No.020

コロンビア国マラリア等熱帯性感染症診断技術開発プロジェクト評価調査団報告書

平成元年8月

国際協力事業団
医療協力部

医協
JR
89-50

コロンビア国マラリア等熱帯性
感染症診断技術開発プロジェクト
評価調査団報告書

平成元年８月

国際協力事業団
医 療 協 力 部

国際協力事業団
21501

序　　文

本プロジェクトは、昭和58年4月から昭和61年3月まで実施された医療技術協力「中央医学研究所プロジェクト」の実施によりコロンビア国に確立された生化学及び免疫学の研究基盤をもとに、マラリアおよび他の熱帯性感染症に関する診断法の開発を通じて、同国国民の公衆衛生向上に寄与することを目的として、昭和61年10月から3年間の予定で開始されたものである。

今回、当事業団は平成元年9月の終了を前に、プロジェクトの協力効果を測定し、目標達成度を判定したうえで総合評価を実施する目的で評価調査を派遣した。

本報告書はその調査結果を取りまとめたものである。

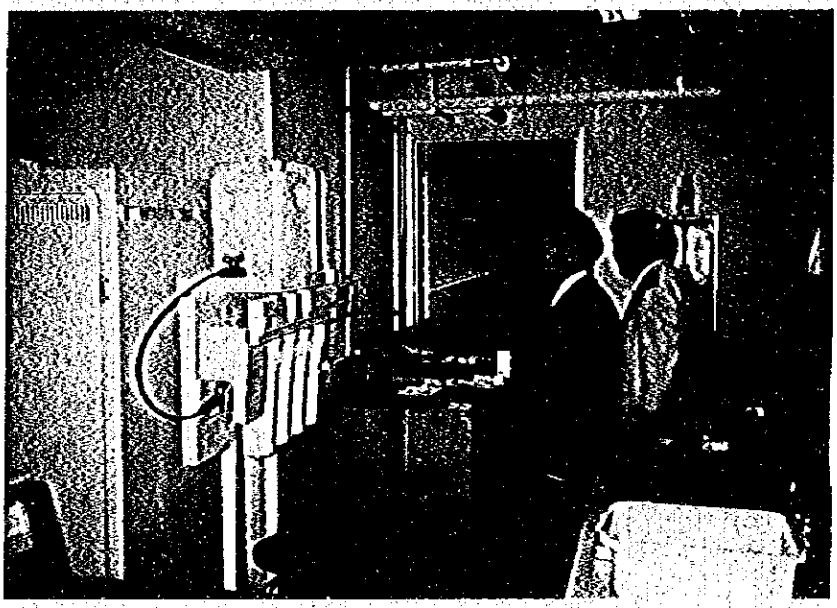
ここに、本件協力事業に深いご理解とご協力をいただいた関係各位に対し、深甚なる謝意を表する次第である。

平成元年8月

国際協力事業団
理事　西野世界

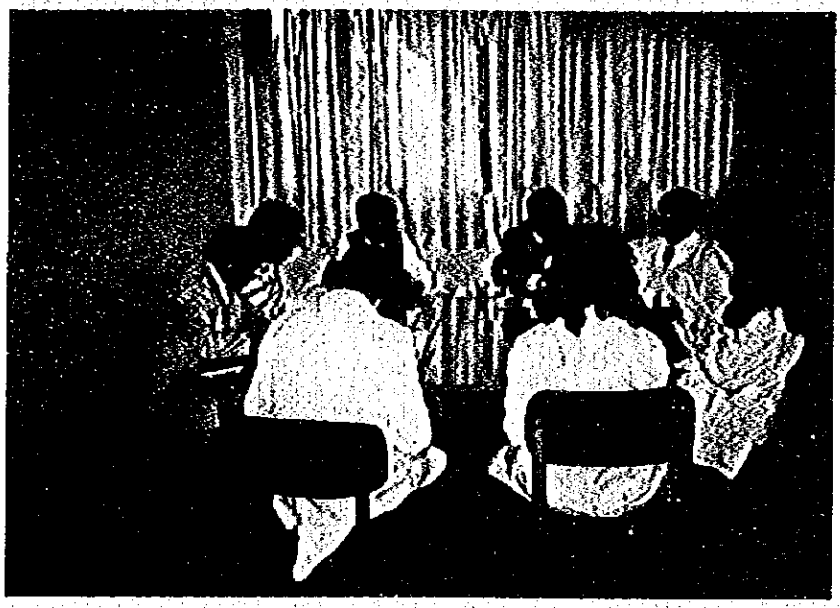
日本大使館表敬

中央医学研究所にて協議
（写真右より相嶋団員，
吉池団員，片岡団長，
Michelsen 中央医学研究所長）



生化学部

免疫学部

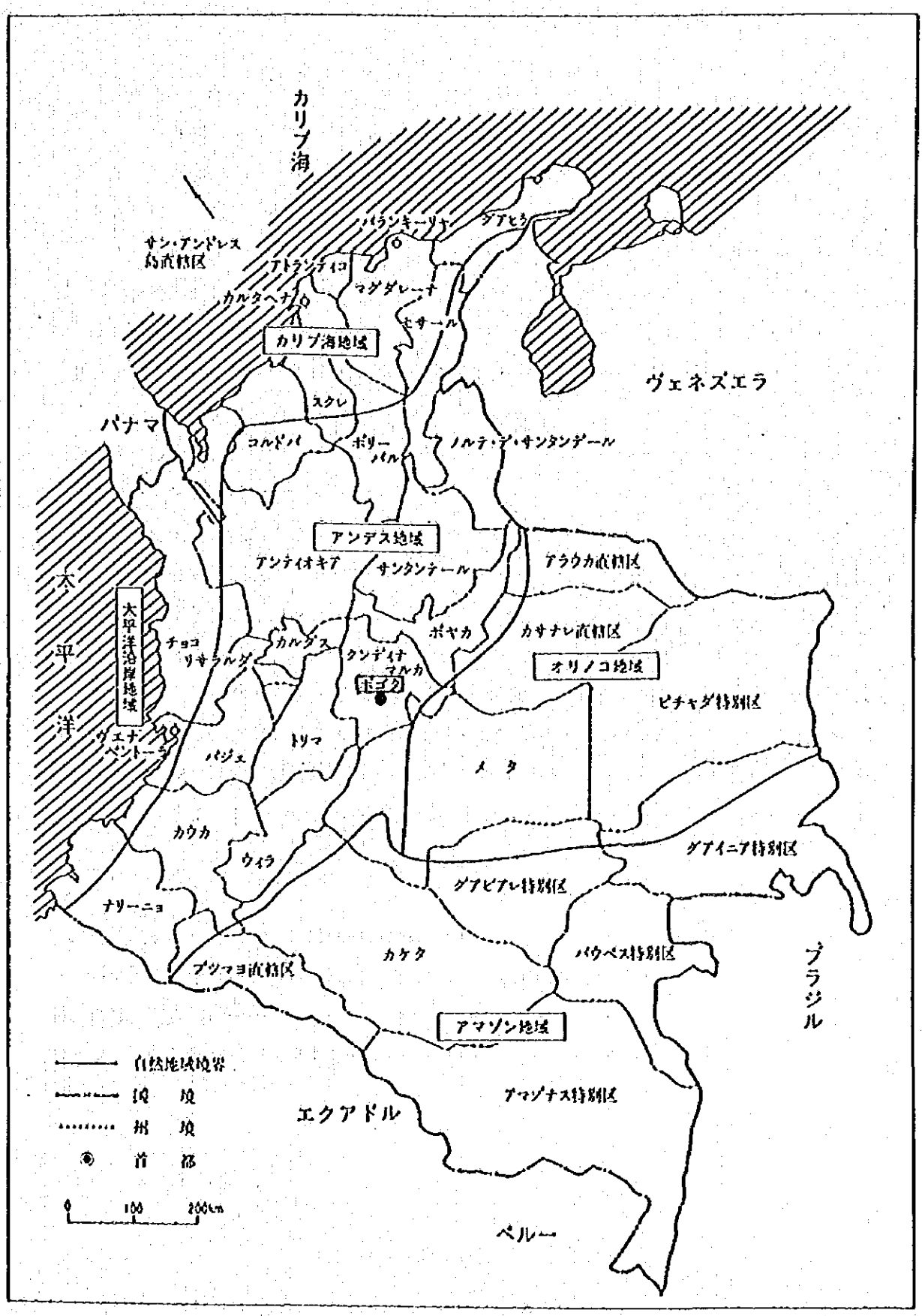


合同評価調査会

JOINT EVALVATION REPORT

署名

コロンビア共和国


カリブ海
サン・アンドレス
島直轄区
バランキーリャ
ダアヒラ
アトランティコ
カルタヘナ
マグダレーナ
セサール
カリブ海地域
ヴェネズエラ
パナマ
スクレ
コルドバ
ボリーバル
ノルテ・デ・サンタンデール
アンデス地域
アンティオキア
サンタンデール
アラウカ直轄区
太平洋沿岸地域
チョコ
リサラルダ
カルダス
ボヤカ
カサナレ直轄区
クンディナマルカ
ボゴタ
オリノコ地域
ピチャダ特別区
ヴェナベントーラ
パジェ
トリマ
メタ
カウカ
ウィラ
グアイニア特別区
グアビアレ特別区
ナリーニョ
カケタ
パウペス特別区
プツマヨ直轄区
ブラジル
アマゾン地域
アマゾナス特別区
エクアドル
ペルー
自然地域境界
国境
州境
首都
0
100
200km

目　　次

1. 評価調査団の派遣 …… 1
1－1 調査団派遣の経緯と目的 …… 1
1－2 調査団の構成 …… 2
1－3 日　程 …… 3
1－4 主要面談者 …… 4
2. 評価結果の要約 …… 6
3. プロジェクトの当初計画 …… 8
3－1 プロジェクトの背景と成立の経緯 …… 8
3－2 プロジェクトの目的 …… 8
3－3 協力計画 …… 8
4. プロジェクト実績 …… 13
5. プロジェクトの評価と提言 …… 15
5－1 免疫学部門 …… 15
5－2 生化学部門 …… 16
5－3 研究内容総合評価 …… 18
5－4 プロジェクトの運営管理・実施体制 …… 20
6. 合同委員会（Coordinating Committee）の協議 …… 32
6－1 協議の経緯と概要 …… 32
6－2 ジョイントエバリュエーションレポート …… 33

―― 資　料 ――

I. 討議議事録（Record of Discussions） …… 49
II. 暫定協力計画（Tentative Schedule of Implementation） …… 62
III. 供与機材実績 …… 69
IV. コロンビア側プロジェクト評価 …… 101

1. 評価調査団の派遣

1－1 調査団派遣の経緯と目的

(1) 調査団派遣の経緯

① プロジェクトの名称

和文：コロンビア国マラリア等熱帯性感染症診断技術開発プロジェクト

英文：The Project on Research and Development of Diagnostic Technology on Malaria and Other Tropical Diseases

② R／D署名日：昭和61年7月22日

③ 協力期間：昭和61年10月1日～平成元年9月30日

④ プロジェクトサイト：保健省中央医学研究所

(Instituto Nacional de Salud)

⑤ 日本側協力機関：国立予防衛生研究所、

(財)化学及血清療法研究所

⑥ 経緯：昭和58年4月から3年間にわたりコロンビア共和国中央医学研究所の生化学および免疫学部門の基盤整備強化を目的にプロジェクト方式技術協力（中央医学研究所プロジェクト）を実施したところ、コロンビア側は、同協力の成果（機材・施設等の整備、人員の養成等研究基盤の整備）を踏まえ、同国に蔓延するマラリアをはじめとした熱帯性感染症の診断法開発について、さらに技術協力要請越した。

これを受けて我が方は、61年7月に実施協議調査団を派遣し、R／D(Record of Discussions) 署名により同年10月1日から3年間のプロジェクト方式技術協力が開始された。

免疫学・生化学（核酸）の両部門でのマラリア検査法技術の確立を目的に協力を展開しているところ、当初計画に若干の修正はあったものの順調に技術協力は行われている。

(2) 調査団派遣の目的

プロジェクトの終了をひかえ、当初実施計画・目標と実際の進捗状況を比較検討し、協力が計画に沿って適切に実施されたか、計画そのものが妥当であったか、プロジェクト運営が円滑・適正に行なわれたか、等々について協力効果を測定し目標達成度を判定する。

今後の協力方針についても、プロジェクト協力期間終了まで、およびその後の対応を含め、コロンビア側と協議する。

(3) 調査事項

① プロジェクトの活動・投入実績

・専門家派遣の成果および問題点（移転技術の定着と応用）

・研修員受入れの成果および問題点（定着性、知識・技術の活用）

・機材供与の成果および問題点（活用とメインテナンスの状況）

・両国の実施体制

② プロジェクトの評価

・目標達成度の分野別評価

・プロジェクトの運営・実施体制の評価

・当初計画の妥当性について

③ 今後の協力方針について

・専門家派遣

・研修員受入れ

・機材供与

(4) 調査方法

① 施設（中央医学研究所）の視察

② カウンターパートとの面談

③ 派遣中専門家との面談

④ コロンビア側責任者との協議

1－2 調査団の構成

団長：片岡哲朗（総括および免疫学）

国立予防衛生研究所　細胞免疫部

ＢＣＧ・ツベルクリン室長

団員：吉池邦人（免疫学および生化学）

国立予防衛生研究所　腸内ウイルス部

第二室長

団員：相嶋隆夫（技術協力）

厚生省大臣官房国際課

国際協力係長

団員：江頭栄二（計画評価）

国際協力事業団

医療協力部医療協力課　職員

＊同時期派遣短期専門家、評価調査に参加

坂本信一（生化学）

㈶化学及血清療法研究所

研究開発部分子遺伝研究室　研究員

1－3　日　程

6月18日（日）移動　成田発　12：00　New York着　11：25（ＪＬ－００６）

19日（月）　〃　New York発　10：30　Bogota着　15：30（ＡＶ－０５３）

20日（火）9:30　ＪＩＣＡ事務所表敬

榎下事務所長に調査方針説明

10:30　日本大使館表敬

色魔大使、久保医務官および永嶋書記官に本調査団の目的・調査方針について説明

14:30　コロンビア国家企画院表敬

技術協力課（Technical Cooperation Division）

Ms. Yolanda Ramirez に調査方針説明

16:00　コロンビア保健省表敬

国際課（International Affairs Division）Dr. Andrés Marino に調査方針説明

21日（水）中央医学研究所（ＩＮＳ）にて視察・協議

9:30　総合ミーティング（第１回協議）

Dr. Jorge Michelsen　Director

Dr. Maurico Restrepo　Laboratory Director

Dr. Miguel Guzman　Head, Immunology group

Dr. Moises Wasserman　Head, Biochemistry group

及び調査団員が出席し調査方針・調査日程につき協議

10:30　研究所視察

生化学グループ、免疫学グループおよび生物製剤製造部門を視察

14:00　第２回協議（於ＩＮＳ）

プロジェクトの活動・投入実績について

22日（木）9:30　第３回協議（於ＩＮＳ）

プロジェクトの評価について

（目標達成度の分野別評価）

23日（金）9:30　第４回協議（於ＩＮＳ）

プロジェクトの評価について

（総括評価）

プロジェクトの今後について

（R／D期間終了までおよび終了後の対応）

24日（土）調査結果整理・日本側打合せ

25日（日）資料整理

26日（月）9:30　第5回協議（於ＩＮＳ）

JOINT EVALUATION REPORT (DRAFT) 作成

27日（火）9:30　第6回協議（於ＩＮＳ）

JOINT EVALUATION REPORT 最終確認

15:00　COORDINATING COMMITTEE（於ＩＮＳ）

Dr. Andres Marino	保健省　国際課
Ms. Yolanda Ramirez	国家企画院　技術協力課
Dr. Jorge Michelsen	Director, INS
Dr. Maurico Restrepo	Laboratory Director
Dr. Moises Wasserma	Head, Biochemistry group

調査団、コロンビア事務所伊藤職員が出席し総括協議

16:00　JOINT EVALUATION REPORT 署名

28日（水）日本大使館報告

色魔大使、及び永嶋書記官に調査結果報告

29日（木）Bogota発　12：15　New York着　19:00（ＡＶ－０５２）

30日（金）New York発　13:30（ＪＬ－００５）

7月 1日（土）東京着　16:20

1－4　主要面談者

コンロビア側

<保健省 (Ministerio de salud)>

Dr. Andres Marino　Director, International Affairs Div.

<国家企画院 (Departamento Nacional de Planeacion)>

Ms. Yolanda Ramirez　Head, Technical Cooperation Div.

<中央医学研究所 (Instituto Nacional de Salud)>

Dr. Jorge Michelsen	Director
Dr. Maurico Restrepo	Laboratory Director
Dr. Moises Wasserman	Head, Group of Biochemistry
Dr. Miguel Guzman	Head, Group of Immunology
Ms. Maria Olfa de Rojas	Staff, Group of Biochemistry
Mr. Vladimir Marshansky	〃
Ms. Ruth Beltran	〃
Ms. Zuleima Rubio	Staff, Group of Immunology

Ms. Gladys Cortes　　Staff, Group of Immunology

Mr. Harold Ibagon　　〃

日本側

<日本大使館>

色魔　力夫　　特命全権大使

久保　利夫　　医務官

永嶋　善隆　　書記官

<ＪＩＣＡ事務所>

榎下　信徹　　事務所長

伊藤　　高　　事務所職員

<プロジェクト派遣中専門家>

坂本　信一　　生化学短期専門家

2. 調査結果の要約

本プロジェクト終結を３ヶ月後に控え、本調査団はコロンビア国側担当者と協力して最終成果の評価を行なった。その結果各論に記したように、当初計画した目標は、概ね、満足すべき到達度が得られ、または完了しつつあることを確認できた。

本プロジェクトは、３年間にわたるコロンビア国中央医学研究所（以下ＩＮＳと略す）プロジェクトの実施によりもたらされた、研究設備と研究体制の基盤強化および研究能力の向上という成果を、ＩＮＳの技術、活力の一層の強化、発展につなげることにより、コロンビア国の永年にわたる懸案である熱帯性感染症対策をはじめとする、同国の保健衛生向上に資することを目標としていた。

そのため、マラリア診断技術の開発を中心テーマに据え、生化学と免疫学の両部門の技術および研究能力向上をはかるという当初計画は、時宜を得た非常に適切な設定であったといえる。

また、実施体制については、コロンビア側責任者として、研究活動の運営と指導に誠意と熱意を以てあたったワッサーマン博士を得たことが、本プロジェクトの推進に極めて有効であった。加えて、日本側国内委員会の努力により、日本側からも、本テーマに熱意を有する神山恒夫専門家が選ばれ、２年間の長期に亘って現地で免疫学部門において、技術の移転ばかりでなく研究推進の中心となって指導に当ったこと、(財)化学及血清療法研究所の生化学部門における研修生受け入れと、専門家派遣について全面的な協力が得られたこととにより、日本・コロンビア両国の研究協力事業としての実施体制が形を整えることができたと判定された。

本プロジェクトの実施により、実験室の設備、実験用機材の充実、研究体制の強化等が成果として得られた。また、研修を受けたカウンターパートは、ＩＮＳを構成する11部門中４部門から選ばれたもので、それぞれの研究室において本プロジェクト推進の中核となっている。マラリア診断技術の開発については、免疫学的、生化学的アプローチの双方にそれぞれ着実な進展がみられ、一部野外実験の試行が行なわれるまでになった。さらに特記すべき成果として、このようにして本プロジェクトの実施に伴ないもたらされたＩＮＳの研究体制の整備が、ＩＮＳの内部ばかりでなく、コロンビア国内の他の研究所、医大などの研究者に対しても大きな好影響を与え、多数の研究テーマについて研究協力がなされつつあり、また生化学の大学院コースが設置され、若手研究者の育成にも大きな貢献がなされつつある（ちなみに、生化学部門の大学院生の20％がＩＮＳで教育されることになる。）。

ＩＮＳ内部に関しては、研究部門ではマラリア以外の感染症の研究、生物学的製剤製造部門では蛇毒に対する抗毒素の開発研究、製剤品質管理部門では、製剤中の混入異種ＤＮＡの検出などに関する研究等々に、本プロジェクトにより培われた研究設備、技術および体制が有機的に活用されつつあり、今後の発展が期待できる。ＩＮＳの研究専門家の実に一割が、通算６年間にわた

った前回および今回プロジェクト実施期間中に、日本で研修を受け各研究室に定着していることも、両国間の協力体制の将来にとって技術移転と定着以上の効果をもたらすものと考えられる。

以上本プロジェクト終了後も波及効果が続くものと思われるが、日本側から将来何らかの援助がなされるならば、その成果の発展は一層確実なものとなるであろう。

3. プロジェクトの当初計画

3－1 プロジェクトの背景と成立の経緯

コロンビアは、湿熱の低地湖沼地帯、未開のアマゾン上流ジャングル地帯、3,000 メートル級の高地などからなる国家であるが、高地を除く全地域に熱帯性伝染病が蔓延し、その制圧は国の重要課題の一つである。同国の公衆衛生機関は中央医学研究所（Instituto Nacional de Salud：ＩＮＳ）に集約されており、その拡充強化は国の保健行政の眼目として重視されている。こうした中で当事業団はコロンビア国中央医学研究所プロジェクト（1983年4月→1986年3月）を実施し、この研究所の免疫学部門と生化学部門の活動能力を強化することに重点をおき協力を行なった。ＩＮＳの強化という目的は「コロンビア国中央医学研究所エバリュエーション調査団報告書（昭和61年2月）」に示されたように、研究基盤の強化という点で成果があったが、コロンビア側では、この成果を基盤としてさらにＩＮＳの研究活動を進展させ、国の公衆衛生への貢献を一層高める必要性を認識し再度日本政府からの協力を求める強い要望があった。これを受けてわが方は、具体的な実施方策について協議検討するため、昭和61年7月に実施協議調査団を派遣し、昭和61年10月1日から3年間の予定で本プロジェクトを開始した。

3－2 プロジェクトの目的

コロンビアの保健医療上の問題の一つはマラリア、リーシュマニア、シャガス病などの原虫感染症を中心とする熱帯性伝染病であり、特にマラリアは、患者数も多く公衆衛生上最も大きな影を落としている感染症の一つである。一方、世界的にみればマラリアの研究は、マラリア原虫の試験管内培養が可能となったことにより、核酸生化学と免疫学の両分野が中心となり診断技術の開発等飛躍的な進展を遂げている。こうした背景をふまえて、マラリアの診断法に関し、ＩＮＳを通じて、生化学および免疫学的技術を移転し、以ってコロンビア国の公衆衛生の向上に寄与することを本プロジェクトの目的とした。

本プロジェクトの開始に当たり留意すべき点が二つあった。第一は、研究が単にアカデミックな学問的興味に終始することなく、現場でのマラリア診断に有用であることを常に念頭においた研究であるべきこと、第二は、本技術援助の究極の目的が、単にマラリアのＤＮＡ診断法の開発にあるのではなく、むしろこの援助を通してＩＮＳ全体の研究能力を強化し、それによりコロンビア国の公衆衛生の前進に貢献することであった。

