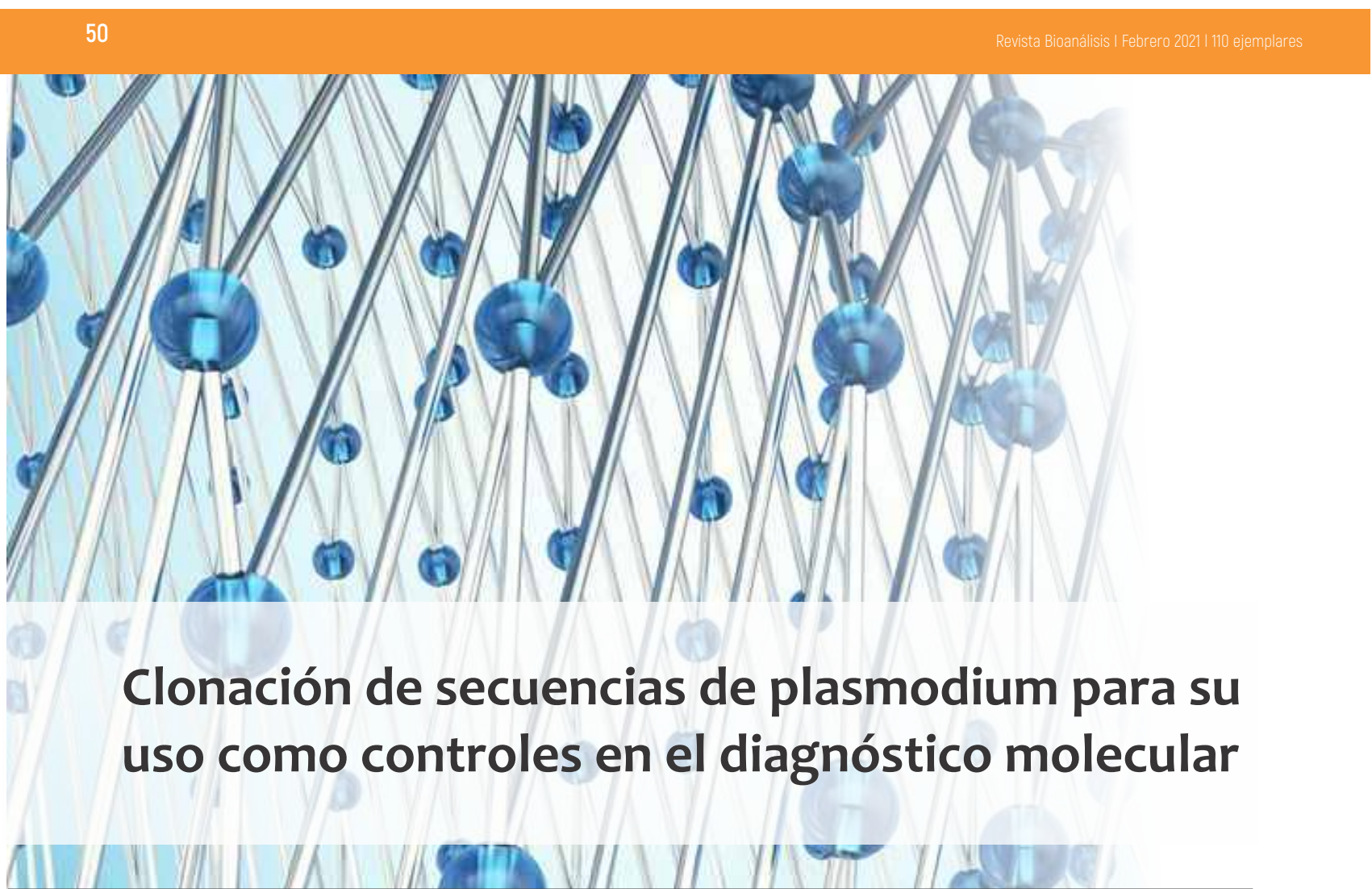




## Clonación de secuencias de plasmodium para su uso como controles en el diagnóstico molecular

**>>>** Las técnicas moleculares son un avance importante para los laboratorios en los cuales se realiza diagnóstico y/o investigación de enfermedades. El uso de técnicas basadas en la amplificación de ADN como la PCR y sus variantes, son utilizadas en el diagnóstico por su alta sensibilidad y especificidad. En la siguiente investigación se estudia la clonación de secuencias de *Plasmodium* para su uso como controles en el diagnóstico molecular.

### **>>> AUTORES**

César Pacheco<sup>1</sup>, Elizabeth Ferrer<sup>1,2\*</sup>, Flor Herrera<sup>1</sup>

Universidad de Carabobo, Facultad de Ciencias de la Salud, Sede Aragua, <sup>1</sup>Instituto de Investigaciones Biomédicas Dr. Francisco J. Triana Alonso (BIO-MED), <sup>2</sup>Departamento de Parasitología, Maracay, Venezuela

### **>>> CORRESPONDENCIA**

Elizabeth Ferrer  
E-mail: elizabeth.ferrer@gmail.com

### **>>> RESUMEN**

Las técnicas moleculares son un gran avance para el diagnóstico de malaria, pero se

requiere disponer de controles positivos adecuados, por lo que el objetivo del presente trabajo fue obtener secuencias clonadas de *Plasmodium vivax* y *P. falciparum* para su uso como controles en la técnica de PCR para el diagnóstico de malaria. A partir de ADN extraído de muestras de pacientes infectados, se amplificaron por PCR las secuencias codificantes del ARN ribosomal de la subunidad pequeña de *P. vivax* y *P. falciparum*. Se purificaron las bandas de 120 pb y 205 pb, respectivamente, a partir de gel de agarosa, y se realizaron las ligaciones con el vector de clonación pGEM-T-Easy. Se transformaron células competentes de *E. coli* XL1Blue MRF<sup>-</sup> con las mezclas de ligación. Posteriormente, se identificaron las colonias recombinantes mediante PCR de colonias, de las cuales se extrajo el ADN plasmídico para la verificación de la clonación de los fragmentos y se utilizaron como controles en la PCR. Se obtuvieron 5 colonias

*Desde siempre enfocados en la lucha  
contra el vector Aedes Aegypti*

# DENGUE

## TEST RÁPIDO



### OnSite® Dengue Ag Rapid Test

Inmunoensayo cromatográfico de flujo lateral para la detección cualitativa del antígeno NS1 del dengue (DEN1, 2, 3, 4) en suero, plasma o sangre entera



### ONE STEP Anti-Dengue (IgM & IgG) Tri-line Test

Ensayo inmunocromatográfico rápido realizado con oro coloidal, para la detección cualitativa de anticuerpos (IgM e IgG) contra el virus del dengue (DV) en sangre total humana, suero o plasma.

