

Figura 5. Insectos y otros invertebrados (A) Adulto de mosca blanca (*Bemisia tabaci*). Fuente: Ing. Ruth León, INTA. (B) Características generales de *Globodera pallida* identificadas en zona norte de Cartago, a nivel de laboratorio y campo respectivamente. Fuente: Ing. Ricardo Piedra, Dra. Cristina Vargas, INTA.

Tejido animal (vertebrados): Este tipo de muestra incluye el tejido de animales vertebrados (mamíferos, aves, peces, reptiles y anfibios), el cual se puede coleccionar mediante diferentes dispositivos o mediante biopsias o cortes con bisturí. El tejido de órganos internos o tejido epitelial se debe trasladar en etanol de 70-90%. Se debe tomar de 200 mg (como mínimo) a 1 g de la muestra para la extracción de ácidos nucleicos.

Fluidos animales: Los fluidos animales como sangre, leche, saliva, orina, heces, etc., se pueden transportar en los mismos recipientes que se utilizan para los análisis clínicos pero deben colocarse en frío, hasta el momento de ser entregados en el laboratorio. Estos recipientes son tubos de ensayo, hisopados, recipientes estériles para orina y heces, etc. En este caso, la cantidad de muestra que se requiere para la obtención de los ácidos nucleicos es muy pequeña (50-100 mg) por lo cual la capacidad de cualquiera de los recipientes antes mencionados es suficiente.

GLOSARIO

Hospedero o huésped: Es todo aquel organismo que sirve de reservorio para otro organismo, generalmente patógeno, que sobrevive a través de los nutrientes o protección que el huésped le brinda.

Agente infeccioso/patógeno: Es toda aquella entidad biológica (virus, bacteria, hongo, etc.) capaz de producir una enfermedad infecciosa en un huésped (humano, animal, vegetal, etc.)

PCR: Significa “reacción en cadena de la polimerasa” por sus siglas en inglés, es una técnica que permite amplificar una región del ADN y crear millones de copias por medio de una reacción enzimática, con el fin de realizar estudios genéticos en distintas áreas de la ciencia.

PCR convencional: Es el tipo de PCR que utiliza un único juego de cebadores¹ y una única ronda de amplificación del ADN blanco.

PCR anidado: Es el tipo PCR que utiliza dos o más rondas de amplificación, cada ronda utiliza un par de cebadores distintos. La ronda final (segunda, tercera, etc.) se realiza usando el ADN amplificado en la ronda anterior.

PCR en tiempo real: Es un tipo de PCR que adiciona elementos como cebadores o sondas marcadas con tintes fluorescentes para realizar la cuantificación del ADN amplificado cada vez que la enzima hace la replicación de la molécula.

Extracción de ácidos nucleicos: Es un procedimiento que inicia con la lisis

¹ Moléculas de ADN de 20-30 nucleótidos de longitud que se utilizan para la amplificación de ADN in vitro.

celular² de una muestra y utiliza sustancias químicas que permiten recuperar los ácidos nucleicos y separarlos de los restos celulares y de otras moléculas como carbohidratos, lípidos y proteínas.

Secuenciación de ácidos nucleicos: procedimiento in vitro que permite determinar el contenido y el orden secuencial de los nucleótidos que conforman una región del ADN o el ARN.

Análisis de secuencias: utilizar una secuencia del ADN para realizar la identificación y la caracterización de un organismo por medio de diferentes programas bioinformáticos; así como, la comparación y asociación genética de la secuencia obtenida con secuencias depositadas en bases de datos internacionales.

Disrupción de tejido: Moler el tejido manual o automáticamente para romper las células y extraer los ácidos nucleicos.

REFERENCIAS

Ludes, B; Pfitzinger, H; Mangin, P. 1993. DNA fingerprinting from tissues after variable postmortem periods. *Journal of Forensic Sciences* 38(3):686-690.

Vincek, V; Nassiri, M; Knowles, J. 2003. Preservation of tissue RNA in normal saline. *Laboratory Investigation* 83(1):137-138.

Seear, PJ; Sweeney, GE. 2008. Stability of RNA isolated from post-mortem tissues of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Fish Physiology and Biochemistry*, 34(1):19-24.

² Proceso de rompimiento de la membrana celular y liberación del contenido de la célula.