3－3 協力計画

(1) 協力内容

本プロジェクトの当初協力計画は、参考資料ⅡのTentative Schedule of Implementationに示

したとおりであるが、具体的な内容は以下のとおりである。

① 免疫学部門

免疫学的視点からの新しいマラリア診断法の開発では、

i）血液中の微量抗原の早期検出

ii）血液中の微量抗体の検出と対応する抗原の同定

iii）マラリア抗原に対する細胞性免疫応答の分析

iv）感染蚊体内のマラリア原虫株の同定

の4項目が主要な標的になると思われる。

このためには、

i）ＥＬＩＳＡ法

ii）免疫ドットブロット法

iii）特異的リンパ球ブラスト化反応

等を中心としていくつかの免疫化学的および免疫生物学的方法を用いることが必要となる。

以上の方法を比較検討するために、次のように年度に区切って到達目標を設定した。

第1年次）　試験管内および感染ヨザル由来原虫抗原の分離精製
　　モノクローナル抗体パネルの作製
　　感染ヨザルの細胞性免疫反応の分析

第2年次）　血清学的および免疫学的反応の標準化
　　野外調査のための予備試験
　　生化学的診断法との比較

第3年次）　診断法の改良
　　野外応用

② 生化学部門

生化学的視点からの新しいマラリア診断技術は、異なるマラリア原虫に対応するＤＮＡをそれぞれ純化・標識し、患者血液中に存在するマラリア原虫ＤＮＡと混合して、特異的に結合した標識ＤＮＡを検出することにより患者血液中に存在するマラリア原虫の存在と種を判定するという方法である。したがって、この方法では標識ＤＮＡと患者血液試料と反応段階に行う「ハイブリダイゼーション」技術の確立が最重要目標であるが、次のように年度に区切って到達目標を設定した。

第1年次）　ゲノムとｃＤＮＡライブラリーの作成
　　標的遺伝子の同定

第2年次）　標的遺伝子の解析
　　特異プロウブの合成・作出

第3年次）　診断技術の完成

野外への応用

(2) 実施計画

表1のとおり専門家派遣・研修員受け入れ機材供与が計画された。

表1. コロンビア国マラリア等熱帯性感染症
診断技術開発プロジェクト暫定実施計画

項　目	項　目　2	昭和61年度	昭和62年度	昭和63年度	平成元年度
調査団	実施協議 ⇔		計画打合わせ ⇔		評価 ⇔
専門家の派遣	免疫学	長期 ⇔	⇔	⇔ (1年半～2年)	
		短期	(2～3か月) ⇔	(2～3か月) ⇔	(2～3か月) ⇔
	生化学（核酸）		(2～3か月) ⇔	(6～6か月) ⇔	(3～4か月) ⇔
研修員受け入れ	生化学		⇔	⇔	
	免疫学		⇔	⇔	
			⇔		
機材供与		・高速冷却遠心機 ・ポラロイドMP4システム ・真空乾燥機 ・安全キャビネット ・クリーンベンチ ・冷却微量高速遠心機 ・マイクロコンピューター ・高速液体クロマトグラフィーシステム一式 ・超音波洗浄器	・超低温冷凍庫 ・冷凍庫 ・窒素コンテナ ・炭酸ガス培養器 ・アイソラック ・セルハーベスター ・コピー機 ・細胞培養用プラスチック器具 ・試薬類　他	※必要に応じ協議のうえ 日本側予算の範囲内 で供与する。	

4. プロジェクト実績

本プロジェクト開始から平成元年８月までの協力実績は表２のとおりである。

表2. コロンビア国マラリア等熱帯性感染症
診断技術開発プロジェクト協力実績 （平成元年８月現在）

項目	項目２	昭和６１年度	昭和６２年度	昭和６３年度	平成元年度
		s 62 10 11 12 1 2 3	s 63 4 5 6 7 8 9 10 11 12 1 2 3	H 01 4 5 6 7 8 9 10 11 12 1 2 3	4 5 6 7 8 9
専門家の派遣	免疫学	神山 62/3/25 ←→			01/3/24
	生化学（核酸）		坂本 62/8/7←→8/23	坂本 63/11/19←→63/12/4	01/06/16←→01/07/02 坂本
	その他				
調査団	実施協議 61/7/13 ←→61/7/26			計画打合わせ 63/10/30←→11/12	評価 01/06/18←→01/07/01
機材供与※		３１，３８４千円 （輸送費を含む） ・ランドクルーザー ・高速冷却遠心機 ・冷却微量高速遠心機 ・安全キャビネット ・炭酸ガス培養機 ・倒立顕微鏡 ・超音波洗浄器 ・アイソラック ・純水製造機 ・セルハーベスター ・超遠心機ローター ・試薬類（現地調達） 他	６３，３３９千円（輸送費を含む） ・高速液体クロマトグラフィーシステム一式 ・クリーンベンチ ・インキュベータージャイロトリーシェイカー ・ウォーターバスジャイロトリーシェイカー ・超遠心機ローター ・炭酸ガス培養機 ・化学天秤 ・細胞培養用プラスチック器具 ・試薬類（現地調達） 他	２３，７０１千円（輸送費を除く） ・電気泳動用品 ・小型冷却遠心機 ・培養用プラスチック・ガラス器具 ・既供与機材の部品（スペアパーツ） ・リコピー用パーツ ・ジーンアッセンブラー（現地調達） ・試薬類（現地調達） 他	１２，９７８千円 （輸送費を除く） ・分離用超遠心機 同上附属品
研修員受け入れ	生化学	Juan Crosby 62/3/12 ←→	（化学及血清療法研究所）	63/4/6	Marta Claudia Gonzalez 01/03/23 ←→ （化学及血清療法研究所） 01/09/06
	免疫学		Harold Ibagon 63/1/26 ←→ （国立小児病院小児医療研究センター）	01/1/23	Gloria Ines Ximera 01/05/13←→ （国立予防衛生研究所） 02/04/30

※供与機材の詳細リストは参考資料Ⅲを参照

5. プロジェクトの評価と提言

5－1 免疫学部門

当初計画策定にあたっては、前「中央医学研究所」プロジェクトで達成された技術移転および研修ずみのカウンターパートを活用する形で、かなり高度の計画がたてられたが、適切であったと判定される。ただし、現地特産のヨザルを用いた、あるいはヌードマウスの繁殖育成による感染実験という非常に先導的な試みが現地側の環境整備が不十分であったため計画を変更せざるを得なかったことは止むを得ないことであった。

実施にあたっては、コロンビア側はカウンターパートの配置の他に、新たにハイブリドーマセクションを一室発足させた。日本側からは、最新の技術・知識を有する神山専門家を2年間の長期にわたってＩＮＳに派遣できたことが、本プロジェクトの成果につながっている。すなわち、ＩＮＳで免疫学部門における研究推進に必須の存在となり、生化学部門長ワッサーマン博士との協力も緊密であった。帰国後も研修員に対して、本プロジェクト終了後の研究進行に不可欠な技術指導を行ないつつある。

研究成果を示すと以下の通りである。

1) マラリア原虫の培養と抗原の調製

コロンビア国で分離された熱帯熱マラリア原虫株を培養して、物理化学的方法によりスカイゾント型原虫に富む分画を得て、これを抗原として用いた。同様にして三日熱マラリア感染患者血液からも、抗原を調製できた。

2) モノクローナル抗体の産生

熱帯熱マラリアのスカイゾント型原虫に対する特異的な抗体を産生する、マウスのハイブリドーマ細胞クローンを確立し、その中の2つについて詳細な検討を行なった。その結果、両者は異なるアイソタイプの免疫グロブリンであることが分った。また、それぞれ異なるマラリア・スカイゾントの可溶性抗原を認識していることが、免疫蛍光染色、ウェスクン・ブロット法による解析等で明らかとなった。この2種類のモノローナル抗体を用いて、サンドイッチ－ＥＬＩＳＡ法を確立できた。

3) 診断法の開発

(a) ＥＬＩＳＡ法による抗体の検出

アビジン・ビオチン標識試薬を用いて、改良したＥＬＩＳＡ法を確立できた。この方法は簡便でかつ高感度であり、僅か10$\mu\ell$の患者血液から抗体を検出できた。この方法は熱帯熱マラリアばかりでなく、三日熱マラリア抗体の検出もに応用できた。

(b) サンドイッチ－ＥＬＩＳＡ法による抗原の検出

前記の2種類のモノクローナル抗体を用いて、サンドイッチ－ＥＬＩＳＡ法を確立し、熱帯

熱マラリア抗原の検出が可能となった。実際に患者末梢血液を用いた場合に、抗原の検出感度0.01～0.001 %の虫血症に相当し、現行の顕微鏡による検出法と同水準がやや上廻る程度である。ただし検出に要する時間と労力に関しては、圧倒的に新しく開発された方法が秀れている。

(c) 細胞性免疫反応の検出

マラリア感染防御における細胞性免疫の重要性が見直されつつあり、患者末梢血中のT細胞の機能を診断に応用しようとする試みがなされている。当研究室でも、スカイゾント抗原を用いて患者血球中のT細胞の幼若化反応について調べてみた。抗原特異的な反応は認められたが、診断的意識の確認はまだなされていない。

4) 野外調査への応用

開発されたＥＬＩＳＡ法を用いて、Tolu-Sucre, Villavlencio, Acacias, San Martin および Granada-Metaの各地から集められた752 のサンプル血清について、予備的な疫学的研究を行なうことができた。

5) 生化学的方法による診断法との比較

免疫学的および生化学的方法による診断の検出感度は、ともに同程度であり、現行の顕微鏡による方法の検出感度と同じかやや高い水準である。

6) 将来の展望

本プロジェクトを通じて、技術移転とのその定着については問題がなく、研修を受けたカウンターパートも免疫学部門に高い割合で配置されている。したがって、マラリア診断法の確立ばかりでなく、同じ手法の活用により他の熱帯性感染症に関する研究も大きく発展する可能性が感じられた。

5－2 生化学部門

(1) 要　約

生化学部門に関しては、本プロジェクトで得られた実績は世界のトップレブルのマラリア研究を遂行するに十分なハードのセットアップがなされ、この研究を遂行するのに必要な基本的技術の確立がなされた。当地がマラリアの流行地の一つであることを考えれば、本プロジェクトの貢献は、大であり、将来的にも評価されると思われる。

(2) マラリア研究評価

ＩＮＳの生化学研究室では、遺伝子工学及びタンパク質解析技術を基盤として本プロジェクトの目的遂行をおこなった。現在の、世界のマラリア研究のトップレベルには若干及ばないものの、今後の当地での研究発展の一里塚として十分評価できると思う。これらの仕事が、達成されたのは基盤として重要な基本的技術の確立がＩＮＳ生化学研究室で行われたことの証明だと思う。

この期間中に、マラリア研究の実績として評価できる仕事を、簡単に列挙すると以下の通り。

① Plasmodium falciparum　ＤＮＡの抽出と精製

Plasmodium falciparum のIn-Vitroでの培養系を確立し、それからそのＤＮＡを抽出・精製する系を確立した。

② Plasmodium falciparum ジーン・ライブラリーの作成

クローニングベクターｐＵＣ１８を用いて、Plasmodium falciparum ＤＮＡのEcoR I 断片のジンライブラリーを作成した。

③ Plasmodium vivax　ＤＮＡの抽出と精製

In-Vitroでの培養が難しいPlasmodium vivax　のＤＮＡを抽出・精製する系を確立した。

④ Plasmodium vivax　ジーン・ライブラリーの作成

③で得たPlasmodium vivax　ＤＮＡに基にそのジーンライブラリーを作成した。

⑤ ハイブリダジェーション系の確立

この系を野外調査に使用することも、１つの目的として次のようなヌクレオチドをプローブとしたハイブリダイジェーションの系の確立が検討された。

a) オリゴヌクレオチド

b) Plasmodium falciparum のゲノム

c) クローニングされたPlasmodium falciparum 断片（３８Ｒ、４Ｒ）

d) クローニングされたPlasmodium vivax　断片

⑥ ｃＤＮＡクローニング

Plasmodium falciparum 感染細胞からのｍＲＮＡ→ｃＤＮＡ合成→クローニングを試みた。

(3) 技術援助面での評価

① 研修生の受け入れ

生化学部門よ２名が㈶化学及血清療法研究所（以下化血研と略す）研究開発部で研修を行った。

② 短期専門家派遣

化血研研究開発部坂本信一が３回、ＩＮＳ生化学研究室を訪問し、技術指導を行った。

上記①、②によりＩＮＳ生化学研究室では、化血研のプロトコールが、かなり定着した。現在、マルタ・ゴンザレスさんが化血研で研修中だが、彼女は、基本的な遺伝子組換え技術だけでなく、動物細胞及び酵母での発現系の技術をも修得中である。これは、コロンビアで得られているＤＮＡクローンの解析に有効なものとなると思われる。

(4) ハード（機器）援助評価

このプロジェクトの援助で、今後仕事を遂行するに必要なハード（機器）は十分揃わったし、今後、そのハードの保全維持は、部品供給に相手側の努力を期待することであるが、問題ないように思われる。

(5) 現状と今後の見通しに関して

先にも触れたように、本プロジェクトの援助と、生化学研究室長であるワッサーマン博士の人

間性とサイエンスに対するセンスにより、基本的な遺伝子工学の技術系が、確立できたことは、大いに評価して良いと思われる。それは、今後の研究進展の素地が確立されたものと言える。

次に、コロンビア国での科学研究について今後の見通しを含めてあえて提言すると、

① コロンビア国全体において科学のレベルが低い。つまり現在の世界のトップレベルと比較すると、遺伝子工学とか、ウイルス学に携わっている絶対人数が少ないために、情報の交換の機会および競争意識が共に低いように感じられる。

② 情　熱

この生化学研究室で働く研究者の平均年齢は、若い。この国でトップレベルの学歴を持った集団が国の中央研究機関（ＩＮＳ）に集まっているとすれば、もっと若者としての仕事（サイエイス）に対する情熱が見られても良いのではないだろうか。

５－３　研究内容総合評価

(1) 当初計画策定について

Ｒ／Ｄ　ＭＡＳＴＥＲ　ＰＬＡＮ（1986）（資料Ｉ）によると、このプロジェクトの目的は、マラリア（および熱帯性感染症）診断技術開発に力点をおきつつ、ＩＮＳの研究能力を強化し、コロンビアの公衆衛生の増進に資するということであった。この目的設定はコロンビアにおけるマラリアの重要性および当時のＩＮＳの研究技術水準からみてきわめて適切であったと言える。また現時点で見れば、ＩＮＳの技術水準は飛躍的に向上しており、当初に決められた具体的計画のかなりの部分が実現している（詳しくは下記）ことを考えると、計画は妥当なものであった。

(2) 実施体制について

ＩＮＳにおける現在の研究環境と機材の充実ぶり、その利用のされ方からして、この面の支援（コロンビアおよび日本による）は、有効かつ十分であったと思われる。生化学部やで長期派遣専門家を欠いたことは、この部門で達成された成果からして、少しも妨げになっていない。

(3) 協力の成果

成果の詳細は、ＩＮＳがまとめたReport of Activities Corresponding to the Project "RESEARCH AND DEVELOPMENT OF DIAGNOSTIC TECHNOLOGY ON MALARIA AND OTHER TROPICAL DISEASES"（資料Ⅳ）にあり、またその内容は、調査団とコロンビア側との間で作成したJOINT EVALVATION REPORT(６－２）に要約されている。本プロジェクトの目的は、Ｒ／Ｄ MASTER PLAN（1986）（資料Ｉ）にあるとおり、ＩＮＳに最新研究技術を移し研究能力を強化すること、およびマラリア診断技術を開発することにあり、したがってこれらの二面から協力の成果は評定されるべきである。

まず、技術移転という点では計画どおり達成されたと言える。免疫学および生化学分野の、現在世界中で使われている基本的技術（ＥＬＩＳＡ法、モノクローナル抗体の作成、核酸の抽出純化、核酸のクローン化、核酸の電気泳動、核酸雑種形成法、ｍＲＮＡ抽出とそのｃＤＮＡ化およ

びその発現、DNA塩基配列決定等）は、ほとんどすべてＩＮＳに移転され、加えて研究機材の充実ぶりからすれば、それに付随するほとんどの研究が可能な水準にある。さらに、ＩＮＳ内の他部門研究室あるいはコロンビアの他の研究機関からＩＮＳに対し技術協力と共同研究を要請されており、導入された各種の技術はプロジェクトに参加したＩＮＳ研究室に留るものではない。こうした意味で、技術導入の波及効果は、当初の予想をこえるものであろう。

現プロジェクトの研究対象となったのは二種のマラリア原虫（Plasmodium falciparum と Plasmodium vivax）である。コロンビアで発生する症例が、ほとんどこの二種のどちらかであるという理由で診断技術の開発が見られた。プロジェクト開発時点で、P. falciparum 原虫は赤血球培養で増殖できるようになっておりこの時点は研究開発にとって大きな利点であった。一方、P. vivaxの方は患者血液から原虫を抽出しなければならず、この点がハンディキャップであり、こうした事情は現在も変っていないが、今後の相手側の努力に期待したい。

診断技術開発の基礎となるのは、診断に使う標準的材料を調製することである。開発した技術が広く使われるためには、これらの基礎的材料が容易にかつ必要なだけ得られなくてはならない。必要な基礎的材料とは免疫学的分野では抗原と抗体（モノクローナル）であり、生化学的分野では純化した原虫ゲノムDNAと、検出プロウブとして使える種特異的なクローン化DNA断片である。これらの材料を二種の原虫で調製できるようにし、研究室内で再構成した検体を使って検出の特異性や感度を調べた上で、実際に診断に使えるかどうか野外検体で試みるといった手順で診断法が開発、確立されてゆくのが通常である。こうし視点からプロジェクトで達成されたレベルを要約すると、次のとおりである。

P. falciparum については、免疫学的方法も、生化学的方法も、実用化の一歩手前まできているようにみえる。赤血球培養で増やした原虫の抗原を使って、ＥＬＩＳＡ法で抗体を測定する試みは、野外検体でも成功している。作成したモノクローナル抗体を使って培養血球の抗原を測定してみると、その感度はおよそ他の方法（顕微鏡的あるいは生化学的）に匹敵するものであった。またP. falciparum のゲノムDNAは血球培養からヒトDNAの混入なしで純化され、そのDNAから種特異的な繰りかえし配列を含むDNA断片がクローン化された。クローンのあるものは原虫DNAを探知するプローブとして使えるものであった。培養血球と正常血球をいろいろな比率で混ぜた再構成検体では、50－100 μℓの血液あたり10pgの原虫DNAが探知された。この感度は顕微鏡で血液を１検体につき20分間観察するのに匹敵するものである。

P. vivaxについてはいくつかの問題が残されている。患者血液から調製した抗原を使ってＥＬＩＳＡ法で調べると、野外検体の抗体測定が可能となったが、この系では抗原の供給が限られている。P. vivax抗原に対するモノクローナル抗体はまだ作られていない。患者血液からいろいろな工夫によりP. vivaxDNAが90％の純度で得られたのは大きな進歩であった。この純化DNAから種特異的な繰りかえし配列を含むと思われる vivaxDNA断片がクローン化され（まだ十分性状が調べられていない）、核酸雑種形成法で原虫DNAを探知する目度がたった。探知の感度

はP. falciparum の場合と同程度であると期待される。

以上のごとく、R／D MASTER PLAN (1980) の計画は、P. vivaxの培養の技術的余地はあるもほぼ順調に進められてきたといえる。

(4) 終了時に残された課題

コロンビアにおけるマラリアの疫学的研究を行うのに、P. falciparum とP. vivaxの二種を対象としなくてはならないのであれば、生化学的方法が近い将来実用化されうるであろう。まず現在クローン化さているP. vivaxDNA断片の性状を早急に調べ、野外検体に使えるかどうか決定しなくてはならない。この完成にINSは今後力を注ぐことが期待される。免疫学的方法診断に使うには、まずP. vivax抗原の供給法を確立する必要があり、モノクローナル抗体をつくる必要もある。これについては今後もINSの自助努力により基礎的研究を続けることと期待される。

INSにおける過去の研究の進行をマラリア診断法の開発、確立という視点からみると、かならずしも直線的に、あるいは最短時間で開発を進めてきたとは言い難い部分もある。例えば、mRNAをcDNA化し、さらにその発現をみる研究は、技術導入としての意味は大きく将来必ず役に立つこととはいえ、診断法の実用化のためには、まずvivax DNAのクローン化、実用プローブの完成を急ぐべきであったと思われる。また新たに導入された技術を利用して他の研究室、研究機関との共同研究がいくつか計画されている。このことは技術導入の波及効果として喜ばしいことである。しかし限定された資金と人力をどのような研究にふりむけるかといった考慮なしに研究は実を結ばないのではないかと危惧される面がある。今後こうした研究管理の問題をINSが重視して研究を進めていくことが望まれる。

5－4 プロジェクトの運営管理・実施体制

(1) 組織図及び人員配置

コロンビア国立中央医学研究所 (Instituto Nacional de Salud：以下"INS"という。) の組織図は図1のとおりである。大きく分けると、研究室部門 (Division de Laboratorio Nal. de Salud "Samper Martinez"「サンペール マルテイネス 国立保健研究所」)、特別調査部門 (Division de Investigaciones Especiales)、地方基本衛生部門 (Division de Saneamiento Basico Rural) 及び管理部門 (Division Administrative)の4部門から成っている。

また、研究室部門の詳細組織図を図2、図3に示したが、微生物免疫グループ (Grupo de Micorobiologia e Inmunologia) は、1986年から微生物学グループ(Grupo de Microbiologia)と免疫学グループ (Grupo de Inmunologia) に分割されており、本プロジェクトの直接援助部門は、前記の免疫学グループと生化学グループ (Grupo de Bioquimica)である。

なお、研究室部門の人員配置は表1のとおりであり、総勢390 名となっている。"Professional" というのは学士以上の資格を有する者であり、"Auxiliar"はその他の補助技術者 (清掃員を含む) である。表1の人員配置状況によると、免疫学グループには16名、生化学には10名が

配置されており、この内、本プロジェクトの研究に従事している人員は下表のとおり、免疫学7名、生化学6名であり両グループ人員の半数を占めており、コロンビア側の本プロジェクトに対する熱意がうかがえる。

	免疫学G			生化学G		
	Prof	Auxi	合計	Prof	Auxi	合計
研究室配置人員	9	7	16	5	5	10
プロジェクト従事者	4	3	7	3	3	6

カウンターパート研修員の定着度については、前身プロジェクト（コロンビア中央医学研究助プロジェクト）も含め研修員10名の内、現在、免疫学に4名、生化学に3名が配置され（免疫学及び生化学各1名研修中）、その他、寄生虫グループに1名在職しており、1名は現在産休中、残り1名はＩＮＳを辞職している状況である。

これからも、日本で研修を行い移転され研究技術は、ＩＮＳの免疫学・生化学両グループに定着し、さらに発展しつつあると考えられる。また、日本側専門家の技術指導・運営管理指導、及びＪＩＣＡ研修制度の活用により、総じて、本プロジェクトに関するコロンビア側の運営管理，実施体制が強化され、現状は妥当でありかつ十分なものであったと評価できる。

Personnels working at Division National Laboratory of Health "Samper Martinez", Colombia National Institute of Health, 1989

	Professional (大学卒以上)	Auxiliar (技術者)
1. Direction	1	4
2. Diagnosis, Research and Reference Section	-	2
Biochemistry Laboratory	5	5
Immunology Laboratory	9	7
Microbiology Laboratory	9	4
Entomology Laboratory	4	8
Environmental Health Laboratory	9	11
Parasitology Laboratory	17	9
Pathology Laboratory	6	6
Genetics Laboratory	7	3
Mycobacteriology Laboratory	7	8
Virology Laboratory	9	14
Clinical Chemistry Laboratory	5	2
3. National Laboratory Network	6	7
4. Production Section		
Rabies Vaccine	3	6
Yellow Fever Vaccine	4	9
BCG Vaccine	4	6
DPT Vaccine	4	9
Anti Snake Venom	4	4
Sterilization	-	5
Culture Media	1	8
Packaging	-	10

	Professional	Auxiliar
Oral Rehidration Salts	1	14
5. Analysis Section		
Food	15	9
Drugs and Cosmetics	9	10
Biological Products	5	5
6. Basic Laboratory Services Section	3	39
7. Library	1	10
Total	149	241

