

Estandarización de un protocolo de extracción de ADN a partir de leche de búfalo  
para el diagnóstico de Leucosis.

Vanessa Maldonado Victoria

Angelly Katherin Poveda López

Asesores:

Juan Carlos González Gómez

Juan Carlos Rincón Flórez

Universidad tecnológica de Pereira

Facultad de ciencias de la salud

Medicina veterinaria y zootecnia

Pereira 2018

## **Estandarización de un protocolo de extracción de ADN a partir de leche de búfalo para el diagnóstico de Leucosis.**

### **Standardization of a DNA extraction protocol from buffalo milk to the diagnosis of Leukosis.**

Vanessa Maldonado V <sup>1</sup>, Angelly Poveda L <sup>1</sup>, Juan Rincón F <sup>2</sup>.

<sup>1</sup> Estudiantes, Programa de medicina veterinaria y zootecnia. Facultad de ciencias de la salud. Universidad Tecnológica de Pereira. <sup>2</sup> Docente asesor, Programa de medicina veterinaria y zootecnia. Facultad de ciencias de la salud. Universidad Tecnológica de Pereira.

#### **Resumen**

En este trabajo se modificó la técnica de salting out para la extracción de DNA en leche de búfalos de agua y se empleó la técnica de PCR para la detección del virus de la Leucosis bovina a partir de DNA en muestras de leches crudas. Para la extracción del DNA de la leche se emplearon dos métodos similares de salting out en los que se realizó la centrifugación de la leche con el uso de buffer de lisis (Tris-HCL, EDTA, NaCl), SDS, Proteinasa K y etanol. Con la única variación de que en el primer protocolo se retiró la primer capa superficial de grasa obtenida de la centrifugación, dando como resultado una concentración de ADN de 20,5µg/µl con una relación 260/280 de 1,77 mientras que en el segundo protocolo no se retiró la capa de grasa y se pudieron obtener concentraciones de ADN mayores con un promedio de 165,78 µg/µl con una relación 260/280 de 1,63, lo que permite clasificar como ADN de pureza aceptable. La obtención del DNA fue posible, demostrando así que el protocolo de extracción empleado permite obtener DNA en condiciones de pureza y cantidad suficiente a partir de pequeños volúmenes de leche. Las muestras fueron analizadas por PCR para evaluar posible presencia de BLV y se encontró que ninguna era positiva para el BLV obteniendo entonces una prevalencia del 0%.

**Palabras clave:** búfalos de agua, Leucosis bovina, Reacción en cadena de la polimerasa, protocolos de extracción.

## **Abstract**

In this work, the salting out technique for the extraction of DNA in water buffalo milk was modified and the PCR technique for the detection of bovine leukosis virus was used from DNA in crude milk samples. For the extraction of the DNA from the milk, two similar methods of salting out were used in which the centrifugation of the milk was performed with the use of lysis buffer (Tris-HCL, EDTA, NaCl), SDS, Proteinase K and ethanol. With the only variation that, in the first protocol the first superficial layer of fat obtained from the centrifugation was removed, resulting in a DNA concentration of  $20.5\mu\text{g} / \mu\text{l}$  with a 260/280 ratio of 1.77 while in the second protocol the fat layer was not removed, and higher DNA concentrations could be obtained with an average of  $165.78\mu\text{g} / \mu\text{l}$  with a 260/280 ratio of 1.63, which makes it possible to classify them as DNA of acceptable purity. The obtaining of the DNA was possible, demonstrating that the extraction protocol used allows obtaining DNA under conditions of purity and sufficient quantity from small milk volumes. The samples were analyzed by PCR to evaluate the possible presence of BLV and it was found that none was positive for BLV, therefore, obtaining a prevalence of 0 %

**Key Words:** water buffaloes, bovine leukemia, polymerase reaction chain, extraction protocol.

## **Introducción**

El ADN Constituye el material genético de los organismos superiores, es el componente químico primario de los cromosomas y el material del que están formados los genes (1). Algunos virus como el de la Leucosis Enzootica Bovina tienen la capacidad de integrarse en el ADN del hospedero y tener presencia en diferentes excreciones del animal, entre ellas la leche. Sin embargo, se desconoce si este virus es secretado en la leche de búfalos y no existen reportes que detallen un método de extracción por salting out en esta especie, que presenta unas características especiales en la leche que difieren de la de bovinos, donde ya se encuentran algunos reportes. La extracción del ADN de la leche constituye el punto de partida para establecer la frecuencia del virus en muestras de leche de búfalos.

