mycobacterium species by polymerase chain reaction (PCR) from paraffin-embedded tissue compare to AFB staining in pathological sections. *J Med Assoc Thai*, 88(1), 108-13

Quispe, E. C., Rodríguez, T. C., Iñiguez, L. R., & Mueller, J. P. (2009). Producción de fibra de alpaca, llama, vicuña y guanaco en Sudamérica. *Animal Genetic Resources/Resources génétiques animales/Recursos genéticos animales*, 45, 1-14.

Rivero, E. R., Neves, A. C., Silva-Valenzuela, M. G., Sousa, S. O., & Nunes,

F. D. (2006). Simple salting-out method for DNA extraction from formalin-fixed, paraffin-embedded tissues. *Pathology-Research and Practice*, 202(7), 523-529.

Sambrook, J., & Russell, D. W. (2006). *The condensed protocols from molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Sato, Y., Sugie, R., Tsuchiya, B., Kameya, T., Natori, M., & Mukai, K. (2001). Comparison of the DNA extraction methods for polymerase chain reaction amplification from formalin-fixed and paraffin-embedded tissues. *Diagnostic Molecular Pathology*, 10(4), 265-271.