



Comparación de la PCR anidada y PCR convencional en el diagnóstico de *Plasmodium vivax* y *P. falciparum*

Galvis Serrano Fabián ¹, Carrillo Hernández Marlen ¹, Quintero Fabián A. ¹.

¹Laboratorio de Biología Molecular. Grupo de Investigación BIOGEN. Universidad de Santander, Cúcuta. Cúcuta, Norte de Santander

Resumen

La malaria es una enfermedad causada por *Plasmodium* sp., y en Colombia anualmente se registran aproximadamente 160.000 casos donde el 75% son producidos por *P. vivax* y 24% por *P. falciparum*. El diagnóstico molecular se realiza mediante PCR anidada que es una amplificación general seguida de una específica, utilizando dos pares de cebadores diferentes. En este trabajo se comparó la sensibilidad y especificidad de la PCR anidada con la PCR convencional para identificar *P. vivax* y *P. falciparum* en ADN de sangre de pacientes. Como muestra se seleccionaron 18 pacientes identificados mediante gota gruesa como positivos para malaria. En el aislamiento del ADN se utilizaron 3 protocolos: Heidari, Chelex[®] 100 y *Kit* comercial de Promega. En la PCR anidada y convencional se emplearon cebadores que identifican *P. falciparum* y *P. vivax*. El resultado de las amplificaciones obtenidas con la PCR convencional fueron similares a las obtenidas con la PCR anidada, demostrando que poseen la misma especificidad y sensibilidad, lo que permite concluir que la realización de la PCR convencional es suficiente para el diagnóstico de *P. vivax* y *P. falciparum*, reduciendo tiempo y costos en la identificación. La PCR es el mejor método para el diagnóstico de Malaria, por ser más sensible y específico, comparado con la prueba rápida y el examen microscópico de gota gruesa, permitiendo detectar la presencia del parásito en las primeras fases de la enfermedad, cuando su carga parasitaria es mínima, y además otorga la posibilidad de identificar casos de infecciones mixtas.

Palabras Clave: *Plasmodium vivax*, *P. falciparum*, PCR anidada, PCR convencional

Abstract

Comparison of PCR and nested PCR in the Diagnosis of *Plasmodium vivax* and *P. falciparum*

Malaria is diseases caused by *Plasmodium* sp., and in Colombia approximately 160,000 cases are annually registered, where 75% are produced by *P. vivax* and 24% for *P. falciparum*. The molecular diagnosis is performed by Nested PCR, is a general amplification followed by a specific, using two pairs of different primers. This study compared the sensitivity and specificity of nested PCR with the conventional PCR to identify *P. vivax* and *P. falciparum* in DNA from blood of patients. As samples were selected 18 patients were identified as positive by blood smear for malaria. At the DNA isolation protocols were used 3: Heidari, Chelex[®]100 and commercial kit from Promega. In the nested PCR and conventional primers were used



22

to identify *P. falciparum* and *P. vivax*. The results of the amplifications obtained with conventional PCR were similar to those obtained with nested PCR, demonstrating that have the same specificity and sensitivity, which allows to conclude that the realization of the conventional PCR is sufficient for the diagnosis of *P. vivax* and *P. falciparum*, reducing time and costs in the identification. The PCR is the best method for the diagnosis of Malaria, which is more sensitive and specific compared with rapid testing and microscopic examination of drop thick, allowing the presence of the parasite in the early stages of the disease when the parasite load is minimal, and also gives the possibility of identifying cases of mixed infections.

Keywords: *Plasmodium vivax*, *P. falciparum*, Nested PCR, Conventional PCR

*Para citar este artículo: Galvis Serrano F, Carrillo Hernández M, Quintero F.A. Comparación de la PCR anidada y PCR convencional en el diagnóstico de *Plasmodium vivax* y *P. falciparum*. Bistua.2013.11(1):21-28

+ Autor para el envío de correspondencia y la solicitud de las separatas: Nestor Fabián Galvis Serrano. Dirección: Avenida 4E #13ª-118. Cúcuta. Norte de Stde.email: fgs999@hotmail.com

Recibido: Octubre 03 de 2012 Aceptado: Febrero 10 de 2013

1.-Introducción

La malaria es una enfermedad con manifestaciones agudas y crónicas causada por protozoarios del genero *Plasmodium* sp. de los cuales cuatro especies infectan a humanos: *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae* y *P. ovale*. Estos parásitos son transmitidos al hombre por mosquitos hembras del genero *Anopheles* sp. que estando infectados, al picar, inoculan los esporozoitos, forma infectante del parásito. (OPS,2009).