## ELISA



DENV Detect™ IgM Capture ELISA, kit x 96 det  
DENV Detect™ IgG Capture ELISA, kit x 96 det  
DENV Detect™ NS1 ELISA, kit x 96 det



**CROMOION**  
ABASTECIMIENTO INTEGRAL HOSPITALARIO  
División Diagnóstico - Biología Molecular

Central: Oporto 6125 - Ciudad de Buenos Aires - Argentina  
Planta Elaboradora Punta Alta, Prov. de Buenos Aires  
mail: [reporte@cromoion.com](mailto:reporte@cromoion.com)  
[www.cromoion.com](http://www.cromoion.com)  
Tel: +54 11 4644-3205/06

recombinantes de *P. vivax* y 12 de *P. falciparum* de las cuales se extrajo ADN plásmidico. Se utilizaron los ADN plasmídicos como controles de reacción en la técnica de PCR de diagnóstico de malaria, obteniéndose las bandas diagnósticas características en todos los casos. La clonación de las secuencias codificantes del ARN ribosomal de la subunidad pequeña de *P. vivax* y *P. falciparum*, permitió su uso como controles positivos en el diagnóstico molecular de malaria, lo cual evita la dependencia de muestras positivas que generalmente presentan variabilidad.

**Palabras clave:** *Plasmodium vivax*, *Plasmodium falciparum*, PCR, malaria.

## >>> INTRODUCCIÓN

La malaria es una enfermedad producida por parásitos del género *Plasmodium* transmitida por la picadura de mosquitos del género *Anopheles*. Hay cinco especies de *Plasmodium* que causan malaria en el humano, siendo las más frecuentes *Plasmodium vivax* y *P. falciparum*. La malaria es la enfermedad parasitaria más importante del mundo, ocasionando casi 500.000 muertes por año. La mayoría de los casos se registran en el África subsahariana, pero también se ven afectadas Asia Sudoriental, el Mediterráneo Oriental, el Pacífico Occidental y las Américas. La enfermedad es endémica en 91 países y además de su relevancia médica y epidemiológica, la malaria tiene importancia desde el punto de vista socioeconómico, por su impacto en los países en vías de desarrollo (OMS 2018).

En las Américas, entre 2000 y 2013 se logró una reducción sustancial en la incidencia de casos de malaria en todos los países endémicos, con la excepción de Guyana y Venezuela, en los cuales se describió un aumento significativo de la morbilidad por malaria durante el mismo período (WHO 2014). En las naciones altamente endémicas de malaria, como Brasil, Colombia y, de hecho, las Américas en general, han logrado una disminución del 50% o más en los casos debido a la implementación de los programas denominados Desarrollo del Milenio y el Plan de Acción Mundial contra la Malaria 2008-2015 (Rodríguez-Morales y Paniz-Mondolfi 2014, Recht et al. 2017).

En Venezuela, la malaria por *P. vivax* representó el 82% de todos los casos, durante los últimos años, seguida de *P. falciparum* (16%), *P. malariae* (<1%) e infección mixta (1,4%). Los estados Bolívar, Amazonas y Sucre se encuentran entre las regiones de Venezuela con mayor incidencia de malaria (63,3, 16,9 y 12,5%, respectivamente) (Cáceres 2011). La malaria representa uno de los aumentos más obvios en las enfermedades desatendidas de Venezuela, donde se ha observado un incremento, de casi tres veces, de los casos de malaria en el territorio venezolano desde el año 2014. La malaria por *P. falciparum* ha aumentado hasta casi un 30%, en el estado Bolívar (Rodríguez-Morales y Paniz-Mondolfi 2014, Recht et al. 2017, Daniels 2018, PAHO 2018, Pacheco et al. 2019).

La gravedad y sintomatología de la enfermedad depende de la especie infectante, siendo la que produce la patología más grave *P. falciparum*. Los síntomas son, principalmente, escalofríos y fiebre. La periodicidad de los episodios se corresponde con el ciclo eritrocítico. El aumento de la cantidad de eritrocitos infectados y destruidos produce restos celulares tóxicos, adhesión de los eritrocitos al endotelio vascular y a otros eritrocitos y formación de coágulos por eritrocitos, plaquetas, leucocitos y pigmento palúdico, pudiendo llevar al fallecimiento (WHO 2014, Milner 2018, OMS 2018).

El diagnóstico de malaria se realiza principalmente por la identificación por microscopía (extendido y gota gruesa) de las especies de *Plasmodium* spp. presentes en muestras de sangre coloreadas con Giemsa, ha sido convencionalmente el método de referencia. Sin embargo, esta técnica requiere de personal entrenado y tiene baja sensibilidad particularmente cuando las parasitemias son bajas o en infecciones mixtas (Rosenblatt 2009, Barber et al. 2013, Murphy et al. 2013).

La detección de anticuerpos no es muy útil en zonas endémicas y puede presentar baja sensibilidad y especificidad. La determinación de antígenos del parásito circulante puede ser un marcador más apropiado de una infección activa. Diversas pruebas inmunocromatográficas comerciales de diagnóstico rápido (RDT: *Rapid Diagnostic Test*) para la detección de antígenos parasitarios están disponibles, cuya sensibilidad y la especifi-

cidad son adecuadas. Las limitaciones de los RDTs son que generalmente no pueden identificar infecciones de *P. falciparum* de las infecciones mixtas, la baja sensibilidad especialmente en infecciones por *P. vivax*, *P. malariae* o *P. ovale*, las reacciones cruzadas con otros antígenos y la permanencia de la reactividad después del tratamiento (Rubio *et al.* 2001, Moody 2002, Maltha *et al.* 2010).