CONTACTO

Dra. Cristina Vargas Chacón. Dirección de Investigación e Innovación (INTA)

Laboratorio de Biología Molecular

Horario: lunes a viernes de 7 am a 3 pm

Teléfono: 2231-5055

E-mail: cvargas@inta.go.cr

Web INTA: www.inta.go.cr

Plataforma PLATICAR: www.platicar.go.cr

Edición: Departamento de Transferencia e Información Tecnológica - INTA.

Diseño: Handerson Bolívar Restrepo



INSTITUTO NACIONAL DE INNOVACIÓN Y TRANSFERENCIA
EN TECNOLOGÍA AGROPECUARIA
(INTA- COSTA RICA)

GUÍA PARA LA TOMA DE MUESTRAS QUE REQUIEREN ANÁLISIS MOLECULARES



Ruth Castro Vásquez
San José, Costa Rica. 2018.

INTRODUCCIÓN

Uno de los procedimientos más importantes en todos los estudios moleculares, es la preservación de las muestras desde el momento que son recolectadas en el campo hasta que llegan al laboratorio para ser analizadas. Se ha reportado que la degradación del ADN y el ARN incrementa con el tiempo y la temperatura (Ludes *et al.* 1993, Vincek *et al.* 2003, Seear & Sweeney 2008), por lo que la mejor forma de preservar los ácidos nucleicos, es cortando el tejido y colocándolo en nitrógeno líquido para posteriormente guardarlo a -80 °C o deshidratar la muestra en frío y al vacío con un liofilizador¹. Sin embargo, en el campo este tipo de procedimientos es casi imposible, por lo cual existen alternativas que pueden utilizarse y que varían dependiendo del tipo de muestra.

RECEPCIÓN DE MUESTRAS Y CANCELACIÓN DE COSTO DE LOS ANÁLISIS

Al momento de ingresar las muestras al laboratorio se le solicitará la siguiente información: fecha de recolección, fecha de recepción, sitio de colecta (provincia, cantón, distrito), georeferencia (no es indispensable), nombre de la finca, nombre del solicitante, datos de contacto (teléfono, fax y correo electrónico), cultivo (si aplica), tipo de muestra (vegetal, animal, etc.) y análisis solicitado (actualmente el laboratorio ofrece el servicio, de extracción de ADN, PCR convencional y anidado, PCR en tiempo real, secuenciación (como un servicio indirecto) y análisis de secuencias). Para el personal del INTA es obligatorio proporcionar el código del F4 o F52 al que pertenece la muestra. En caso de que los objetivos de los F4/F5, no incluyan análisis moleculares, el funcionario debe traer una nota de justificación con el visto bueno del jefe inmediato. Para la entrega de los resultados se debe cancelar el costo de los análisis a las cuentas bancarias: Banco Nacional, cta. cliente: 15100010012136324, cta. corriente: 100-01-000-213632-3 ó Banco de Costa Rica, cta. cliente: 15201001023057206, cta. corriente: 001-0230572-0. Se cuenta con la siguiente cuenta en dólares: Banco de Costa Rica, cta. cliente: 15201001023800645, cta. corriente: 001-0238006-4.

¹ El liofilizador es un equipo que permite extraer el agua de una muestra (deshidratar) por medio de un proceso de sublimación, es decir, el agua pasa del estado sólido al gaseoso sin pasar por el estado líquido.

² Un formulario F4 es el protocolo diseñado por el INTA para registrar las investigaciones que se llevan a cabo en la institución, mientras que el F5 es el protocolo que registra las actividades especiales realizadas por los investigadores (transferencia, elaboración o modificación de procedimientos, etc.).

PROCEDIMIENTO PARA LA TOMA DE LA MUESTRA

Todas las bolsas, tubos u otros envases y envoltorios que se utilicen para transportar la muestra deben ser entregados debidamente rotulados con el nombre del solicitante y con el código o nombre con el cual el solicitante identifica la muestra; esto con el propósito de que el personal del laboratorio, pueda asociar los resultados obtenidos, con el solicitante y muestra correspondiente.

TIPOS DE MUESTRAS Y RECOMENDACIONES PARA SU TRANSPORTE AL LABORATORIO

En caso de que el muestreo se prolongue por varios días, las muestras deben refrigerarse en sus bolsas húmedas (no congelarse), o sumergirse en alcohol de 90-95% y congelarse (tomando ~400 mg del tejido ó 0.5 mL de fluido).

