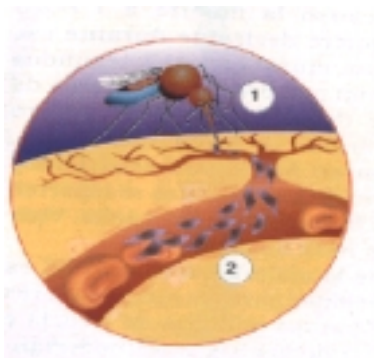


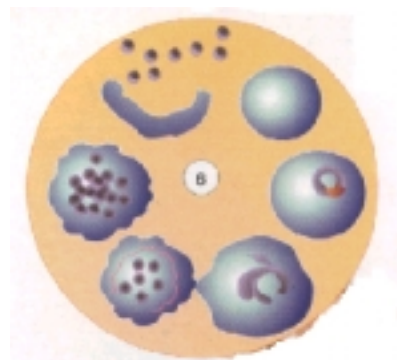
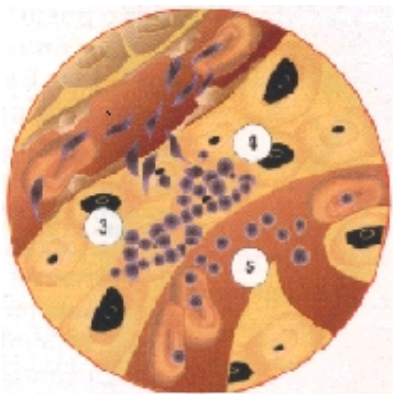


**NUCLEO UNIVERSITARIO "RAFAEL RANGEL"**  
**CENTRO DE INVESTIGACIONES**  
**"JOSE WITREMUNDO TORREALBA"**

**PROGRAMA DE POSTGRADO Y CONVENIOS INTER INSTITUCIONALES**



**ESTANDARIZACIÓN DE LA TÉCNICA DE PCR**  
**PARA ESTUDIOS DE EPIDEMIOLOGIA MOLECULAR**  
**EN MALARIA**



**CURSO/TALLER**  
**MANUAL**

**TRUJILLO 06 AL 12 DE JUNIO DE 1999**  
**VENEZUELA**

## **INDICE**

- Presentación
- Antecedentes
- Objetivos
- Participantes
- Introducción
- Metodología
- Métodos para detectar polimorfismo de los parásitos
- Limitaciones Técnicas
- Lecturas Recomendadas
- Créditos

## PRESENTACIÓN

En Trujillo, Venezuela y bajo la coordinación del Centro de Investigaciones Parasitológicas “Dr. José W. Torrealba”, 15 investigadores de distintas instituciones latinoamericanas y europeas se han reunido con el fin de estandarizar la técnica de PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa) en malaria, realizándose un trabajo de laboratorio que permitió discutir y entender las dificultades comunes surgidas con el empleo de diversos protocolos, complementado con la presentación por los grupos participantes de resultados obtenidos en su experiencia de trabajo con esta técnica, entre ellos: identificación y tipificación de *Plasmodium* sp., a partir de muestras de sangre, otros tejidos y del mosquito.

Como resultado de las observaciones y discusiones realizadas, ofrecemos y dedicamos este Manual Práctico sobre la Técnica de PCR, a los nuevos investigadores y estudiantes que se inician en cursos avanzados donde esta herramienta les sería de utilidad.



## **ANTECEDENTES**

1.- En Lisboa y bajo la coordinación del Centro de Malaria e Doencas Tropicais (IHMT), 8 instituciones europeas se han reunido en un trabajo de estandarización de la técnica de PCR. Esta red de instituciones ha implementado unos cambios de la técnica de PCR en el terreno que resultan en una disminución en la pérdida de material genético de los parásitos, ya sea que este se origine de sangre de pacientes, de los vectores o de cualquier otro material.

2.- La existencia de un compromiso de trabajo entre las instituciones proponentes generado por el componente B2 del proyecto ALFA financiado por la Comunidad Económica Europea y el interés es extender la red de investigación en salud Pública y el entrenamiento de estudiantes de Postgrado.