El uso de técnicas basadas en la amplificación de ADN como la PCR y sus variantes son útiles en el diagnóstico por su alta sensibilidad y especificidad (Rubio *et al.* 2001, Murphy *et al.* 2013). Para la técnica se requieren controles positivos, tradicionalmente obtenidos a partir de muestras de sangre de pacientes, que son muy variables (Rubio *et al.* 2001). La tecnología del ADN recombinante permite la clonación de diversas secuencias que posteriormente se pueden utilizar como controles positivos (Navarrete-Castro *et al.* 2004, Acevedo *et al.* 2009, Camacho *et al.* 2016). Por lo que el objetivo de este trabajo fue la clonación de secuencias de *Plasmodium* para su utilización

sirviendo de controles en el diagnóstico molecular.

## >>> MATERIALES Y MÉTODOS

### Muestra biológica

Se emplearon muestras de sangre de pacientes infectados por *P. vivax* y *P. falciparum* identificados por microscopía (extendido y gota gruesa) de sangre coloreada con Giemsa, realizadas por microscopistas especializados del Centro de Investigaciones de Campo “Dr. Francesco Vitanza”, Tumeremo, municipio Sifontes, estado Bolívar, Venezuela. Se confirmó la especie presente en estas muestras por PCR realizada en el Instituto de Investigaciones Biomédicas “Dr. Francisco J. Triana Alonso” (BIOMED), de la Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad de Carabobo, Sede Aragua, en Maracay, Venezuela.

### Plásmido de clonación y genotipo bacteriano

Se utilizó el vector pGEM®-T Easy (Prome-

## CENTRO DE DERIVACIÓN

- Asesoramiento y consulta permanente.
- Trazabilidad de las muestras.
- Política de seguridad de envíos.
- Adecuado abastecimiento de materiales de apoyo necesarios para la correcta derivación.
- Confiabilidad en los resultados.
- Directorio de Análisis.

CLIENTES: Aseguradoras de Riesgo de Trabajo - Centros de Diálisis  
Clínicas Veterinarias - Hospitales Públicos - Hospitales Privados  
Laboratorios Clínicos Humanos - Laboratorios Clínico Veterinarios  
Policlínicos - Sanatorios - Logística

### LABORATORIO CENTRAL

San Lorenzo 164 - Tel/Fax: 54 - 2983 - 420867 (central rotativo)  
Urgencia: (02983) 15 406395 - (B7500IGD) Tres Arroyos - Bs As.  
E-mail: cismalab@cismalab.com.ar - www.cismalab.com.ar



ga), que permite la clonación directa de productos de PCR. Se emplearon bacterias *Escherichia coli* de la cepa XL1-Blue MRF<sup>-</sup> (Stratagene®) y del genotipo: *supE44*, *hsdR17*, *recA1*, *endA1*, *gyrA46*, *thiA1*, *lacI* (*proAB+* *lacI* *lacZ*  $\Delta$ M15, *Tn10*, *Tet<sup>r</sup>*), para la propagación y mantenimiento de los plásmidos.

### Extracción de ADN

El aislamiento de ADN de las muestras se llevó a cabo por extracción con solventes orgánicos utilizando la técnica de fenol- cloroformo- alcohol isoamílico (Sambrook y Russel 2001), adaptada a las condiciones del laboratorio (Rivero et al. 2004). El papel de filtro con la sangre seca fue colocado en un microtubo, se maceró con 400  $\mu$ L de tampón (Tris 0,05 M, pH 8; EDTA 0,05 M; NaCl 0,1 M y 1% de SDS) y proteinasa K 0,2 mg/mL. Luego, se colocó cada muestra en baño María a 55°C por 1 hora. Posteriormente, se le adicionó 300  $\mu$ L de fenol- cloroformo- alcohol isoamílico (25:24:1), se agitó y se centrifugó a 6.200 g por 5 min. Se trasvasó el sobrenadante a otro vial y se agregó 300  $\mu$ L de fenol-cloroformo- alcohol isoamílico (25:24:1), se mezcló por inversión y se centrifugó a 6.200 g por 5 min. Se tomó la fase acuosa y se colocó en otro microtubo, al cual se le agregaron 300  $\mu$ L de cloroformo, se centrifugó de nuevo y el sobrenadante se trasvasó a otro microtubo para posteriormente precipitar el ADN con dos volúmenes de isopropanol más 50  $\mu$ L de NaCl 5 M y se colocó a -20°C durante toda la noche. A continuación, se centrifugó a 18.800 g durante 15 min y se lavó el precipitado con 700  $\mu$ L de isopropanol al 70%, se centrifugó otra vez a 18.800 g por 15 min y se secó el precipitado (Speed Vac Thermo Savant DNA 120). Finalmente, se resuspendió el ADN en 50  $\mu$ L de agua destilada estéril, se le agregó 0,1  $\mu$ g/ $\mu$ L de ARNasa (Promega) y se incubó a 65°C durante 10 min. El ADN se guardó a -20°C hasta su utilización.

### PCR anidada

La detección de *P. falciparum* y *P. vivax* se llevó a cabo usando cebadores específicos para la región del ADN codificante del ARN ribosomal de la subunidad pequeña del género *Plasmodium*; cebador directo rPLU5:  
- 5'-CCTGTTGTTGCCTTAACTTC-3' y cebador reverso rPLU6:

- 5'-TTAAAATTGTTGCAGTTAAAACG-3' y para cada especie: *P. falciparum* cebador directo rFAL1:  
- 5'-TTAAACTGGTTTGGGAAAACCAAATATAT-3' y cebador reverso rFAL2:  
- 5'-ACACAATGAACTCAATCATGACTACCCGT-3' y *P. vivax*: cebador directo rVIV1:  
- 5'-CGCTTCTAGCTTAATCCACATAACTGATA-3' y cebador reverso rVIV2: ACTTCCAA-GCCGAAGCAAAGAAAGTCCT

TA. El tamaño de los productos esperados es de 1.200 pb para la secuencia de *Plasmodium* sp. de la primera reacción y en la segunda reacción de 120 pb para *P. vivax* y de 205 para *P. falciparum* (Snounou et al. 1993). Las reacciones se llevaron a cabo en un volumen de 25  $\mu$ L con ~10 ng de ADN, en un termociclador PTC-100 (MJ Research, Inc., Watertown, MA). Se emplearon controles negativos en cada reacción (todos los reactivos excepto el ADN molde).