Bacterias, Protozoos y Hongos: Estos microorganismos generalmente vienen asociados a suelo, medios líquidos (savia, sangre, agua, etc.), tejido vegetal o animal, por lo que se recomienda realizar un aislamiento del microorganismo previamente. En caso de que no sea posible tener el microorganismo puro, proceda a conservar la muestra de tejido fría y húmeda mientras la transporta hasta el laboratorio. Evite coleccionar tejido en avanzado estado de descomposición.

Los hongos tipo champiñones deben colocarse en papel periódico o papel toalla y almacenarse en bolsas plásticas. Las bolsas no deben cerrarse sino simplemente doblarse sobre sí mismas. Las muestras deben introducirse dentro de una hielera cada vez que se guardan en las bolsas y el tejido no debe triturarse.

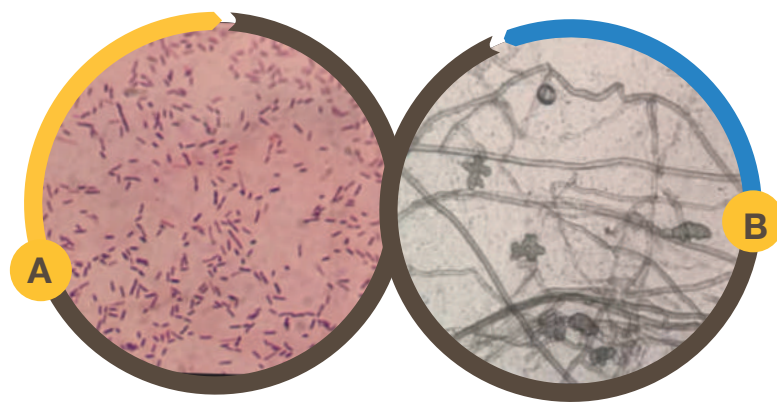


Figura 1. Microorganismos fitopatógenos (A) *Burkholderia glumae* durante tinción de gram. (B) Hifopodio del hongo *Gaeumannomyces graminis* var *graminis*. Fuente: Ing. Luis Vargas, INTA.

Tejido vegetal: Cuando el análisis se va a realizar a partir de tejido vegetal, se sugiere recolectar el tejido más nuevo (brotes, plántulas, etc.). En el campo, el procedimiento a seguir para coleccionar la muestra es igual al descrito para los hongos tipo champiñones. La muestra debe permanecer húmeda y fría. En el caso de los tallos leñosos, raíces gruesas, semillas y plantas suculentas o crasas (tipo cactus, aloe vera, etc.), estas no requieren estar envueltas en papel húmedo, simplemente deben alejarse de la luz solar directa y permanecer en frío. Este tipo de material, requiere la utilización de nitrógeno líquido o equipo especial para realizar la disrupción del tejido antes de la extracción de ácidos nucleicos, por lo que el costo incluye este procedimiento adicional.



Figura 2. Muestras de tejido vegetal. (A) Trifolios de frijol. (B) Corte de una muestra de tejido vegetal (arroz). Fuente: Luis Vargas, INTA.

Tejido animal (invertebrados): Este tipo de muestra incluye artrópodos, crustáceos, miriápodos, nematodos, etc. Se sugiere coleccionar adultos, ninfas, larvas o huevos, de forma individual en tubos plásticos de 1.5 ml, que contengan de 0.5-1 ml de etanol al 90-95% para sumergir por completo la muestra. Las muestras muy pequeñas como ácaros, thrips, piojos, etc., se procesan en grupo, de manera que se recomienda que cada tubo con alcohol contenga al menos de 20 a 100 individuos. Si el objetivo es la extracción de ADN de un único individuo, esto se debe especificar al momento de hacer la solicitud del análisis. Los animales de mayor tamaño como babosas, polillas, escarabajos, etc., se sugiere coleccionarlos de forma individual, vivos o colocarlos en tubos plásticos con una capacidad que esté en razón del tamaño de la muestra (2 ml, 15 ml, 50 ml, etc.). Las muestras con nematodos deben ser remitidos primero al laboratorio de nematología.