## OBJETIVOS

Los proponentes acordaron realizar en Trujillo, Venezuela un taller similar al celebrado en Lisboa, con alguno de los científicos de esta red y de Latinoamérica, para realizar:

a. Un trabajo de laboratorio que permita discutir y entender las dificultades comunes con la técnica de PCR.

b. La presentación por los grupos participantes de trabajos con utilización de PCR, es decir: Identificación y tipificación de *Plasmodium* sp. En muestras de sangre y en mosquito vector.

c. Discusión de eventuales proyectos científicos en colaboración con diferentes grupos de participantes.

d. Elaboración de un manual con la técnica para uso de estudiantes.

### **Red Europea:**

Centro de Malaria e outras Doenças Tropicais ( Inst. de Higiene e Medicina Tropical), Lisboa, Portugal - Virgílio E do Rosário, Henrique Silveira, João Pinto e Ana Paula Arez.

Karolynska Intitut, Estocolmo, Suecia - Anders Bjorkman y Anna Farnert.

Oxford University, Reino Unido - KarenDay y Marian Bruce.

London School Hygiene Tropical Medicine, Londres, Reino Unido - David Conway.

Imperial College, Lister Unit, Londres, Reino Unido - Georges Snounou.

Edinburgh University, Reino Unido - David Walliker y Lisa Cartwright.

Institut Pasteur, París, Francia - odlle Puijallon y grupo.

Swiss Tropical Institute, Suiza - Hans Peter Beck.

Instituto Carlos III, Madrid, España - Agustín Benito y José Rubio.

**Red Latinoamericana:**

Centro de Investigaciones “Dr. José Witremundo Torrealba”. Trujillo - Venezuela. Elina Rojas, Leslie Alvarez, Carolina Salas.

Instituto Colombiano de Medicina Tropical. Medellín - Colombia. Marcos Restrepo, Amanda Maestre.

División de Investigación de Malariología. Maracay - Venezuela. Ludmel Urdaneta.

Laboratorio de Genética Molecular. U.C.V. Caracas -  
Venezuela. Palmira Guevara, Magda Pecile.

Laboratorio de Estudios de Malaria. U.C.V. Caracas -  
Venezuela. Oscar Noya, Noraida Zerpa, Alfredo Noda.

Superintendencia de Controle de Endemias SUCEN. Sao  
Paulo - Brasil. Silvia Di Santi.

## PARTICIPANTES

### Investigadores:

- ◆ **Palmira Guevara.** Laboratorio de Genética Molecular. Fac. de Ciencias. Universidad Central de Venezuela
- ◆ **Dinora Lopes.** Centro de Malaria e outras Doenças Tropicais (CMDT)-IHMT. Lisboa - Portugal.
- ◆ **Amanda Maestre.** Instituto Colombiano de Medicina Tropical. Medellín - Colombia.
- ◆ **J. Alfredo Noda.** Laboratorio para Estudios sobre Malaria - Malariología. Caracas - Venezuela.
- ◆ **Magda Pecile.** Hospital J.M. de los Ríos. Caracas-Venezuela.
- ◆ **Silvia Di Santi.** Superintendência de Controle de Endemias. Brasil- São Paulo.
- ◆ **Henrique Silveira.** Centro de Malaria e outras Doenças Tropicais (CMDT)-IHMT. Lisboa - Portugal.
- ◆ **Ludmel Urdaneta.** División de Investigaciones Malariología. Maracay - Venezuela.
- ◆ **Noraida Zerpa.** Laboratorio para Estudios sobre Malaria - Malariología. Caracas - Venezuela.



- \* Leslie Alvarez            \* Herminia Bendezú
- \* Ignacio Castillo            \* Doris García
- \* Elizabeth Juárez            \* Carmen Morales
- \* María Carolina Salas       \* Irene Sandoval

\*Postgrado Centro de Investigaciones “Dr. José W. Torrealba.  
Trujillo - Venezuela.

