

Comparación de dos protocolos de extracción de ADN para la detección de infección por *Plasmodium* spp. en *Anopheles* spp.

Comparison of two protocols of DNA extraction for the detection of infection by *Plasmodium* spp. in *Anopheles* spp.

María Monsalve Restrepo*, Héctor Ortega Arellano *,
Lina Gutiérrez Builes †, Margarita M. Correa ‡, Mario Zapata Tamayo §

RESUMEN

INTRODUCCIÓN

La detección de anofelinos infectados por *Plasmodium* spp. se ha realizado tradicionalmente por medio de microscopía óptica e inmunoensayos. Actualmente, las metodologías basadas en la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), proveen una alta sensibilidad y especificidad; sin embargo, algunos autores han reportado que inhibidores, presentes en el cuerpo del mosquito, pueden disminuir la sensibilidad de la PCR para la detección de *Plasmodium* spp., y tal efecto podría reducirse con la utilización de protocolos de extracción de ADN que remuevan de forma eficiente los inhibidores potenciales.

OBJETIVO

Comparar dos protocolos de extracción de ADN para la detección de infección por *Plasmodium* spp. en *Anopheles* spp.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se seleccionaron diez mosquitos *Anopheles stephensi* infectados con *Plasmodium falciparum*, previamente disectados, para separar cabeza-tórax de abdomen, que fueron evaluados por dos protocolos de extracción: uno con resina quelante y otro sin resina; se realizaron diluciones del producto de extracción y se amplificó el DNA por PCR anidada. Se compararon las diferencias entre las frecuencias de amplificación mediante la prueba t-Student y las hipótesis fueron probadas aplicando la prueba de diferencia entre las proporciones de dos poblaciones.

RESULTADOS

En especímenes cuyo ADN fue extraído usando el protocolo sin resina quelante la amplificación de ADN del parásito fue de 11,6%, y con el protocolo con resina fue 6,6%. Del total de las amplificaciones, un 20% correspondieron a material de extracción sin dilución y un 7,5% a material de extracción diluido 1:10; la diferencia entre las proporciones de amplificación fue estadísticamente significativa ($p < 0,05$).

CONCLUSIONES

El protocolo que con mayor eficiencia permitió detectar ADN del parásito en ADN extraído de mosquitos fue aquel al que no se añadió resina quelante; con este, la amplificación fue aproximadamente dos veces mayor que con el protocolo con resina.

PALABRAS CLAVES

Anopheles spp. Extracción de ADN. Malaria. PCR anidada. *Plasmodium* spp.

*Microbiólogo y Bioanalista, Grupo de Microbiología Molecular, Escuela de Microbiología, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia. †Microbióloga y Bioanalista, Ph.D en Ciencias Básicas Biomédicas, Grupo de Microbiología Molecular, Escuela de Microbiología, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia. ‡Ph. D. en Microbiología, Docente, Grupo de Microbiología Molecular, Escuela de Microbiología, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia. §Bacterióloga y Bioanalista, Epidemiólogo y MSc. en Ciencias Básicas Biomédicas, Grupo de Microbiología Veterinaria, Escuela de Microbiología, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia. Contacto: zapmario@gmail.com
Recepción: 28-02-2011. Aceptación: 6-04-2011.

ABSTRACT

INTRODUCTION

Detection of anophelines infected with *Plasmodium* spp. has traditionally been conducted by optical microscopy and immuno-assays. Currently, methodologies based on Polymerase Chain Reaction (PCR), provide high sensitivity and specificity; however, some authors have reported that inhibitors present in the mosquito's body can decrease PCR sensitivity for *Plasmodium* spp. detection and that their effect could be reduced using DNA extraction protocols that efficiently remove those potential inhibitors.

OBJECTIVE

To compare two DNA extraction protocols for the detection of *Plasmodium* spp. infecting *Anopheles* spp.

MATERIALS AND METHODS

Ten *Anopheles stephensi* mosquitoes infected with *Plasmodium falciparum* were dissected to separate head-thorax and abdomen and processed by one of the extraction protocols, dilutions of the DNA were evaluated by nested PCR. Differences between amplification frequencies were analyzed by the t-Student's test and the hypotheses were analyzed by the test of difference between proportions of two populations.

RESULTS

In specimens with DNA extracted by the protocol without chelating resin amplification of parasite DNA was achieved in 11.6% of the samples and with the protocol with chelating resin, in 6.6%. From all of the amplifications, 20% corresponded to undiluted DNA and 7.5% to DNA diluted 1:10; the difference between amplification proportions was statistically significant ($p < 0.05$).

CONCLUSIONS

The protocol that more efficiently detected parasite DNA in mosquitoes was the one without chelating resin; with it, amplification was approximately two fold to the one obtained with the protocol with resin.

KEY WORDS

Malaria, *Anopheles* spp., *Plasmodium* spp., DNA extraction, nested PCR.