Con la extracción de ADN a partir de leche bufalina se quiere encontrar material que sirva como base diagnóstica sobre enfermedades presentes en esta y su posible incidencia en el medio. Para la extracción de ADN de la leche será utilizado el método de Salting Out que es considerado como una técnica rápida y sensible, la cual requiere un costo menor comparado con otras técnicas más especializadas como las de los Kits comerciales.

La estandarización de un método económico para obtener el ADN, constituirá un punto importante de partida para futuras investigaciones, con el fin de evaluar la presencia de este virus en muestras de leche, sobre todo, si se tiene en cuenta los reportes asociados a la Leucosis bovina como un problema de salud pública, por su asociación con el cáncer de mama (2). La leche de búfalos puede constituir el vehículo de entrada del virus al cuerpo humano por el consumo de leche cruda o derivados lácteos sin pasteurizar, creando así la necesidad de implementar programas de control.

Una de las actividades para las que se utiliza la producción de búfalos es para la obtención de leche, una búfala en promedio puede alcanzar lactancias de  $270 \pm 25$  días, con una producción de leche de  $3000 \pm 1000$  litros por lactancia (3,4)

La leche es un líquido secretado por las glándulas mamarias de las hembras mamíferas que contiene muchas sustancias siendo el componente principal el agua y otras como lípidos, carbohidratos y proteínas, en menor valor algunos minerales y enzimas (5). Entre otros componentes de la leche se encuentran también las células somáticas como lo son los leucocitos de la sangre y las células epiteliales de la glándula mamaria, estos normalmente están presentes en bajas cantidades y suelen aumentarse durante procesos infecciosos o lesiones, la importancia de estas células somáticas es la participación en la defensa contra afecciones de la ubre (6). Estas células pueden ser utilizadas para detectar ADN de virus mediante pruebas diagnósticas que ayudan a la identificación de agentes patógenos que estén afectando al animal.

Las producciones bufalinas están en relación constante con el ganado bovino y filogenéticamente están emparentados, entonces, de alguna manera pueden

compartir enfermedades comunes como la brucelosis y la leucosis; aunque estas enfermedades aun no son claras en la mayoría de países del mundo, en países como Brazil ya se han confirmado casos de leucosis enzootica en búfalos (7).

La leucosis enzootica es una enfermedad neoplásica causada por la infección del virus de la leucosis bovina (VLB) que es un retrovirus, la infección generalmente es de forma crónica y asintomática. La importancia de estudiar este virus se mantiene en la capacidad de infectar las células de distintas especies animales y posiblemente incluyendo al hombre, esta infección es transmitida horizontalmente, la sangre y la leche son los principales medios de transmisión (8,9).

Este virus cuenta con varias proteínas estructurales que son clasificadas por su peso molecular, entre ellas está la p24 y gp51 que es la encargada de la respuesta humoral del huésped y ambas son inmunógenas, por lo cual los anticuerpos producidos contra ellas pueden ser identificados en casi todos los animales infectados (10).

El objetivo de este estudio fue estandarizar un protocolo de extracción de ADN por método de Salting Out modificado a partir de leche cruda de búfalo de agua para diagnosticar presencia de Leucosis.

## **Materiales y métodos**

### *Obtención de las muestras*

Se recolectaron muestras de leche cruda de seis hatos comerciales de diferentes razas búfalinas, ubicados entre los departamentos Quindío, Risaralda y Valle del Cauca, los cuales cuentan con un clima tropical, una temperatura que oscila entre los 23°C y 26°C y una altitud que va desde los 1300 a 1600 msnm aproximadamente.