**Coordinadora del Curso:** Elina Rojas

**Institución Sede:** Centro “Dr. José W. Torrealba”

**Director:** Dr. José Vicente Scorza

## **FINANCIAMIENTO**

- OPS/OMS (Organización Panamericana de la Salud, Venezuela).
- Ministerio de Sanidad y Asistencia Social. Dirección de Malariología
- Consejo de Estudios de Postgrado. Universidad de Los Andes, Venezuela.

## INTRODUCCIÓN

Puede definirse el proceso de PCR como un nuevo método que amplifica exponencialmente una copia única de un gen o parte de él mediante reacciones sucesivas del ADN polimerasa.

En esencia PCR es un medio de replicación de una secuencia corta de ADN, con rapidez de modo que se efectúan millones de copias de la secuencia elegida.

El proceso de PCR requiere de cuatro componentes:

1. - Dos cebadores (**primers**) que constan cada uno de 15-20 bases de ADN. Estas pequeñas secuencias se denominan oligonucleótidos; estos oligos corresponden a la secuencia de ADN inmediatamente adyacentes a la secuencia de interés.
2. - ADN- Polimerasa (Taq polimerasa). Enzima que en general procede de la bacteria *Thermus aquaticus*, efectúa el proceso fundamental de la replicación.
3. - Un gran número de bases libres de ADN.
4. - El ADN genómico del parásito. Debido a la extrema sensibilidad del PCR la cantidad necesaria de ADN puede ser muy pequeña (aprox. 1 a 2 ng).

El proceso de PCR puede resumirse de la siguiente forma:

a) El ADN genómico se desnaturaliza a una temperatura relativamente elevada (cerca de 95°C) y se transforma en ADN de filamento único.

b) Se expone este ADN a grandes cantidades de los oligonucleótidos, que se hibridan con las bases complementarias apropiadas en el ADN genómico cuando este es enfriado hasta una temperatura aproximada de hibridación entre 35 y 65°C.

c) Se calienta el ADN a una temperatura intermedia (70-75°C) con un gran número de bases de ADN libres, la ADN polimerasa sintetiza a esta temperatura un nuevo filamento de ADN extendiéndose a partir de la secuencia del oligo.

El ADN recién sintetizado consta de un doble filamento que tiene la terminación 5' del oligo en un extremo, seguido por las bases añadidas mediante la extensión del oligo por la ADN polimerasa.

d) Se calienta de nuevo el ADN de doble filamento hasta una temperatura elevada, en ese momento el ADN recién sintetizado sirve como molde para nuevas síntesis.

A medida que estos ciclos de enfriamiento-calentamiento se repiten, se sintetizan los productos de ADN. Esta amplificación se produce en forma geométrica, el número de

copias se dobla en cada ciclo; los ciclos se repiten entre 30 y 40 veces generando millones de copias del ADN original.

**Nota Histórica:** La técnica del PCR fue inventada en 1983 por el científico **Kary Mullis** y reconocida su labor con el premio **Nobel** en 1993. Biólogos Moleculares y otros investigadores reportan su aplicabilidad en la publicación de más de cuatro mil trabajos científicos.

## **METODOLOGÍA**

A.- Recolección y Transporte de Muestras

- Tipo de Muestras

B.- Protocolos

C.- Ambiente de Trabajo

D.- Materiales y Reactivos

## RECOLECCIÓN Y TRANSPORTE DE MUESTRAS

Según el tipo de muestra

1. Papel de filtro. Se utiliza papel de filtro Whatman # 3 ó 4 y se colocan aproximadamente 60 µl de sangre, se deja secar, colocándolo luego en una bolsa plástica. Si hay mucha humedad ambiental se coloca una pequeña cantidad de sílica-gel dentro de la bolsa.

Para estudios posteriores guardar en lugar seco o a -20° C.