La PCR para determinar el género *Plasmodium*, se llevó a cabo empleando los oligonucleótidos cebadores rPLU5 y rPLU6, los cuales amplifican una región común del genoma en las dos especies estudiadas de *Plasmodium*. Esta reacción se realizó siguiendo el protocolo anteriormente estandarizado (Snounou et al. 1993), con algunas modificaciones: tampón de reacción Colorless GoTaq® Flexi (TrisHCl 50 mM pH 8,5; NaCl 50 mM), MgCl<sub>2</sub> 0,6 mM, mezcla de desoxirribonucleótido trifosfato (dNTPs) 120  $\mu$ M, 0,24  $\mu$ M de cada cebador rPLU6 y rPLU5 y GoTaq® Flexi DNA polimerasa (Promega) 1 U. Se adicionó 10 ng de ADN obtenido de las muestras de los pacientes, en un volumen final de 25  $\mu$ L. La reacción se realizó en un termociclador PTC-100 thermalcycler (MJ Research, Inc., Watertown, MA) con el programa; 94°C por 4 minutos, 30 ciclos de 94°C durante 30 segundos, 58°C por 1 minuto, 72°C durante 1 minuto y una extensión final a 72°C por 5 minutos.

Para la detección de las especies de *P. vivax* y *P. falciparum*, se realizó una PCR multiplex, es decir, agregando en el mismo tubo los cebadores específicos de cada especie del parásito, de la siguiente forma: tampón de reacción GoTaq® Flexi (TrisHCl 50mM pH 8,5; NaCl 50mM), MgCl<sub>2</sub> 1 mM, mezcla de dNTPs 120  $\mu$ M, 0,24  $\mu$ M de cebadores para *P. falciparum* (rFAL1 y rFAL2), 0,16  $\mu$ M de cebadores para *P. vivax* (rVIV1 y rVIV2) y

GoTaq® Flexi DNA polimerasa (Promega) 1 U. Se adicionó 2 µL del producto de la primera reacción de PCR diluido 1/10, para un volumen total de 25 µL. La segunda PCR se realizó en un termociclador PTC-100 thermalcycler® (MJ Research, Inc., Watertown, MA) con el siguiente programa: 94°C por 4 minutos, 35 ciclos de 94°C por 30 segundos, 58°C durante 1 minuto, 72°C por 1 minuto y una extensión adicional a 72°C por 5 minutos. En todas las PCR realizadas se hizo un control negativo formado por la mezcla de reacción.

### Electroforesis en gel de agarosa

Tanto los ADN extraídos de cada muestra como los productos de PCR se analizaron en geles de agarosa al 2% empleando como tampón de electroforesis TBE (Tris Base 0,9 M; Ácido Bórico 0,9 M; EDTA 0,01 M, pH: 8,5) a un voltaje de 80 V por 45 min. Las muestras de ADN se colocaron en cada pocillo con tampón muestra (xilen-cianol al 0,02%, azul de bromofenol al 0,02 %, glicerol al 50%)

y SYBR® Green I<sup>(19)</sup> y se observaron en un equipo de fotodocumentación (BIORAD Molecular Imager® Gel DOC™XR+) utilizando el Software de análisis de imagen (Image Lab™ Software Versión 3.0) suministrado por el mismo fabricante.

### Purificación de los productos de PCR

Las bandas de ADN de las segundas reacciones se cortaron a partir de los geles de agarosa y se purificaron utilizando el estuche comercial Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System® (Promega Corporation, Madison, Wisconsin, USA) siguiendo las instrucciones de la casa comercial.

### Construcción de los plásmidos recombinantes

Se utilizó 1 U de la enzima ADN ligasa T4 para la reacción de ligación de los productos de PCR purificados y el vector comercial pGEM®-T Easy. Se empleó una relación molar plásmido-inserto 1:5 y 1:10. El tampón utilizado fue: Tris- HCl

## ONE STEP Anti-HIV (1&2) Test

es un ensayo inmunocromatográfico rápido realizado con oro coloidal para la detección cualitativa de anticuerpos contra el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) de todos los isotipos (IgG, IgM, IgA) específico para el VIH-1, incluidos el subtipo O y el VIH-2 simultáneamente.

- Sensibilidad Diagnóstica 99,8 %
- Especificidad 100%
- Resultados en 15 minutos
- Suero, Plasma o Sangre entera
- Kit x 40 determinaciones
- Amplia fecha de vencimiento



**CROMOION**  
ABASTECIMIENTO INTEGRAL HOSPITALARIO  
División Diagnóstico - Biología Molecular

Central: Oporto 6125 - Ciudad de Buenos Aires - Argentina  
Planta Elaboradora Punta Alta, Prov. de Buenos Aires  
mail: [reporte@cromoion.com](mailto:reporte@cromoion.com)  
[www.cromoion.com](http://www.cromoion.com)  
Tel: +54 11 4644-3205/06

30 mM (pH 7,8),  $\text{MgCl}_2$  10 mM, DTT 10 mM, ATP 1 mM. Posteriormente, se incubó a 4°C por al menos 12 h.

### Preparación y transformación de células competentes

Se realizó un cultivo de bacterias, *E. coli* XL1-BLUE MRF', en 5 mL de medio LB (Luria Bertani; triptona 10g/L, extracto de levadura 5 g/L, NaCl 5 g/L, pH 7), a partir *E. coli* XL1B criopreservadas y se cultivó a 37°C y 200 rpm, toda la noche. Posteriormente, se diluyó 1 mL del cultivo en 50 mL de medio LB y se incubó a 37°C con agitación de 200 rpm. Después se centrifugaron las células por 15 minutos a 3.000 rpm a 4°C, y se resuspendió el sedimento en 10 mL de  $\text{CaCl}_2$  100 mM también a 4°C. Se centrifugaron por 15 minutos a 3.000 rpm a 4°C y se resuspendieron en 4 mL de solución  $\text{CaCl}_2$  100 mM más glicerol 15%, a 4°C y finalmente se colocaron 200  $\mu\text{L}$  de células competentes en microtubos y se congelaron rápidamente a -80°C, hasta su uso (Sambrook y Russel 2001). Una vez preparadas las células competentes, a 200  $\mu\text{L}$  de las mismas, se les añadió las mezclas de ligación para su transformación por choque térmico (30 min 4°C, 90 seg 42°C, 2 min 4°C). Se agregó 800  $\mu\text{L}$  de medio LB (a 42°C) a cada tubo y se incubó a 37°C, con agitación de 200 rpm por 1 hora. Se extendieron 200  $\mu\text{L}$  de las células transformadas en placas de LB-Agar-Ampicilina (100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) tratadas con X-Gal (20 mg/mL) e IPTG (1 M). Se incubó a 37°C por al menos 12 horas. Posteriormente, se cuantificaron las colonias blancas (recombinantes) y las azules (no recombinantes).