### *Aislamiento del DNA*

De cada hato se tomaron 2 muestras pareadas para evaluar dos protocolos diferentes que tenían como base la extracción de ADN de leche bovina por el

método de salting out (11). Los métodos fueron modificados a la leche de búfalos de acuerdo a los siguientes protocolos:

Protocolo 1: Se tomaron muestras de 14ml de leche cruda en tubos falcón que ya estaban previamente marcados en la tapa y el lomo. Se dejaron reposar en el refrigerador a 4°C por 1 hora aproximadamente, se centrifugo a 3.500 RPM durante 8 minutos, luego se descartó el sobrenadante sin perturbar el botón de células, utilizando una pipeta Pasteur o un hisopo estéril para romper y extraer la capa de nata, se adicionaron 5ml de solución salina y se agito fuerte hasta lograr disolver el botón de células, se centrifugo nuevamente (de 2 a 3 veces más) a 3500 RPM durante 8 minutos y se descartó el sobrenadante sin perturbar el botón hasta observar el sobrenadante incoloro. Posteriormente se adicionaron 5ml de buffer de lisis (Tris-HCL, EDTA, NaCl, agua destilada) y se llevó al vortex hasta disolver el botón, se adiciono 300 µl de SDS al 10% y luego se agregó de 26.5 µl de Proteinasa K. Habiendo agregado a cada muestra el SDS, la Proteinasa K y el buffer de lisis se procedió a resuspender nuevamente el botón mediante vortex suave durante 1 minuto y se llevó a Incubar al baño maría a 55°C durante 12 horas, posteriormente se refrigeraron a 4°C por 5 minutos, se le adiciono 2 ml de solución NaCl saturada y agito. Con esto se formó un precipitado de proteínas blanco que NO se disolvía. Se Centrifugo a 3.500 RPM durante 15 minutos y se eliminó el sobrenadante sin perturbar el botón. Se adicionaron 4 ml de etanol al 100% a -20C y se Invierte el tubo varias veces hasta observar una madeja y nuevamente se centrifugo a minutos, se descartó el etanol sin dejar caer la madeja y se agregaron 2ml de etanol al 70% mediante vortex suave se resuspendió la madeja durante 1 minuto, se volvió a descartar el sobrenadante sin perder la madeja y se dejó secar muy bien los tubos por 24 a 48 horas para que se evaporara el etanol. Una vez secos los tubos, se adiciono buffer TE 300 µl y se alicuotaron en viales de 1,5 µl y almacenados a -20°C para el posterior análisis por PCR.

El protocolo 2. Fue igual al protocolo 1, sólo que en este caso no se rompió la capa de nata, ni se adicionó la solución salina, solo se procede a pasar directamente de la centrifugación a la adición del buffer de lisis.

*Análisis del DNA extraído*

Se realizó la cuantificación de ADN mediante un nanodrop 2000c (thermoscientific) usando 2µl de la muestra resultante de cada protocolo de extracción. Se tuvo en cuenta también las relaciones 260/280 y 260/230 como indicadores de pureza del ADN. Los datos fueron almacenados para su posterior análisis estadístico.

#### *Amplificación por PCR*

Con las 12 muestras de ADN extraídas se procedió a realizar una PCR anidada para BLV previamente estandarizada. El gen parcial env de BLV se amplificó mediante PCR anidada. La amplificación por PCR se realizó usando la Top Taq polimerasa de Qiagen (0.2 ul) y los siguientes cebadores externos F (5'ATGCCYAAAGAACGACGG-3') y R (5'CGACGGGACTAGGTCTGACCC-3'), después se anidaron con los cebadores internos F-Env<sub>5030</sub> (5'TCTGTGCCAAGTCTCCCAGATA-3') y R-Env<sub>5608r</sub> (5'AACAACAACCTCTGGGAAGGGT-3') para la segunda PCR. La mezcla de reacción fue en un volumen final de 25 ul, contenía 14.7 µl de agua destilada, 2.5 µl de Buffer top taq, 0.5 µl de 10 mM de mezcla dNTP, y 1 µl de cada primer (10 pM) y 5 ul de ADN. Las dos PCRs presentaron las mismas condiciones y el perfil de amplificación fueron los siguientes: 98°C durante 2 min, seguidos de 30 ciclos de desnaturalización a 98°C durante 15 s, hibridación a 60°C durante 20 s y extensión a 68°C durante 60 s. Los primers externos dieron como resultado la amplificación de un fragmento de ADN de 913 bp, y los primers internos amplificaron un fragmento de 597 bp de la región gp51 del gen env (12).