INTRODUCCIÓN

La malaria es una enfermedad de proporciones globales, transmitida por vectores biológicos;¹ causa una alta morbilidad y mortalidad, convirtiéndose en un problema de salud pública, principalmente en regiones tropicales de países en desarrollo.² La malaria humana se presenta por la picadura de mosquitos hembra del género *Anopheles* spp., infectados con *Plasmodium* spp.³ Para que un mosquito sea implicado como vector de la malaria, es necesario conocer su capacidad vectorial y su competencia vectora.^{4,5} Uno de los elementos útiles para evaluar la competencia vectora de una especie anofelina es la determinación de las tasas de infección e infectividad por *Plasmodium* spp.^{2,5}

La detección de las especies de *Plasmodium* causantes de la malaria en vectores anofelinos se ha realizado tradicionalmente mediante la observación de estos parásitos en glándulas salivares e intestino medio, por microscopía óptica. Esta metodología posee un límite de detección mínimo de 10 a 30 parásitos;⁶⁻⁸ una de sus mayores limitaciones es que se requiere la disección de mosquitos frescos, y el análisis de cada mosquito es una labor que demanda tiempo y debe realizarlo personal experimentado.^{9,10} Otras metodologías utilizadas incluyen ensayos inmunológicos como los ensayos de inmunoabsorción ligados a enzimas (ELISA “Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay”), con un límite de sensibilidad de 20 a 50 parásitos;^{6,11} sin embargo, esta prueba tiene algunos problemas de precisión y validez,⁹ dado que no puede diferenciar entre la proteína del circumsporozoito que está presente en la superficie del esporozoito y la que podría estar depositada en los tejidos del mosquito,^{12,13} lo cual aumenta la probabilidad de que se presenten falsos positivos. En general, las técnicas mencionadas son poco sensibles para bajos o moderados niveles de infección, lo cual constituye un problema en muchas zonas maláricas de países como Colombia, donde los principales vectores presentan tasas de infección inferiores al 1,0%.^{14, 15}

Otra de las técnicas que se utilizan actualmente para la detección e identificación del parásito en el mosquito, es la amplificación por Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), la cual ofrece una alternativa efectiva, dado que provee análisis altamente sensible y específico, permitiendo la detección de hasta un genoma del parásito,^{16,17} la determinación de la especie de *Plasmodium* y el estudio de la diversidad genética de las pobla-

ciones de las diferentes especies del parásito.¹⁸ Sin embargo, algunos investigadores han encontrado una disminución en la sensibilidad de la PCR para la detección de parásitos de la malaria en los vectores anofelinos.^{19,20} Esta disminución en la sensibilidad se ha atribuido a la presencia de inhibidores o interferentes en los tejidos del mosquito, los que podrían removerse, si previamente al análisis por PCR se adoptan métodos de extracción de ADN que remuevan de forma más eficiente estos inhibidores o si se hace disección del mosquito y dilución del material a amplificar.^{18, 21-25} Teniendo en cuenta esta situación, se diseñó un experimento con el objetivo de comparar dos protocolos de extracción de ADN, cuya diferencia principal es la utilización de una resina quelante de iones, para identificar cuál de estos dos procedimientos permite con mayor eficiencia la amplificación de ADN de *Plasmodium* spp. en *Anopheles* spp., por medio de una PCR anidada.

MATERIALES Y MÉTODOS

El estudio se realizó bajo un modelo comparativo experimental con un diseño de bloques completamente aleatorizados. Se tomaron dos bloques, cada uno de ellos con diez mosquitos, a cada bloque se le aplicó un protocolo de extracción de ADN diferente; cada bloque se conformó por un nivel, el cual correspondía a un mosquito disectado previamente, así: cabeza-tórax y abdomen, cada componente se utilizó individualmente para la extracción del ADN. A partir de este nivel se conformó un subnivel que correspondió a la dilución del material extraído a partir del mosquito (material puro, dilución 1:10 y dilución 1:100). De esta manera, las variaciones en el protocolo de extracción, las fracciones del mosquito y las diluciones realizadas, conformaron tratamientos independientes.

En cada bloque se incluyeron cuatro controles positivos y cuatro controles negativos, a los cuales se les aplicaron los mismos tratamientos. El control negativo lo constituyó material de extracción de mosquitos no infectados de la especie *Anopheles albimanus* (donado de la colonia del PECET-UdeA) Para los controles positivos se tomaban 4 µL del ADN obtenido de manera individual de mosquitos *An. albimanus* de colonia, a los que se les adicionaba 2 µL de ADN de *Plasmodium falciparum* a una concentración de 82,04 µg/mL. Además, como controles positivos

para la PCR se utilizó ADN de *P. vivax* a una concentración de 84,03 µg/mL y ADN de *P. falciparum* a una concentración de 82,04 µg/mL.

UNIDADES EXPERIMENTALES

Se trabajó con 20 mosquitos *Anopheles stephensi* infectados con *P. falciparum*, se removieron las patas y alas de cada mosquito y se descartaron; luego a cada mosquito se le separó la cabeza-tórax del abdomen, se usó independientemente las cabezas y tórax o los abdómenes de diez mosquitos por cada bloque, de tal forma que el número de replicas fue mayor de dos, con el fin de observar una variabilidad mayor del 50%.