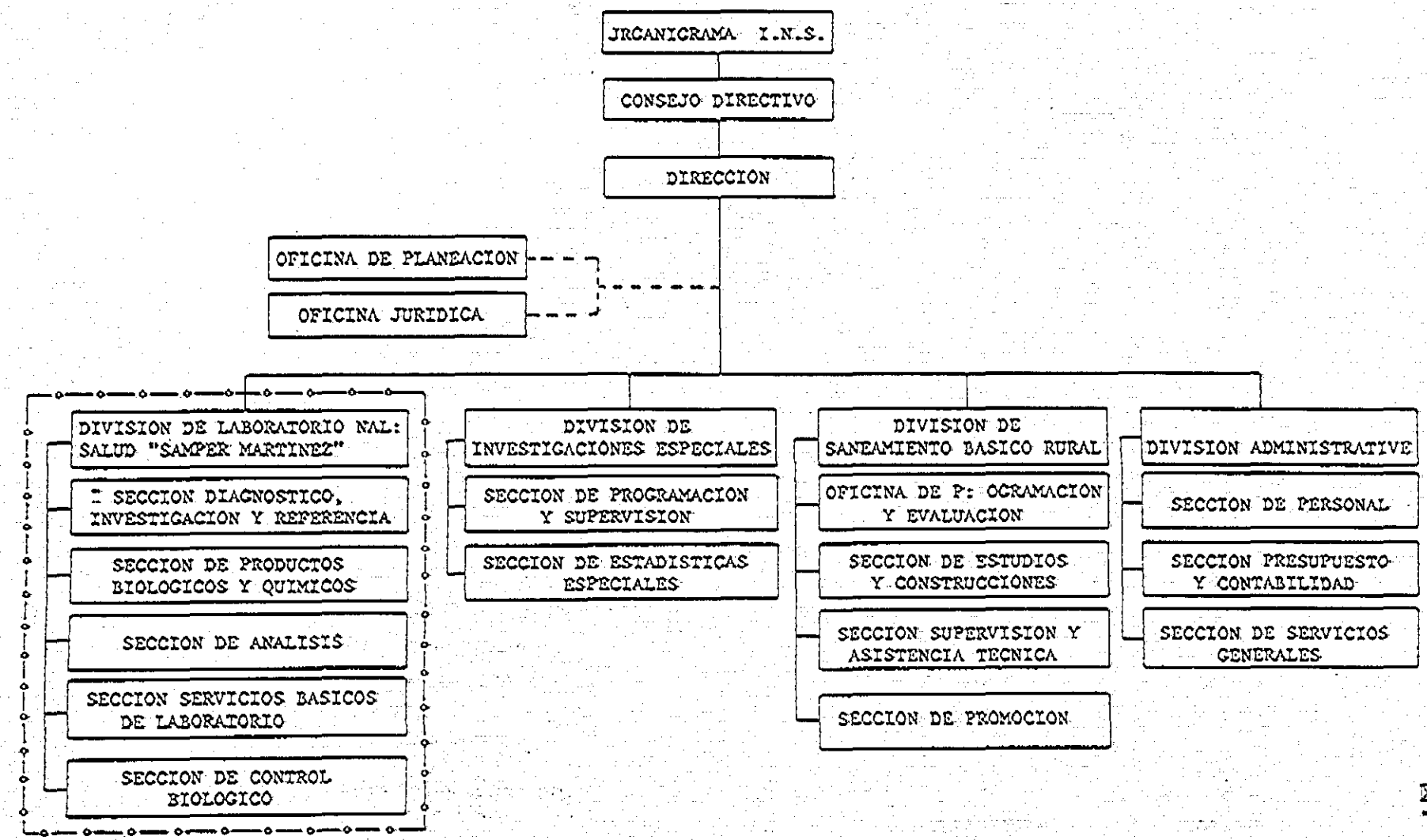
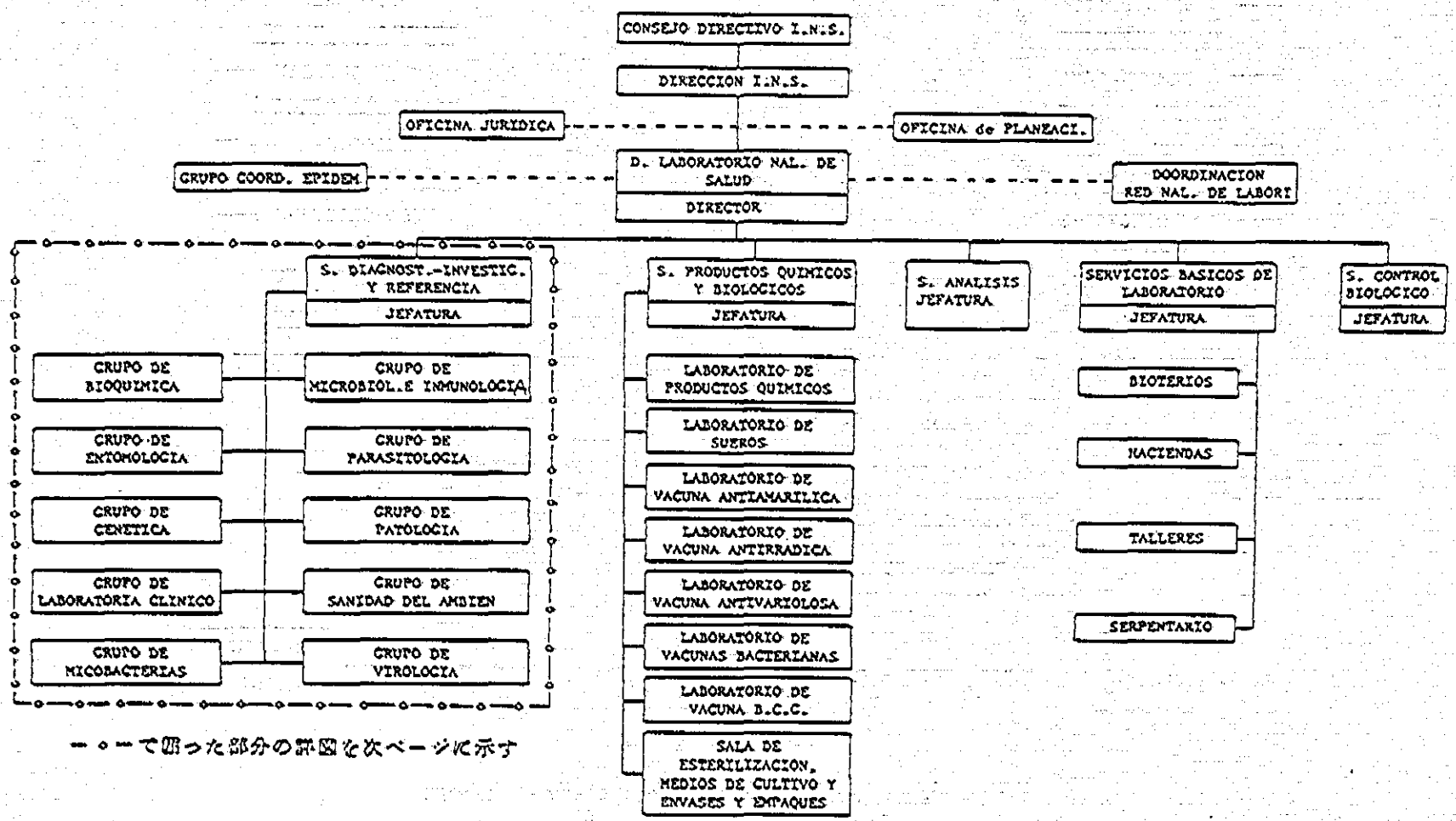


図1

—○—で囲った部分の詳図を次ページに示す

図2

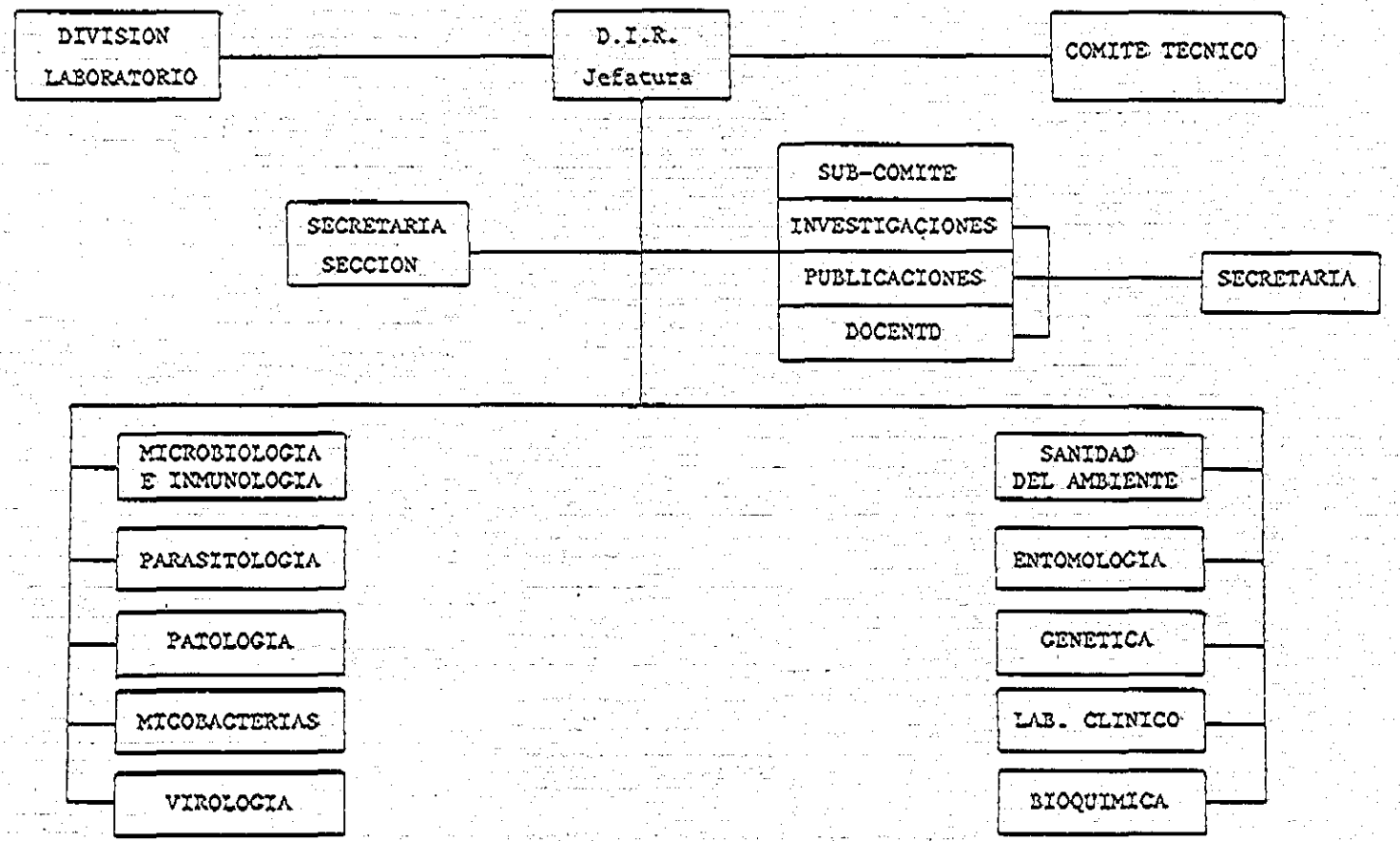
DIVISION LABORATORIO NAL. DE SALUD "SAMPER MARTINEZ"



－・－で囲った部分の詳図を次ページに示す

DIVISION LABORATORIO NATIONAL DE SALUD

SECCION DIAGNOSTICO, INVESTIGACION Y REFERENCIA



(2) 予　算

ＩＮＳの1983年から1988年までの予算は表２のとおりである。これによると、1986年・1987年の予算額（特にOthers）が多いが、これは、ＩＮＳの増改築工事を行なったためとのことである。また、1987年を機に"Fix costs"が急増しているが、これは、1986年まで"Others"に含めていたものを"Fix costs"に移したためでるとのＩＮＳ側の説明があった。それによると、年により何をどの予算項目にするかが異なっているため表２は、解りにくい部分があるがTotal 額は正しいとのことであり、1988年の予算額は3,408,299 千コロンビアペソ（日本円で役1,363,280千円）である。

表３は、本プロジェクトサイトであるＤＲＲ Section（Diagnosis, Research and Reference：図２の"－○－"で囲んだ部分にあたる）と免疫学グループ及び生化学グループの予算である。ＤＲＲ Section は、1988年では、ＩＮＳ総予算額のうち約8.9 %を占め、その内免疫学グループが約6.9 %を、生化学グループが約6.5 %を占めている状況である。

表４は、本プロジェクトの運営管理予算である。これは、免疫学・生化学両グループのみならず、何らかの形で本プロジェクトに係わる全ての経費を含んでいるとのことであるが、1988年でみるとＩＮＳ総予算額の約１%、研究室部門予算の約10%を占めている。

以上のことから、本プロジェクトに対する予算措置は、かなりの割り当てがなされており、実際にも、プロジェクト運営管理に必要かつ十分な予算であったと評価できる。

TABLE 2 (表2)

Colombia National Institute of Health
Annual Budget
(Thousands · Colombia Pesos) (単位 千コロンビアペソ：1989年現在1ペソ＝約0.4円)

Year	1983	1984	1985	1986	1987	1988
Fix costs (1)	181.189	222.453	231.936	277.226	1.566.107	2.042.000
Investment costs (2) National Laboratory of Health	360.629	423.453	568.371	922.482	774.152	702.500
Others	1.463.808	1.179.326	1.407.555	2.851.146	2.623.483	663.700
Total	2.005.626	1.852.232	2.207.862	4.050.854	4.963.742	3.403.200

(1) Fix costs: pay roll. consumables and office equipment,general services (water,electric energy, etc)

(2) Investment costs: reagents and specific laboratory consumables. glassware,laboratory equipment, construction.

TABLE 3 (表3)

National Laboratory of Health "Samper Martínez"
Budget for Diagnosis, Research and Reference Section (DRR),
Biochemistry and Immunology laboratories

(単位：千コロンビアペソ)

Year	1983	1984	1985	1986	1987	1988
FIX COSTS						
DRR Section	78.552	98.192	122.740	153.426	191.783	230.139
Immunology	5.107	6.384	7.980	9.976	12.470	14.964
Biochemistry	6.356	7.945	9.931	12.414	15.518	18.622
INVESTMENT COSTS						
DRR Section	37.866	44.463	59.679	96.860	80.786	73.763
Immunology	2.915	3.423	4.595	7.458	6.256	5.680
Biochemistry	598	703	943	1.530	1.277	1.165
TOTAL						
DRR section	116.418	142,655	182.419	250,286	272,569	303,902 (総予算額の約8.9%)
Immunology	8,022	9,807	12,575	17,434	18,726	20,644 (約6.9%)
Biochemistry	6,954	8,648	10,874	13,944	16,795	19,787 (約6.5%)

TABLE 4 (表4)

National costs involved in JICA project

(Thousands colombian pesos)

(単位：千コロンビアペソ)

Year	1985	1986	1987	1988	1989
Investment counterpart (1)	2.000	5.000	2.000	4.000	5.000
Personnel (2)	13.185	16.480	20.601	25.752	32.190
Other expenses (3)	2.485	1.200	1.750	3.200	-
Total	17.670	22.680	24.351	32.952	37.190

(1) Amount of money specifically devoted to the project

(2) Personnel working full time in the project

(3) Costs involved in customs storage and land freight of equipment and supplies coming from abroad

(3) 供与機材の管理状況

本プロジェクトでは、1986年から1989年までの間に約1億2,200万円の額で機材供与を行なっている。

供与した機材は、全て免疫学・生化学両グループに配置され、有効に活用されている。特に、大型の機材については使用管理台帳が備えつけられ、誰がいつ使用したか記録し管理されていた。試薬類は、試薬棚に整頓管理され、フラスコ・試験管・ピペット等も、毎日洗浄され保管されていた。

以上のとおり、供与機材の管理状況は非常に良好であり、本プロジェクト終了後もこの状態は続くものであると確信された。

6. 合同委員会（Coordinating Committee）の協議

6－1 協議の経緯と概要

コロンビア側との協議は1－3調査日程に記載したとおり、6回にわたって行われ、最終的な総括として6月27日にCoordinating Committeeを開催し、合同評価書(JOINT EVALUATION REPORT)を作成し、日本側コロンビア側双方でサインが交された。その詳細内容については、前項までに述べたので、ここでは、結論のみを以下に簡潔に述べる。

(1) R／Dに記載された主要目標は、日本側コロンビア側の効果的協力により達成された。

(2) プロジェクトの運営に関しても、日本側専門家およびコロンビア側カウンターパートの熱意と努力により適正に実行された。

(3) 本プロジェクトで得られた研究技術は、今後もコロンビア国内のみならず近隣諸国へも波及し、継承されていくものと考えられる。

(4) INSは、今後も研究を継続・発展し、コロンビア国でのマラリアをはじめとする熱帯性感染症の研究・診断技術の中心として活躍することが期待できる。

(5) 本プロジェクトは当初予定どおり、平成元年9月30日を以って終了することとする。

6－2 ジョイントエバリュエーションレポート

JOINT EVALUATION REPORT

ON

THE JAPANESE TECHNICAL COOPERATION

FOR

THE PROJECT ON RESEARCH AND DEVELOPMENT OF DIAGNOSTIC TECHNOLOGY ON MALARIA AND OTHER TROPICAL DISEASES

IN

THE REPUBLIC OF COLOMBIA

JUNE, 1989
BOGOTÁ,
COLOMBIA

MUTUALLY ATTESTED AND SUBMITTED

TO ALL CONCERNED

BOGOTÁ, COLOMBIA

JUNE 27, 1989

Dr. Tetsuro Kataoka
Head,
The Evaluation Team,
Japan International Cooperation Agency,
Japan

Dr. Jorge Michelsen
Director,
National Institute of Health
The Republic of Colombia

I. INTRODUCTION

The Japanese Evaluation Team (hereinafter referred to as "the Team") organized by the Japan International Cooperation Agency (hereinafter referred to as "JICA") and headed by Dr. Tetsuro Kataoka, visited the Republic of Colombia from June 19 to June 29, 1989 for the purpose of evaluating the activities concerning the Project on Research and Development of Diagnostic Technology on Malaria and Other Tropical Diseases (hereinafter referred to as "the Project").

During its stay in the Republic of Colombia, the Team discussed and studied with the Colombian counterparts concerned and the Japanese expert on a number of aspects regarding the progress, performance and results of the Project.

Through careful studies and discussions, the joint evaluation report was summarized in the following chapters.

II. ORIGINAL MASTER PLAN OF THE PROJECT

In accordance with the Record of Discussions signed on July 22, 1986, the project started on October 1, 1986, for the purpose of strengthening research capabilities of the Institute Nacional de Salud (hereinafter referred to as the "INS") with special emphasis on development of diagnostic technology on malaria and other tropical diseases, as a three-year Project, and thus contributing to the promotion of public health in the Republic of Colombia.

In order to attain the above-mentioned objectives, the following activities were to be carried out through dispatch of Japanese experts, acceptance of Colombian personnel for training in Japan and provision of equipment.

(a) Improvement of biochemical techniques on specific detection of malaria.

(b) Improvement of immunological techniques on diagnosis of malaria.

(c) Application of the developed techniques to other tropical diseases prevailing in Colombia.

(d) Application of these techniques to the field studies.

III. IMPLEMENTATION OF THE PROJECT

1. Counterpart training in Japan

(1) Biochemical field

Mr. Juan Crosby was accepted for training on nucleic acid recombination techniques in the Chemo-Sero-Therapeutic Research Institute, Kumamoto for one year from April, 1987.

Ms. Marta González has been accepted for training on recombinant DNA techniques in the Chemo-Sero-Therapeutic Research Institute, Kumamoto for six months since March, 1989.

(2) Immunological field

Mr. Harold Ibagon was accepted for training on fundamental serological diagnostic techniques in the National Children's Medical Research Center, Tokyo for one year from February, 1988.

Ms. Gloria Munera has been accepted for training on diagnostic techniques in cellular immunology in the National Institute of Health, Tokyo for one year since May, 1989.

2. Japanese Expert

(1) Biochemical field

Dr. Shinichi Sakamoto was dispatched to the INS for two weeks in August, 1987.

Dr. Shinichi Sakamoto was dispatched to the INS for two weeks in November, 1988.

Dr. Shinichi Sakamoto has been dispatched to the INS for two weeks in June, 1989.

(2) Immunological field

Dr. Tsuneo Kamiyama was dispatched to the INS for two years from March, 1987.

3. Equipment

Necessary equipment has been provided without any serious shipping trouble since 1986. The total amount of donation will be about Japanese Yen 122,000,000 by September, 1989. The following is the list of main parts of the equipment.

(1) Japanese Fiscal Year 1986

- 4WD vehicle
- High speed refrigerated centrifuge
- Polaroid MP4 system
- Vacuum oven
- Water purifier
- Carbon dioxide incubator
- Inverted microscope
- Electric oven
- Rotor for centrifuge
- Reagents, etc.

(2) Japanese Fiscal Year 1987

- Fast protein liquid chromatography
- Clean bench
- Autoclave
- Electric balance
- Incubator with accessories
- Water bath with accessories
- Electric stimulator
- reagents, etc.

(3) Japanese Fiscal Year 1988

- Gene assembler
- Refrigerated centrifuge
- Laboratory supplies
- Replacement parts for equipment previously donated
- Reagents, etc.

(4) Japanese Fiscal Year 1989

- Ultracentrifuge with accessories

IV. METHODS OF EVALUATION

1. Materials used as reference

In order to evaluate the past performance and achivement quantitatively and/or qualitatively, the following materials are used as basis of reference.

(1) The Record of Discussions
(2) The Tentative Schedule of Implementation
(3) The official request made by the Government of Colombia with respect to Japanese expert services, counterpart training in Japan and provision of equipment by means of A-1, A-2, A-3 and A-4 forms, respectively.
(4) The Minutes of Discussions agreed in the course of the implementation of the Project.

2. Discussion and observation

The Team discussed various aspects of the Project and observed the buildings, machinery, equipment, facilities and utilities made available for the Project.

To recognize the impact and efficiency of the training, discussions were held with counterparts trained in Japan.

V. RESULTS OF EVALUATION

1. Biochemical field

1.1 Collection of nucleic acids

Plasmodium falciparum and *P. vivax* DNAs were successfully purified from the *in vitro* erythrocyte cultures and from patient blood, respectively. *P. falciparum* DNA was virtually free of human DNA , and *P. vivax* DNA was 90% pure (the highest in literature). The purified *P. vivax* was particularlly useful. Because of its difficult purification, it is only available in a few laboratories.

1.2 Cloning of nucleic acids

Specific repeated sequences from *P. falciparum* and *P. vivax* were molecularly cloned in pUC18 from the respective purified DNA samples. Selected clones were characterized in hybridization experiments for possible use for diagnosis.

1.3 Preparation of probes

Radioactive probes were prepared from whole genomic DNA of *P. falciparum*, synthetic DNA and the cloned *P. falciparum* DNA, and were compared for detection of the parasite sequence by hybridization. It was concluded that the cloned DNA is best suited as a probe for this purpose.

1.4 Methods for processing samples

Detection of the parasite DNA sequences with cloned P. falciparum DNA as a probe was tested for DNA extracted from the reconstituted samples (normal blood plus cultured erythrocytes containing parasites). The detection level was 10pg of DNA per 50-100 ul of blood. A practical method for extraction of DNA from mosquitos was established for future field studies.