2. Sangre con anticoagulante. Si no se va a procesar inmediatamente, la muestra debe congelarse a -20°C.

3. Tejidos. Estas muestras deben colocarse en un tampón de lisis.

## Sangre con anticoagulante



### 4. Muestra de mosquitos.

4.1. Guardar en sílica-gel para procesar el mosquito completo en seco.

4.2. Traer vivos al laboratorio y procesar en fresco.

## TIPO DE MUESTRAS

Para la detección y el diagnóstico de la malaria podemos tomar los siguientes tipos de muestras:

1. - Sangre periférica: Por punción capilar/venosa

1.1 Tubo capilar:

- con Citrato
- Heparina



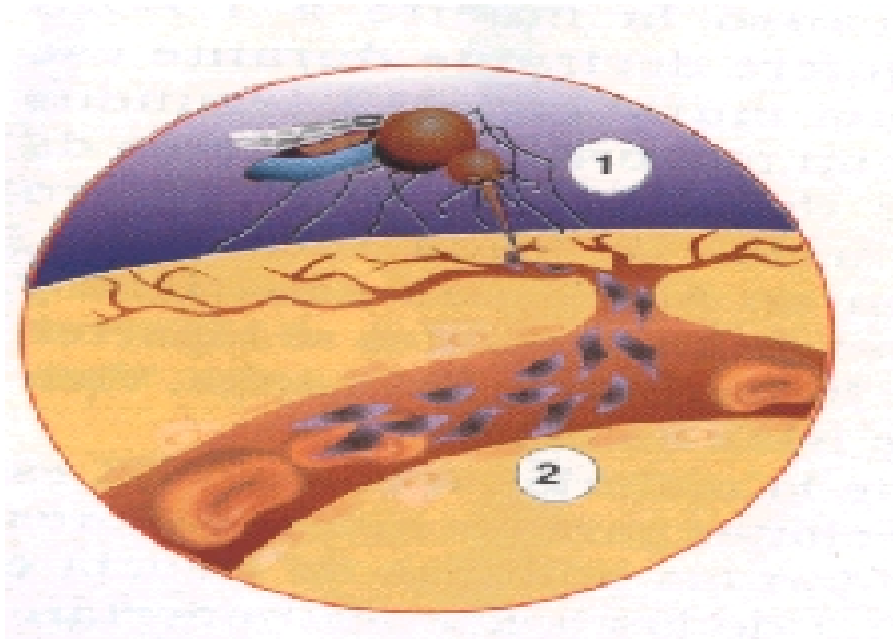
1.2 Papel de filtro.

2. - De tejido (cordón umbilical, placenta, etc.)



3. - De mosquitos:

- Del estómago y/o de las glándulas salivales
- Del mosquito entero



## **AMBIENTE DE TRABAJO**

Las condiciones ideales para el desarrollo de la técnica de PCR, deben constar de tres espacios físicos separados uno del otro, para evitar el riesgo de contaminación entre las muestras procesadas.

### 1. - Ambiente para la extracción del ADN

Se recomienda utilizar una campana de extracción de gases, en el caso de ser utilizados protocolos con solventes orgánicos (cloroformo, fenol y etanol).