#### *Análisis estadístico.*

Se realizó un análisis descriptivo de los datos de cuantificación y pureza obtenidos mediante el nanodrop y se realizó una comparación de cada muestra pareada usando la prueba t de student para muestras pareadas respecto a la concentración de ADN, la relación 260/280 y 260/230, teniendo en cuenta los dos protocolos planteados anteriormente. Adicionalmente, se realizó una prueba F para comparar las varianzas de las variables y condiciones planteadas. Finalmente, se calculó la prevalencia en las muestras de leche.

## Resultados

Fue posible establecer un método para extracción de DNA a partir de leche de búfalo con el cual se logró obtener cantidades promedio por encima de 50  $\mu\text{g}$  que es lo recomendado, las muestras de búfalo tenían mayor concentración grasa por lo que en alguno de los métodos se propuso la extracción de esta, los resultados se presentan en la tabla 1.

**Tabla 1.** Análisis descriptivo de dos protocolos de extracción de ADN y significancia estadística teniendo en cuenta la concentración y la relación 260/280 y 260/230

	<b>Protocolo</b>	<b>Media</b>	<b>Mínimo</b>	<b>Máximo</b>	<b>Varianza</b>
<b>Concentración</b>	1	20,5 b	6,80	29,70	10,5 b
	2	165,7 a	46,80	577,30	198,8 a
<b>A260</b>	1	0,41	0,14	0,59	0,21
	2	3,32	0,94	11,55	3,98
<b>A280</b>	1	0,23	0,09	0,34	0,12
	2	2,13	0,56	7,60	2,66
<b>260/280</b>	1	1,77	1,51	2,00	0,20
	2	1,64	1,49	1,77	0,10
<b>260/230</b>	1	0,33	0,21	0,47	0,13
	2	0,41	0,35	0,55	0,07

\*Letras diferentes indican medias estadísticamente diferentes  $\alpha=0.05$

Se encontró que en el protocolo 2 en el cual no se extraía la capa de grasa fue el mejor método (significativo con  $\alpha=0.05$ ), ya que permitió obtener concentraciones de ADN mayores con un promedio de 165,78  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  con una relación 260/280 de 1,63 que la permite clasificar como ADN de pureza aceptable; adicionalmente fue encontrada una relación 260/230 de 0,41 lo que hace pensar que con este método quedan algunas contaminaciones con fenoles.

Con respecto al protocolo 1 fue posible observar que presentaba menor varianza y esa diferencia fue estadísticamente significativa, pero en la relación 260/280 y 260/230 no hubo diferencia estadísticamente significativa. Finalmente, las muestras fueron tomadas y analizadas por PCR para evaluar posible presencia de BLV, al realizar el análisis de estas 12 muestras de leche se encontró que ninguna era positiva para el BLV obteniendo entonces una prevalencia del 0%. Las medias obtenidas en la relación 260/280 y 260/230 en ambos protocolos son estadísticamente iguales, por lo tanto, ningún protocolo es mejor que el otro respecto a la pureza del ADN.

## **Discusión**

Los resultados obtenidos en la concentración de ADN y en la relación 260/280 fueron similares a los reportados por Liu *et al.*, (2014) donde obtuvieron concentraciones de ADN genómico de 12 a 45  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  y el correspondiente a los valores OD260/280 fue 1.65 a 1.75 (13). Los cuales son valores que están en los mismos rangos obtenidos en esta investigación. En el protocolo 2 utilizado se obtuvieron niveles de concentración de hasta 165,7  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ .

En protocolos utilizados por otros autores para la extracción de ADN en leche bovina y ovina realizaron la eliminación de la capa superior (crema) y la capa intermedia (proteína de la leche), se removieron raspando y decantando, dejando atrás el sedimento que contenía células somáticas y obtuvieron valores para 260/280 de 1.55 a 1.75, para el método 260/230 de 1.85 a 2.71 y con concentraciones de 12 y 45  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ , el tamaño y la calidad del ADN de algunas de las muestras fueron aceptables (13–15), mientras que en las pruebas realizadas en la extracción de ADN en leche de búfalo la retirada de la capa de nata no arrojó tan buenos resultados como en los que se dejó la capa de nata, ya que parece que al eliminarla esta se lleva un gran contenido de células (16).