1.5 Implementation of diagnostic methods

DNA hybridization methods were implemented for the detection of P. falciparum and P. vivax in blood samples and in mosquitos. An immunological method for quantification of antibodies against P. falciparum and P. vivax was established and used, and a monoclonal antibody-based method for detection of P. falciparum soluble antigens was preliminarily tested. Furhter laboratory studies are needed before this method is tested in the field.

As to P. vivax, DNA hybridization will be the only feasible method for epidemiological studies in the near future.

2. Immunological field

2.1 Preparation and antigenic analysis of parasite

Schizont fractions have been obtained from the culture of a Colombian isolate of P. falciparum and the peripheral blood of

patients infected with P. vivax. The fractions were used as antigens in an ELISA assay and antigen-specific blastogenic response. Immunological characteristics of the antigen were analyzed by the use of monoclonal antibodies.

2.2 Monoclonal antibody production

A section for hybridoma study has been established in the Immunology group of the INS for the Project. Several hybridoma cell lines producing anti-malaria antibody have been obtained. Finally, two monoclonal antibodies against P. falciparum schizonts were well-characterized and chosen for immunological studies in the Project.

2.3 Development of serological and immunological diagnostic methods

An improved ELISA method was developed by the use of avidine and biotine labelled reagents. This method was simple and able to detect antibodies in 10 ul of the patients' blood. Using the two monoclonal antibodies obtained, a sandwich-ELISA was established and applied successfully to detect soluble antigens of P. falciparum in patients' sera.

2.4 Field study

The ELISA method developed has been successfully applied to epidemiological studies using 752 samples of sera collected at Tolu-Sucre, Villavicencio, Acacias, San Martin and Granada-Meta.

2.5 Comparison with biochemical approach

Sensitivities of diagnostic methods by biochemical and immunological approaches have reached the level of microscopic assay.

3. Technical cooperation

3.1 Training of Colombian personnel in Japan

Four Colombian counterpart personnel of the INS have been or are being trained in Japan. They worked hard and have accquired all necessary techniques in the course of the training. It has been noted that they played a very important role in attaining the objectives of the Project.

3.2 Dispatch of Japanese experts

One long-term expert and three short-term experts were dispatched to the INS. They worked very closely with Colombian counterparts in all lines of activities. It has been noted that all the assigned experts made their best efforts in order to attain the main goal of the Project.

3.3 Provision of machinery and equipment

The laboratories of immunology and biochemistry in the INS were fully equipped with the most modern appliances. The provision of equipment is sufficient for the INS to function as a Centre of Research and Development of diagnostic technology.

Colombian counterparts are capable of operating the machinery and equipment, all of which are under proper conditions.

3.4 Colombian efforts for the implementation of the Project

The INS provided the laboratories, the manpower and the budget in order to ensure the best proficiency of the Project.

VI. CONCLUSION

1. The main goal of the cooperation programme stated in the Record of Discussions and other pertinent papers has been fully attained, largely due to efforts of the Colombian counterparts with the efficient cooperation of the Japanese experts.

2. It has been noted that all assigned Japanese experts and Colombian counterparts showed genuine interest and exerted all possible efforts for the eventual self-reliant operation of the Project.

3. The current techniques dealing with nucleic acids and monoclonal antibodies have been fully transferred to the INS laboratories. Successful cloning of specific repeated DNA sequences of P. falciparum and P. vivax will give essential tools in the near future to the people studying epidemiology of malaria both in Colombia and in other neighbouring countries.

4. The INS laboratories will not only continue and develop their researches, but also function as a centre to spread these new techniques, which are now important for clinical and basic studies on tropical diseases, to other laboratories and Institutes in Colombia.

5. In conclusion, both sides agreed that the Project should be terminated on September 30, 1989 as originally scheduled.

資　料

資料1. 討議議事録

RECORD OF DISCUSSIONS
BETWEEN THE JAPANESE IMPLEMENTATION SURVEY TEAM AND THE AUTHORITIES CONCERNED OF THE GOVERNMENT OF THE REPUBLIC OF COLOMBIA ON THE JAPANESE TECHNICAL COOPERATION FOR THE PROJECT ON RESEARCH AND DEVELOPMENT OF DIAGNOSTIC TECHNOLOGY ON MALARIA AND OTHER TROPICAL DISEASES

The Japanese Implementation Survey Team (hereinafter referred to as "the Team") organized by the Japan International Cooperation Agency (hereinafter referred to as "JICA") and headed by Dr. Tohru Tokunaga visited the Republic of Colombia from July 14 to July 24, 1986 for the purpose of working out the details of the technical cooperation program concerning the Project on Research and Development of Diagnostic Technology on Malaria and Other Tropical Diseases.

During its stay in the Republic of Colombia, the Team exchanged views and had a series of discussions with the Colombian authorities concerned in respect of the desirable measures to be taken by both Governments for the successful implementation of the above mentioned project.

As a result of the discussions, both parties, taking account of the provisions of the Agreement on Technical Cooperation between the Government of Japan and the Government of the Republic of Colombia signed on December 22, 1976, agreed to recommend to their respective Governments the matters referred to in ... document attached hereto.

Bogotá, July 22 , 1986

Dr. Tohru Tokunaga
Head of Implementation Survey Team
Japan International Cooperation Agency, JAPAN

Dr. Efraim Otero Ruiz
Minister for Health,
The Republic of Colombia

CESAR VALLEJO MEJIA
Head of the
National Department of Planing
The Republic of Colombia

Dr. Luis Fernando Duque
Director of National Institute of Health,
The Republic of Colombia

ATTACHED DOCUMENT

I. COOPERATION BETWEEN BOTH GOVERNMENTS

1. The Government of Japan and the Government of the Republic of Colombia will cooperate with each other in implementing the Project on Research and Development of Diagnistic Technology on Malaria and other Tropical Diseases (hereinafter referred to as "the Project") for the purpose of strengthening research capabilities on tropical diseases and thus contributing to the promotion of public health in the Republic of Colombia.

2. The Project will be implemented in accordance with the Master Plan which is given in Annex I.

II. DISPATCH OF JAPANESE EXPERTS

1. In accordance with the laws and regulations in force in Japan, the Government of Japan will take necessary measures through JICA to provide at its own expense services of the Japanese experts as listed in Annex II. through the normal procedures under the Technical Cooperation Scheme of the Government of Japan.

2. The Japanese experts referred to in 1. above and their families will be granted in the Republic of Colombia the privileges, exemptions and benefits in accordance with the provisions of the Agreement on Technical Cooperation between the Government of Japan and the Government of the Republic of Colombia signed on December 22, 1976 (hereinafter referred to as "the Agreement").

III. PROVISION OF MACHINERY AND EQUIPMENT

1. In accordance with the laws and regulations in force in Japan, the Governemnt of Japan will take necessary measures through JICA to provide at its own expense such machinery, equipment and other materials (hereinafter referred to as "the Equipment") necessary for the implementation of the Project as listed in Annex III. through the normal procedures under the Technical Cooperation Scheme of the Government of Japan.

2. The Equipment will become the property of the Government of the Republic of Colombia upon being delivered C.I.F. to the Colombian authorities concerned at the ports and/or airports of disembarkation, and will be utilized exclusively for the implementation of the Project in consultation with the Japanese experts referred to in Annex II.

IV. TRAINING OF COLOMBIAN PEERSONNEL IN JAPAN

1. In accordance with the laws and regulations in force in Japan, the Government of Japan will take necessary measures through JICA to receive at its own expense the Colombian personnel connected with the Project for technical training in Japan through the normal procedures under the Technical Cooperation Scheme of the Government of Japan.

2. The Government of the Republic of Colombia will take necessary measures to ensure that the knowledge and experience acquired by the Colombian personnel from technical training in Japan will be utilized effectively for the implementation of the Project.

V. SERVICES OF COLOMBIAN COUNTERPART AND ADMINISTRATIVE PERSONNEL

1. In accordance with the laws and regulations in force in the Republic of Colombia, the Government of the Republic of Colombia will take necessary measures to secure at its own expense the necessary services of Colombian counterpart and administrative personnel as listed in Annex IV.

2. The Government of the Republic of Colombia will allocate the necessary number of suitable qualified personnel corresponding to each Japanese expert to be dispatched by the Government of Japan as specified in Annex II. for the effective and successful transfer of technology under the Project.

VI. MEASURES TO BE TAKEN BY THE GOVERNMENT OF THE REPUBLIC OF COLOMBIA

1. In accordance with the laws and regulations in force in the Republic of Colombia, the Government of the Republic of Colombia will take necessary measures to provide at its own expense:

   (1) Land, buildings and facilities as listed in Annex V;
   (2) Supply or replacement of machinery, equipment, instrument, vehicles, tools, spare parts and any other materials necessary for the implementation of the Project other than those provided through JICA under III. above;
   (3) Transportation facilities and travel allowance for the official travel of Japanese experts within the Republic of Colombia including daily transportation between their residence and working site;
   (4) Suitably furnished accommodations for the Japanese experts and their families.

2. In accordance with the laws and regulations in force in the Republic of Colombia, the Government of the Republic of Colombia, through the executing agency will bear:

   (1) Expenses necessary for the transportation of the Equipment within the Republic of Colombia as well as for the installation, operation and maintenance thereof;
   (2) All running expenses necessary for the implementation of the Project.

3. Customs duties, internal taxes and any other charges, imposed on the Equipment in the Republic of Colombia will be dealt with, in accordance with the provisions of the Agreement.

VII. ADMINISTRATION OF THE PROJECT

1. The Minister for Health will bear overall responsibility for the implementation of the Project.

2. The Director of National Institute of Health of the Republic of Colombia, as the Head of the Project, will be responsible for the administrative and managerial matters of the Project.

3. The Japanese Team Leader will provide necessary recommendation and advice on technical and administrative matters concerning the implementation of the Project to the Head of the Project.

4. The Japanese experts will give necessary technical guidance and advice to the Colombian counterpart personnel on matters pertaining to the implementation of the Project.

5. For the effective and successful implementation of the Project, a Coordinating Committee will be established with the functions and composition as referred to in Annex VI.

VIII. CLAIMS AGAINST JAPANESE EXPERTS

The Government of the Republic of Colombia undertakes to bear claims, if any arises, against the Japanese experts engaged in the Project resulting from, occurring in the course of, or otherwise connected with the discharge of their official functions in the Republic of Colombia except for those arising from the willful misconduct or gross negligence of the Japanese experts, in accordance with the provisions of the Agreement.

IX. MUTUAL CONSULTATION

There will be mutual consultation between the two Governments on any major issues arising from, or in connection with this Attached Document.

X . TERM OF COOPERATION

The duration of the technical cooperation for the Project under this Attached Document will be three (3) years from October 1st, 1986.

However, there will be a general review by the Coordinating Comittee on the progress of the implementation of the Project during the second year of the cooperation period in order to assess whether the term of cooperation should be modified for the successful implementation of the Project.

ANNEX I.

MASTER PLAN

1. Objectives of the Project

The Project aims to strengthen the research capabilities of the National Institute of Health with special emphasis on development of diagnostic technology on malaria and other tropical diseases prevailing in the Republic of Colombia.

2. Implementation of the Technical Cooperation

The Government of Japan will cooperate with the Government of the Republic of Colombia in carrying out the Project through dispatch of Japanese experts, acceptance of Colombian personnel for training in Japan and provision of equipment, according to the tentative annual implementation schedule.

3. Activities under the Project

(a) Improvement of biochemical techniques on specific detection of malaria.
(b) Improvement of immunological techniques on diagnosis of malaria.
(c) Application of the development techniques to other tropical diseases prevailing in Colombia.
(d) Application of these techniques to the field studies.

ANNEX II.

JAPANESE EXPERTS

1. Team leader

2. Experts in the fields of:

   (1) biochemistry
   (2) immunology
   (3) other related fields mutually agreed upon as necessary

ANNEX III.

LIST OF EQUIPMENT

Machinery, equipment and materials for activities in the fields of:

(1) biochemistry
(2) immunology
(3) other related fields mutually agreed upon as necessary

ANNEX IV.

LIST OF COLOMBIAN COUNTERPART AND ADMINISTRATIVE PERSONNEL

1. Head of the Project

2. Counterpart personnel in the fields of:

   (1) biochemistry
   (2) immunomogy
   (3) other related fields mutually agreed upon as necessary

3. Administrative personnel

   (1) administrator
   (2) accountant
   (3) other necessary supporting staff

ANNEX V.

LIST OF LAND, BUILDINGS AND FACILITIES

1. Land of the National Institute of Health

2. Buildings and facilities

   (A) adminsitrative building

      (a) team leader's room
      (b) rooms for experts
      (c) offices for staff
      (d) other rooms as required

   (B) laboratory

   (C) library

   (D) animal house

3. Pilot study areas and collaborating institutions

ANNEX VI.

COORDINATING COMMITTEE

1. Functions

The Coordinating Committee will meet in principle once a year and whenever necessity arises, and work:

(1) To formulate the annual work plan of the Project in line with the Tentative Schedule of Implementation formulated under the framework of this Record of Discussions;
(2) To review the overall progress of the Project as well as the achievements of the above-mentioned annual work plan;
(3) To review and exchange views on major issues arising from or in connection with the Project.

2. Composition

(1) Chairman: Director of National Institute of Health
(2) Members:

Colombian side:
a) Head of Group of Biochemistry (Project Manager)
b) Head of Group of Immunology
c) Representative of Office for International Affairs and Organizations, Ministry of Health
d) Representative of National Department of Planning
e) Other experts of National Institute of Health, as necessary

Japanese side:
a) Team leader
b) Experts
c) Other experts and personnel concerned to be dispatched by JICA, as necessary
d) Resident Representative of JICA Office

Note: Officials of the Embassy of Japan may attend the Coordinating Committee as observers.

資料II. 暫定協力計画

TENTATIVE SCHEDULE OF IMPLEMENTATION OF THE PROJECT ON RESEARCH AND DEVELOPMENT OF DIAGOSTIC TECHNOLOGY ON MALARIA AND OTHER TROPICAL DISEASES

The Japanese Implementation Survey Team and the Colombian authorities concerned have jointly formulated the Tentative Schedule of Implementation of the Project as annexed hereto.

This has been formulated in connection with the Attached Document of the Record of Discussions signed between the Japanese Implementation Survey Team and the Colombian authorities concerned for the Project on Research and Development of Diagnostic Technology on Malaria and Other Tropical Diseases on the condition that necessary budget will be allocated for the implementation of the Project by both sides, and that the Schedule is subject to changes within the framework of the Record of Discussions when necessity arises in the course of implementation of the Project.

Bogota, July 22, 1986

Dr. Tohru Tokunaga
Head of Implementation Survey Team,
Japan International Cooperation Agency,
JAPAN

Dr. Efraim Otero Ruiz
Minister for Health
The Republic of Colombia

DR. CESAR VALLEJO MEJIA
Head of the
National Department of Planning
The Republic of Colombia

Dr. Luis Fernando Duque
Director of National Institute of Health,
The Republic of Colombia

Annual Implementation Plan for the Project
on Research and Development of Diagnostic Technology on Malaria and Other Tropical Diseases in Colombia

	1986	1987	1988	1989
		FIRST YEAR	SECOND YEAR	THIRD YEAR
Survey Team	Implementation	Planning and Consultation		Evaluation
Counterpart Training in Japan		Biochemical research 1) 2) Immunological research (2~3)	1) 2) (2)	
Japanese Expert		Biochemical research 1) 1) Immunological research 2) 2)	1) 2)	1) 2)
Equipment		Described in following pages		

1) Biochemical Research and Development of Diagnostic Technology on Malaria

	1986	1987 FIRST YEAR	1988 SECOND YEAR	1989 THIRD YEAR
1. Research Program a) Collection of DNA b) Production of specific probe c) Hybrydization -detection d) Cloning of cDNA e) Field work f) Gene expression	a) —— b) —— c) —— d) —— e) —— f) ——			
2. Target of Annual Activity		Productipn of genomic and cDNA library Identification of target	Analysis of target gene Production and hybridization of probe	Complementation of diagnostics Application in field
3. Counterpart Training in Japan		Basic technology DNA, RNA from Plasmodium Preparation of gene library Chemical synthesis of DNA		Methodology Synthesis and cloning of DNA Hybridization-detection Standardization of the test Gene expression
4. Japanese Expert		Planning	Methodology Production of probe Hybridization-detection method Gene expression system	Methodology Expression
5. Equipment		High speed refrigerated centrifuge. Polarpid MP4 system Vaccum oven Safety Cabinet and clean bench Refrigerated microcentrifuge Microcomputer HPLC (High prosesure liquid chromatography)		

2) Immunological Research and Development of Diagnostic Technology on Malaria

	1986	1987	1988	1989
	FIRST YEAR		SECOND YEAR	THIRD YEAR
1. Research Program a) Preparation of antigen b) Establisment of infection system in Aotus monkey c) Analysis of target antigen by immunological and biochemical methods d) Development of immunological diagnostic method e) Application to the field f) Comparison with biochemical diagnostic method g) Adoption to field condition h) Application to other tropical diseases	a) b) c)	d)	e) f)	g) h)
2. Target of Annual Activity	Purification of antigen Monoclonal antibody production. Cellular response in infected monkey	Standarization of sero-and immunological diagnostic methods. Pilot study for field research. Comparison with biochemical approach		Field application Other tropical diseases
3. Counterpart Training in Japan				
4. Japanese Expert				
5. Equipment	Immunology: Ultra low freezer Low freezer N2 container CO2 incubator	Iso rack Refrigerated microcentrifuge Cell harvester Photocopier		

資料Ⅲ．供与機材実績

コロンビア国マラリア等熱帯性感染症診断技術開発プロジェクト　昭和61年度供与機材

番号	品名及び仕様	メーカー名	数量	番号	品名及び仕様	数量
1	高速冷却遠心機	日立工機㈱		1.	車両本体	
①	SCR20BA 110V,50Hz		1		コロンビア国向けトヨタランドクル	
②	ロータ				ーザーハードトップタイプ	
1)	RPR20-2　アングルロータ		1		MODEL: FJ70LV-KR	1台
2)	RPR20-3　〃		1		(仕様)ガソリンエンジン (3,955cc)	
3)	RPR16　〃		1		ショートホイールベース	
4)	RPR12-2　〃		1		4速マニュアルフロアシフト	
5)	RPRS3-3　スイングロータ		1		左ハンドル	
③	RPRS3-3用 チューブラック				定員5名	
イ)	GR(4ケ組)		1		ブーストベンチレーター	
ロ)	YE(4ケ組)		1		エアコンディショナー	
ハ)	OR(4ケ組)		1		ファン&カップリング	
④	遠心用チューブ				オーナーズマニュアル(英3)	
1)	50PPボトル組(10ケ入)		20		パーツカタログ(英3)	
2)	50PCボトル組(10ケ入)		20		リペアマニュアル(英3)	
3)	7PCチューブ(10ケ入)		40		冷蔵庫29ℓ付	
4)	80PCボトル (10ケ入)		20		他	
5)	300PCボトル (10ケ入)		10			
6)	C2-PPキャップ(20ケ入)		20			
2	冷却遠心機	日立工機㈱		2.	スペアパーツ(車両本体の10%)	1台分
①	日立05PR-22		1			
	110V, 50Hz				TOTAL	1台
②	ロータ RT3S3		1			
③	チューブラック					
1)	GR(4ケ組)		1			
2)	YE(4ケ組)		1			
3)	OR(4ケ組)		1			

番号	品名及び仕様	メーカー名	数量
1	電子タイプライター	ブラザー	
	EM-501(100V)トランス付		1
	デイジーホイール		
	1) ブルーアム10		1
	2) ブルーアム12		1
	3) ブルーアム15		1
	4) ローリPS		1
	5) レターゴシック12		1
	印字リボン		
	コレクタブルカーボンリボン		10
	訂正リボン		
	リフトオフコレクション		
	テープ(2ケ入)		5
	パソコン接続用インター		
	フェイス(ケーブル付)		1
	IF-300		
2	純水製造器 MILLI-Q	MILLI-PORE	1
	交換用カートリッジ		
	1) ミリスタック(1ケ入)		2ケ
	MSGS05CKJ		
	2) イオン交換カートリッジ		2箱
	(2ケ入)CPMB01202		
	3) スーパー活性炭カートリッジ		4ケ
	(1ケ入)CDFC0120J		
	4) ライフガードプレフィルター		3ケ
	(1ケ入)CP150100J		
	5) 貯水タンク20 1		1台
	ZRJK20LTK		
	6) 専用架台ZRJKSTDOA		1台
4	遠心管	ベックマン	
	ベックマンSOTIローター用		40
	ボトルアッセンブリ		
	同上用キャップ№335257		

番号	品名及び仕様	メーカー名	数量
5	冷却微量高速遠心機	トミー	
	トミーMR・150		2
	(110V50Hz)		
	ローター		
	1) TMA-2(15ml×12)		2
	2) P.Pチューブ15ml		2箱
	500本入		
7	安全キャビネット		
	クラスII MIP-740P	フォーマ	1
	プロパンガスバーナー付	CCI	
	真空配管		
	作業用コンセント付(6m)		
	吸引器, シュアびん付		
	ホルムアルデヒドガス消毒器		
	JF20型	城東理化	1
	キャビネット用交換 フィルター		
	1) 循環用		2枚
	2) 排気用		1枚
8	ピペット洗浄器	ヤマト科学	
	超音波, ヤマトAW-31		2
	トランス付		
9	炭酸ガス培養器		1式
	タバイBNA-110	タバイ・エスペック	
	特別付属品		
	CO^2空ボンベ30kg用		1本
	ボンベ架台		1台
	圧力調節器		1ケ
	本体架台		1台
10	倒立顕微鏡		
	ニコンTHD セット1	ニコン	1
	基本観察セット		
	手術ハロゲンランプ10ケ付		
11	恒温水そう		
	ヤマト BZ-21 水そう	ヤマト科学	3
	ヤマト BF-21 ヒーター		
	トランス付		

番号	品名及び仕様	メーカー名	数量
12	PHメーター	日立・堀場	1式
	EHO-14, ディジタル		1
	日立堀場 F-8E型		
	電極(複合・本型)		
	6326-06C型		2
	PH標準粉末(PH4, PH688		各10
	PH922)		
13	超音波洗浄器	ヤマト科学	
	ブランソンLTH-1620-24		
	トランス付		
14	ヴォルテックスミキサー	エム・エス	
	550G型		4
15	ピペットエイド		
	充電式(例:ドラモント		
	PA400型)		8
16	アイソラック		
	スチール製 1SK-2型		2
	交換用エアフィルターケージ		2組
	1) マウスケージ(TPX) KA-1型		50
	2) 同上用ステンレスふた		30
	3) 給水ビン(金属ノズル付)		
	KH-2型		40
17	バキュームオーブン	ヤマト科学	
	ヤマト DP-32T		1
	真空ポンプ PD-200型		
	真空ホース M5付		2
18	セルハーベスター	ギルソン	1式
	Model 7020, 3インレット		
	2アウトレット		
	1) サクションユニット7051		1
	2) フィルターマット100枚入 7031		2
	3) プライメント 7035		1
	4) フィルターディスク		1
	トランスファーシステム 7060		
19	ケスピレーター	ヤマト科学	
	ヤマトWP-15 トランス付		1