EXTRACCIÓN DE ADN

El tórax y abdomen de los mosquitos utilizados por bloque se distribuyeron aleatoriamente en dos grupos, formando así dos bloques, cada uno con diez replicas. En uno de los bloques se realizó la extracción de ADN utilizando el protocolo con resina quelante, mientras en el otro se siguió un protocolo para la extracción de ADN sin utilizar la resina.

EXTRACCIÓN DE ADN MEDIANTE

EL PROTOCOLO SIN RESINA QUELANTE

La cabeza-tórax y abdomen de cada mosquito se lavaron dos veces con etanol al 95% para remover contaminantes; se homogenizaron independientemente en un tubo de 1,5 mL con 100 µL de solución de lisis (0,1 M NaCl, 0,1 M sucrosa, 0,1 M Tris (pH 9,1), 0,05 M EDTA y 0,5% SDS) y se incubó a 65°C, por 30 minutos, luego se le adicionó 14,5 µL de acetato de potasio 8 M y se incubó a -20°C, durante toda la noche. Posteriormente, se centrifugó a 13.000 rpm (Heraeus, Wetzlar, Alemania), por 15 minutos, a 4°C; se tomó el sobrenadante, se realizó la precipitación de ácidos nucleicos usando 100 µL etanol absoluto y después de seis minutos se centrifugó nuevamente a 13.000 rpm, por 15 minutos, a 4°C y al sedimento se le adicionaron 100 µL de etanol frío al 70%, se centrifugó a 13.000 rpm por 5 minutos a 4°C. Nuevamente, al sedimento se le adicionaron 100 µL de etanol absoluto, y se centrifugó a 13.000 rpm por 5 minutos a 4°C. Finalmente, el sobrenadante se removió y se dejó evaporar el etanol del precipitado durante 30 minutos, el material obtenido se resuspendió en 50 µL de TE 1X (10 mM Tris, 1mM EDTA, pH 7,6), se incubó por 10 minutos a 65°C y se almacenó a -20°C, para realizar los análisis posteriores.

EXTRACCIÓN DE ADN MEDIANTE

EL PROTOCOLO CON RESINA QUELANTE

La cabeza-tórax y abdomen de cada mosquito se lavaron dos veces con etanol al 95% para remover contaminantes; se homogenizaron independientemente en un tubo de 1,5 mL con 100 μ L de solución de lisis (0,1 M NaCl, 0,1 M sucrosa, 0,1 M Tris (pH 9,1), 0,05 M EDTA y 0,5% SDS) y se incubó a 70°C, por 15 minutos; luego de dejarla enfriar a temperatura ambiente durante 5 minutos, se le adicionó 15 μ L de acetato de potasio 8 M y se incubó a -20°C, por 30 minutos. Posteriormente, se realizó una centrifugación a 13.000 rpm, por 10 minutos, a 4°C, se tomó el sobrenadante, se adicionaron 200 μ L de resina quelante al 5% y se incubó a 56°C durante toda la noche. Al día siguiente, la reacción se incubó en agua hirviendo durante 8 minutos, y mezclada a intervalos de 2 minutos, para posterior separación mediante centrifugación a 13.000 rpm, por 3 minutos, a 4°C. El sobrenadante se transfirió a un tubo nuevo para ser nuevamente centrifugado a 13.000 rpm, por 3 minutos, a 4°C. Finalmente, el sobrenadante se removió, el precipitado se dejó secar al aire durante 30 minutos y el material obtenido se resuspendió en 50 μ L de TE 1X se incubó durante 10 minutos, a 65°C y se almacenó a -20°C, para realizar los análisis posteriores.

PCR ANIDADADA

El material obtenido con cada protocolo de extracción se diluyó en TE 1x (1:10 y 1:100); luego todas las muestras, tanto diluidas como sin diluir, se amplificaron mediante PCR anidada, usando los oligonucleótidos específicos del género *Plasmodium* (rPLU1 y rPLU5) y (rPLU3 y rPLU4) citados por Singh y col.¹⁰ y las condiciones de PCR previamente estandarizadas,¹⁴ como se describe brevemente a continuación. Inicialmente, el producto de extracción se amplificó por PCR con oligonucleótidos específicos de género, dirigidos al ADN de la subunidad ribosomal pequeña de *Plasmodium* spp.; la amplificación del ADN se realizó en una reacción de 25 μ L que contenía: dNTPs 200 μ M, Tampón 1X, 4 mM de MgCl₂, 0,25 μ M de cada uno de los oligonucleótidos, 1,3 unidades de Taq polymerasa y 6 μ L de material de extracción. Parte del producto de esta primera reacción se utilizó como molde para la segunda reacción de amplificación de la PCR anidada específica de género, en una reacción de 25 μ L que contenía dNTPs 200 μ M, Tampón 1X, 4 mM de MgCl₂, 0,25 μ M

de cada uno de los oligonucleótidos, 0,5 unidades de Taq polymerasa y 2 μ L del primer producto de PCR. Las condiciones para la PCR con los primers rPlu1-rPlu5, fueron: un paso inicial de desnaturalización a 94°C, por cuatro minutos; seguido por 35 ciclos de: 30 segundos a 94°C, 55°C por 60 segundos y 72°C por un minuto y un paso final de elongación a 72°C por cuatro minutos. Las condiciones para la PCR anidada usando los primers rPlu3-rPlu4, fueron: un paso de desnaturalización a 94°C por cuatro minutos, seguido por 35 ciclos de: 94°C por 30 segundos, 62°C por 60 segundos y 72°C por un minuto, y uno de elongación a 72°C por cuatro minutos. El producto de la segunda ronda de PCR se visualizó por medio de una electroforesis en gel de agarosa al 0,8%, teñido con bromuro de etidio (0,5 μ g/ μ L), usando un trans-iluminador (BIO-RAD, California CA, USA).

