Protocolo de extracción de ADN en lotes de 10 mosquitos para la identificación de *Plasmodium spp.* mediante qPCR

Pérez Rico A.¹, Lacasa Navarro J.², Rubio Muñoz JM.³, Ruiz Contreras S.⁴, Vega Pla JL.⁵

Sanid. mil. 2013; 69 (2): 77-81; ISSN: 1887-8571

RESUMEN

Las tropas que despliegan en zonas de operaciones endémicas de malaria, necesitan de una información precisa del riesgo sanitario para la toma de decisiones acerca de las medidas de prevención más adecuadas. El estado de portador de un mosquito se determina clásicamente por la presencia o ausencia de esporozoitos de *Plasmodium spp.* en las glándulas salivales. Los protocolos basados en la amplificación del ADN en tiempo real (qPCR) son muy sensibles, sin embargo existen dificultades en la qPCR debido a inhibidores presentes en los tejidos del mosquito, lo que obliga a trabajar de uno en uno. En este trabajo se diseña una qPCR para amplificar una región conservada entre mosquitos de diferentes especies y otros dípteros, con el objetivo de comparar varios protocolos de extracción de ADN y determinar el más eficiente a la hora de procesar lotes de 10 mosquitos.

PALABRAS CLAVE: Malaria, Dípteros, *Anopheles*, Reacción en cadena con polimerasas en tiempo real, ADN Ribosómico.

Protocol for DNA extraction in batches of 10 mosquitoes for the identification of *Plasmodium spp.* thorough qPCR.

SUMMARY: Troops deployed in operational areas where malaria is endemic, need accurate information on the health risk for this disease to make decisions about the most appropriate prevention measures. The carrier status of a mosquito is classically determined by the presence or absence of sporozoites of *Plasmodium spp.* in the salivary glands. Protocols based on DNA amplification in real time (qPCR) are very sensitive, however there are difficulties in qPCR due to inhibitors present in tissues of the mosquito, therefore it is necessary to work one by one. In this paper we design a qPCR to amplify a preserved region among different species of mosquitoes and other Diptera, in order to compare various DNA extraction protocols to determine the most efficient one when processing batches of 10 mosquitoes.

KEY WORDS: Malaria, Diptera, *Anopheles*, Real-Time Polymerase Chain Reaction, Ribosomal DNA..

INTRODUCCIÓN

La malaria es una enfermedad endémica en muchas regiones del mundo. En ocasiones las tropas que se encuentran en alguna de las diferentes misiones internacionales que se encomiendan al Ministerio de Defensa deben desplegarse en éstas zonas. Previamente al despliegue sería importante conocer los riesgos reales de infección pues los tratamientos preventivos son largos y no exentos de cierto riesgo, además no hay disponibles vacunas eficaces hasta el momento. Una de las formas de evaluar los riesgos sanitarios, es monitorizar la presencia de insectos vectores de la enfermedad y comprobar si realmente se encuentran en estado de portador.

El estado de portador de un mosquito se determina por la presencia o ausencia de esporozoitos de *Plasmodium spp.* en las glándulas salivales. Tradicionalmente, se lleva a cabo mediante la disección, tinción y evaluación visual de las glándulas con un microscopio. Sin embargo, esto requiere personal capacitado, lleva mucho tiempo y no se pueden determinar las especies de *Plasmodium* presentes. Esta metodología está siendo sustituida, en gran medida, por métodos inmunológicos y moleculares más eficaces.

Los protocolos basados en la amplificación del ADN en tiempo real mediante reacciones en cadena mediadas por polimerasas termoestables (qPCR), son más sensibles que los inmunológicos e incluso permiten diferenciar, en la misma reacción, las cuatro especies de *Plasmodium* patógenas para el hombre (Mangold et al. 2005). Sin embargo los inhibidores presentes en los tejidos del mosquito y en el exoesqueleto duro de la cabeza y el tórax dificultan la amplificación mediante la PCR de ADN de mosquito y por tanto de *Plasmodium spp.*¹⁻³. Esta circunstancia condiciona que cada mosquito deba analizarse individualmente. Para superar este problema, se podría diseccionar el intestino medio y las glándulas salivales de los mosquitos antes de cada amplificación con la PCR. Este enfoque puede ser adecuado para los experimentos específicos de laboratorio, pero no para los estudios epidemiológicos en los que se procesan un gran número de mosquitos.