El cuadro clínico clásico inicia con accesos febriles precedidos por escalofrío, seguidos de intensa sudoración, repetidos cada 48 ó 72 horas, según la especie de *Plasmodium* sp. Cuando existen infecciones mixtas se modifica la periodicidad de la fiebre. Las principales complicaciones de la malaria ocurren por la infección con *P. falciparum*, produciendo daño cerebral, insuficiencia renal, fiebre biliosa hemoglobinúrica, anemia severa, edema pulmonar, ictericia, daño hepático, hemorragias, hiperparasitemia, hipoglicemia, síntomas gastrointestinales, entre otras (Carmona y Arango, 2012).

En el mundo esta enfermedad produce al año la muerte de 3 millones de personas aproximadamente (Calderón et al., 2006). En Colombia cada año se registran en promedio 160 mil casos de malaria, donde el 75% de las infecciones son producidas por *P. vivax* y 24% por *P. falciparum*. En Norte de Santander la malaria es una enfermedad endémica con una alta morbilidad en la región (INS, 2012).

Diagnosticar a tiempo la enfermedad permite establecer un tratamiento adecuado y evitar la aparición de complicaciones. La identificación del parásito se realiza mediante la técnica de

la gota gruesa que permite la observación directa de las distintas formas de *Plasmodium* sp, requiriendo de 50 a 100 parásitos/ml, para que la prueba obtenga resultados positivos (Rodríguez et al., 2010). Esto provoca la posibilidad de obtener falsos negativos en etapas tempranas de la infección por baja parasitemia. La implementación de técnicas moleculares como métodos de diagnóstico permiten una mayor sensibilidad alcanzando a detectar de 1-10 parásitos en 1 μ l de sangre, con una especificidad del 100% y una reducción en el tiempo de diagnóstico (González et al., 2005). El diagnóstico molecular de *P. vivax* y *P. falciparum* se puede realizar mediante una PCR anidada que consiste en una amplificación inicial general seguida de una amplificación específica, utilizando dos pares de cebadores diferentes, esta técnica demanda el doble de tiempo, gasto de reactivos y la posibilidad de contaminación, a diferencia de la PCR convencional, donde solo utiliza un único par de cebadores para la identificación específica del patógeno.

En este trabajo se evaluó la especificidad y sensibilidad de la PCR anidada y convencional para la identificación molecular *P. vivax* y *P. falciparum*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Muestra

Se seleccionaron 18 pacientes febriles que acudieron a los centros de salud y fueron diagnosticados mediante gota gruesa como positivos para malaria. Estos pacientes fueron informados sobre la investigación y se les solicitó su participación mediante la firma de un documento de consentimiento informado. La gota gruesa se tomó por punción capilar en el dedo índice de la mano para hacer el extendido y coloreado con



24

Giemsa. Se examinaron 100 campos microscópicos y el recuento de parásitos se hizo con base en 100 leucocitos, tomando 8.000 leucocitos como valor de referencia para expresar la parasitemia (parásitos/mm³) (OMS, 2000).

Aislamiento del ADN

Se utilizaron 3 protocolos para la obtención del ADN de los parásitos: **1.**

Protocolo: Propuesto por Heidari et al., (2005) modificado, en donde a 100 μ l de sangre total con EDTA, se le adicionan 200 μ l de buffer R (0.015% Saponina, 50 mM NaCl, 1 mM EDTA), vortex 20 por segundos, se centrifuga a 10000 rpm por 10 minutos y se descarta el sobrenadante, luego se agrega 250 μ l de buffer R y vortex por 30 segundos, se centrifuga a 10000 rpm por 10 minutos y se descarta el sobrenadante, el *pellet* de ADN se resuspende en 50 μ l TE. **2.**

Protocolo: Chelex[®] 100 con papel o sangre, donde aun fragmento de papel impregnado con sangre o 100 μ l de sangre se le adiciona 300 μ l de Chelex[®] 10%, vortex por 30 segundos, se colocan los tubos en un baño a 100°C por 10 minutos, luego se centrifugan a 12000 rpm por 3 minutos y se recupera el sobrenadante (200 μ l aprox.) a un nuevo tubo, se centrifugan a 12000 rpm por 3 minutos se recupera el sobrenadante (100 μ l aprox.) a un nuevo tubo, y se conservan a -20 °C. **3. Protocolo:** Kit comercial *Wizard Genomic DNA Purification* de Promega.