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los resultados obtenidos se analizaron por comparación de frecuencia relativa de amplificación, aplicados comparativamente entre bloques, niveles y subniveles de tratamiento. La medida de dependencia que se utilizó fue la prueba t-Student, con una significancia del 95%. Las hipótesis fueron probadas empleando la prueba de diferencia entre las proporciones de dos poblaciones.²⁶

RESULTADOS

Se obtuvo una amplificación de la región de interés del ADN de la subunidad ribosomal pequeña del *Plasmodium* mediante PCR anidada en 9% de las muestras (11/120). En el bloque de mosquitos tratados con el protocolo sin resina quelante (diez mosquitos), se logró amplificar la región de interés en cinco niveles, correspondientes al material de extracción del ADN a partir de tres abdomenes y dos cabeza-tórax. En los subniveles de tratamiento se observó la amplificación de la región de interés en cinco muestras de material puro y en dos muestras de material en dilución 1:10; sólo dos muestras que presentaron amplificación en el subnivel de material puro amplificaron en el subnivel de dilución 1:10. En el subnivel de material en dilución 1:100 no se observó la amplificación de la región de interés.

En el bloque de mosquitos tratados con el protocolo con resina quelante (diez mosquitos), se logró

amplificar la región de interés en tres niveles, correspondientes al material de extracción del ADN a partir de dos abdomenes y uno de cabeza-tórax. En los subniveles de tratamiento se amplificó la región de interés en tres muestras de material puro y en una muestra de material en dilución 1:10, sólo una muestra presentó amplificación tanto en el subnivel de material puro como en el subnivel de dilución 1:10; mientras que en el subnivel de material con dilución 1:100 no se observó la amplificación de la región de interés.

Cuando se compararon de forma independiente los bloques de tratamientos, se observó la amplificación de la región de interés en 11,6% (7/60) de las muestras extraídas utilizando el protocolo sin resina quelante, y en 6,6% (4/60) de las muestras extraídas utilizando el protocolo con resina quelante, la diferencia entre las proporciones de amplificación fue estadísticamente significativa ($p=0,045$) (tabla 1).

Tabla 1. Comparación entre los bloques de tratamientos.

36. Muestras	37. Protocolo de extracción de Birungi y Munstermann (2002)	38. Protocolo de extracción de Chelex®
39. Amplificadas	40. 7*	41. 4*
42. Total	43. 60	44. 60
*p < 0,05		

El análisis estadístico de prueba de hipótesis realizado, buscando identificar si existía diferencia entre las proporciones de amplificación de ambos bloques, cuya estimación inicial fue $p_1 = p_2$, con la regla de decisión de $Z = 1,645$, un alfa = 0,05 y un estadístico de prueba calculado de $Z = 0,96$, determinó que existen diferencias estadísticamente significativas entre el número de amplificadas obtenidos mediante PCR, cuando se compararon las frecuencias de amplificación de ambos bloques, lo cual indicó que el protocolo con resina quelante fue menos eficiente para la extracción de ADN de *Plasmodium* de partes de mosquito, en comparación al protocolo sin resina quelante.

Cuando se compararon de forma independiente los niveles cabeza-tórax y abdomen, se observó la amplificación de la región de interés en un 8,3% (5/60) de las muestras provenientes de cabeza-tórax y en

10% (6/60) de las muestras provenientes de abdomen. La diferencia entre los resultados de las proporciones de amplificación no fue estadísticamente significativa al evaluar independientemente estos niveles ($p=0,56$) (tabla 2), indicando que el éxito en el proceso de extracción de ADN de *Plasmodium falciparum* fue estadísticamente independiente del segmento del cuerpo de mosquito que se evaluó.

Tabla 2. Comparación entre los niveles de tratamientos.

45. Muestras	46. Cabeza-Tórax	47. Abdomen
48. Amplificadas	49. 5*	50. 6*
51. Total	52. 60	53. 60
p > 0,05		

Cuando se compararon de forma independiente los subniveles de diluciones, se observó que cuando se utilizó material puro, se logró amplificar la región de interés en 20% (8/40) de las muestras (figura 1), mientras que cuando se realizó una dilución 1:10 del material de extracción, se observó el amplicón esperado en 7,5% (3/40) de las muestras; la diferencia entre las proporciones de amplificación fue estadísticamente significativa ($p = 0,026$) (figura 2). No se obtuvo amplificación de la región de interés en ninguna de las muestras diluidas 1:100. Esto para la práctica implicaría que para efectos de amplificación de ADN de *Plasmodium falciparum* en mosquitos anofelinos no es recomendable realizar diluciones altas (1:100) del material de extracción para realizar la PCR, esto debido a la alta posibilidad de diluir significativamente el ADN blanco y disminuir la probabilidad de amplificar la región de interés.