番号	品名及び仕様	メーカー名	数量
20	電子レンジ	日立	
	家庭用(中型)		1
	MR-9000HR(120V)		
21	精密はかり	ヤマト科学	
	ヤマトUO-1560SD 分銅付		1
22	コロニーカウンター	ヤマト科学	
	ヤマト CC-21		1
	特別付属品:		1式
	クルフヒューグル方 平円板		10枚
	マイラー方円板		10枚
	アダプターリング		4枚
	アダプターリング		1枚
	けい光板		1ケ
23	ファインダー	ニコン	
	用クエストベルトDW-		1
24	接写レンズ		
	マイクロニッコール55mm F2.8S		1
	接写リングPK-13		1
25	DNA電気泳動装置		
	バイオラド仕様	Bio-Rad	
	1) 標準型 170-4306		
	2) ミニ 170-4307		
	3) ワイド 170-4343		
26	遠心機ローター	ベックマン	1式
	ベックマン45Ti, Cat.339160		1
	ボトル アッセンブリCat.34291		30
	同上用キャップ №339165		30
28	パソコン用AVR電源安定装置		
	(115V)		1
29	電気泳動 プロットシステム	セントラル科学	
	HOEFER		
	1) プレート洗浄そう SE-100型		1
	2) そう泳動そう SE-250		2
	3) ゲル作製器 SE-215		1
	4) 染色ジェーカー PR-50		1
	5) ゲル乾燥器 SE-540		1
	6) トランスファーユニットTE-22		1

番号	品名及び仕様	メーカー名	数量
	7) パワーサプライ PS-250		1
	8) ハイブリダイゼーション キット PR-800		1
	9) ハイブリダイゼーション キット PR-800-4		1
	10) ミクロフイルトレーション バイオラド	Bio-Dot	1
	11) インキュベーション トレイ (小型) 170=4041		1
	12) 同上用フタ (小型) 170-4045		1
30	ポラロイド写真システム	ポラロイド	
	1) MP-4 電気泳動保革型		1セット
	2) 同上用フイルム, 白黒, ASA1000, T667		100 200 パック
31	小型回転培養器	大洋サービス	
	1) PT-50 (S=50rpm) トランス付		1
	2) ホルダー		
	イ) 18×110mm用A型		1
	ロ) 25×110mm用B型		1
	ハ) 用C-100型		1
	ニ) 25×50mm バイアル用D型		
32	ハイブリパック	コスモバイオ㈱	
	1) MOC S1001 50枚/1袋		10袋
33	細胞培養用プラスチック器具	栄研化学	
	1) メッキン・シャーレ (500枚/箱)		5箱
	2) 60mmシャーレ Cat.25010	イワキガラス	1箱
	3) 25mm² フラスコ Cat.25100(300/)	イワキコーニング	2箱
	4) 75cm² フラスコ Cat/25110(100/)		1箱
	5) プレート 12-Well Cat.25815(50/)		1箱
	6) プレート 24-Well Cat.25820(50/)		5箱
	7) プレート 76-Well Cat.25860(50/)	イワキガラス	5
	8) プレート ½-96-Well Cat.25870(50/)	イワキガラス	5箱
	9) 試験管 16×125 Cat.25200(500/)		2箱
	10) 遠心管 15ml Cat.25317(500/)		5箱
	11) 遠心管 50ml Cat.25331		5箱
	12) クライオチューブ 1ml Cat.25701(500/)		2箱
	13) クライオチューブ 2ml Cat.25702(500/)		2箱
	14) フイルターデイスポ Cat.25925(12/)		10箱
	15) フイルターシリンジ Cat.25901(100/)		5箱
	16) ピペット 1ml 1000/箱 7075		3箱
	17) ピペット 5ml 200/箱		15箱
	18) ピペット 25ml 200/箱7525	フアルコン	5箱
	19) 試験管フアルコン 2051 500/箱		2箱
	20) 試験管フアルコン 2054 500/箱		2箱
34	細胞培養用ガラス器具	イワキガラス	
	1) パスツールピペット (1000本入) Cat.7095B-146		4箱
	2) パスツールピペット (1000本入) Cat.7095B-229		4箱
	3) シーテイピペット 1ml Cat.EP-ST-1		100本

番号	品名及び仕様	メーカー名	数量
	4) シェーテイピペット 2ml		100本
	Cat.EP-ST-2		
	5) シェーテイピペット 5ml		150本
	Cat.EP-ST-5		
	6) シェーテイピペット		150本
	Cat.EP-ST-10		
	7) シェーテイピペット 25ml		100本
	Cat.EP-ST-25		
35	ろ過器材	ザートリウス	
	1) ポータフイルター		10箱
	13mm SM1654E112入		
	2) ポータフイルター		10箱
	25mm SM16517E12入		
	3) ポリカーボろ過器	ナルゲン	2ケ
	250ml SM165-10		2ケ
	4) ろ過膜 13mm 03μ	東洋ろ紙	100枚
	5) ろ過膜 25mm 03μ		100枚
	6) ろ過膜 47mm 03μ		100枚
	7) ガラスプレフイルター13mm用		100枚
	8) ガラスプレフイルター25mm用		100枚
	9) ガラスプレフイルター47mm用		100枚
36	ピペットカン		
	1) ステンレス製 長さ25cm		10本
	2) ステンレス製 長さ35cm		10本
37	マイクロピペット(ヤンキー型)		
	1) 1-5μl Cat.4614	クレイアダムス	
	1000本/箱		1箱
	2) 10μl Cat.4616		1箱
	1000本/箱		
	3) 25μl Cat.4619		1箱
	1000本/箱		
	4) 50μl Cat.4625		1箱
	1000本/箱		
	5) 100μl Cat.4625		1箱
	1000本/箱		
38	試験管	イワキガラス	
	Cat.99445 10×75 1000本/箱		3箱

番号	品名及び仕様	メーカー名	数量
39	ピペッター	ギルソン	
	1) ピペットマン P-20		5
	2) ピペットマン P-200		3
	3) ピペットマン P-1000		3
	4) ピペットマン P-5		2
	5) ピペットマンホルダー		3
	6) リペットマン R-1000		2
	7) マイクロマン M-25		2
	8) マイクロマン M-50		2
	9) マイクロマン M-250		2
	10) マイクロマンキャピラリー		3
	200本/箱		
	11) マイクロマンキャピラリー		3
	CP-50 200本/箱		
	12) マイクロマンキャピラリー		3
	CP-250 200本/箱		
	13) ピペットマンラック付チップ		10
	C20/JJ 1000入ギルソン		
	14) ピペットマンラック付チップ		3
	C200/TB 1000入		
	15) タイターテック可変型	大日本製薬	2
	12チャンネル		
	5-50μl フロー		
	16) タイターテック可変型		2
	12チャンネル50-20μl		
	17) フインピペットデジタル可変		3
	ラブシステム 5-40μl		
	18) フインピペットデジタル可変		3
	40-200μl		
	19) フインピペットデジタル可変		3
	200-1000μl		
	20) パイポンプ 2ml	クラスフイン	2
	21) パイポンプ 10ml		2
	22) デイスペンサー 100S	住友ベークライト	3
	23) フインチップ・61	ラブシステム	5袋
	(200本/袋)		

番号	品名及び仕様	メーカー名	数量
	24) クオリティーチップ	クオリティ	
	Cat.105(1000本/袋)		40袋
	25) クオリティチップ		10ケ
	Cat.110c=96-RB		
	26) チップキャリアー	大日本製薬	10ケ
	54(P)Cat.61-214-00		
	27) S100用シリンジ20	住友ベークライト	10袋
	100本/袋		
	28) S100用シリンジ30		10袋
	100本/袋		
	29) S100用シリンジ40		10袋
	100本/袋		
40	活せん付丸型びん		
	ポリエチレン製, ポリプロピレン活せん		
	1) 広口 21		5ケ
	2) 細口 51		5ケ
41	三方コック	ナルゲン	
	ポリプロピレン製,		
	テフロン活せん, 4mm		
	ナルゲン		4
42	ラック	ナルゲン	
	1) ナルゲン		
	5930-13/16 4ケ/箱		2箱
	2) ナルゲン		
	5930-25/30 4ケ/箱		2箱
	3) ナルゲン		
	5931-10/13 4ケ/箱		2箱
	4) ナルゲン		
	5931-13/16 4ケ/箱		2箱
	5) ナルゲン		
	5931-16/20 4ケ/箱		2箱
43	リンプルチューブ	エッペンドルフ	
	1) エッペンドルフ 3810		
	1.5ml フタ付1000入		5箱
	2) エッペンドルフ 3813		
	0.7ml フタ付1000入		1箱
	3) チューブキャリアー1.5ml用		8ケ

番号	品名及び仕様	メーカー名	数量
44	ELISA	ヌンク	
	1) ヌンクイムノウオッシュー8		2組
	名470173		
45	パラフイルム		
	パラフイルムM 12ケ/組		1箱
46	チューブ		
	1) タイコン(理化学用)		
	1/16×1/8		50
	2) タイコン(理化学用)		
	1/16×3/16		50
	3) タイコン(理化学用)		
	1/4×1/8		50
	4) タイコン(理化学用)		
	5/16×3/16		50
	5) タイコン(理化学用)		
	1/2×5/16		50
	6) シリコン 5×7mm		15M
	7) シリコン 8×12mm		15M
	8) シリコン 12×16mm		15M
	9) 任意い管コネクター		10ケ
	ポリプロピレン4-6-8/12-14-16		
	10) 迅速コネクター		
	ポリエチレン4-5-6		20ケ
	11) 迅速コネクター		
	ポリエチレン6-7-8		20ケ
	12) 塩化カルシウム		
	乾燥チューブ20×100		5ケ
	13) テフロンシールテープ(10m)		2ケ
47	スポイト		
	ラテックス製, 赤1g, 2g, 5g 各50ケ		1組
48	紫外線用保護面		
	顔をカバーできるもの UVC803		1
49	プラスチック グローブ	イマムラ	
	Mサイズ100枚/箱		25箱
50	サクラメント グローブ		
	ラボメント, サイズ100枚/箱		25箱
51	スライドグラス	マツナミ	

番号	品名及び仕様	メーカー名	数量
	1) フロスト付マツナミ目		2000枚
	S-2215		
	2) ビルケルチルク血算錠		
	プライトライン		5枚
	3) 血算錠用カバーグラフ		50枚
	22×24mm		
52	フイルムカセット	コダック	
	1) コダックミニ標準スクリーン X-Omatic 18×24cmカセット付		6
	2) コダック標準型		
	8″×10″用 X-Omatic		6
	カセットスクリーン付		
	3) コダック標準型		
	35×13cm用 X-Omatic		2
	4) オートラジオグラフイ用フイルム		
	XAR-5 8″×10″		2pk
	5) オートラジオグラフイ用フイルム		
	XAR-5 13×18cm		2pk
	6) オートラジオグラフイ用フイルム		
	XAR-5 35×43cm		1pk
53	遠心管		
	1) トミーPP/N-3110-950		
	50ml 8本入		10箱
	2) トミーPA/N-3119-0050		
	50ml 8本入		10箱
54	ニトロセルロース膜	シェライヒャー	
	Ref. №401196 0.45m		2巻
	30×300cm		
55	プレートシーラー	フアルコン	
	3073 200枚/箱		3箱
56	オートクレーブシーラー	家田貿易	
	1) ステリパックR10×25cm		
	500枚/箱		2箱
	2) ステリパック30×30cm		
	500枚/箱		2箱
	3) ステリパック12×50cm		
	500枚/箱		2箱

番号	品名及び仕様	メーカー名	数量
	4) ハンドシーラー		1台
57	遠心管		
	1) コーレックス 8441		
	48本/箱		1箱
	2) コーレックス 8445		
	36本/箱		1箱
	3) コーレックス 8441-ADP		
	12ケ/箱		1箱
	4) コーレックス 8445-ADP		
	12ケ/箱		1箱
58	ミキサー		
	1) TAIYO ミクロミキサー		1台
	P型 トランス付		
59	ベンチペーパー	ワットマン	
	1) ワットマンベンチコート		1巻
	92×5000cm 片面ろ紙,		
	片面ポリエチレンコート		
60	ディスペンサー		
	1) ソコレックス0.5-5ml	SOCOREX	
	(500ml)		2ケ
	2) ソコレックス(1000ml)		2ケ
	3) リピーティングディスペンサー		
	9500型クローリン		2ケ
	イ) マイクロシリンジ	ハミルトン	
	EN型Bポイント		
	イ) 250μl		5本
	ロ) 1ml		3本
	ハ) 25ml		3本
61	スターラーかくはん子		
	1) オクタゴン, テフロン		
	長さ15mm, 30mm,		1組
	45mm 各10本		
62	シンチレーション バイアルウイートン		
	1) ウイートン Cat.98562		4箱
	500本/箱		
	2) ジペット(ウイートン200)		
	10ml用 Cat.084264		2ケ

番号	品名及び仕様	メーカー名	数量
	3) ジベットかっ色リザーバー, 1250ml Cat.084434		2ケ
	4) ジベットネジロフダブタ 33・430Cat.844530		2ケ
63	デイスポシリンジ	テルモ	
	1) 1ml針なし(100本/箱)		15箱
	2) 25ml針なし(100本/箱)		15箱
	3) 5ml針なし(100本/箱)		15箱
	4) 10ml針なし(100本/箱)		10箱
	5) 注射針(メッキン済) 18× 静脈用(100本/箱)	テルモ	5箱
	6) 注射針(メッキン済) 静脈用(100本/箱)		20箱
	7) 注射針(メッキン済) 27×3/4 静脈用(100本/箱)		5箱

コロンビア国マラリア等熱帯性
感染症診断技術開発プロジェクト　昭和62年度供与機材

（高速液体クロマトグラフィーシステム）

FAST PROTEIN LIQUID CHROMATOGRAPHY

Item	No.	Description	Q'ty
1)	19-4301-01	Pump P-500	2
2)	18-5500-01	Pump P-3500	1
3)	19-6800-01	Fast Protein Liquid Chromatography-LCC-500	1
4)	19-7510-01	Motor Valve MV-7	1
5)	19-7520-01	Motor Valve MV-8	1
6)	18-0595-01	Sample Holder MV-8	1
7)	18-2460-01	Valve PMV-7	1
8)	18-3860-01	Mixer 35 MPA	2
9)	18-5510-01	Flow Equalizer	1
10)	19-8300-01	PH Monitor	1
11)	19-8305-01	Flow-through PH Electrode	1
12)	19-8306-01	Standard PH Electrode	1
13)	18-0530-01	Chromatography Rack	1
14)	19-7585-01	Super Loop	1
15)	18-0590-01	Cable Kit LA-500	1
16)	19-5079-01	Franging/Start-up Kit	1
17)	18-0404-01	Assorted Sample	1
18)	19-5084-01	Pre-filter	1
19)	18-3140-01	Column Cramp	5
20)	18-3895-01	Pre-filter 35MPA	1
21)	18-2471-01	Sample Loop 100P 1/16 10 1	1
22)	18-2472-01	Sample Loop 100P 1/16 20 1	1
23)	18-2474-01	Sample Loop 100P 1/16 100 1	1
24)	19-4381-01	Sealing Ring	3
25)	19-7476-01	Tube Connector	10
26)	19-7477-01	Capillary Tubing(2M)	5
27)	19-8003-01	Chart Recorder REC-482	1
28)	19-2509-01	Monitor UV-1	1
29)	19-6254-01	Flow Cell HR-10	1
30)	19-2432-01	Filter Kit(254MM)	1
31)	19-2433-01	Filter Kit(180MM)	1
32)	19-6000-01	Fraction Collector FRAC-100	1

Item №		Description	Q'ty
33)	19-5164-01	Valve PSV-100	1
34)	19-6005-01	Communication Cable	1
35)	19-6006-01	Signal Cable	1
36)	19-4611-01	Pump P-1	1
37)	18-5576-01	Capillary Tubing(Xitanium, I.D.0.25MM x 50MM)	5
38)	17-0537-01	Sepharose 6HR 10/30	1
39)	17-0538-01	Sepharose 12HR 10/30	1
40)	17-0546-01	Mono Q HR 5/5	1
41)	17-0547-01	Mono S HR 5/5	1
42)	17-0489-01	Sepharose 6(Prep Grade) 125ML	10
43)	18-1460-01	Column HR 16/50	1
44)	18-1442-01	Packing Equipment HR 16	1
45)	18-0427-01	Filter Assembly HR 5	2
46)	17-0533-01	Pro RPC HR 5/2	1
47)	17-0532-01	Pep RPC HR 5/5	1
48)	19-6828-01	Thermal Paper(5/pack)	2
49)	19-5082-01	Spare Filter for Prefilter(5/pack)	1
50)	18-6353-01	Filter HR 5(10/pack)	1
51)	18-3575-01	Filter Kit HR 10(10/pack)	1

番号	品名及び仕様	メーカー名	数量
1	純水製造用部品 Mi111-Q用		
	1) ミリスタンクフィルター(1ケ入) MSGS05CH1	日本ミリポア	2箱
	2) イオン交換カートリッジ(2ケ入) CDMB02202	〃	2箱
	3) 活性炭カートリッジ(4ケ入) CDFC01204	〃	1箱
	4) ライフガードプレフィルター (3ケ入) CP1501003	〃	1箱
2	超遠心器ローター SW41Ti ローター №331336	ベックマン	1個
3	超遠心器用チューブ		
	1) ポリアロマチューブ331372	〃	100本
	2) ポリカーボネートチューブ 338784	〃	50本
	3) VTi65フィックシール 342412	〃	300本
4	オートクレーブ 1-P SS240標準付属品1式付 110V60Hz	トミー精工	1台
5	炭酸ガス培養器 BNA-210 スペアパーク，圧力調整器 本体架台 各1式付	タバイエ	1式
6	ホッティングスターラー CHS-2 110V 撹拌容量50~5,000mℓ 〃 台寸法170m/mφ	アドバンテック	1台
7	ウォーターバス		
	1) サーモメイトBF-21 AC110V60Hzトランス付	ヤマト科学	1台
	2) 試験槽 BZ-21 285×224×202(m/m)	〃	1台
	3) ウォーターバス BM-42 AC110V60Hz(単)トランス付	〃	1台
8	ハンディアスピレーター WP-25 AC110V60Hz(単)トランス付	〃	1台

番号	品名及び仕様	メーカー名	数量
9	化学天秤		
	1) 電子上皿天秤 L6100 60g/606g 0001g/0.01g	ザクトリックス	1台
	2) 電子分析天秤 R-300S 303g 0.1g	〃	1台
10	スライドグラス S-2215 フロスト付 100枚入	マツナミ	100箱
11	細胞培養用プラスチック器具		
	1) 滅菌Sシャーレ500枚入	単研機械	5箱
	2) 35m/mφシャーレ500枚入 №25,000	コーニング	2箱
	3) 60m/mφシャーレ500枚入 №25010	〃	2箱
	4) 25cm²フラスコ 300枚入 №25100	〃	1箱
	5) 75cm²フラスコ 100枚入 №25110	〃	1〃
	6) プレート12穴 100枚入 №3512	コースター	1〃
	7) プレート24穴 50枚入 №25820	コーニング	5〃
	8) プレート96穴 平底 50枚入 №25860	〃	5〃
	9) プレート96穴1/2平底 50枚入 №25870	〃	5〃
	10) チューブ 15mℓ 500枚入 №25317	〃	5〃
	11) チューブ 50mℓ 300枚入 №25331	〃	5〃
	12) クライオチューブ 1mℓ 500枚入 №25701	〃	2〃
	13) クライオチューブ 2mℓ 500枚入 №25702	〃	2〃
	14) ディスポフィルター12枚入 №25932	〃	5〃

番号	品名及び仕様	メーカー名	数量
	15) フイルターシリンジ 100枚入	コーニング	5箱
	№25901		
	16) ピペット 1mℓ 1000入	〃	2〃
	№7075		
	17) ピペット 5mℓ 200入	〃	10〃
	№7075		
	18) ピペット 25mℓ 200入	〃	5〃
	№7075		
	19) チューブ 6mℓ 1000入	ファルコン	2〃
	№2054		
	20) チューブ 16mℓ 1000入	〃	2〃
	№2051		
12	グローブ		
	1) プラスチックMクリーン100入	和研薬	25〃
	2) ラボメントM 100入	サクラメント	25〃
13	培養関係ガラス器具		
	1) パスツールピペット 146mm		
	1000本入7095-146	コーニング	5〃
	2) パスツールピペット 229mm		
	1000本入7095-229	〃	5〃
	3) シューティピペット 1mℓ		
	10本入 EP-ST-1	〃	10〃
	4) シューティピペット 2mℓ		
	10本入 EP-ST-2	〃	10〃
	5) シューティピペット 5mℓ		
	10本入 EP-ST-5	〃	15〃
	6) シューティピペット 10mℓ		
	10本入 EP-ST-10	〃	10〃
	7) シューティピペット 25mℓ		
	10本入 EP-ST-25	〃	15〃
	8) コーレックス遠心管		
	48本入 №8441	〃	1〃
	9) コーレックス遠心管		
	36本入 №8445	〃	1〃
	10) コレックスアダプター		
	12本入8441-ADP	〃	1〃

番号	品名及び仕様	メーカー名	数量
	11) コーレックスアダプター		
	12本入8445-ADP	コーニング	1箱
	12) 試験管 10×75		
	1000本入 99445	〃	3〃
14	ポリプロピレンチューブ		
	N-3110, 9500 8本組	トミー	10式
	ポリフロアーチューブ		
	N-3119, 0050 8本組	〃	10〃
15	ベンチコート沪紙	ウットマン	1包
	方面沪紙 片面ポリエチレンコート		
	92×5000cm		
16	エッペンドルフチューブ		
	1) 1.5mℓチューブ500入	エッペンドルフ	10箱
	2) 向上用ラック3821 20本	〃	12個
17	沪過器材		
	1) ポリカーボネート吸収加圧	ザラトリックス	10〃
	沪過器 SM-16510		
	2) ガラス沪過器47m/m	〃	5〃
	250mℓ SM16307		
	3) メングランフィルター		
	13m/m 0.22μm		
	SM11307-13N 100枚入	〃	2〃
	4) メングランフィルター		
	022μm SM11307-25N		
	100枚入	〃	2〃
	5) メングランフィルター		
	47m/m 022μm		
	SM11306-47N 100入	〃	2〃
	6) メングランフィルター		
	47m/m 0.45μm		
	SM11306-47N 100入	〃	2〃
	7) プレフィルター20m/m		
	グラスフィバー	〃	1〃
	SM13400-375 200入		
18	ピペッターチップ		
	1) クレイアダムス 1~5μℓ	クレイアダムス	1箱
	4614 1000入		

番号	品名及び仕様	メーカー名	数量
	2) クオリティチップ №105 1000入	クオリティ	50袋
	3) マイクロマンキャピラリー CP-25 200入	ギルソン	5箱
	4) マイクロマンキャピラリー CP-50 200入	〃	5〃
	5) マイクロマンキャピラリー CP-250 200入	〃	5〃
19	ワットマン沪紙 3MM Chr 46×57cm 100入	ワットマン	5〃
20	プレートシーラー №3073 200入	ファルコン	3〃
21	オートクレーブバッグ		
	1) ステリーバック 19×25cm 500枚入	窓田貿易	2〃
	2) ステリーバック 30×30cm 500枚入	〃	2〃
	3) ステリーバック 12×50cm 500枚入	〃	2〃
22	スターラー攪拌子 オクタゴンテフロン 15mm, 30mm, 45mm 各10本	池本	1式
23	タイプライターリボン		
	1) ブラザーコレクタブル カーボンリボン	ブラザー	10
	2) ブラザーリフトオフ コレクションテープ	〃	10
24	ハーベスター沪紙 タイターテック530用 №78-115-05 100入	タイターテック	2箱
25	パリコン付属品		
	1) インクリボンカートリッジ PR-201-01	NEC	2個
	2) プリンター用紙 1511-P 500枚入	〃	20包