PCR

La PCR anidada y convencional utilizaron los cebadores que corresponde a un segmento del gen ADNr 18S, propuestos por Calderón et al. (2006). Para la primera PCR se utilizaron las secuencias Plagen1

CTTGTTGTTGCCTTAACTTC y Plagen2 TTAATAATTGTTGCAGTTAAAACG; y para la PCR específica las secuencias rFALC1 TTAAACTGGTTTGGGAAAACCAAATATATT y rFALC ACACAATGAACTCAATCATGACTACCCGTC para *P. falciparum*; y rVIV1 TCTAGCTTAATCCACATAACTGATAC y rVIV2 CTTCCAAGCCGAAGCAAAGA para *P. vivax*.

La mezcla de reacción, temperaturas y ciclos se estandarizaron en este trabajo. En la PCR general la mezcla de amplificación contenía 1 μ M de cada cebador, 200 μ M de dNTPs, 2 mM MgCl₂, 1 U de Taq polimerasa, 2 μ l de ADN, en un volumen final de 50 μ l. Las condiciones de programación del termociclador fueron: desnaturalización inicial a 94°C por 4 minutos; seguido por 35 ciclos a 94°C por 30 segundos, 55°C por 1 minuto y 72°C por 1 minuto, y extensión final a 72°C por 4 minutos. En la PCR específica se utilizó un volumen final de 50 μ l que contenía 1 μ M de cada cebador, 200 μ M de dNTPs, 2 mM MgCl₂, 1 U de Taq polimerasa, 2 μ l de ADN producto de la primera amplificación (PCR anidada) o 2 μ l de ADN de las muestras (PCR convencional). Las condiciones de amplificación fueron: desnaturalización inicial a 94°C por 4 minutos; seguido por 35 ciclos a 94°C por 30 segundos, 58°C por 1 minuto y 72°C por 1 minuto, extensión final a 72°C por 4 minutos. La PCR convencional se realizó siguiendo el mismo protocolo utilizado para la segunda amplificación de la PCR anidada el ADN aislado de muestras de pacientes. Los productos fueron visualizados en geles de agarosa al 1.2 % teñidos con bromuro de etidio. El tamaño de los productos esperados



25

fue de 205 pb para *P. falciparum* y 117 pb para *P. vivax*.

RESULTADOS

En el análisis de las muestras de sangre por gota gruesa, 14 pacientes (78%) presentaron *P. vivax* y 4 pacientes (22%) *P. falciparum*. En la parasitemia se observaron que 16 muestras estaban entre el rango de 5-20 parásitos por microlitro, y 2 muestras presentaban más de 100 parásitos por microlitro.

En el aislamiento de ADN, la metodología propuesta por Heidari et al. (2005) utiliza 20µL de sangre venosa generando baja concentración, que no fue perceptible en geles de agarosa al 1%; en este trabajo se aumentó 5 veces el volumen de muestra, obteniendo mayor concentración de ADN y optima pureza (Figura 1a).

El aislamiento del ADN de los parásitos con el *kit* de Promega mostró una adecuada concentración al ser visualizados en geles de agarosa al 1% (Figura 1b). El método de aislamiento con Chelex® es más rápido y sencillo de realizar. Además permite aislar ADN a partir de muestras de papel impregnadas con sangre o sangre venosa. La cantidad de ADN que se obtiene es poca, no mostrando producto en la visualización en la electroforesis, pero adecuada para la identificación molecular de *P. vivax* y *P. falciparum*.

La identificación de *P. vivax* y *P. falciparum* en las muestras de ADN de los 18 pacientes, mostró una banda de 1057 pb, correspondiente a la amplificación de la subunidad menor del ARN ribosomal de *Plasmodium* sp., producto de la primera amplificación de la PCR anidada. En la segunda

amplificación utilizando cebadores específicos se obtuvieron bandas esperadas de 117pb en 14 muestras para *P. vivax* y 205 pb en 4 muestras para *P. falciparum* (Figura 2).