DISCUSIÓN

La PCR se ha convertido en una alternativa práctica y ventajosa para la detección del *Plasmodium* spp. en los vectores anofelinos, gracias a su alta sensibilidad y especificidad;¹⁴⁻¹⁸ esta técnica requiere un ADN extraído de buena cantidad y calidad.²⁶ En nuestro estudio se encontró que el protocolo de extracción sin resina

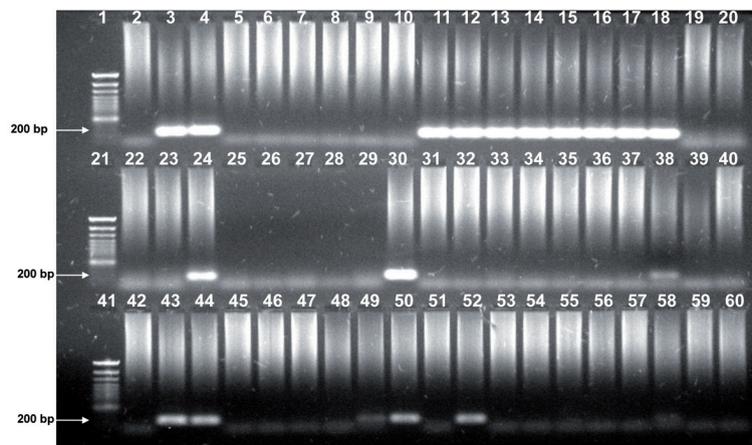


Figura 1. Productos de amplificación de ADN de *Plasmodium falciparum* en material sin dilución de *Anopheles stephensi*. Se observó un amplificado de 200 bp. en 7 muestras. Carriles 1, 21 y 41: Marcadores de peso molecular en bp.; 2: Blanco; 3: ADN *Plasmodium falciparum*; 4: ADN *Plasmodium vivax*; 5-10: controles negativos, ADN de *Anopheles albimanus*; 11-18: controles positivos, ADN de *P. falciparum* adicionado al ADN de *Anopheles albimanus*; 19, 20, 22-24, 40, 42-45: ADN extraído por protocolo sin resina quelante a partir de abdomen; 25-29, 46-50: ADN extraído por protocolo sin resina quelante a partir de cabeza-tórax; 30-34, 51-55: ADN extraído por protocolo con resina quelante a partir de abdomen; 35-39, 56-60: ADN extraído por protocolo con resina quelante a partir de cabeza- tórax. Todas las condiciones de la reacción fueron descritas en el texto. Un volumen de 7 μ L de la reacción fue corrida en un gel de agarosa al 0,8%.

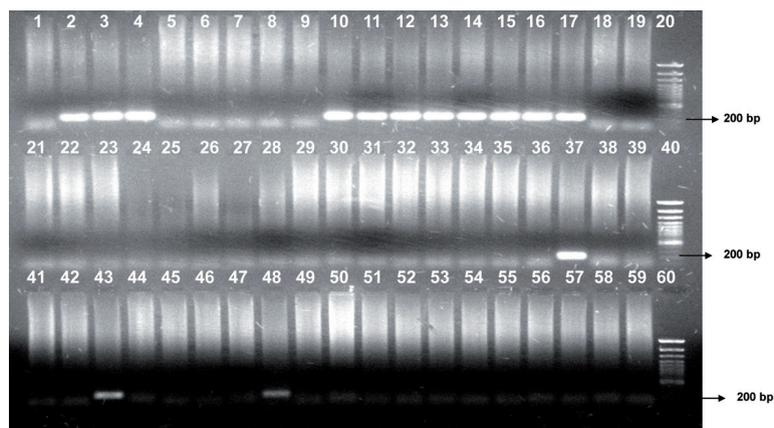


Figura 2. Productos de amplificación de ADN de *Plasmodium falciparum* en material en dilución 1:10 de *Anopheles stephensi*. Se observó un amplificado de 200 bp. en 5 muestras. Carriles 20, 40 y 60: Marcadores de peso molecular en bp.; 1: Blanco; 2: ADN *Plasmodium falciparum*; 3: ADN *Plasmodium vivax* dil 1:10; 4: ADN *Plasmodium falciparum* dil 1:10; 5-9: controles negativos, ADN de *Anopheles albimanus*; 10-17: controles positivos, ADN de *Plasmodium falciparum* adicionado al ADN de *Anopheles albimanus*; 18, 19, 21-23, 39, 41-44: ADN extraído por protocolo sin resina quelante a partir de abdomen; 24-28, 45-49: ADN extraído por protocolo sin resina quelante a partir de cabeza-tórax; 29-33, 50-54: ADN extraído por protocolo con resina quelante a partir de abdomen; 34-38, 55-59: ADN extraído por protocolo con resina quelante a partir de cabeza-tórax. Todas las condiciones de la reacción fueron descritas en el texto. Un volumen de 7 μ L de la reacción fue corrida en un gel de agarosa al 0,8%.