番号	品名及び仕様	メーカー名	数量
26	ピペッターチップ		
	1) フィンチップ 61 200入	ラブシステム	5箱
	2) S-100用シリンダ20 100入	住友ベーク	10〃
	3) 〃 30 100入	住友ベーク	10〃
	4) 〃 40 50入	〃	10〃
27	イムノアッセイプレートリンプロ 平底96穴 100入 №77-172-05	リンプロ	10〃
28	プラスチック製品 オートクレーブバッグステルリン AC-509 200入	窓田貿易	2〃
29	マグネチックスターター		
	自公転型 G1	タイヨー科学	2台
	マグミキサー MD-41 AC110V60Hz単トランス	ヤマト科学	2〃
30	ローラック		
	1) №1880-2 10入	イワキ	1箱
	2) №1880-5 10入	〃	1〃
	3) フタ№1880-0 10入	〃	2〃
31	マイクロプレート 96穴 U型リジット 100入	三光純薬	1〃
32	洗浄ビン ユニットタイプ ポリエチレン 500mℓ	池本	20個
33	ステンレスバット 100×125×27m/m	〃	10〃
34	クリーンベンチ №50275 特別付属品	ラブコンコ	1台
	1) #80750 専用架台		
	2) #50053 内部棚		
	3) #50053 ニードル型試圧弁		
35	ブッペ屈折計 3丁	ブタゴ	1〃
36	マルチテストスライド Flow №60, 415, 05 15穴 100入		10箱

番号	品名及び仕様	メーカー名	数量	番号	品名及び仕様	メーカー名	数量
37	インキュベータージャイロトリ	NBS	1台	39	電極刺激装置	ナルコ	1台
	シェーカー G-24				SI-10 ㈱707-0002		
	特別付属品				特別付属品		
	1) 振盤台 M1036-0360.	〃	1個		ピン電極 707-0004	〃	1個
	三角フラスコ用 9×500mℓ				GSR 〃 710-0008	〃	1〃
	2) 振盤台 M1036-0340	〃	1〃		針電極 710-0015	〃	1〃
	三角フラスコ用 21×125				パワーケーブル 711-0005	〃	1組
	3) 振盤台 M1036-0330	〃	1〃		〃 711-0157	〃	1〃
	三角フラスコ用 36×50						
	4) 振盤台 M1036	〃	1〃				
	30° 傾斜クランプ 9×250						
	5) テストチューブラック M1036-0480 64×25 試験管用	〃	1〃				
	6) 多用途架台 M1036-0490	〃	1〃				
	7) 冷却コイル M1036-1090	〃	1〃				
	8) ガスマンフィルド M1036-0291	〃	1〃				
38	ウォーターバスジャイロ	〃	1台				
	トリーシェーカー G-76						
	特別付属品						
	1) 振盤台 A76-1	〃	1〃				
	4×1ℓ 三角フラスコ用						
	2) 振盤台 A76-500	〃	1〃				
	6×500mℓ三角フラスコ用						
	3) 振盤台 A76-250	〃	1〃				
	9×250mℓ三角フラスコ用						
	4) 振盤台 A76-125	〃	1〃				
	16×125mℓ						
	5) 振盤台 A76-50	〃	1〃				
	25×50mℓ						
	6) テストチューブラック	〃	1〃				
	A76-TT25 49×25mℓ						
	試験管用						
	7) ガスフード M1028-0110	〃	1〃				
	8) 冷却コイルM1028-0100	〃	1〃				

コロンビア国マラリア等熱性感染症診断技術開発プロジェクト

昭和63年度供与機材

A．日本から購送分

A－1　検査機器類

番号	品名及び仕様	メーカー名	数量
1.	オートクレーブ用パック（L）	家田貿易	5袋
	No.8503　200 枚1袋		
	同上用ラック　No.9901		2ヶ
2.	培養プラスチック・ガラス製品		
	1）遠心チューブ	コーニング	
	15㎖　25317　500 入		6箱
	50㎖　25331　300 入		4〃
	2）ショーティピペット、ディスポ	〃	
	7078B－1　500 入		2〃
	7078B－5　400 入		4〃
	7078B－25　400 入		2〃
	3）24－穴プレート　25820　50入	〃	6〃
	96－穴プレート　25860　50入		4〃
	4）25㎖フラスコ　25100　300入	〃	2〃
	75㎖　〃　25110　100入		4〃
	5）血清チューブ	〃	
	1㎖　25701　500 入		8箱
	2㎖　25702　500 入		8〃
	6）メディウムビン，キャップ付	〃	
	1700－100　50 入		4〃
	1700－300　30 入		4〃
	1700－500　30 入		4〃
	7）ディスポ滅菌Sシャーレ	栄研機材	8〃
	500 入		
	8）スライドグラス	マツナミ	110箱
	S－2215　100 入		

番号	品名及び仕様	メーカー名	数量
	9) 培養試験管	ファルコン	
	2051　1,000 入		2〃
	2054　1,000 入		2〃
	10) 角ディシュ	〃	2〃
	1012　100 ×100 ×15㎜		
	500 入		
3.	カラーテープ（カッター付）	井　内	5箱
	K250　10色／組		
	補充用テープ　K25　10色／組		5〃
4.	透析チューブ	スペクトロ	
	スペクトラポア、6	ポア社	
	分子量100,012 ㎜×10m		2巻
	スペクトラポア、6		
	分子量100,018 ㎜×10m		2〃
5.	粉末濾紙	東洋濾紙	
	40～100 メッシュ　500g		2箱
	200 メッシュ以上　500g		2〃
	ガラス繊維濾紙　100 枚入		10〃
	（プレフィルター　2.4 ㎝GC－90）		
6.	ペンチペーパー	ワットマン	2巻
	92㎝×50m		
7.	シンチレーションバイアル	ウィートン	4箱
	986562　500 本入		
	オムニバイアル		2〃
	225102　1,000 本入		

番号	品名及び仕様	メーカー名	数量
8.	石英セル	井内	4ヶ
	SU－2　セミミクロ用		
9.	シーロンフィルム	フジフィルム	1箱
	10cm×40m　10ヶ／箱		
10.	スターラー回転子（テフロン）		2組
	25mm、35mm、55mm　各5本組	池本	
11.	マイクロマン用キャピラリー	ギルソン	
	M－25用　CP－25　200本入		5箱
	M－50用　CP－50　200本入		5〃
	M－250用　CP－250　200本入		5〃
12.	オートクレーブ用ドアパッキン	トミー精工	
	SD－30N用		2ヶ
	S－90N用		2〃
13.	オートスチルWA－72用部品	ヤマト科学	
	原水フィルター　SWPPO10－1		2ヶ
	イオン交換カートリッジ　B－10Y		2〃
	水量調節弁　228		1〃
	電磁弁　242		1〃
	〃　243		1〃
14.	真空乾熱器　DP－32用部品	ヤマト科学	
	熱センサー　3075		1ヶ
	ボールバルブ　4011		1〃
	ドアパッキン　2020		1組

番号	品名及び仕様	メーカー名	数量
15.	ラボウオッシャー　AW−62用部品		
	ベアリング　305 及び306		1組
	電磁パッキン　218		1ヶ
	リレー　361		1〃
	スイッチ　321		1〃
	〃　322		1〃
	ランプ　323 及び324		1組
	タイマー　316		1ヶ
16.	TMD倒立顕微鏡レンズ	ニコン	
	NCF　Plan　DL 4×		1ヶ
	NCF　Plan　ELWD　DL40×C		1〃
17.	電気泳動用品	Hoefer	
	1)　振揺シェーカー　PR−50		1台
	2)　グラジェントメーカー　XPO−77		1〃
	3)　ハイブリダイゼーションチャンバー　PR−800		1ヶ
	4)　スペーサー　SE219　6枚組		1組
	5)　DNAミニプロメーター　TKO−100		1台
	6)　パワーサプライ　PS−500 X		1〃
	7)　電気泳動ユニット　SE250 −10A・75		1〃
	コーム　211 −10付		
	8)　ゲル作成器　SE215		1台
	9)　コーム　SE211A−10−1.5		10ヶ
	SE211A−R−1.5		
	10)　トランスファーブロッティングユニット		1台
	TE−22		

番号	品名及び仕様	メーカー名	数量
18.	小型冷却遠心器 Model ：MR－150 特別付属品： 1) ローター TMA－2 1.5 ml×12用 2) ポリチューブ 1.5 ml 500 入	トミー精工	 1ヶ 2箱
19.	イムノウオッシュ8型 No470173 プレートシーラー No3073 200 入	ヌンク	2台 5箱
20.	メンブレンフィルター 0.2μm 13mmφ 100 枚入	東洋濾紙	10箱
21.	バイアル（メラミンキャップ付） オートクレーブ可、透明ガラス SVF－3 16.5×45 100入 SVF－12 24.3×55 50入	日電理化	 15箱 20〃
22.	プラスチックグローブ クリーン Mサイズ 100 枚	イマムラ	10箱
23.	ディスポループ 1型 500 入 10 型 500 入 ニードル 500 入	井内	 4箱 4〃 8〃
24.	チャイナマーカー 黒、赤、ライトブルー 各6ダース	井内	1式
25.	スライドプロジェクター Model ：AF－2500（115V）ズームレンズ付	キヤビン	1台

番号	品名及び仕様	メーカー名	数量
26.	冷却遠心器 Model：05PR22ダウントランス（115V−100V）付 特別付属品： 1) RT5S2ローター 2) Aアッセンブリー 15mℓ32用 C 〃 10mℓ40用 G 〃 50mℓ4用 3) アッセンブリー用バランサー 4) ガラスチューブ 10mℓ 50入 15mℓ 50入 50mℓ 10入 5) ヒューズ 6) カーボンブラッシュ	日立	1台 1ヶ 1〃 1〃 1〃 1〃 2箱 2〃 2〃 5ヶ 2〃
27.	マグミキサー Model：MH−81 トランス付	ヤマト科学	1台
28.	液体チッ素コンテナー Model：DR−30	ダイヤ冷機	1台
29.	ブンゼンバーナー APT−II	井内	2ヶ
30.	細菌培養ペトリ皿 デイスポタイプ No3025 150 φ×20mm 100入	ファルコン	3箱
31.	アクロフィルター50 疎水タイプ 0.2 μm 18入り	ゲルマン	1箱
32.	テープディスペンサー C−25 ヘビィーデューティーディスク	3M	10ヶ

番号	品名及び仕様	メーカー名	数量
33.	レンズペーパー 20×23cm　100枚入	ワットマン	10箱
34.	ディスペンサー・カッター パラフィルム用	池本	1ヶ
35.	培養試験管 25317　CTF　500入	コーニング	2箱
36.	電気泳動用品	Hoefer	
	1) ニトロセルロース膜　82mmディスク		5箱
	TM−NC4C82　25入		
	〃　33cm×3m		2巻
	TM−NC4−ROLL		
	2) ブロッティングペーパー　20×20cm		10箱
	TM−BLT2020　50入		
	〃　33cm×3m		5巻
	TM−B14−ROLL		
	3) ナイロン66プラス　20cm×3m		2巻
	TM−NTP4−RL20		
	4) フルオロメーターキュベット		6ヶ
	TKO−100用		
	5) DEIA，プローブシステム		1ヶ
	PR−200		
37.	ラブトップバランス Model：FX−3000 秤量：3000g 最小読取：0.01g	エー&ディ	1台

番号	品名及び仕様	メーカー名	数量
38.	カプセル遠心器 Model：HF－120（タイマーなし） 以下余白	トミー精工	2台

A－2　事務用品類

品　　名	規　　格	数　量
リコーＦＴ4060用パーツ　その他 別紙の通り		1　式
備　考		

	数 量
リコピー　ＦＴ4060用パーツ	
ドラム　　51429201	1ヶ
ギャー　18Z　　52051188	1ヶ
ペーパーフィード　　51422616	1ヶ
クリーナーブラシ　　51423580	1ヶ
クリーマング刃　　51423565	1ヶ
オイル刃　　51424117	1ヶ
トランスポートベルト　　51429001	1ヶ
主コロナワイヤ　　51429003	1ヶ
Ｔｄｓコロナワイヤ　　51429004	1ヶ
油供給パット　　51424236	1ヶ
熱ローラー　　51429320	1ヶ
圧ローラー　　51424090	1ヶ
ランプ　　51425318	1ヶ
ヒーター　　51425306	1ヶ
トナー	10ヶ
油　　5415909	1缶
固定ディスクユニット	
ＰＣ－98H51U	1台
インターフェースボード	
ＰＣ－9801－27	1ヶ

B．現地調達分

B－1　事務用品類

品　　名	規　　格	数　量
電動タイプライターブラザー （現地仕様）	EM－701	1　式
備　考		

B－2　検査機器類

番号	品名および仕様	メーカー名	数量
2.	Gene Assembler Plus Synthesizer		1
-1)	Olivetti Computer with 1 Keyboard, Prive and		1
	Xarddisk 10 MB Graphic Cotour		
-2)	Olivetti Printer CPL with Cable		1
-3)	Ink Cartridge		2
-4)	Fancold Paper for Priner		2
	A－Supper　(0.2 UMOLE)		10
	C－　〃　　〃		10
	G－　〃　　〃		10
	T－　〃　　〃		10
	A－　〃　(1.3 UMOLE)		10
	C－　〃　　〃		10
	G－　〃　　〃		10
	T－　〃　　〃		10
	Fosfor Amidite A 400mg		10
	〃　　T　〃		10
	〃　　G　〃		10
	C		10
	Tetrazole		10
	Bromna-Arlanda Freight and Insurance		1
	Tmportation Solvents for Gene Assembler Equipment		1

B－3　試薬類他

Fisher Scientific

ITEM	QTY	UNIT	FISHER CATADG NO	COMMODITY DESCRIPTION
1C	4	EA	PR P2020	RIBOPROBE GEMINI SYSTEMII
2C	2	EA	PR Q5410	K/RT TM UNIVERSALSEQ SYSTEM
3C	2	EA	PR Q5401	PUC/M13 REV SEQ PRIMER 17MR2U
4C	2	EA	PR Q5391	PUC/M13 FWSEQ PRIMER 17MER2UG
5C	1	EA	PR T3610	REG GT10 PLUS REGPKG SYSTEM
6C	2	EA	PR B1770	EMBL 3BAMHI ARMPK KSY20UGIIEX
7C	2	EA	PR T3022	REG LAMBDA GTIIMREG PKG SYSTEM
8C	2	EA	PR S3710	PROTOBLOT LAM GTII INN SCR SYS
9C	6	EA	PR U1001	NICK TRANSLATION SYSTEM
10C	2	EA	PR E5750	ERASE-A-BASETM SYSTEM
11C	2	EA	PR M5102	AMVREVERSE TRANCRPTASE 1500U
12C	2	EA	PR M2202	DNA POLYMERASE IKLENDW 750U
13C	2	EA	PR K3152	PACKAGENE SYSTEM IIEXTRACTS

G & G Sucesores

Item	CANTIDAD	UNIDAD	DESCRIPCION
			LFERJA FOB EXFABRICA SAINT LOUTS MISSOURI
1	4	Fr	× 50L Dulbecos Modified Eagles Medlun D-1152
2	4	Fr	× 50L NCTC135-Medium Hybri-Max N-5138
3	1	Fr	× 50L NCTC135-Medium Hybri-Medum Hyvri-Max N-5138
4	2	Cj	25×20ml. Fetal Bovine Serum Lyophilized F-3010
5	1	Cj	10×10ml. Gentamicin Sulfate G-8767
6	2	Fr	Kilo Hepes H-9136
7	1	Fr	× Kilo TES T-6022
8	1	fr	× 100mg. Aminopteric A-3411
9	1	Fr	× Un Millon de Unidades Heparin H-8514
10	1	Fr	× 100gr Hypo ×anthine H-9636
11	1	Fr	× 25grs. Thymidine T-1895
12	1	Fr	× 50,000Unidades Phosphatase Alkalini P-4502 (reemplazada por P-5521)
13	1	Fr	× 50grs. Sinma 104 Phosphatase Substrate 104-0
14	2	Cj	5 × 1 mg Antibody to Human IGG I-3382
15	2	Cj	5 × 1 mg Antibody to Human IGM I-0759
16	2	Cj	5 × 1 mg Antibody to Mouse IGG M-8645
17	1	Cj	5 × 1 mg Antibody to Mouse IGG 1 M-8770
18	2	Cj	5 × 1 mg Anti Mouse IGM M-8644
19	5	Fr	x1 m l. Alkaline Phosphatase Conjugateanti Goat IGG A-3540
20	5	Fr	× 1 m l Peroxidase conjugate to antigoat IGG A-3540
21	1	Cj	5 × 1 mg Antibody to Mouse IGG 3 M-8270
22	5	Fr	x 2 m l. Biotin-affinity Isollantibody to goat IGG B -7014
23	5	Fr	× 2 m l. FITCConzugate to Mouse F-0257
24	2	Fr	× 1 m l. Avidin Alkaline Phosphatase A-7294
25	5	Fr	× 2 m l. Avidin FITC A-7014 (reemphaza da par A-2050)
26	1	Fr	× 5 Avidin Peroxidase A-3151
27	50	U	Film Polaroid type 667 F-4636

Amesham International

REFERENCIA	NOMBRE	CANTI DAD	FORMA EXPAQUE
PB 10174	DEOXYADENOSINE 5'-(ALPHA32P) TRIPHOSPHATE	18	500uCi
PB 10175	DEOXYCYTIDINE 5'-(ALPHA32P) TRIPHOSPHATE	9	500UCi
SS 1304	DEOXYADENOSINE 5'-35S TRIOTRIPHOSPHATE	9	1 mCi

BRL

REFERENCIA	NOMBRE	CANTI DAD	FORMA ENPAQUE
1058 HZ	DNA Blot System Paper	10	paguete
1525 HP	NACS prepac Convertibles	10	pag. 20 col
5201 SB	Bam HI	1	10,000 un.
5202 SB	Eco RI	2	20,000 uni
5206 SB	Hinc II	1	1,500 uni
5207	Hind III	2	10,000 nni
5208	HPA I	1	500 uni
5213 SB	BGL II	2	2,000 uni
5215 SC	PST I	2	5,000 uni
5- 7 SB	SAL I	1	5,000 uni
5223 SA	HIEF I	2	1,000 uni
5224 SC	T4 DNA ligase	4	500 uni
5226 SA	XBA I	2	2,000 uni
5228 SA	SMA I	2	1,000 uni
5229 SB	SAU 3A	1	100 uni
5250 SB	Lamba DNA	1	2,000 uni
5295 LC	Eco RI linker	2	1 A 260 U
5296 LC	Hind III linker	2	1 A 260 U
5298 LC	BAM B I linker	2	1 A 260 U
5507 UB	Cesium Chloride	2	1 kg
5509 UB	Phenol	2	1 kg
5517 UB	LMP Agarose	2	100 gr
5520 UC	XGal	2	1 gr
5535 UA	Guanidine Isothiocyanate	2	500 gr
5537 UA	AMP Screen	10	10 kg
5561 UB	Bovine Serum Albumin	2	150 mg
8001 SB	S1 Nuclease	1	100,000 un
8004 SB	T4 Kinase	1	1,000 un
8005 SB	T4 DNA Polymerase	1	250 un
8020 SB	AMV Rev-Transcriptase	2	100 un
8017 SA	DNAESI (RNASE Free)	2	2 mg
9507 SA	Biotin II DUTP	2	125 ml
9508 SA	Biotin II UTP	4	125 ml

II. 平成元年度供与機材

番号	品名及び仕様	メーカー名	数量
1.	分離用超遠心機		1式
1)	分離用超遠心機	日立工機	1
	日立 SCP70H2		
	220V, 60Hz		
	70,000rpm, 501,000×g		
	(付属品)		
1)	RP65V T2 バーティカルローター	〃	1
	5㎖×16本、65,000rpm		
	416,000 ×g		
2)	SRP70AT アングルローター	〃	1
	12㎖×12本、70,000rpm		
	452,000 ×g		
3)	RPS65T スイングローター	〃	1
	5㎖×3本、65,000rpm		
	420,400 ×g		
4)	STF-1 チューブシーラー	〃	1
	220V/100V トランス付		
5)	チューブラック(B)	〃	1
	5PA シールチューブ用		
	(スペアパーツ)		
1)	5PAシールチューブ	〃	6
	50本1箱(RP65V T2用)		
2)	B2スペースキャップ	〃	16
	(RP65V T2用)		
3)	12PAチューブ	〃	10
	50本1箱(SRP70AT用)		
4)	C-T1 キャップ組	〃	12
	(SRP70AT用)		
5)	5PAチューブ	〃	2
	50本1箱(SRP65AT用)		
6)	キャップ	〃	3
7)	保守用スペアパーツAセット	〃	1

番号	品名 仕様	数量
2.	アステック社製	
	プログラムテンプコントロールシステム	一式
	PC－500（110V、60Hz. 1P. トランス外側付）	
	同上用エプソンコンピューター付	
	（110V、60Hz. 1P）	
	五箱値引	
	輸出梱包代陸上運賃	
	消費税3％	

資料IV. コロンビア側プロジェクト評価

Report of activities corresponding
to the project

"RESEARCH AND DEVELOPMENT OF DIAGNOSTIC TECHNOLOGY
ON MALARIA AND OTHER TROPICAL DISEASES"

September 1986 to September 1989

Instituto Nacional de Salud - COLOMBIA
Japan International Cooperation Agency - JICA - JAPAN

I N D E X

Summary	1 - 2
Introduction	3
Research aspects	3
Scientific progress in Biochemistry	3 - 18
Scientific progress in Immunology	19 - 22
General evaluation	23
Other areas of impact	23 - 24
Technical aspects	24
Japanese experts	24 - 25
Colombian counterparts	25
Colombian efforts for the completion of the program	25 - 26
Conditions and use of the equipments	26
Future perspectives for the use the acquired technology in Colombia	26 - 28

A N E X E S :

1. Análisis de Plásmidos recombinantes con insertos de ADN genómico de *Plasmodium falciparum*.
   Fernando Angel S, Ramón Mantilla, Moisés Wasserman.
   BIOMEDICA 8: 15-19 (1988)

2. Construcción de un banco de clonos de cDNA a partir de mRNA de P. falciparum.
   María Orfa de Rojas, Moisés Wasserman.
   BIOMEDICA 8: 5 - 14 (1988)

3. *Plasmodium falciparum*: in vitro massive invasion during short periods of time[1].
   Jean Paul Vernot and Moisés Wasserman
   Submitted to J. Protozool (1989)

4. Report to Dr. Jorge Michelsen
   Director General, Instituto Nacional de Salud
   From Dr. Tsuneo Kamiyama
   Expert in Immunology

SUMMARY

A. Research Aspects.

The goals were attained. Various genomic and cDNA libraries. *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* were constructed. Specific and repetitive fragments were isolated and their use as DNA probes was fully studied. Different labelling methods including non-radioactive ones, were established and compared; expression expertise was acquired; a basic biochemistry research on the parasite was established, and limited field work was performed.

Monoclonals against *Plasmodium falciparum* were produced. Two, which recognise soluble antigens were fully characterized and used for the construction of a sandwich ELISA for detection of circulant parasite antigens. There were established a cellular immunology research program and various immunoenzyme and immunofluorescence methods for detection of *P. falciparum* antibodies. Limited field work was performed.

The establisment in this Institute and in Colombia of these frontier technologies have excerted a great impact. The groups involved in the program reached a very high level in personal preparation and infrastructure, acquiring the potentiality to solve not only the model queries under study, but many others. Cooperation with other groups within the Institute are opening new research lines and applications in solution of problems, and cooperation with universities made from the project a source of well formed young scientist which will improve research in this and other colombian Institutions.

B. Technical Aspects.

Two Japanese experts were very important for the development of the project. One Mr. Sakamoto came for three short periods, to trasfer specific techniques to the group of biochemistry, and the second Dr. Kamiyama was for two years in immunology doing very important scientific work and performing as teacher and guide of several young researchers.