Utilizando únicamente los cebadores específicos en una sola PCR (PCR convencional) para la identificación de *P. vivax* y *P. falciparum*, se observaron productos similares a los obtenidos en la PCR específica de la PCR anidada, una banda de 117pb para *P. vivax* y 205 pb para *P. falciparum* (Figura 3).

Para determinar la sensibilidad se utilizaron muestras de sangre de pacientes con parasitemia de 5-20 parásitos/µl y más de 100 parásitos/µl, y se probaron todos los ADN aislados a partir de los diferentes protocolos utilizados, Heidari, *kit Wizard* y Chelex, de las muestras de sangre de los pacientes con diagnóstico directo de *P. vivax*, observándose amplificación en todos ellos, tanto para la PCR anidada como para la convencional.

DISCUSION

Por su facilidad, rapidez y bajo costo, la gota gruesa sigue siendo el método de primera elección para confirmar el diagnóstico de malaria, especialmente en zonas remotas que cuentan con recursos mínimos de laboratorio. La identificación de malaria por PCR requiere de una metodología dispendiosa y costosa, que demanda de equipos e infraestructura complejas, sin embargo posee ventajas sobre la gota gruesa, como la de permitir la diferenciación de especies, cuando se presentan dificultades morfológicas o una infección mixta; y además puede detectar bajas concentraciones de parasitemia (> 1 parásito por µl de sangre).



CONCLUSIONES

En este trabajo se observó que el aislamiento del ADN utilizando Chelex es más sencillo, corto y económico; obteniéndose ADN suficiente para la realización de la PCR. El resultado de la amplificación con la PCR convencional fue igual al de la PCR anidada, utilizando muestras con alta y baja parasitemia, mostrando la misma especificidad y sensibilidad, confirmando que es posible identificar *P. vivax* y *P. falciparum* empleando solo la PCR convencional, reduciendo el tiempo de diagnóstico, las posibilidades de contaminación por mayor manipulación del ADN, costos de las pruebas y permitiendo su uso como método rutinario del diagnóstico.

REFERENCIA BIBLIOGRÁFICAS

- Calderón S, Ayala E, Cabrera L, Ferry H, Gilman R y Achon G. (2006). Comparación de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y microscopía en la detección de malaria después del tratamiento para infecciones con *P. vivax* y *P. falciparum*. *Mosaico científico*. **3**: 43-48.
- Carmona J, Arango E. (2012). Mixed malaria: prevalence in Colombia and Latin America. *Iatreia* **25**(4): 334-346.
- Coleman R, Sattabongkot J. (2006). Comparison of PCR and microscopy for the detection of asymptomatic malaria in a *Plasmodium falciparum* and *vivax* endemic area in Thailand. *Malar J*. **5**: 121-127.
- Gonzales L, Rodríguez M, Betanazos Á. (2005). Eficacia de una prueba rápida para el diagnóstico de *Plasmodium vivax* en pacientes sintomáticos De Chiapas, México. *Rev Invest Salud Pública*. **47**: 282-287.
- Heidari M, Assmar M, NooriDaloii M. (2005). Detection of *Plasmodium falciparum* directly from blood samples using the polymerase chain reaction. *Journal of Sciences*. **16**: 21-24.
- Jiménez M, Hinestroza Y, Gómez R. (2007). Reformas sanitarias e impacto del control de malaria en dos áreas endémicas. *Colombia Médica*. **38**: 113-131.
- López A, Coello J, Mejía R, Banegas E, Fontecha G. (2011). Comparación de gota gruesa y PCR para la detección de infecciones maláricas en Honduras. *Revista Ciencia y Tecnología*. **9**: 68-81
- Ministerio de Protección Social – Instituto Nacional de Salud. (2010). Gestión para la Vigilancia Entomológica y Control de la transmisión de Malaria. SIVIGILA. 131:22-23.
- Ministerio de Protección Social – Instituto Nacional de Salud. (2010). Protocolo de vigilancia y control de Malaria. SIVIGILA. 19:4-5
- Montoya A, Menco J, Natalia Osorio N, Zuluaga M, J Duque J, Torres G, Restrepo M. (2008). Concordancia entre gota gruesa, inmunocromatografía y reacción en cadena de la polimerasa para el diagnóstico de malaria. *Biomédica*. **28**: 252-261
- Organización Mundial de la Salud. (2000). Medios Auxiliares para el



27

Diagnóstico de las Infecciones Palúdicas.
2da. Ed. Pág. 8.