El objetivo del trabajo es el diseño de un protocolo de extracción de ADN que permita amplificar lotes de 10 mosquitos minimizando el efecto de los inhibidores de la qPCR.

¹ Tte Veterinario. Laboratorio de Investigación Aplicada. Cría Caballar de las Fuerzas Armadas. Córdoba. España.

² Cte. Veterinario. Escuela Militar de Sanidad de la Defensa. Departamento de Veterinaria. Madrid. España.

³ Instituto de Salud Carlos III. Centro Nacional de Microbiología. Laboratorio de Malaria y otras Parasitosis emergentes. Madrid. España.

⁴ Diputación de Huelva. Laboratorio del Servicio de Control de Mosquitos. Huelva. España.

⁵ Tcol Veterinario. Cría Caballar de las Fuerzas Armadas. Laboratorio de Investigación Aplicada. Córdoba. España.

Dirección para correspondencia: Jose Luis Vega Pla. Laboratorio de Investigación Aplicada, Apartado de Correos 2087, 14080-Córdoba. Telf.: 957325312 Fax.: 957322493. jvegpla@oc.mde.es.

Recibido: 21 de junio de 2012

Aceptado: 30 de enero de 2013

MATERIAL Y MÉTODOS

Se solicitan mosquitos de especies diferentes para poner a punto las técnicas de extracción del ADN al Servicio de Mosquitos de la Diputación de Huelva.

Ha sido necesario recabar muestras de ADN control de las diferentes especies de *Plasmodium* para usarlas como patrones; para lo cual se recurre al Laboratorio de Malaria y otras Parasitosis Emergentes del Instituto de Salud Carlos III.

Para el estudio se emplean mosquitos del género *Anopheles spp.* Los mosquitos tienen un tratamiento previo de congelación. Se introducen en un cilindro de acero dotado de un émbolo del mismo material; se sumerge el cilindro cerrado en nitrógeno líquido durante 3 minutos, se extrae y se agita durante un minuto de forma que el émbolo pulverice la muestra. Después se añade 200 uL de agua y se traspasa el contenido a un microtubo para realizar la extracción del ADN.

Se proponen diferentes técnicas de extracción:

- **Protocolo 1:** Columnas (i-genomic CTB ADN Mini Kit, Intron Biotechnology, Inc).
- **Protocolo 2:** Digestión. Se añaden 100 uL de tampón K (TrisHCl 10mM, pH 8,5; MgCl₂ 2,5mM; KCl 50mM; Tween 20 0,5%) y 0,5 uL de proteinasa K (20mg/ml). Se incuban a 56 °C durante 45 min. y posteriormente a 95 °C durante 10 min. para inactivar la proteinasa K.
- **Protocolo 3:** Resina y digestión. Se añaden 200 uL de Chelex® 5% y 10 uL de proteinasa K (20 mg/ml). Se incuban a 65°C durante 45 minutos y a 95°C durante 10 min.

Los extractos obtenidos de cada uno de los tres protocolos se amplifican con diferentes condiciones en lo que refiere a la cantidad de mosquitos (1 ó 10), la realización de lavados con TE 10:1 (Tris HCl 10 mM pH 7,5 EDTA 1 mM) previos a la extracción y diluciones del extracto en agua (1/1-1/1000). En los lavados se añade 500 uL de TE, se agita y se centrifuga a 11.000g durante 1 minuto, se elimina el sobrenadante y se repite el proceso dos veces más.

Como control de la qPCR se amplifica una región común del genoma de los mosquitos. Se realiza un diseño de cebadores buscando secuencias conservadas del ADN del mosquito, en concreto en la región que codifica la subunidad 28S ribosomal. La búsqueda se realiza en la base de datos GeneBank⁴. Para el diseño de los cebadores se emplea la aplicación informática Primer3Plus⁵.