### Análisis de las colonias bacterianas recombinantes (PCR de colonias)

Una pequeña traza de cada colonia blanca seleccionada fue colocada en 25  $\mu\text{L}$  de mezcla de reacción de PCR (cebadores 0,2 mM,  $\text{MgCl}_2$  1 mM, dNTP's 0,2 mM, *Taq* polimerasa GoTaq® Flexi, Promega 1 U y tampón de reacción GoTaq® Flexi Buffer colorless). Los cebadores empleados fueron los descritos anteriormente para la segunda reacción de PCR. El programa utilizado fue: 94°C por 5 min, 30 ciclos (94°C x 30 seg, 50°C x 30 seg, 72°C x 2 min) y 72°C durante 7 min. Como control negativo se utilizó una colonia azul. Los productos de la PCR se observaron en geles de agarosa al 2%,

empleando un marcador de tamaño molecular de pares de bases (100 bp DNA step ladder, Axygen).

### Obtención de los plásmidos recombinantes

Una vez confirmada por PCR, la recombinación de los fragmentos de ADN en el vector comercial pGEM®-T Easy en las células transformadas, se hicieron cultivos de estas en medio LB líquido con ampicilina (100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) para obtener a partir de estas colonias los ADN plasmídicos. Se centrifugaron los cultivos y el sedimento se resuspendió en tampón TE (Tris- HCl 50 mM, pH: 8, EDTA 10 mM), y RNAsa (100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) y se incubó a 37°C durante 15 min. Se agregó NaOH 200 mM y SDS al 1% y se colocaron por 5 minutos a temperatura ambiente, se añadió acetato de potasio (3 M, pH 5,5) y se incubó a 4°C durante 5 minutos. Luego, se centrifugaron las suspensiones y se precipitó el ADN plasmídico utilizando isopropanol y acetato de potasio (3 M, pH 5,5). Posteriormente, se centrifugaron los microviales a 14.000 rpm por 30 minutos, se le colocó etanol al 70% al sedimento para lavarlo y se centrifugó de nuevo. Se dejaron secar los ADN plasmídicos y se resuspendieron en agua destilada estéril y se conservaron a -20°C hasta su uso.

Se realizó la PCR multiplex para la detección de *P. vivax* y *P. falciparum* en la forma antes descrita y utilizando como ADN molde 1  $\mu\text{L}$  de los ADN plasmídicos obtenidos. Los productos se observaron en geles de agarosa de la forma antes descrita.

## >>> RESULTADOS

La cantidad y calidad de los ADN extraídos de muestras de sangre en papel de filtro de pacientes infectados con *P. vivax* y *P. falciparum* fue buena ya que se amplificaron por PCR las secuencias codificantes del ARN ribosomal de la subunidad pequeña de estos parásitos. Se observaron las bandas diagnósticas de 120 pb y 205 pb, de *P. vivax* y *P. falciparum* respectivamente.

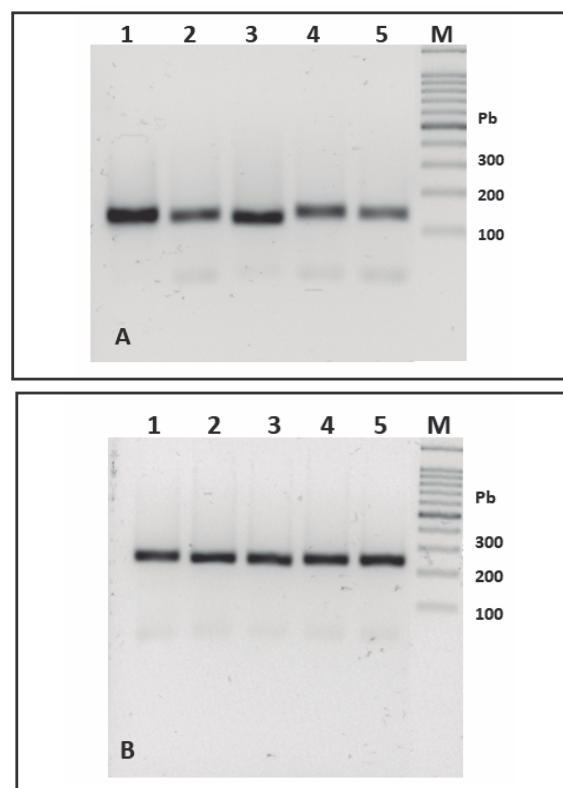
Se purificaron estas bandas a partir de gel de agarosa y se realizaron las ligaciones con el vector de clonación pGEM-T-Easy. Tanto la reacción de ligación, como la transformación de las células competentes *E. coli* XL1Blue MRF' con las

mezclas de ligación fueron exitosas, ya que se identificaron 5 colonias recombinantes (blancas) de *P. vivax* y 12 de *P. falciparum*. Se verificó la presencia del inserto en estas colonias mediante PCR de colonias, observándose las bandas diagnósticas características de 120 pb para *P. vivax* (Fig. 1A) y de 205 pb para *P. falciparum* (Fig. 1B) en la mayoría de las colonias.

Se extrajo el ADN plasmídico de 3 colonias recombinantes para cada especie. Se utilizaron estos ADN plasmídicos extraídos en la PCR de diagnóstico de malaria. De nuevo se obtuvieron las bandas diagnósticas características que presentaban el fragmento del tamaño esperado (Fig. 2).

**>> Figura 1.** Electroforesis en agarosa al 2% de los productos de reacción de la PCR de colonias para la verificación de la clonación. A) (1-5) Colonias recombinantes de *Plasmodium vivax* (M) Marcador de 100 pb (Promega). B) (1-5) Colonias recombinantes de *Plasmodium falciparum*, (M) Marcador

de 100 pb (Promega).