### 2. - Ambiente para la preparación de la mezcla de PCR.

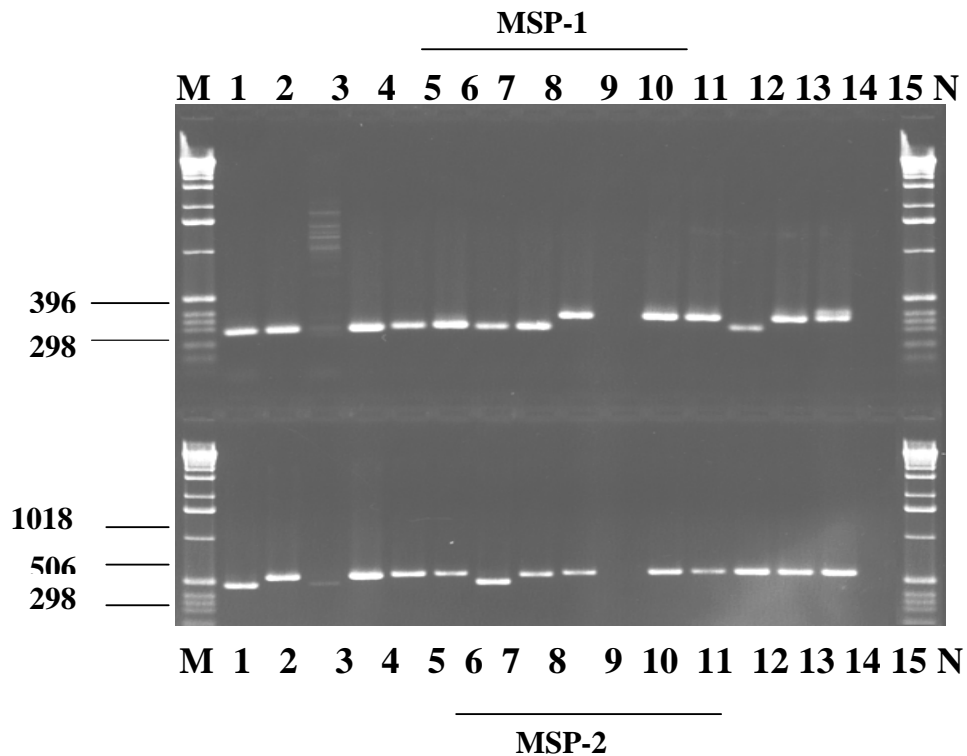
Es conveniente utilizar una campana provista de luz blanca y luz ultravioleta, esta última, se encenderá una vez finalizado el trabajo, con la finalidad de esterilizar el ambiente.

### 3. - Ambiente para la electroforesis.

4. - Cuarto oscuro para tomar fotografías de los geles y posteriores revelados.

**NOTA:** Es esencial evitar la contaminación de los ambientes 1 y 2 con los productos amplificados por PCR

## GEL



Electroforesis analítica del producto de amplificación por PCR de los genes MSP-1 y MSP-2 en aislados de *P. falciparum* de Venezuela. A) Aleles del gen MSP-1. B) Aleles del gen MSP-2. Las líneas N corresponden al control negativo sin ADN. Las líneas M corresponden al marcador de peso molecular de 1 Kb. (Foto tomada por Ludmel Urdaneta).

## **MATERIALES Y REACTIVOS**

Materiales, reactivos y equipos se presentan en forma separada para cada uno de los procedimientos.

### **1. - Recolección de muestras**

- Papel de filtro
- Láminas portaobjetos
- Viales de polivinil (eppendorf)
- Lápiz punta de carbón
- Alcohol
- Lancetas
- Capilares heparinizados
- Bolsas plásticas de cierre hermético
- RPMI
- Cava de anime (nevera portátil)
- Hielo seco, refrigerantes
- Sílica-gel
- Tampón de lisis
- Bisturí
- Pinzas
- Tijeras
- Colorante de Giemsa
- Azul de Metileno
- Agua tamponada
- Agua destilada
- Formol neutro 10%
- Frasco para histología

- Guantes

## **2. - Extracción de ADN en papel**

- Viales
- PBS+ Saponina 0.05%(stock 10% \* 0.01% Azida Sódica)
- PBS
- Chelex 100- IRON
- Centrífuga refrigerada
- Micropipetas (10,20,200µl,etc)
- Puntas para micropipetas
- Vórtex
- Tampón de lisis ( 40mM Tris-HCl pH=8.0, 80mM EDTA pH 8.0, 2% SDS)
- Pronasa
- Proteinasa K
- Estufa (37°C)
- Fenol
- Fenol- cloroformo
- Alcohol absoluto
- Acetato de sodio
- Congelador (-20°C o -70°C)
- Papel parafilm
- Tampón de elución
- Agua estéril
- Micropipetas (10,20,100 y 1000µl)