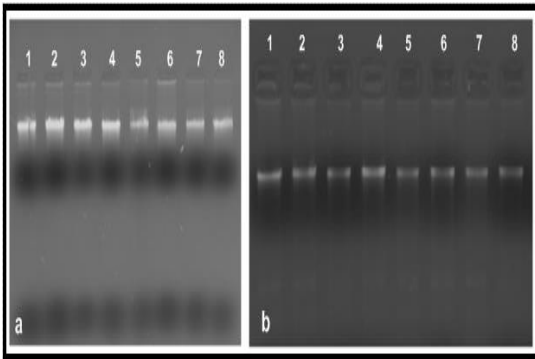
Organización Panamericana de la Salud -
Ministerio de Protección Social. (2010).
Guía de atención clínica de Malaria.124:
5.

Rodríguez I, Abreu N, Carrasquel A,
Bolívar J, González M, Scorza J, Pérez H.
(2010). Infecciones maláricas en
individuos asintomáticos en la población
indígena Jivi, Amazonas, Venezuela. *Bol
Mal Salud Amb.* **50**: 197-218

Zakeri S, Kakar Q, Ghasemi F, Raeisi A,
Butt W, Safi N, et al. (2010). Detection of
mixed *Plasmodium falciparum* & *P. vivax*
infections by nested-PCR in Pakistan, Iran
& Afghanistan. *Indian J Med Res.*
132:31-5.

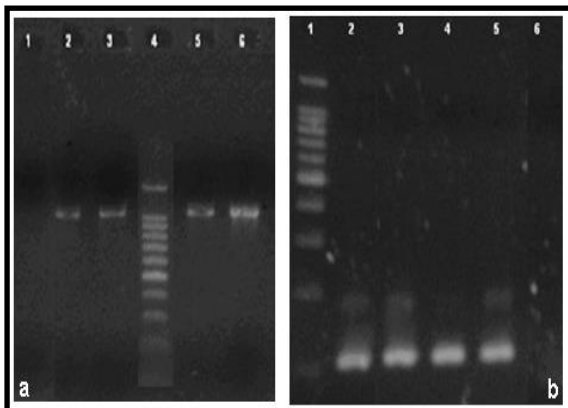
Figura 1: Aislamiento de ADN

a. Heidari et al. (2005). Líneas 1 a 3: muestras de pacientes con *P. falciparum*. Línea 4 a 8: muestras de pacientes con *P. vivax*. **b. Kit de Promega.** Líneas 1 a 3: muestras de pacientes con *P. falciparum*. Línea 4 a 8: muestras de pacientes con *P. vivax*.

**Figura 2: Identificación de *P. vivax* mediante PCR anidada**

a. PCR general. Línea 1: control negativo. Líneas 2 y 3: muestras de pacientes con parasitemias de 5-20 parásitos por microlitro (banda de 1.057 pb). Línea 4: Marcador de peso molecular 100pb DNA Ladder (Promega). Líneas 5 y 6: muestras de pacientes con parasitemias de más de 100 parásitos por microlitro (banda de 1.057 pb).

b. PCR específica. Línea 1: Marcador de



peso molecular 100pb DNA Ladder (Promega). Líneas 2 y 3: muestras de pacientes con parasitemias de 5-20 parásitos por microlitro (banda de 117pb). Líneas 4 y 5: muestras de pacientes con parasitemias de 5-20 parásitos por microlitro (banda de 117pb). Línea 6: control negativo. El ADN utilizado en esta PCR anidada se obtuvo con la metodología de Chelex 100.

Figura 3. Identificación de *P. falciparum* y *P. vivax* mediante PCR convencional

a. *P. falciparum*: Líneas 1 y 2: muestras de pacientes con parasitemias de 5-20 parásitos por microlitro (banda de 205pb). Líneas 3 y 4: muestras de pacientes con parasitemias de más de 100 parásitos por microlitro (banda de 205pb). Línea 5: Marcador de peso molecular *HyperLadder II* (Bioline). **b. *P. vivax*:** Líneas 1 y 2: muestras de pacientes con parasitemias de 5-20 parásitos por microlitro (banda de 117pb). Líneas 3 y 4: muestras de pacientes con parasitemias de más de 100 parásitos por microlitro (banda de 117pb). Línea 5: Marcador de peso molecular *HyperLadder II* (Bioline). El ADN utilizado en esta PCR se obtuvo con la metodología de Chelex 100.