quelante mostró mejores resultados, dado que con este se logró la amplificación de la región de interés en un mayor número de muestras que con el protocolo que utiliza resina. Los dos protocolos comparados en nuestro estudio difieren además en el tiempo de incubación de las muestras en hielo después de agregar el acetato de potasio; mientras que en el protocolo sin resina quelante las muestras se incuban durante toda la noche, en el protocolo con resina quelante las muestras se incuban durante 30 minutos. Es posible que el tiempo de incubación de las muestras con el acetato de potasio sea un factor que influye en el bloqueo de los inhibidores de la PCR, y esto puede ser explicado por el mayor tiempo de acción que puede tener el acetato de potasio para precipitar las proteínas presentes,²⁸ que finalmente podrían interferir con la PCR. Los resultados obtenidos con el protocolo sin resina concuerdan con lo reportado por Fraga y col.,²⁹ quienes al comparar cinco protocolos de extracción de ADN observaron que en aquellos en los que se empleaba acetato de potasio por mayor tiempo y concentración, se obtenía un mejor rendimiento y pureza del ADN. Sin embargo, ambos resultados están en desacuerdo con lo encontrado por Rosero y col.,³⁰ quienes evaluaron varios tiempos de incubación de la muestra, en abdómenes de mosquitos anofelinos, con acetato de potasio y evidenciaron que la mayor concentración de ADN y frecuencias de amplificación se obtuvieron al utilizar el tratamiento de 1 h, por lo que los autores sugirieron que era posible reducir el tiempo de incubación con AcK sin afectar la cantidad y calidad del ADN extraído.

Algunos investigadores también han sugerido que hay partes del mosquito que contienen mayor cantidad de interferentes de la PCR. Arez y col.,¹⁸ compararon las frecuencias de amplificación usando como material de extracción el mosquito completo, la cabeza y tórax, el abdomen, el intestino medio o las glándulas salivares. Estos autores observaron que cuando la extracción se hizo a partir de todo el mosquito o de la cabeza-tórax, las frecuencias de amplificación fueron menores que las obtenidas cuando la extracción se hizo a partir de las otras partes del mosquito, por lo que sugirieron que los interferentes provenían probablemente del exoesqueleto del mosquito. Arez y col.,¹⁸ trabajaron con mosquitos no infectados y para efectuar la PCR, adicionaron ADN de *Plasmodium falciparum* 3D7 al material de extracción.

En nuestro estudio se trabajó con mosquitos de 10 días postinfección, diseño que asemeja mejor las condiciones naturales del trabajo con mosquitos de campo. Los resultados mostraron diferencia entre las proporciones de positividad, siendo mayor en abdomen (10%) y aunque la diferencia no fue estadísticamente significativa, esta información puede orientar la decisión sobre qué tipo de muestra utilizar para la extracción de ADN en futuros estudios entomológicos. Un posible derrotero a seguir para la incriminación de especies vectoras o estimación de la tasa de infectividad, es analizar solo cabeza y tórax;^{14, 15} para la identificación molecular de especies anofelinas, podría emplearse el abdomen o una pata o ala de este,^{31,32,33} y si se pretende estimar la tasa de infección, podría analizarse sólo el abdomen del mosquito disectado.

Algunos investigadores han descrito factores intrínsecos y extrínsecos que afectan la amplificación de una región de interés. Entre los factores extrínsecos se encuentran los métodos de preservación de los especímenes³⁴ y entre los factores intrínsecos se encuentra la presencia de posibles inhibidores o interferentes de la PCR presentes en los tejidos del mosquito.^{18, 21-25} Por ello, se ha recomendado diluir el material de extracción de ADN para disminuir las concentraciones de los interferentes presentes en las muestras y de esta manera lograr elevar la eficiencia de la PCR.^{14, 35} En este trabajo, se compararon las proporciones de amplificación obtenidas partiendo de material puro, material diluido 1:10 y 1:100 para evaluar si la disminución de los posibles interferentes en las respectivas diluciones se veía reflejado en la frecuencia de amplificación; sin embargo, la mayor frecuencia de amplificación se observó cuando se amplificó a partir de material puro (20%), en las muestras diluidas 1:10 la frecuencia de amplificación de la región de interés fue menor (7,5%), y no se logró amplificación en muestras en dilución 1:100. Esta información sugiere que al diluir el material extraído, se disminuyó la concentración del ADN en la muestra utilizada para la amplificación, a un nivel por debajo del límite de detección. Lo anterior debe tenerse en cuenta cuando se trabaja con mosquitos anofelinos capturados en campo, debido a que en muchas zonas maláricas de Colombia los vectores presentan tasas de infección bajas (14, 15), y si se realizan diluciones del material de extracción se esta-

ría disminuyendo la posibilidad de detectar mosquitos infectados.

La comparación de métodos de extracción permitió determinar que el protocolo de extracción que con mayor eficiencia permitió detectar ADN de parásito en ADN genómico extraído de mosquitos, fue aquel al que no se añade resina quelante; de igual forma la mayor frecuencia de amplificación se logró con material sin dilución. Consideramos que con base en los resultados de nuestro estudio y las hipótesis existentes sobre los factores extrínsecos que pueden afectar la eficiencia de la PCR, es necesario realizar estudios para evaluar, entre otros factores, la eficiencia de los métodos de preservación de mosquitos y su incidencia en la eficiencia de la PCR para la detección de mosquitos anofelinos infectados.