- Baño María
- Guantes de látex
- Gradillas para viales

### **3.- PCR**

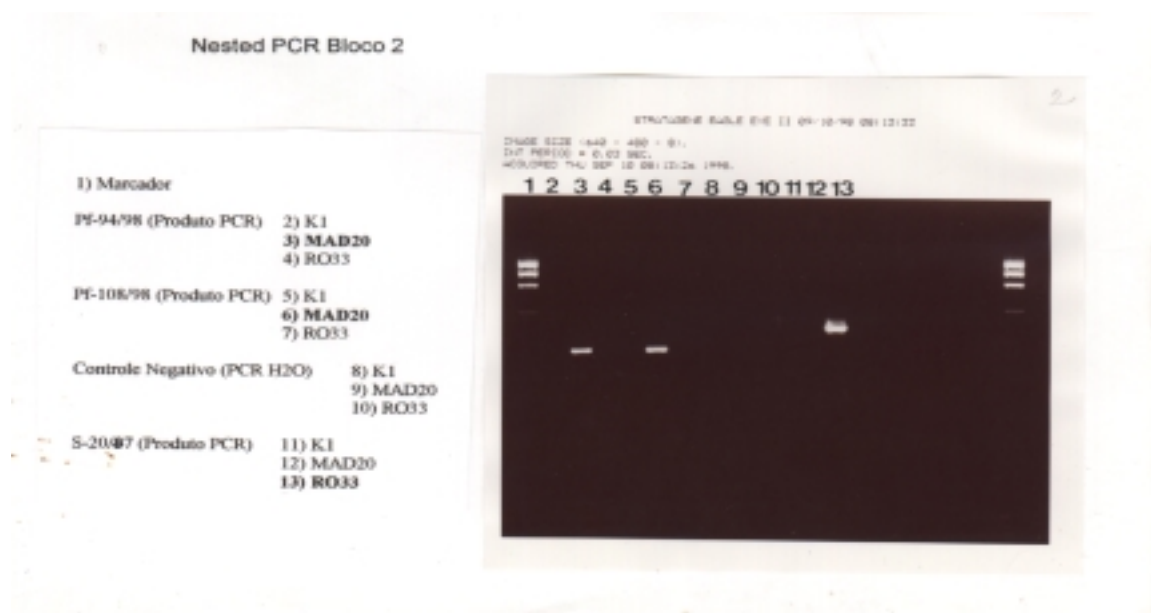
- Viales
- Micropipetas
- Vórtex
- Tampón
- MgCl
- Primers
- dNTP's
- Taq polimerasa
- Aceite mineral
- Termociclador
- Agarosa
- TBE
- Cámaras para electroforesis
- Naranja o azul de Bromofenol
- Bromuro de Etidio (BrEt)
- Transiluminador
- Cámara fotográfica instantánea
- Gradilla para viales
- Marcador de peso molecular
- Agua estéril
- Guantes

## EQUIPO DE CAMPO PARA LA TOMA DE MUESTRAS



## MÉTODOS PARA DETECTAR POLIMORFISMO DE LOS PARÁSITOS

- A.- **PCR** seguido por hibridación con sondas específicas
- B.- **NESTED PCR**: el PCR inicial es seguido por una segunda amplificación, que utiliza como templado el producto de la primera amplificación.
- C.- **Múltiplex PCR**
  - 1.- **SSO**: sequence specific oligoprobing
  - 2.- **SSCP**: sequence specific conformational polymorphism
  - 3.- **RFLP**: restriction fragment length polymorphism
  - 4.- **VARIOS**: (1) **TGGE** temperature gradient gel electrophoresis. (2) **SS-PCR** sequence specific primer PCR).
  - 5.- **RAPD**
  - 6.- **Microsatélites**
  - 7.- **Secuenciación**





## **LIMITACIONES TÉCNICAS**

- ◆ Sensibilidad
- ◆ Tamaño y secuencia del templado
- ◆ Eficiencia de la reacción de amplificación
- ◆ Secuestro de los parásitos
- ◆ Dinámica de la transmisión

## LECTURAS RECOMENDADAS

- ◆ Barker R, Banchongaksorn T, Courval J, Suwonkerd W, Rimwungtragoon K & Wirth D. (1992). A simple method to detect *Plasmodium falciparum* directly from blood samples, using the polimerase chain reaction. **Am J Trop Med Hyg** **46**: 416-426
  