La amplificación se lleva a cabo en un volumen final de 20 µl conteniendo 4 µl del extracto, poniendo las muestras siempre por duplicado. Cada reacción contiene 67 mM Tris-HCl pH 8,8, 16,6 mM (NH₄)₂SO₄, 0,01% Tween-20, 2,5 mM MgCl₂, 0,2 mM de cada deoxinucleosido trifosfato, 200 nM de cada cebador y 0,5 U de Taq ADN polimerasa (Imolase, Biotium), incorporando EvaGreen® (Biotium) como elemento intercalante para revelar la presencia de producto amplificado. Se emplea un termociclador RotorGene 6000 (Corbett), con una fase de desnaturalización y activación de la Taq de 10 min a 95°C, seguida de 35 ciclos de 95°C - 45 seg, 50°C - 30 seg y 72°C - 30 seg. En la fase de hibridación se hace la adquisición de la fluorescencia emitida por el agente intercalante.

El ciclo umbral o de cuantificación (C_q) es el valor donde la curva de amplificación cruza la línea umbral. Para calcular el umbral se hacen diluciones decimales de una muestra y se calcula el coeficiente de correlación (R²) que es el porcentaje de datos que coinciden con la hipotética curva estándar formada por la concentración de las muestras y el ciclo de cuantificación, teniendo en cuenta que en condiciones teóricas en cada ciclo se produce el doble de producto amplificado. Cuando el C_q es superior a 35 se considera que hay muy poca muestra o que hay un efecto inhibitorio sobre la qPCR.

Adicionalmente, y para demostrar que el ADN de *Plasmodium spp.* no se inhibe durante el proceso de extracción del ADN y su posterior dilución, se contamina un lote de 10 mosquitos de la especie *Anopheles atroparvus* con una alícuota de ADN obtenido de un paciente portador de *Plasmodium falciparum*. Se elige uno de los protocolos, se diluye el extracto obtenido y se amplifica según el procedimiento propuesto por Mangold y col.⁶ y se observa el efecto de los inhibidores.

RESULTADOS

Se diseña una técnica de amplificación mediante PCR cuantitativa a tiempo real a partir de una región del ADN ribosomal de 176 pb (*Culex quinquefasciatus* GeneBank n°: XM_001852845.1 posición 844-1019) que se encuentra muy conservada entre diferentes géneros de dípteros como *Anopheles*, *Aedes*, *Culex*, *Chironomus*, *Phlebotomus*, *Simulium*, y *Acricotopus* entre otros. La amplificación de esta región permite apreciar cómo afectan los inhibidores a la eficiencia de la PCR al comparar los diferentes

Figura 1. Amplificación de una secuencia de la unidad 28S ribosómica en colecciones de 10 mosquitos *Culex perexiguus* (azul) y *Ochlerotatus caspius* (granate) extraídas con columnas (i-genomic CTB ADN Mini Kit, Intron Biotechnology, Inc.). Se amplifican las diluciones 1/1 y 1/10 y se ponen por duplicado. El control positivo es una muestra de un mosquito *Anopheles atroparvus* extraído con columnas y diluido de 1/1 a 1/10.000 (gris). Como control de la qPCR sin muestra se usa agua como sustrato de la reacción (verde).

Tabla 1. Resultados de comparar tres protocolos de extracción de ADN de mosquitos *Anopheles atroparvus*. Se indica el número de mosquitos empleados (N°), el éxito (+) o fracaso (-) de la amplificación (A) y el ciclo umbral medio de la qPCR (Cq) en diferentes diluciones de cada extracto.