Con relación a este y otros estudios realizados, se evidencia que los procedimientos de purificación de ADN influyen en la determinación de la concentración y pureza del ADN, que son los parámetros importantes para aplicaciones posteriores, como el

análisis de PCR (15). Los métodos modificados del kit comerciales al parecer producen ADN de la más alta calidad y cantidad, y tienen requisitos de tiempo intermedio y son solo un poco más caros que los demás métodos (14).

En este estudio, con el protocolo número uno, el valor máximo que se obtuvo para la relación 260/280 fue de 2.0, comparando los resultados con otras pruebas en las que usaron kits comerciales, para probar si se puede aumentar el rendimiento total de ADN. La relación 260/ 280 de otros estudios mostró una mejor pureza cuando se usaron PCIAA y KIT2, pero nunca fueron superiores a 1,8 (15).

La contaminación con fenol y etanol se ha evidenciado en otros estudios en donde se ha demostrado la acción inhibidora del etanol sobre la actividad de la polimerasa, haciendo que la eficacia de la amplificación por PCR se reduzca, lo que genera un impacto negativo en la precisión del análisis cuantitativo de los estudios (17,18). Muchos autores en varias partes del mundo al investigar la presencia de anticuerpos en búfalos para el BLV no encontraron positividad o positividad baja que no pasaron del 10,0%. Estos autores resaltan que la ausencia de animales positivos para el BLV en muestras de búfalos estudiados, puede indicar que la especie posea una resistencia natural o que hay contactos más débiles entre bovinos y búfalos que permitan la transmisión por vía biológica o mecánica, lo cual lo hace más interesante para ser estudiado a fondo en esta especie (7,19,20).

En este estudio se encontró una frecuencia del 0% en las muestras de leche analizadas. Otros estudios han encontrado prevalencias de 90.8%, 83.3%, 41% en leche bovina, variando según la raza (8,9,21). Esto es importante si se tiene en cuenta la relación reportada entre la presencia del virus de Leucosis bovina y el cáncer de mama en mujeres. Se han realizado estudios en los que se ha confirmado su relación con el cáncer de mama por el consumo de leche de vaca, encontrando que de 218 casos se ha detectado el BLV en el epitelio mamario del 59% de las mujeres diagnosticadas con cáncer de mama, frente al 29% de las que no tenían antecedentes de cáncer de mama. La frecuencia de BLV en el epitelio mamario de mujeres con cambios pre malignos (n = 21) fue del 38%, entre la frecuencia en

casos de cáncer de mama y controles normales sin cáncer de mama (22), y otro estudio en Colombia donde de 56 casos, se encontró 7% de prevalencia en la prueba de inmunoperoxidasa para la proteína gp51 del virus de la Leucosis bovina al mostrar positividad con color marrón en el citoplasma de las células, sitio donde se localiza el antígeno gp51 del BLV (2).

### **Conclusiones y recomendaciones**

Fue posible establecer un método que permita la extracción de grandes concentraciones de ADN a partir de leche de búfalos y establecer una prueba de PCR para el virus de la Leucosis Bovina a partir de ellas. No se encontró presencia del virus de la Leucosis bovina en las muestras de leche analizadas. Como recomendación se plantea la necesidad de dejar secar durante más tiempo los tubos e igualmente disminuir la concentración a 1,5 ml de NaCl para evitar la contaminación con alcoholes y sales que puede actuar como inhibidores *de la PCR*.

### **Referencias bibliográficas**

1. Rosenberg. DNA is the Genetic Material. 2017;
2. A.ochoa, A.ubribe M gutierre. Estudio del potencial zoonótico del virus de la leucosis bovina y su presencia en casos de cáncer de seno. Univ Sci. 2006;11(2):31–40.
3. Patiño EM. Produccion Y Calidad De La Leche Bubalina. 2011;24(cuadro 1):25–35.
4. APHIS U. Parametros productivos y reproductivos [Internet]. Available from: <http://asobufalos.com/el-bufalo/datos-productivos/>
5. Wilfrido B EM. parametros de calidad de leche de bufala. Rev Cient FCV-LUZ. 2000;X(4):346–52.