 **BD Vacutainer®**  
Líder en Soluciones Preanalíticas

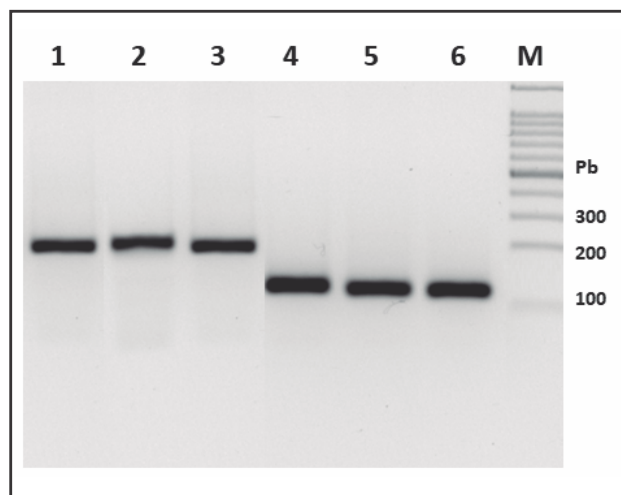
Calidad y Bioseguridad:  
Su interés y nuestro compromiso



Para contactarse, llámenos al: 0800-444-55BD (23)  
o escribanos a: [vacutainer@bd.com](mailto:vacutainer@bd.com)



**>> Figura 2.** Electroforesis en agarosa al 2% de los productos de reacción de la PCR de diagnóstico de malaria utilizando los ADN plasmídicos con las secuencias clonadas. (1-3) ADN plasmídicos con la secuencia clonada de *Plasmodium falciparum*. (4-6) ADN plasmídicos con la secuencia clonada de *Plasmodium vivax*. (M) Marcador de 100 pb (Promega).



## **>>> DISCUSIÓN**

Las técnicas moleculares son un avance importante para los laboratorios en los cuales se realiza diagnóstico y/o investigación de enfermedades parasitarias. El uso de técnicas basadas en la amplificación de ADN como la PCR y sus variantes, son útiles en el diagnóstico por su alta sensibilidad y especificidad en la detección de agentes infecciosos por amplificación de ciertas secuencias genómicas. Los resultados no dependen de una infección anterior ni del estado inmunológico del paciente, por lo que permiten identificar infecciones recientes (activas) (Murphy et al. 2013).

Desde los últimos años se tiene con un gran número de técnicas moleculares basadas en la amplificación de ADN (PCR) para el diagnóstico de malaria (Snounou et al. 1993, Rivero et al. 2004, Murphy et al. 2013, Berzosa et al. 2018, Martín-Díaz et al. 2018, Mirahmadi et al. 2018). La diana más empleada para la identificación de *Plasmodium* spp. es el ADN codificante del ARN ribosomal de la subunidad pequeña 18S (*small subunit ribosomal RNA*, *ssu-rRNA*), por tener secuencias variables y conservadas a lo largo del gen (Snounou et al. 1993, Murphy et al. 2013). La técnica de PCR basada en la amplificación de esta diana, se utiliza comúnmente

por los laboratorios de investigación y de referencia de diagnóstico de malaria de los distintos países endémicos e incluidos países no endémicos (Snounou et al. 1993), para diagnóstico, en el caso de migrantes y viajeros (Martín-Díaz et al. 2018).

Con respecto a la malaria, se ha demostrado en diferentes trabajos que la sensibilidad de la técnica de PCR es mayor que la de los métodos tradicionales basados en examen microscópico (extendido de sangre coloreado y gota gruesa) o las técnicas basadas en detección de antígenos (Berzosa et al. 2018, Martín-Díaz et al. 2018, Mirahmadi et al. 2018). Por otro lado, se obtiene una mejor especificidad, lo cual permite una mejor identificación de la especie y la determinación de mayor número de infecciones mixtas que empleando las otras técnicas (Rubio et al. 2002, Berzosa et al. 2018, Martín-Díaz et al. 2018, Mirahmadi et al. 2018).

Tanto para la estandarización, validación y uso de estas técnicas moleculares se requiere contar con controles positivos, los cuales frecuentemente se obtienen de muestras de pacientes o de cultivos. En el caso de las muestras de pacientes, la desventaja es la gran variabilidad existente por las diversas infecciones con diferentes cepas de los parásitos, los cuales pueden dar patrones no característicos en algunos casos. Con respecto a los cultivos, aunque, sería una muestra más homogénea, tiene como desventajas mayor laboriosidad, costos y riesgos de infección. Los controles son un elemento esencial en la interpretación de los resultados, sin ellos no se puede desarrollar un ensayo (Navarrete-Castro et al. 2004, Acevedo et al. 2009, Camacho et al. 2016, Báez 2017).

Para diagnosticar malaria es indispensable la confirmación en los laboratorios, dado que la sintomatología puede ser no característica. Para todos los diagnósticos, se necesitan controles positivos para validar los ensayos. Convencionalmente, se emplean muestras de pacientes infectados, que generalmente son difíciles de conseguir y presentan variabilidad, o muestras de cultivo que requiere de técnicas laboriosas y costosas. Una forma eficaz de obtener controles positivos, es la utilización de la tecnología de ADN recombinante que permite la clonación de secuencias específicas del genoma del parásito. En este

trabajo se presenta la clonación de las secuencias codificantes del ARN ribosomal de la subunidad pequeña de *P. vivax* y *P. falciparum*, con la finalidad de proponer el empleo de estos recombinantes como controles positivos para las técnicas moleculares, lo que disminuiría el uso de cultivos o muestras de pacientes infectados.

La tecnología de ADN recombinante permite solventar las desventajas del uso de muestras de pacientes o cultivos del parásito, con la clonación de las secuencias diana amplificadas por PCR (Navarrete-Castro et al. 2004, Acevedo et al. 2009, Camacho et al. 2016, Báez 2017).

En este estudio las secuencias fueron insertadas en el vector pGEM®-T Easy, que es un vector que permite la clonación directa de productos de PCR, representando una estrategia de clonación sencilla, que puede ser verificada mediante PCR de colonias y PCR de ADN plasmídico extraído de esas colonias recombinantes, tal

como se hizo en este trabajo y como ha sido realizado en otros trabajos (Navarrete-Castro et al. 2004, Acevedo et al. 2009, Camacho et al. 2016, Báez 2017).