Until this moment five Colombian workers went to Japn in the frame of this project, to complete a number of ten for the whole term of the cooperation. They are located in 4 out of 11 groups and represent a very important porcentage of the active research workers of the Institute.

The laboratories of immunology and biochemistry were fully equiped, with the most modern appliances, placing them in a position which enables to close the technological gap between our country and more advanced ones. This Institute provided the laboratories, the manpower, and the budget necessaries to ensure the best proficiency of the cooperation program.

C. Future perspectives

This very well based program ensures the continuation of the efforts in the actual active lines, broadening their scope and goals. Other research and tecnical applications are starting based in the knowledge acquired and in the available equipments and infrastructure.

Programs of polio vaccination control with virology, of diagnostics of enteric bacteria with microbiology, of quality control and improvement of antigens with the section of production will be may be the beggining of a very wide, future perspectives of the reported cooperation program.

INTRODUCTION

This report is the result of the joint effort between the governments of Colombia and Japan to establish new techniques, based on recombinant DNA and monoclonal antibodies for diagnosis of tropical diseases.

The following points will be discused:

A. Research Aspects
   1). Scientific progress in Biochemistry.
   2). Scientific progress in Immunology,
   3). General evaluation.
   4). Other areas of impact.

B. Technical aspects
   1). Japanese experts.
   2). Colombian Counterparts.
   3). Colombian efforts for the completion of the program.
   4). Conditions and use of the equipments.

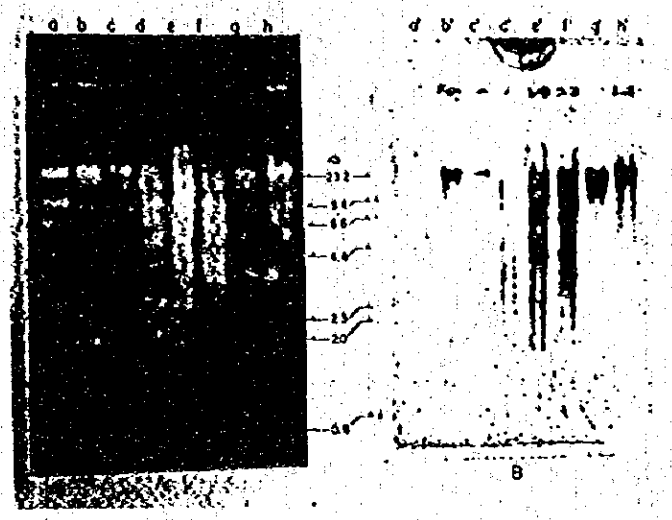
C. Future perspectives for the use the acquired technology in Colombia

A. Research Aspects.

1). Scientific progress in Biochemistry.

a). Collection and purification of *Plasmodium falciparum*.
The parasite DNA was obtained from in-vitro cultures in 5% human erythrocytes and defined media.
Two colombian established strains were used FCB-1 and FCB-2. Both were very well defined for infectivity and fast growth. Parasites were freed using saponine 1%, were digested with proteinase K and RNase A and extracted with phenol, chloroform

and ether. The DNA was collected by ethanolic precipitation and purified in a CsCl gradient.
The ability of several enzymes for thorough digestion of the DNA was tested. An example is shown in figure 1.



A-Bretd photography B-Southern blot - autoradiography with P. falciparum DNA. DNA was digested with Sal I (b) PSI I (d), Hind III (e) EcoRI (f) and Bam HJ (g) and undigested (h).

Because of the broad spectrum of fragments obtained with ECO-RI, we choose this preparation for cloning.

b). Cloning of P. falciparum DNA
For obtention of species specific probes, we decided to clone. The parasite DNA and choose repetitive and specific sequences. The whole DNA was tested (as reported in the literature then), but cross-reactivity was detected against P. vivax and murine plasmodia.
ECO-RI restricted fragments were cloned in the plasmid PUC-18 on the multiple site in the B-galactosidase gene. Recombinants were selected by inactivation of the gene as observed by growth of

white colonies in IPTG, X-Gal containing medium.
Recombinants were replated, and specific sequences were selected by hybridization of nitrocellulose fixed replicas against P. falciparum, P. vivax and human DNA.

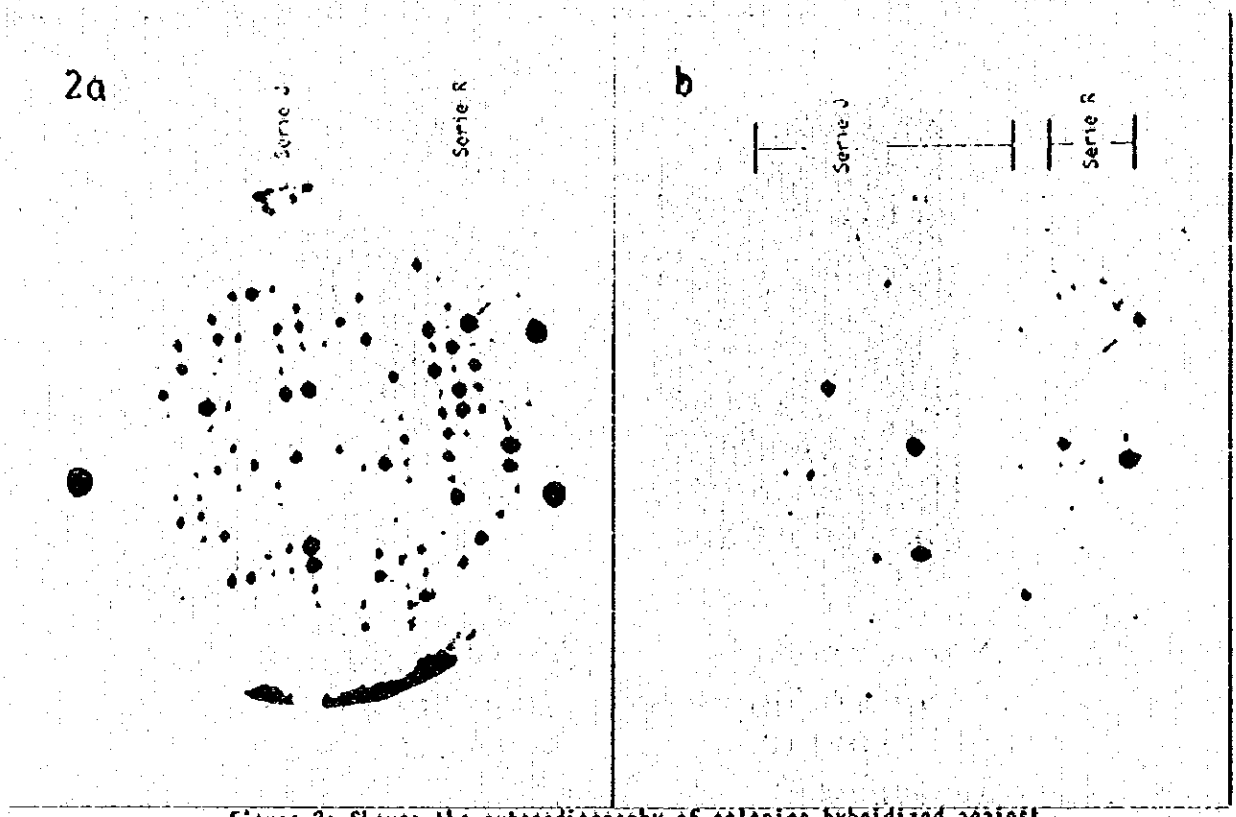
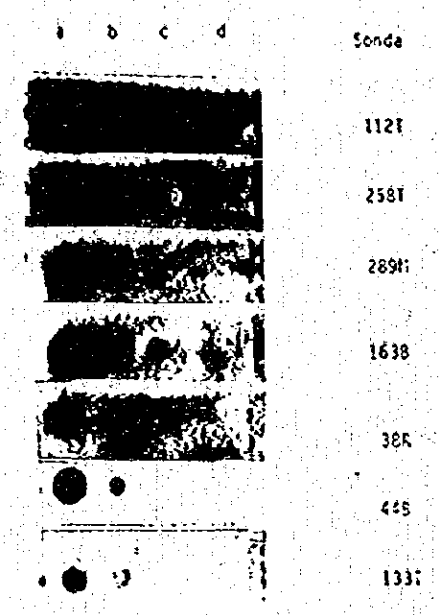


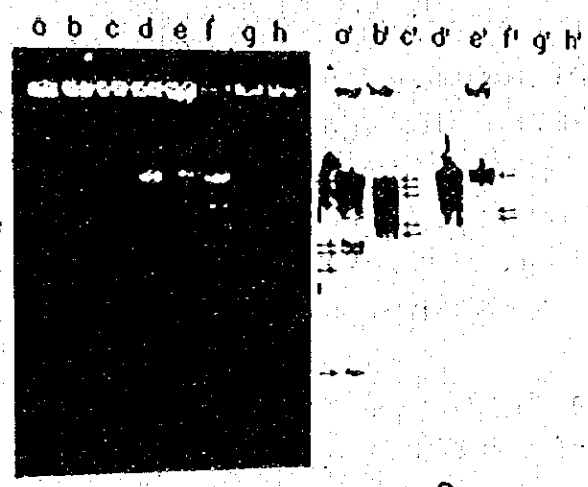
Figure 2a Shows the autoradiography of colonies hybridized against P. falciparum and 2b against human DNA, the arrows point to clone 38 R

More than 300 clones provenient from 3 libraries were studied and selected according to the strength of the signal produced, using dots with defined quantities of P. falciparum DNA. Examples in Figure 3.



Hybridization of several recombinant probes against 10,1,0,1 and 0.01 ng of purified DNA.

The repetitivity in the genoma of the parasite was tested with southerm blots of the genomic DNA digested with various enzymes and hybridized against the recombinant plasmid DNA. Example in figure 4.



Several bands hybridized against plasmid 38R in restriction patterns of P. falciparum DNA (Arrows). DNA was digested with EcoRI (a) Hind III (b) Psf I (c) Bam HI (d) and Sal I (f)

Anexe 1 - Paper on this work published in Biomédica.

c). Collection and purification of Plasmodium vivax DNA.

It became clear to us, that although there are not reported in the literature probes for P. vivax; for us in Colombia it is as important as that of P. falciparum's, and for any epidemiological work it would be missleading to work with one without the other.

The obtainment of P. vivax DNA is a very difficult goal.

There is no practical in-vitro culture available, and parasitaemias in patients are of 0.1% or less. One single leucocyte contaminant has the same DNA contents of 40.000 parasites aproximately.

Many aproaches for purification were tryed, finally the following protocol was successful:

a) The blood of patients was subjected to a discontinuous, 70, 60 and 43% percoll gradient, and in the 60-70% interfase a fraction enriched with parasites was collected.

b) Parasites were put to mature in defined medium with human serum for 36 hours and then a treatment with a solution 0.85% NH_4Cl cause the lysis of parasitized and non-parasitized erythrocytes while contaminant leucocytes were left intact.

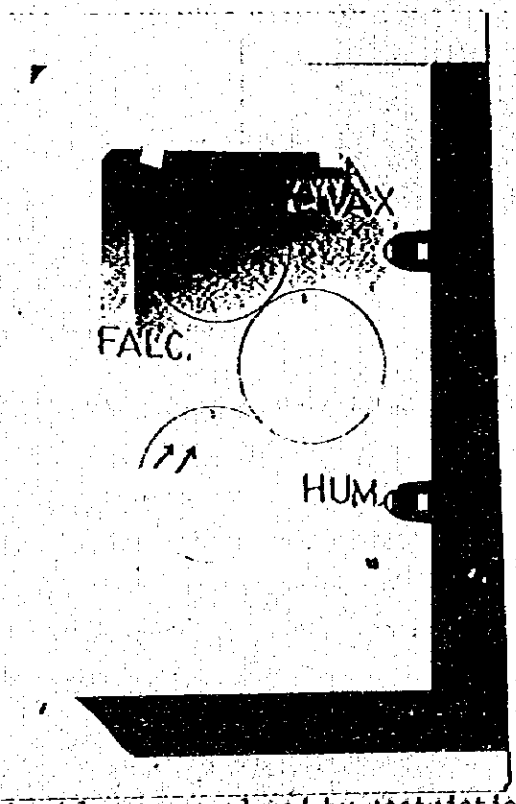
c) A continuous percoll gradient was used to isolate the less dense lysed parasited erythrocytes and DNA was extracted.

d) A CsCl et-Br gradient was used to purify the DNA, and only were collected the fractions within densities of 1.51 to 1.53 g/ml. A purity of 90% as detected with dot blots was obtained. No report in the literature yields a purity like this.

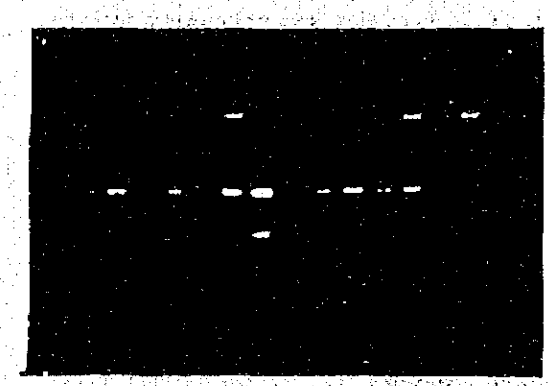
d). Cloning of P. vivax DNA

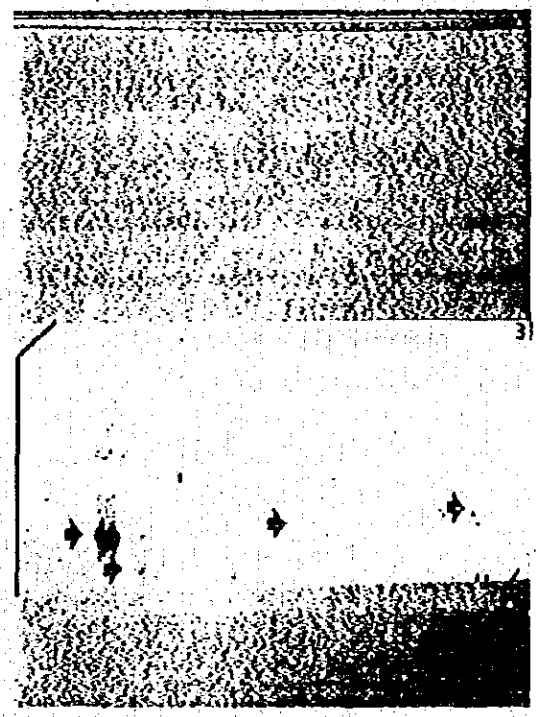
For the cloning of P. vivax DNA we decided to use an enzyme with few restriction sites in human DNA. The rationale was

to obtain very big human DNA fragments wich will be selected against to, during the cloning procedure, enhancing the chances to have vivax specific fragments. About 2.000 clones were studied the ones giving the strongest hybridization signal against P. vivax DNA were chosen, and their crossreactivity with P. falciparum and human DNAs was tested. Figure 5 exemplifies one of these experiments.



The most noticeable were analyzed by restriction and electroforesis followed by southern blotting and hybridization, as in figure 6.





P. vivax DNA was digested with various enzymes, and subjected to electrophoresis, southern blot and hybridization against one of the clones. In figure 7, the arrows points to the pattern of multiple restriction bands expected with a repetitive sequence. Sensitivity for detection and specificity were determined with dot blots vivax, falciparum and human DNA as shown in figure 8a

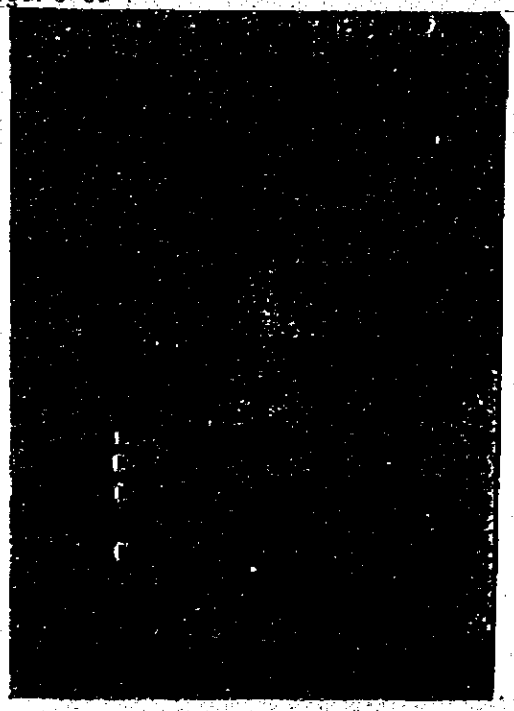
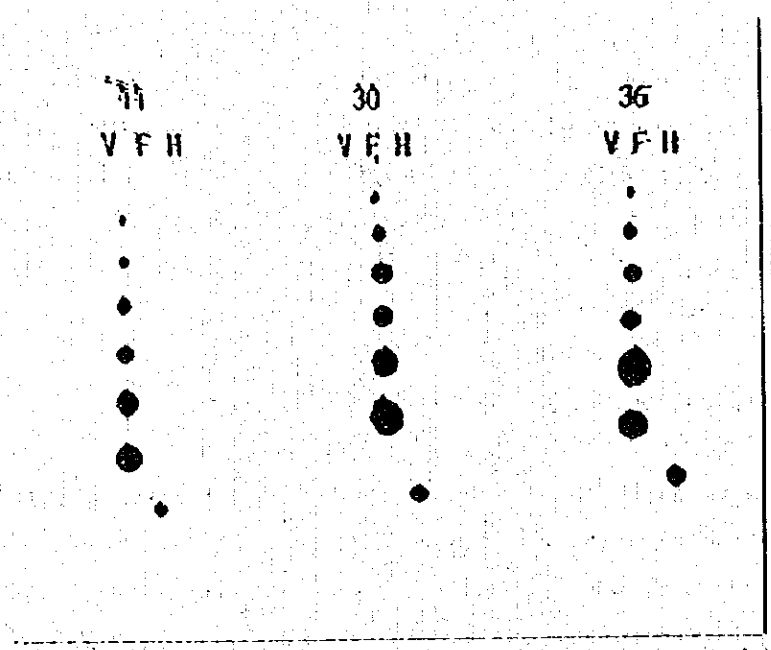
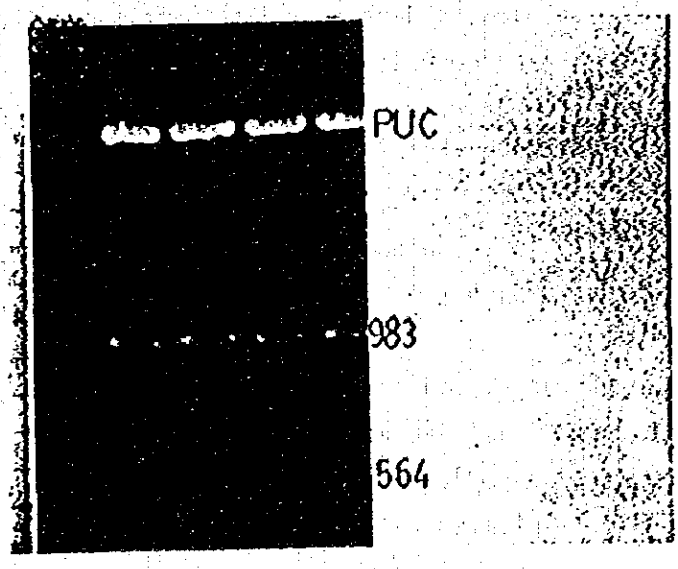


Figure 8a



Dot blot of P. vivax (O), P. falciparum (F) and human DNAs (H) against 3 cloned P. vivax fragments.
Max sensitivity 10 pg.

Figure 8b



Excision and restriction of insert II P. vivax with Bam HI and Hind III

The detection was feasible at 0.01 ng of DNA, comparable to that of P. falciparum. For further characterization we decided to sequence one of the most promising clones, the Nº 11, with a size of 1.5kb aprox. it was submitted to double digestion with the enzymes Hind III and Bam HI giving two fragments, one of 983 bp and the second of 564 bp. The fragments were recloned in M13Mp18 and the single chains are being used actually for the sequence. (Figure 8b).

e) Hybridization detection.

Until now several probes have been studied.

a) Three different oligonucleotides kindly a synthesized by Kaketzuken), two corresponding to repetitive sequences on a single-gene, one for falciparum and one for vivax, gave a specific response, but a very low sensitivity;they needed more than 200 ng of DNA to give a positive response. The cause may be the low specific activity attained $5x10^5$ dpm/ug and the fact that they correspond to a single-gene. A third oligonucleotide 21 mer reported as highly repetitive gave us a better sensitivity (around 50 ng) and was proved to be contained in our clone 38R. Since we can get better labeling with the clone, we didn't used further the oligonucleotide.

b) Whole genomic DNA of P. falciparum was labelled to a high specific activity. A typical hybridization experiment is shown in figure 9.

The sensitivity is acceptable, but for blood samples, the cross-reactivity with the human DNA contamination gives a high background.

c) Two clones for P. falciparum 38R and 4R in combination, give an specific and sensitive answer when DNA is extracted from 50-100 ul of blood. Blood is phenol-chloroform and ether extracted and DNA is precipitated with ethanol.

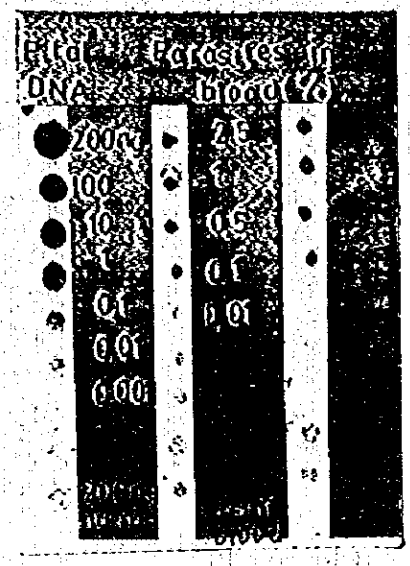


Figure 9

Plasmodium falciparum purified DNA, and parasitized erythrocytes diluted in complete blood were hybridized against total genomic DNA of P. falciparum.

See cross-reactivity against human DNA indicating low contamination of the crude probe even after exhaustive purification.

In this case the probe would be able to detect 10 pg of DNA.

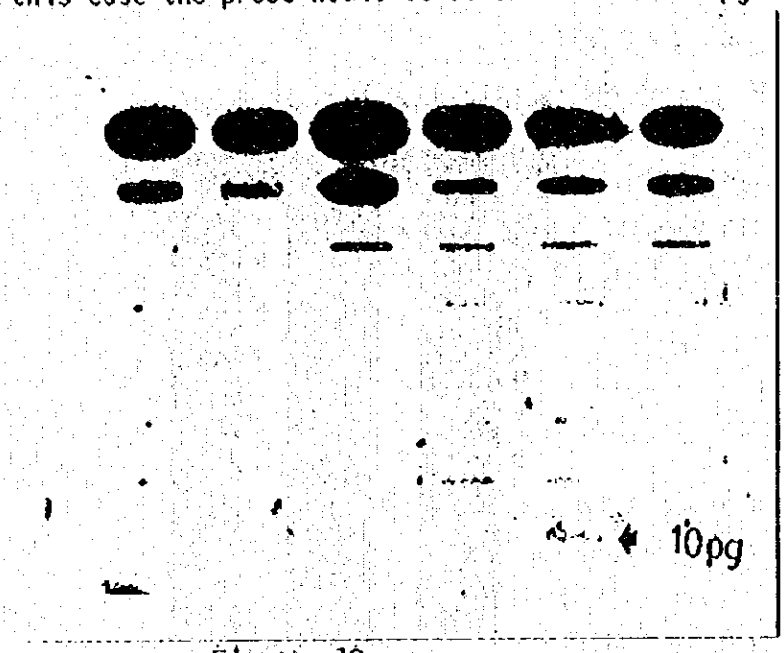


Figure 10

d) One clone of P. vivax, the clone 11 is able to detect P. vivax, as described before, till 10 pg per sample.

e) Non-radioactive labelling.