6. w. wolter, v. castañeda b. kloppert. La mastitis bovina. Inst estatal Investig Hesse . :20–1.
7. Chaves NP, Bezerra DC, Dos Santos LS, Sá JS, Santos HP, Pereira HDM. Intercorrência entre leucose enzoótica e brucelose em búfalos (*bubalus bubalis*) em sistema de produção extensivo. *Pesqui Vet Bras*. 2012;32(2):131–4.
8. Felmer R, Zuniga J. Diagnosis and typing of bovine leukaemia virus using a PCR-RFLP test on DNA extracted from somatic cells in milk. *Arch Med Vet*. 2006;38(3):253–7.
9. Herrera DYH, Terranova AMP, Benavides JA, Flórez JEM, Giovambattista G. Detección del virus de la leucosis bovina en ganado criollo colombiano mediante PCR-anidado. *Acta Agronómica* [Internet]. 2012;60(4):312–8. Available from: [http://www.revistas.unal.edu.co/index.php/acta\\_agronomica/article/view/28845/40342](http://www.revistas.unal.edu.co/index.php/acta_agronomica/article/view/28845/40342)
10. Gonzales E, Oliva G, Valera A, Bonzo E, Licursi M, Etcheverrigaray M. Leucosis Enzoótica Bovina: Evaluación De Técnicas De Diagnóstico ( Id , Elisa-I , Wb , Pcr ) En Bovinos Inoculados Experimentalmente. *Analecta Vet*. 2001;296(2):12–20.
11. Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res*. 1988;16(3):1215.
12. Polat M, Takeshima S nosuke, Hosomichi K, Kim J, Miyasaka T, Yamada K, et al. A new genotype of bovine leukemia virus in South America identified by NGS-based whole genome sequencing and molecular evolutionary genetic analysis. *Retrovirology*. 2016;
13. Liu YF, Gao JL, Yang YF, Ku T, Zan LS. Novel extraction method of genomic DNA suitable for long-fragment amplification from small amounts of milk. *J Dairy Sci*. 2014;

14. Psifidi A, Dovas CI, Banos G. A comparison of six methods for genomic DNA extraction suitable for PCR-based genotyping applications using ovine milk samples. *Mol Cell Probes*. 2010;
15. Liao J, Liu Y. Purification procedures meaningfully influence DNA quantification in milk. *LWT*. 2018;
16. Mosquera XC, Biotec I, Bernal C V, Muskus CL, Berdugo JG. Detección de *Brucella abortus* por pcr en muestras de sangre y leche de vacunos detection of *brucella abortus* in blood and milk of dairy cattle by pcr method. *RevMVZ Córdoba*. 2008;13(3):1504–13.
17. Wang M, Yang J, Gai Z, Huo S, Zhu J, Li J, et al. Comparison between digital PCR and real-time PCR in detection of *Salmonella typhimurium* in milk. *Int J Food Microbiol*. 2018;
18. Espinosa Asuar L. Guía práctica sobre la técnica de PCR 517 Guía práctica sobre la técnica de PCR.
19. Camargo, Daniel Stangarlin deMatos, Jane Cecília Silveira deGonçalves, Alexandra Ariadine BittencourtRodrigues, Érika Dayane Leal, Silva, Sandro Patroca daCasseb, Livia Medeiros NevesLangoni, HelioNegrão, Andréa Maria GóesCasseb A Prevalência de anticorpos para o vírus da diarreia viral bovina, Herpesvírus bovino Tipo 1 E Vírus da leucose enzoótica bovina em búfalos de água da ilha de marajó.
20. Viana RB, Fava C Del, Monteiro BM, Moura AC de B, Albuquerque R dos S, Cardoso E da C, et al. Ocorrência do vírus da leucose enzoótica dos bovinos (BLV) e de anticorpos contra herpesvírus bovino tipo-1 (BoHV-1) e vírus da diarreia viral bovina (BVDV) em búfalos no Estado do Pará. *Acta Sci Vet*. 2016;44(0):01–7.
21. Nekouei O, Stryhn H, VanLeeuwen J, Kelton D, Hanna P, Keefe G. Predicting within-herd prevalence of infection with bovine leukemia virus using bulk-tank milk antibody levels. *Prev Vet Med*. 2015;

22. Buehring GC, Shen HM, Jensen HM, Jin DL, Hudes M, Block G. Exposure to bovine leukemia virus is associated with breast cancer: A case-control study. *PLoS One*. 2015;10(9):1–13.