- ◆ Collins F H, Mehaffey P, Rasmussen M, Brandlin-Bennet A, Odera J & Finnerty V. (1988). Comparison of DNA- probe and isoenzyme methods for differentiating *Anopheles gambiae* and *Anopheles arabiensis* (Diptera: Culicidae). **J Med Entomol** **25**: 116-120
  
- ◆ Contamin H, Fandeur T, Bonnefoy S, Skouri F, Ntoumi, F & Mercereau- Puijalon, O. (1995). PCR typing of field isolates of *Plasmodium falciparum*. **J Clin Microbiol** **33**: 944-951
  
- ◆ Farnert A, Snounou G, Ingegered R & Björkman A (1997). Daily dynamics of *Plasmodium falciparum* subpopulations in asymptomatic children in a holoendemic area. **Am J Trop Med Hyg** **56**: 538-547.
  
- ◆ Garnham P C C (1996). *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium reichenowi*. **In** Malaria Parasites and Other

Haemosporidia, p.p. 357-430. Blackwell Scientific Publications, Oxford.

◆ Gupta S, Trenholme K, Anderson R M & Day K P (1994). Antigenic diversity and the transmission dynamics of *Plasmodium falciparum*. **Science** **263**: 961-963.

◆ Haddad D, Snounou G, Mattei D, Enamorada L G, Figueroa J, Stahl S & Berzins K (1999). Limited genetic diversity of *Plasmodium falciparum* parasites in field isolates from Honduras. **Am J Trop Med Hyg** (In press).

◆ Pinto J, Arez A P, Franco S, Rosário V E, Palsson K, Jaenson T G T & Snounou G. (1997). Simplified methodology for PCR investigation of midguts from mosquitoes of the *Anopheles gambiae* complex, in which the vector and *Plasmodium* species can both be identified. **Ann Trop Med Parasitol** **91**: 217-219.

◆ Postigo M, Mendoza L A, Pérez H. (1998) Malaria diagnosis by polymerase chain reaction: a field study in south- eastern Venezuela. **Trans R Soc Trop Med Hyg** **92**: 509-511

◆ Roberts D J, Craig A G, Berendet A R, Pinches R, Nash G, Marsh K & Newbold C I. (1992). Rapid switching to multiple

antigenic and adhesive phenotypes in malaria. **Nature** **357**: 689-692.

◆ Snounou G, Viriyakosol S, Zu X P, Jarra W, Pinheiro L, Rosário V E, Thaithong S & Brown K N (1993). High sensitivity of detection of human malaria parasites by the use of nested polymerase chain reaction. **Mol Biochem Parasitol** **61**: 315-320

◆ Tirasophon W, Ponglikitmongkol M, Wilariat P, Boonsaeng N, Panyim S (1991). A novel detection of a single *Plasmodium falciparum* in infected blood. **Biochem Biophys Res Comm** **175**: 179-184

◆ Urdaneta L, Guevara P, Ramirez J L. (1998). Evaluation of DNA Recombinant Methodologies for the Diagnosis of *Plasmodium falciparum* and their Comparison with the Microscopy Assay. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, **93(5)**: 693-646.

◆ Wathers AP, Mc Cutchan T (1989). Rapid sensitivity diagnosis of malaria based on ribosomal RNA. **Lancet** **8651**: 1343-1346

◆ Wooden J, Kyes S, Sibley C (1993). PCR and strain identification in *Plasmodium falciparum*. **Parasitology Today 9:** 303-305

◆ Zolg J, Andrade L, Scott E 1987. Detection of *Plasmodium falciparum* DNA using repetitive DNA clones as species probes.

**Mol Biochem Parasitol**

## **CRÉDITOS**

**Fotos:** Manuel Delgado  
Ludmel Urdaneta  
Silvia Di Santi

**Edición:** Elina Rojas

**Programación  
y Transcripción:** Amneris Canelones