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos a investigadores del grupo de Investigación Microbiología Molecular, Escuela de Microbiología, Universidad de Antioquia, por sus valiosos aportes técnicos, temáticos y metodológicos, a los Grupos de investigación Salud y Comunidad y PECET, de la Universidad de Antioquia, por la donación de *Anopheles albimanus* de colonia y ADN de *Plasmodium falciparum*, que se usaron como controles y a la Dra. Shirley Luckhart, Department of Medical Microbiology and Immunology, University of California at Davis, EUA, por la donación de mosquitos *Anopheles stephensi* infectados con *Plasmodium falciparum*.

FINANCIACIÓN

Este trabajo contribuyó a la formación en investigación de estudiantes de pregrado y fue anidado al proyecto código 1115-05-16879, financiado por el Instituto Colombiano para el Desarrollo de la Ciencia y la Tecnología “Francisco José de Caldas” (Colciencias).

CONFLICTO DE INTERESES

Los autores declaramos la ausencia de conflicto de intereses o responsabilidades compartidas.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. **Norris D E.** Genetic markers for study of the anopheline vectors of human malaria. *International Journal for Parasitology*. 2002;32:1607-15.
2. **Fleming G.** *Biología y Ecología de los vectores de la malaria en las Americas*. Washington, D.C.; Organización Panamericana de la Salud; 1986.
3. **Botero D, Restrepo M.** *Parasitosis Humanas. Malaria (Paludismo)*. 4 ed. Medellín: Corporación para Investigaciones Biológicas; 2005. p. 162-208.
4. **Lounibos L.P. and Conn J.E.** Malaria vector Heterogeneity in South America. *American Entomologist*. 2000; 46(4):238-247.
5. **Beerntsen B, James A, Christensen B.** Genetics of Mosquito Vector Competence. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 2000; 64(1):115-37.
6. **Wirtz RA, Zavala F, Charoenvit Y, Cambell GH.** Burkot T.R., Scheneider I, et al. Comparative testing of monoclonal antibodies against *Plasmodium falciparum* sporozoites for ELISA development. *Bull World Health Organization*. 1987;65:39-45.
7. **Gilles HM.** 1993. Diagnostic methods in malaria. In: Gilles HM, Warrel DA, editores. *Bruce Chwatts Essential malariaology*. 3 ed. London: Edward Arnold; 1993. p. 78-95.
8. **Coleman R, Barth J, Turell M, Gordon S, Sattabongkot J, Copeland R, et al.** Development and evaluation of a dipstick assay for detection of *Plasmodium falciparum* and *P. vivax* sporozoites in mosquitoes (Diptera: Culicidae). *Journal of Medical Entomology*. 2000; 37(4): 581-87.
9. **Stoffels J, Docters Van Leeuwen W, Post RJ.** Detection of *Plasmodium* sporozoites in mosquitoes by polimerase chain reaction and oligonucleotide rDNA probe, without dissection of the salivary glands. *Medical and Veterinary Entomology*. 1995; 9: 433-7.
10. **Singh B, Bobgare A, Cox-Snigh J, Snounou G, Abdullah MS, Rahman HA.** A genus and species specific nested polymerase chain reaction malaria detection assay for epidemiologic studies. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 1999; 60: 687-92.
11. **López AF, Schmunis G.** Diagnóstico de Malaria. Programa de Enfermedades Transmisibles. OPS/OMS. 1988; 7: 57-64.
12. **Golenda CF, Starkweather WH, Witz RA.** The distribution of circumsporozoite protein (CS) in *Anopheles stephensi* mosquitoes infected with *Plasmodium falciparum* malaria. *Journal of Histochemistry Cytochemistry*. 1990; 38: 475-81.
13. **Beier JC, Koros JK.** Anatomical dissemination of circumsporozoite protein in wild Afro-tropical *Anopheles* affects malaria sporozoite determination by ELISA.