Protocolo	N°	Lavado	qPCR							
			1/1		1/10		1/100		1/1000	
			A	Cq	A	Cq	A	Cq	A	Cq
Columna	10	si	+/-	12,1	+	12,4	+	15,7	+	19,1
	10	no	-	26,3	+	15,6	+	18,1	+	22,5
	1	si	+	16,2	+	19,8	+	23,5	+	27,1
	1	no	+	13,6	+	17,1	+	21,6	+	25,0
Digestión	10	si	+/-	23,5	+	24,2	+	28,1	+	34,6
	10	no	-	-	+	27,0	+	34,0	-	-
	1	si	+	14,7	+	18,2	+	21,0	+	25,1
	1	no	+	18,6	+	23,2	+	26,8	+	30,3
Resina y digestión	10	si	-	-	+	21,5	+	24,8	+	29,0
	10	no	-	-	+	24,2	+	29,0	+	34,1
	1	si	+/-	19,7	+	23,8	+	26,1	+	30,3
	1	no	+/-	15,4	+	20,1	+	23,8	+	27,5

Tabla 2. Ciclo de cuantificación (Cq) como resultado de la amplificación de una secuencia de la unidad 28S ribosómica en muestras duplicadas de mosquitos de cuatro especies diferentes. Se extraen con columnas (i-genomic CTB ADN Mini Kit, Intron Biotechnology, Inc.) y se diluyen 1/10 antes de su amplificación. Como control de la qPCR sin muestra se usa agua como sustrato de la reacción.

Identificación	Cq medio	Cq Desv. estándar
Control sin muestra	-	-
Control Positivo	16,03	0,05
<i>Culiseta longiareolata</i>	16,85	1,18
<i>Anopheles plumbeus</i>	13,70	0,10
<i>Ochlerotatus caspius</i>	20,60	0,23
<i>Culex pipiens</i>	15,60	0,14
<i>Culex perexiguus</i>	16,93	0,45
<i>Culex modestus</i>	16,77	2,32

protocolos de extracción para 1 y 10 mosquitos del género *Anopheles atroparvus* a diferentes diluciones (Tabla 1).

Los resultados permiten observar que los tres métodos de extracción de ADN a partir de un solo mosquito son válidos. En el caso de extraer a partir de colecciones de 10 mosquitos se obtuvo una fuerte inhibición de la qPCR cuando se pretendía amplificar el extracto sin diluir (Figura 1). Los mejores resultados con 10 mosquitos se han obtenido con el método de extracción de las columnas. Los lavados de la muestra previamente a su extracción siempre han mejorado los resultados en los concentrados de 10 mosquitos, sin embargo cuando se trabaja con un solo ejemplar el efecto del lavado es negativo pues aumenta el Cq en todos los casos.

Mediante diluciones decimales de una extracción de un mosquito con columnas (1/1 a 1/10.000) se construye una curva estándar y se obtiene un alto coeficiente de correlación (R^2) de

0,9976. Esta curva se usa como referencia en las siguientes amplificaciones.

En la Tabla 2 se observan que los Cq obtenidos tras una extracción de lotes de 10 mosquitos de diferentes especies con columnas y diluido el extracto a 1/10, se encuentran todos por debajo de 21.

Una extracción directa con Proteinasa K o el empleo de resinas quelantes como Chelex® precedidos de un lavado de la muestra, pueden ser procedimientos útiles y económicos para trabajar con grupos de 10 mosquitos. Sin embargo, se aprecia un aumento del número de ciclos necesarios hasta alcanzar el umbral de amplificación (Cq) con respecto al uso de un kit comercial basado en el empleo de columnas de extracción. Cuando sólo interesa un resultado positivo o negativo, cualquiera de los métodos puede ser válido pero si interesa cuantificar la carga parasitaria se debería recurrir al método más eficiente y sensible como es el de columnas.

DISCUSIÓN

El tratamiento de las muestras con Chelex® ha sido considerado por Arez y col. (2000)¹ como una de las técnicas más eficaces. Lardeux y col. (2008)⁷ también indicaron que los protocolos basados en Chelex® pueden ser uno de los más interesantes para extraer ADN en conjuntos de hasta 100 mosquitos. Sin embargo estos autores detectan una fuerte inhibición de la PCR cuando se supera la cantidad de 2 mosquitos extraídos a la vez, además el protocolo propuesto tiene el inconveniente de que no puede ser empleado para cuantificar la cantidad de parásitos presentes debido a que su eficiencia es irregular.