Esta estrategia de clonación utilizando la tecnología del ADN recombinante y vectores apropiados para clonación directa de productos de PCR se ha utilizado para otros agentes infecciosos, tales como; virus, bacterias y hongos. En el caso de virus, se ha usado para el virus de influenza aviar (Acevedo et al. 2009), virus de la hepatitis C (Navarrete-Castro et al. 2004), alfavirus y flavivirus (Camacho et al. 2016) y el virus PRRS (síndrome reproductivo y respiratorio porcino) (Báez 2017).

En bacterias, se ha empleado para *Bacillus anthracis* (Sohni et al. 2008), *Salmonella entérica* (Gokduman et al. 2016) y en hongos en *Fusarium oxysporum* (Báez 2017). También se ha utilizado para control de calidad en detección de múltiples agentes (Chan et al. 2016).

# Publicá con nosotros

Entramos en un nuevo año, un año donde nos metemos de lleno en la ERA DIGITAL. El mundo cambio y la forma de llegar a más personas es a través de la tecnología. Es por eso que la forma de alcanzar nuevos clientes es con Revista Bioanálisis. Una revista con 17 años de trayectoria en el mercado del Diagnóstico Bioquímico. Donde te ofrecemos contenido actualizado, promoción de productos, interacción con el cliente, y mucho más.

Seguimos continuamente trabajando para ofrecerle el mejor servicio, y que juntos tengamos un año mejor.

Revista  
**bioanálisis**

[www.revistabioanalisis.com](http://www.revistabioanalisis.com)

Por otra parte, también se ha utilizado para el estudio de modificaciones genéticas (mutaciones) en el caso de enfermedades hematológicas como leucemia (Ustek *et al.* 2008) y se ha sugerido su uso para diferentes agentes patógenos de enfermedades endémicas y exóticas (Smith *et al.* 2006). En estas últimas, es muy difícil conseguir los controles positivos de pacientes, debido al bajo número de casos.

La tecnología del ADN recombinante puede proporcionar un posible banco de controles positivos permanente para cualquier agente infeccioso, evitando depender tecnológicamente de otros países para obtener los controles y disminuyendo la ejecución de protocolos laboriosos y costosos para tener aislados tanto virales, como de bacterias, hongos, o parásitos, utilizando cultivos celulares y/o inoculación de animales de laboratorio (Navarrete-Castro *et al.* 2004, Smith *et al.* 2006, Sohni *et al.* 2008, Ustek *et al.* 2008, Acevedo *et al.* 2009, Camacho *et al.* 2016, Chan *et al.* 2016, Gokduman *et al.* 2016, Báez 2017).

Otra de las ventajas de la clonación de las secuencias diana diagnósticas de las técnicas moleculares es que se garantiza la reproducibilidad de los resultados. Además, de poder hacer estudios de posible variabilidad de ese gen mediante secuenciación.

Entre las colonias recombinantes obtenidas, dos de ellas; una correspondiente a *P. vivax* y otra correspondiente a *P. falciparum*, rindieron productos de amplificación de tamaños diferentes a las bandas diagnósticas características. Pudiese tratarse de variantes genéticas del parásito en las muestras de esos pacientes, pero hacen falta más estudios, principalmente de secuenciación de esos productos, para determinar si realmente corresponden a variaciones genéticas del parásito o a algún artefacto producido en la metodología de obtención de los clones recombinantes. De todos modos, esta metodología permite seleccionar los clones con el inserto del tamaño correcto y guardar los clones diferentes para estudios posteriores.

Estos plásmidos recombinantes con las secuencias clonadas, pueden ser multiplicados de manera de mantener un suministro constante de

controles positivos para diagnóstico e investigación en malaria, además de poder ser cedidos a otros grupos de investigación de regiones no endémicas que no disponen de los controles necesarios. Además, con ellos puede hacerse control de calidad externo y comparaciones de técnicas en estudios multicéntricos sin la limitante de que se puedan agotar los controles positivos.

## >>> CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en este trabajo demuestran la clonación de los productos de PCR y su aplicación como controles en diagnóstico e investigación en malaria, favoreciendo la reproducibilidad de la técnica y evitando el uso de muestras de pacientes, que generalmente presentan gran variabilidad.

## Agradecimientos

A todo el personal del Centro de investigaciones de Campo “Dr. Francisco Vitanza” por recibirnos y orientarnos para la toma de muestras a pacientes, en especial a su director, el Dr. Jorge Moreno.

## >>> REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ACEVEDO AM, SANTANA E, DÍAZ DE ARCE H, PÉREZ LJ, CABALLERO A, SUÁREZ L, SÁNCHEZ O. 2009. Desarrollo de controles positivos para métodos moleculares de detección de virus de influenza aviar. *Rev. Salud Anim.* 31(1):50-54.
- BÁEZ J. 2017. Clonación de genes para elaboración de controles positivos internos para la detección de enfermedades que afectan al sector agropecuario. Quito: Universidad de las Américas [Disertación Grado Ingeniero Agrónomo], pp. 64-92.
- BARBER BE, WILLIAM T, GRIGG MJ, YEO TW, ANSTEY NM. 2013. Limitations of microscopy to differentiate *Plasmodium* species in a region co-endemic for *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax* and *Plasmodium knowlesi*. *Malar. J.* 12(1):8.
- BERZOSA P, DE LUCIO A, ROMAY-BARJA M, HERRADOR Z, GONZÁLEZ V, GARCÍA L, FERNÁNDEZ-MARTÍNEZ A, SANTANA-MORALES M, NCOGO P, VALLADARES B, RILOHA M, BENITO A. 2018. Comparison of three diagnostic methods (microscopy, RDT, and PCR) for the detection of malaria parasites in representative samples from Equatorial Guinea. *Malar. J.* 17(1):333.
- CÁCERES JL. 2011. La malaria en el estado Bolívar, Venezuela: 10 años sin control. *Bol. Mal. Salud Amb.* 51(2):207-214.
- CAMACHO D, REYES J, FRANCO L, COMACH G, FERRER E. 2016. Clonación de secuencias de alfavirus y flavivirus

para su uso como controles positivos en el diagnóstico molecular. Rev. Perú. Med. Exp. Salud Pública. 33(2):269-273.

CHAN M, JIANG B, TAN TY. 2016. Using pooled recombinant plasmids as control materials for diagnostic Real-Time PCR. Clin. Lab. 62(10):1893-1901.