- Medical and Veterinary Entomology. 1991; 5: 81-5.
14. **Gutiérrez LA, Naranjo N, Jaramillo LM, Muskus C, Luckhart S, Conn JE, Correa MM.** Natural infectivity of *Anopheles* species from the Pacific and Atlantic Regions of Colombia. *Acta Tropica*. 2008; 107: 99-105.
 15. **Gutiérrez LA, González JJ, Gómez GF, Castro MI, Rosero DA, Luckhart S, Conn JE, Correa MM.** Species composition and natural infectivity of anthropophilic *Anopheles* (Diptera: Culicidae) in the states of Córdoba and Antioquia, Northwestern Colombia. *Memorias Instituto Oswaldo Cruz*. 2009;104:1117-24
 16. **Snounou G, Viriyakosol S, Jarra W, Thaithong S, Brown KN.** Identification of the four human malaria parasites species in field samples by the polymerase chain reaction and detection of a high prevalence of mixed infections. *Molecular and Biochemical Parasitology*. 1993;58:283-92.
 17. **Seesod N, Nopparat P, Hedrum A, Holder A, Thaithong S, Uhlen M, Lundeburg J.** An integrated system using immunomagnetic separation, polymerase chain reaction and colorimetric detection for diagnosis of *Plasmodium falciparum*. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 1997; 56: 322-28.
 18. **Arez AP, Lopes D, Pinto J, Franco AS, Snounou G, do Rosario VE.** *Plasmodium* sp.: Optimal protocols for PCR detection of low parasite numbers from mosquito (*Anopheles* sp.) sample. *Experimental Parasitology*. 2000; 94: 269-72.
 19. **Schriefer ME, Sacchi JB, Wirtz RA, Azad AF.** Detection of polymerase chain reaction–amplified malarial ADN in infected blood and individual mosquitoes. *Experimental Parasitology*. 1991;73: 311-6.
 20. **Snounou G, Pinheiro L, Gonçalves A, Fonseca L, Dias F, Brown KN, do Rosario VE.** The importance of sensitive detection of malaria parasites in the human and insect host in epidemiological studies, as shown by the analyses of field samples from Guinea Bissau. *Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 1993;87: 649-53.
 21. **Tassanakajon A, Boonsaeng P, Wilairat P, Panyim S.** Polymerase chain reaction detection of *Plasmodium falciparum* in mosquitoes. *Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 1993; 87: 273-5.
 22. **Wilson MD, Ofosu-Okyere A, Okoli AU, McCall PJ, Snounou G.** Direct comparison of microscopy and polymerase chain reaction for the detection of *Plasmodium* sporozoites in salivary glands of mosquitoes. *Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 1998; 92: 482-3.
 23. **Vythilingam I, Nitiavathy K, Yi P, Bakotee B, Hugo B, Singh B, et al.** A highly sensitive, nested polymerase chain reaction based method using simple ADN extraction to detect malaria sporozoites in mosquitoes. *Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health*. 1999; 30: 631-5.
 24. **Póvoa MM, Machado RL; Segura MN, Vianna GM, Vasconcelos AS, Conn JE.** Infectivity of malaria vector mosquitoes: correlation of positivity between ELISA and PCR-ELISA test. *Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 2000; 94: 106-7.
 25. **Sylla EH, Kun JF, Kreamsner PG.** Mosquito distribution and entomological inoculation rates in three malaria-endemic areas in Gabon. *Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 2000; 94: 652-6.
 26. **Wayne W.** Daniel. *Bioestadística: base para el análisis de las ciencias de la salud*. México D.F: Editorial LIMUSA, S.A. Grupo Noriega Editores;1999. Pág. 290-3.
 27. **Carvalho A, Vieira L.** Comparison of Preservation Methods of *Atta* spp. (Hymenoptera: Formicidae) for RAPD Analysis. *An. Revista de la Sociedad Entomológica*. 2000; 29(3): 489-96.
 28. **Rocha S.** Teoría y práctica para la extracción y purificación del ADN en palma de aceite. *Palmas*. 2002; 23 (3): 9-17.
 29. **Fraga J, Rodriguez J, Fuentes O, Castex M, Fernández A.** Comparación entre 5 métodos para la extracción de ADN de Triatómíneos: su utilización en la técnica de ADN polimórfico amplificado al azar (RAPD). *Revista Cubana de Medicina Tropical*. 2004; 56(3): 203-7.
 30. **Rosero D, Gutiérrez L, Cienfuegos V, Jaramillo L, Correa M.** 2010. Optimización de un procedimiento de extracción de ADN para mosquitos anofelinos. *Revista Colombiana de Entomología*. 36 (2): 260-3.
 31. **Zapata M, Cienfuegos V, Quiros O, Quiñones M, Luckhart S, Correa M.** 2007. Discrimination of *Anopheles* species from San Pedro de Urabá-Antioquia, Colombia, by PCR-RFLP analysis of ITS sequences. *Am. J. Trop. Med.* 77(1): 67-72
 32. **Astrid V. Cienfuegos, Doris A. Rosero, Nelson Naranjo, Shirley Luckhart, Jan E. Conn, Margarita M Correa.** 2011. Evaluation of a PCR-RFLP- ITS2 assay for discrimination of *Anopheles* species in northern and western Colombia. *Acta Tropica*. 118: 128-135.
 33. **Cienfuegos A, Córdoba L, Gómez G, Luckhart S, Conn J, Correa M.** Diseño y evaluación de metodologías basadas en PCR-RFLP de ITS2 para la identificación molecular de mosquitos *Anopheles* spp. (Diptera: Culicidae) de la Costa Pacífica de Colombia. *Rev. Biomédica*. 2008; 19(1): 35-44
 34. **Tayutivutikul J, Pongprasert W, Royce L, Ruangrit K.** Comparison of Preservation Techniques for Silkworm (*Bombyx mori* L.) DNA Based on Polymerase Chain Reaction (PCR) Products. *CMU. Journal*. 2003; 2(2): 107-14.
 35. **Li F, Niu C, Ye B.** Nested polymerase chain reaction in detection of *Plasmodium vivax* sporozoites in mosquitoes. *Chinese Medical Journal (Engl)* 2001;114:654-8.