La amplificación de ADN extraído de un enfermo parasitado con *Plasmodium falciparum* y mezclado con un lote de 10 mosquitos *Anopheles atroparvus*, no se vio inhibida cuando se sometió esta colección al proceso de extracción de ADN con co-

lumnas y su posterior dilución 1/10, obteniéndose un Cq medio de 24,38 (+/- 0,39) después de ocho amplificaciones.

Según indican Mangold y col. (2005)⁶, la sensibilidad de la técnica de qPCR propuesta es de 0,2 parásitos/μl. La dilución 1/10 llevaría esta sensibilidad a 2 parásitos/μl. Un solo oocisto dentro de un mosquito produce miles de esporozoitos que son susceptibles de migrar a las glándulas salivales, aunque no todos llegan⁸, por lo tanto en un mosquito infectante puede albergar miles de ellos tanto en glándulas salivales como circulando, por lo tanto la técnica descrita conserva la sensibilidad suficiente como para detectar mosquitos portadores de *Plasmodium spp.*

El análisis de lotes de 10 mosquitos, en lugar de análisis individuales, para monitorizar la presencia de vectores portadores de *Plasmodium spp.*, facilitaría abordar los estudios epidemiológicos como los que se desarrollan en zona de operaciones previos al despliegue de tropas o durante el mismo.

Esta técnica de extracción también podría ser aplicada en otras zoonosis transmitidas por diferentes artrópodos como Leishmaniosis, Borreliosis, Fiebre del Nilo Occidental, etc., diseñando secuencias diana en cada caso para usarlas como controles positivos de la extracción del ADN.

AGRADECIMIENTOS

Al Organismo Autónomo de Cría Caballar de las Fuerzas Armadas, que ha financiado los análisis de biología molecular.

A la Escuela Militar de Sanidad de la Defensa, que ha suministrado los mosquitos problema.

Al Instituto de Salud Carlos III, que ha suministrado las muestras de ADN para ser usadas como control.

A la Diputación de Huelva, que ha suministrado los mosquitos que se usaron como sustrato de la extracción de ADN.

BIBLIOGRAFÍA

1. Arez AP, Lopes D, Pinto J, Franco AS, Snounou G, do Rosário VE. *Plasmodium* sp.: Optimal Protocols for PCR Detection of Low Parasite Numbers from Mosquito (*Anopheles* sp.) Samples. *Experimental Parasitology*. 2000 abr;94(4):269–72.
2. Schriefer ME, Sacchi JB Jr, Wirtz RA, Azad AF. Detection of polymerase chain reaction-amplified malarial DNA in infected blood and individual mosquitoes. *Exp. Parasitol.* 1991 oct;73(3):311–6.
3. Snounou G, Viriyakosol S, Zhu XP, Jarra W, Pinheiro L, do Rosario VE, et al. High sensitivity of detection of human malaria parasites by the use of nested polymerase chain reaction. *Mol. Biochem. Parasitol.* 1993 oct;61(2):315–20.
4. Benson DA, Karsch-Mizrachi I, Lipman DJ, Ostell J, Wheeler DL. GenBank. *Nucleic Acids Res.* 2008 ene;36(Database issue):D25–30.
5. Untergasser A, Nijveen H, Rao X, Bisseling T, Geurts R, Leunissen JAM. Primer3Plus, an enhanced web interface to Primer3. *Nucleic Acids Research*. 2007 may 8;35(Web Server):W71–W74.
6. Mangold KA, Manson RU, Koay ESC, Stephens L, Regner M, Thomson RB, et al. Real-Time PCR for Detection and Identification of *Plasmodium* spp. *J Clin Microbiol.* 2005 may;43(5):2435–40.
7. Lardeux F, Tejerina R, Aliaga C, Ursic-Bedoya R, Lowenberger C, Chavez T. Optimization of a semi-nested multiplex PCR to identify *Plasmodium* parasites in wild-caught *Anopheles* in Bolivia, and its application to field epidemiological studies. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 2008 may;102(5):485–92.
8. Hillyer JF, Barreau C, Vernick KD. Efficiency of salivary gland invasion by malaria sporozoites is controlled by rapid sporozoite destruction in the mosquito hemocoel. *Int J Parasitol.* 2007 may;37(6):673–81.