DANIELS JP. 2018. Increasing malaria in Venezuela threatens regional progress. Lancet Infect Dis. 18(3):257.

GOKDUMANK, AVSAROGLU MD, CAKIRISA, USTEK D, GURAKAN GC. 2016. Recombinant plasmid-based quantitative Real-Time PCR analysis of *Salmonella enterica* serotypes and its application to milk samples. J. Microbiol. Methods. 122:50-58.

MALTHA J, GILLET P, CNOPS L, VAN DEN EJ, VAN ESBROECK M, JACOBS J. 2010. Malaria rapid diagnostic tests: *Plasmodium falciparum* infections with high parasite densities may generate false positive *Plasmodium vivax* pLDH lines. Malar. J. 9(1):198.

MARTÍN-DÍAZ A, RUBIO JM, HERRERO- MARTÍNEZ JM, LIZASOAIN M, RUIZ-GIARDIN JM, JAQUETI J, CUADROS J, ROJO-MARCOS G, MARTÍN-RABADÁN P, CALDERÓN M, CAMPELO C, VELASCOM, PÉREZ-AYALAA. 2018. Study of the diagnostic accuracy of micro-biological techniques in the diagnosis of malaria in the immigrant population in Madrid. Malar. J. 17(1):314.

MILNER DA JR. 2018. Malaria pathogenesis. Cold Spring Harb Perspect Med. 8(1). pii:a025569.

MIRAHMADI H, SHAHRAKIPOUR A, MEHRAVARAN A, KHORASHAD AS, RAHMATI-BALAGHALEH M, ZAREAN M.

2018. Evaluation of malaria multiplex/nested PCR performance at low parasite densities and mixed infection in Iran: A country close to malaria elimination. Infect. Genet. Evol. 65:283-287.

MOODY A. 2002. Rapid diagnostic tests for malaria parasites. Clin. Microbiol Rev. 15(1):66-78.

MURPHY SC, SHOTT JP, PARIKH S, ETTER P, PRESCOTT WR, STEWART VA. 2013. Malaria diagnostics in clinical trials. Am. J. Trop. Med. Hyg. 89(5):824-839.

NAVARRETE-CASTRO J, MARTÍNEZ-RODRÍGUEZ M, SIRIA-TORREBLANCA N, CALDERÓN-RODRÍGUEZ GM. 2004. Clonación de una secuencia representativa de la región no traducible 5' (5'-UTR) del virus de la hepatitis C. Bioquímica. 29(1):11-17.

OMS (ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD). 2018. Notas descriptivas Paludismo. Disponible en línea en: <http://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/malaria> (Acceso 03.02.2019).

PACHECO C, MORENO J, HERRERA F. 2019. Molecular detection and species determination of malaria parasites, Venezuela. Emerg. Infect. Dis. 25(2):355-357.

PAHO (PAN-AMERICAN HEALTH ORGANIZATION). 2018. Interactive Malaria Statistics. Disponible en línea en: [http://www.paho.org/hq/index.php?option=com\\_topics&view=readall&cid=2149&Itemid=40757&lang=es](http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_topics&view=readall&cid=2149&Itemid=40757&lang=es) (Acceso 03.02.2019).

RECHT J, SIQUEIRA AM, MONTEIRO WM, HERRERA SM, HERRERAS, LACERDA MVG.

2017. Malaria in Brazil, Colombia, Peru and Venezuela: current challenges in malaria control and elimination. Malar. J. 16(1):273.

RIVERO J, URDANETA L, ZOGHBI N, PERNALETE M, RUBIO-PALISY, HERRERA F. 2004.

Optimization of extraction procedure for mosquitos DNA suitable for PCR-based techniques. Int. J. Trop. Insect Sci. 24(3):266-269.

RODRÍGUEZ-MORALES AJ, PANIZ-MONDOLFI AE.

2014. Venezuela's failure in malaria control. Lancet. 384(9944):663-664.

ROSENBLATT JE. 2009. Laboratory diagnosis of infections due to blood and tissue parasites. Clin. Infect. Dis. 49(7):1103-1108.

RUBIO JM, BUHIGASI, SUBIRATS M, BAQUERO

M, PUENTE S, BENITO A. 2001. Limited level of accuracy provided by available rapid diagnosis tests for malaria enhances the need for PCR-based reference laboratories. J. Clin. Microbiol. 39(7):2736-2737.

RUBIO JM, POST RJ, VAN LEEUWEN WM, HENRY MC, LINDERGARD G, HOMMEL M. 2002.

Alternative polymerase chain reaction

method to *iPlasmodium* species in human blood samples: the semi-nested multiplex malaria PCR (SnM-PCR). Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 96(S1):S199-S204.

SAMBROOK J, RUSSELL D. 2001. Molecular cloning: a laboratory manual, 3a ed. Cold Spring Harbor, New York, USA, pp. 157-251.

SMITH G, SMITH I, HARROWER B, WARRILOW D, BLETCHLY C. 2006. A simple method for preparing synthetic controls for conventional and real-time PCR for the identification of endemic and exotic disease agents. J. Virol. Methods. 135(2):229-234.

SNOUNOU G, VIRIYAKOSOL S, ZHU XP, JARRA W, PINHEIRO L, DO ROSARIO VE, THAITHONG

S, BROWN KN. 1993. High sensitivity of detection of human malaria parasites by the use of nested polymerase chain reaction. Mol. Biochem. Parasitol. 61(2):315-320.

SOHNIY, KANJILALS, KAPUR V. 2008. Cloning and development of synthetic internal amplification control for *Bacillus anthracis* real-time polymerase chain reaction assays. Diagn. Microbiol. Infect. Dis. 61(4):471-475.

USTEK D, SIRMAS, CAKIRISA, COŞAN F, OKU B, ÖZBEK U. 2008. Cloning of chimerical translocations as positive control for molecular genetic diagnosis of leukemia. Turk J. Haematol. 25(1):20-23.

WHO (WORLD HEALTH ORGANIZATION). 2014.

World malaria report. Geneva. Disponible en línea en: [http://www.who.int/malaria/publications/world\\_malaria\\_report\\_2014/en/](http://www.who.int/malaria/publications/world_malaria_report_2014/en/) (Acceso 03.02.2019).