For use in field studies and in laboratories far from the center of the country it seems highly desirable to use non radioactive labelling methods.

We have tried labelling of DNA with biotinilated analogs of dATP and detection of the probe with a Streptavidin-Alkaline phosphatase conjugate. Using a mixture of the Plasmids 38R and 4R we were able to detect 12.5 pg of purified P. falciparum DNA.

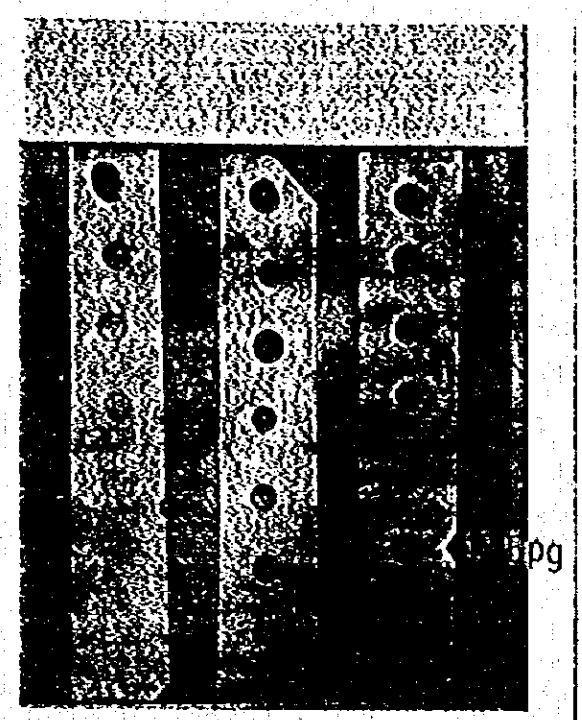


Figure 11

f) Processing of the samples.

Blood samples were either applied directly (3 ul) on the nitrocelulose extracted with phenol-chloroform and precipitated with ethanol (50 ul).

For mosquitoes three methods were tested as follows:

A	B	C
Homogenization Triton X-100-Sacarose Tris HCl	Homogenization Triton X-100 NH_4 OH	Homogenization Guanidinium-HCl
Digestion SDS & Proteinase K	Boiling 30 min Neutralization	3 min 68°C SDS
Phenol extraction	Centrifugation Phenol extraction	Centrifugation Discard - rests
DNA precipitation Ethanol - Na-acet.	DNA precipitation	DNA precipitation Isopropanol
Recovery 60% DNA $\frac{\text{Abs 260}}{\text{Abs 280}} = 1.6$	Recovery 60% DNA $\frac{\text{Abs 260}}{\text{Abs 280}} = 1.7$ Unespecific background in hybridization	Recovery 90% DNA $\frac{\text{Abs 260}}{\text{Abs 280}} = 1.8$

The third method is simpler, faster gives the better recovery and no background. All further experiments with mosquitoes were performed with this protocol.

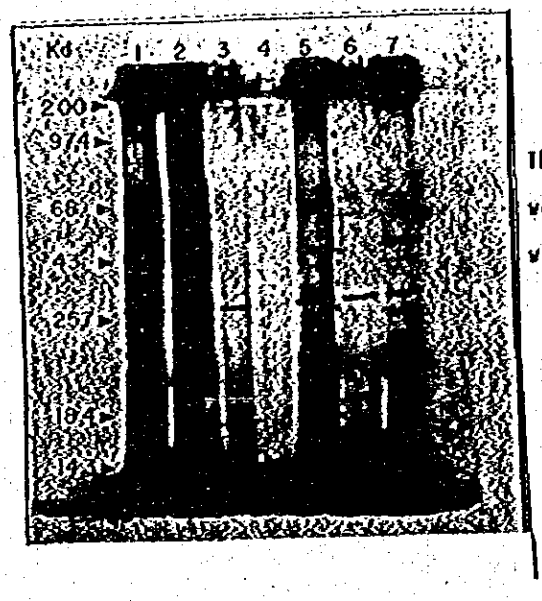
g) cDNA cloning and gene expression.

For further studies on the biology of the parasite it was considered important, in the present project, to acquire the knowledge for cloning of cDNA and expression of genes.

The progress in this field was as follows:

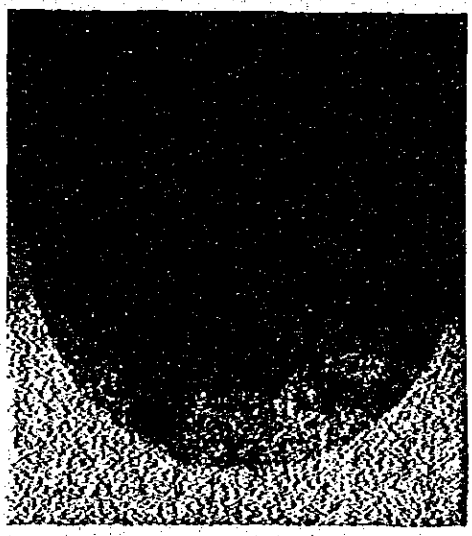
a) Isolation of mRNA.

The mRNA, of defined stages in a highly synchronized culture was purified. From a hot phenol-chloroform extract, tRNA was precipitated with Cl Li and the poly-A-mRNA was purified using uligo-dt-Cellulose. The size and integrity of the mRNA were verified doing in-vitro traslation and electrophoretic analysis of the products. The resultant proteins were compared with those produced in-vivo by the parasite.



The stars show oligopeptides which were found in in-vitro synthesis as well as in vivo.

b) Cloning of cDNA.
Double stranded cDNA of the mRNA preparations (provenient from stages of a syncronized growth) were synthesized and introduced in the site EcoR1 of the phage vector gt-10. In three different systems the obtained recombinants ranged from 2.3×10^4 to 2.2×10^5.



Autorradiography of a replica in nitrocellulose of recombinant-phage infected plate, hybridized against P. falciparum complete DNA.

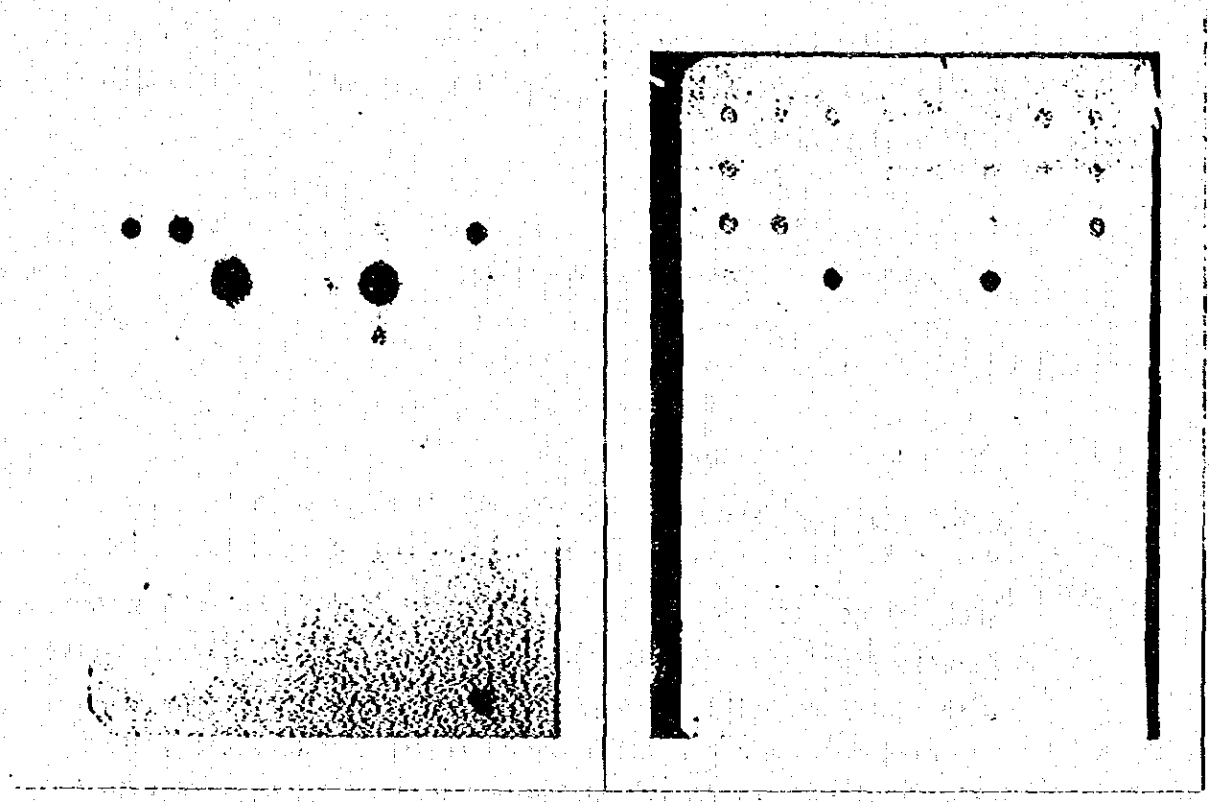
c) Expression of genes.
We are working in this field trying to acquire the expertise needed for the purpose. Actually we are sub-cloning inserts to the phage λ gt-11 which is a "mild expression" bacterial vector. One of our workers have been establishing two eucaryotic systems in the laboratory; one of them will be choosen for expression of a protein of interest as will be described in "future perspectives". The systems were: 1) Baculovirus; it was used the transfer vector pAcRR23 and cotransfection with AcNPV virus was performed in a cell line of Spodoptera frugiperda

I PLB-SF-21. The gene transferred in all the systems was the lac Z from E. coli, and in this case detection was by size on SDS-PAGE of trasformed cell extracts. 2) Vaccinia virus, strain MyCRH. The vector used was P2TK-1A was performed in-vivo homologous recombination in BSC40 cells and the recombinants were detected by immuno-chromogenic assays (black plaque assay).

h) Field Trials.

a) During the three years, 18 trips were done to a small town in the oriental valleys were the prevalence of malaria is high during all the time. The purpose was to collect infected mosquitoes for the standardization of detection, and to collect live specimes of the species Anopheles darlingi which was suggested to be one of the most important transmitters of malaria, for colonization in the laboratory.
The intents for colonization were not succesful, probably because special characteristics of the mating "Ceremony" of this species which require very big spaces. All further experiments were performed using the less infective species Anopheles albimanus

b) Detection of Plasmodium falciparum in mosquitoes. Comparison with one immunological method.
A group of 152 mosquitoes which were feed in blood infected with gametocytes, were eliminated at different days after infection. Analysis of contents of Plasmodium in torax and in abdomen was performed using an immunological kit provided to Dr. Kamiyama by the Walter Reed Army Hospital (U.S.A.) and with different probes: A mixture of plasmids 38R+4R labelled with ^{32}P, genomic DNA labelled with ^{32}P, the 21 mer repetitive synthetic oligonucleotide, and a mixture of 38R + 4R labelled with biotin.



Autoradiography of DNA extracted from mosquitoes detected with ^{32}P - probe

DNA extracted from mosquitoes detected with Biotynilated probes

A summary of the results is as follows:

Days infect.	No. Mosq.	E.L I S A (positive) %	38R + 4R ^{32}P (+%)	Genomic ^{32}P (+%)	Olig. Synt.(+%)	38R + 4R Biotin(+%)
4	28	0	18	14	22	32
5	16	0	6	6	6	18
6	19	0	5	0	0	10
7	28	0	6	4	4	14
8	13	0	0	0	0	0
9	13	0	9	9	0	0
10	40	30	8	8	8	8
Uninfected	27	0	0	0	0	0

From the same group different mosquitoes (not reusable for biochemical studies) were disected and observed microscopically the results were:

Days Infect.	No. Mosq.	% Positive
7	8	25
9	4	75
10	10	10
Cumulative porcentage		27%

There is no significant coincidence between ELISA and DNA probes. Allways a positive with the less sensitive probe is also positive with the other probes. The presence of positives from the fourth day of infection agrees with the microscopic observation, its unexpected the ELISA observation of "sudden" 30% positives in the tenth day without previous positivity.
New experiments are in way for elucidation of the problems post by these results.
c) For use with immunology,a field work for studing antibodies specific to defined antigens is being performed. Three groups of 50 donnors each were chosen. One of normal uninfected and without memory of infection; a second of people who migrated from non-endemic areas to endemic areas (oriental valleys) and who were malaria infected recently, and a third group of villagers from the pacific coast, who are living and working in hyperendemic areas and get only very mild infections.
The sera are being under study now with immunoprecipitation and with western blotting. Results will be used in accordance with immunology to improve the monoclonal- based, detection of parasites method.

2). Scientific progress in Immunology.

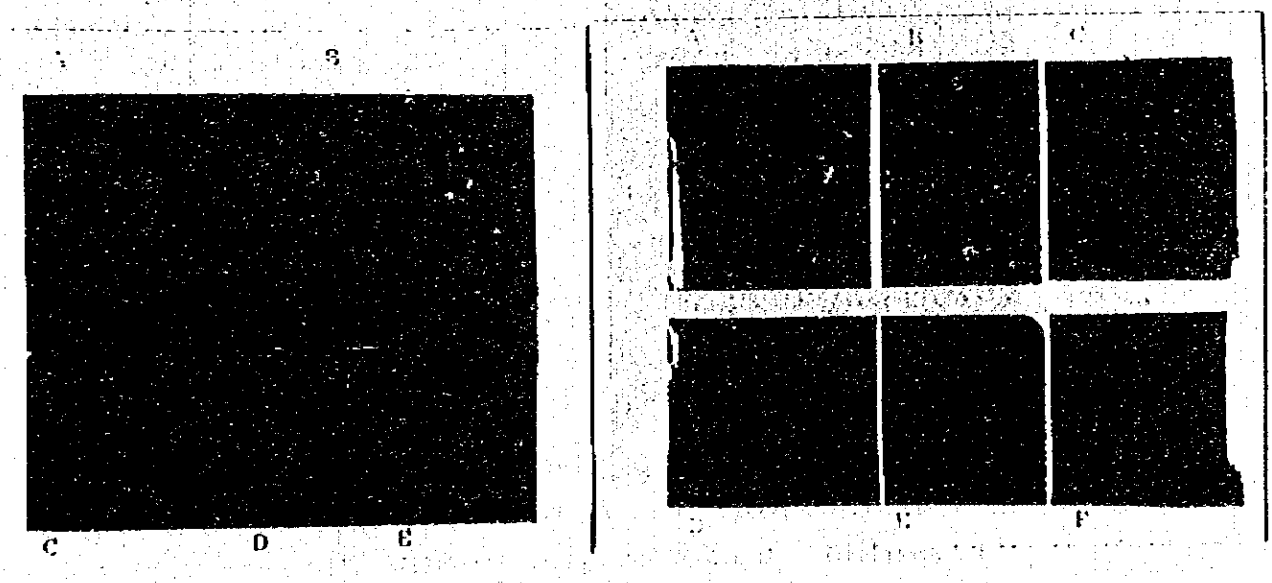
a). Detection of antimalarial antibodies by ELISA.

An improved ELISA method was succesfully implemented and tested (by Dr. Kamiyama's work and guidance).

Schizont rich fractions from cultured P. falciparum and P. vivax infected erythrocytes from blood donors were used as antigens.

The method, based on biotin labelled antibodies and avidine Phosphatase conjugates was able to detect, very simply, antibodies in samples of 10 ul of the patients blood.

b). Monoclonal antibodies were produced by several fusions of differently immunized mice spleen cells with P3x63 Ag 8.653 mouse myeloma cells. Two monoclonal antibodies (M-45 and G-172) against P. falciparum schizonts were choseen after a careful study.



A. Monoclonal M-45 B. Monoclonal G-172

C. Policlonal antisera D. Non immune serum

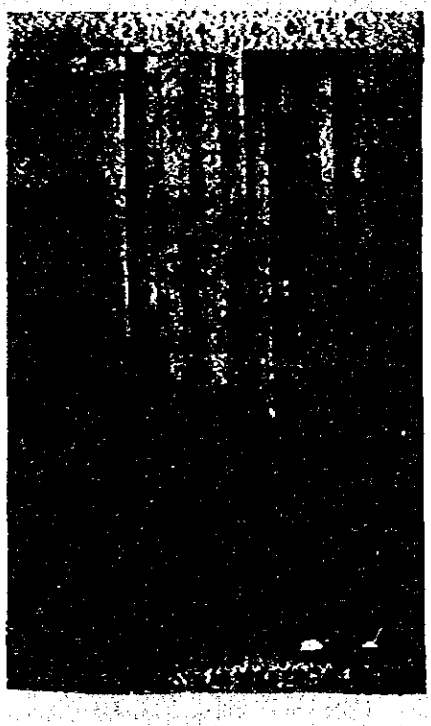
E. Microma Sup.

A,B,C Conc. M-45

DEF Conc. G-172

The immunofluorescence patterns on the schizont infected erythrocytes show different patterns. The monoclonal antibody M-45, IgM isotype, produced an uniform and generalized fluorescence; while that one of G-172, IgG2a isotype, showed patched regions of high intensity.

When a P. falciparum schizont extract was transfered to nitrocellulose after SDS-PAGE (Western blot), M-45 reacted with a 72 kd protein and two low molecular weight proteins of 30 and 26 kd. The G-172 monoclonal antibody identified only a 120 kd protein.

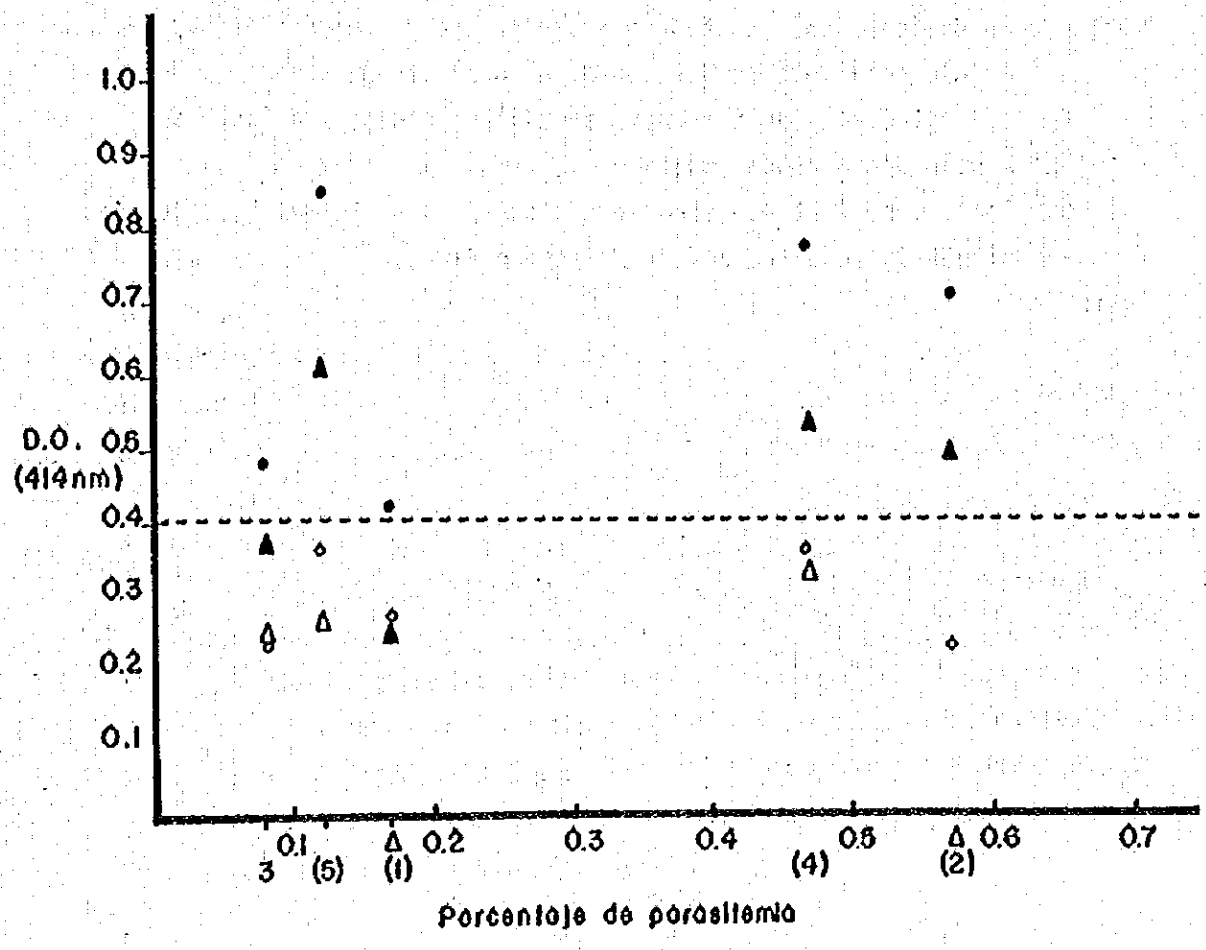


3,7 Monoclonal Ab. M-45

4,8 Monoclonal Ab. G-172

A mixture of the monoclonals was used in a sandwich ELISA to capture P. falciparum soluble proteins in sera of patients sufering of acute malaria. The test was positive until sera dilution of 1/400

A correlation of parasitaemia with O.D in several samples is shown:



filled circles and triangles are infected samples,

empty circles are non infected samples.

c). Under the direction of Dr. Kamiyama peripheral blood lymphocytes from falciparum malaria patients were tested for their responsiveness to P. falciparum parasites. Although the patient's lymphocytes responded specifically to the antigen, no clear-cut

relationship was shown between the degree of response and the history of the patients.
An apparent suppresive effect of T-lymphocytes and macrophages on lymphocytes of P. vivax patients was observed.

d). Field studies.
Dr. Kamiyama and the immunology team conducted small scale epidemiological studies to evaluate the usefulness of the serological methods described. A total of 752 samples were collected at Tolu-Sucre and at Villavicencio, Acacias, San Martin and Granada - Meta.
Antibodies in these sera were determined by ELISA. Positivities of 18% in Tolu and 34% in Meta were found.

3) General Evaluation

The main goal of the cooperation program, as stated by the agreement: "The governments will cooperate for the purpose of strengthening research capabilities on tropical diseases and thus contributing to the promotion of public health..." has been fully attained.

Specific targets were planned for the research programs, training, Japanese Experts working visits and supply of equipments and laboratory materials.

Every target was analyzed in detail in this report. In general all were accomplished. The laboratory research programs to a full extent, the field works were only preliminar and to a limited extent due to the characteristics of this kind of work and to the need of longer than expected laboratory validations; however the capability is fully established and the limited programs will be enlarged soon.

The educative targets, training of counterparts in Japan and coming of experts to Colombia were also completed. As explained in this report the impact of the knowledge acquired by the Institute was greatly amplified to other Colombian research Institutions.

The equipment established very good laboratories, up to date with the field. All the equipment is correctly functioning and is being used also by other researchers in the Institute and frequently to support related health research from other Colombian Universities and Institutes.

This project induced a huge progress and closed substantially the gap previously existing between our locally available technology and the laboratories from developed conuntries.

4) Other areas of impact

During this three years, the following activities related to formation of scientific personnel for Colombia (not for the Institute) were carried out.

Magister thesis: Four biochemistry thesis for M.Sc. in the National University were performed within the project.

This represents approximately 20% of the National output of posgraduate biochemists.
(Since only two faculties in the country have M.Sc. programs, and there are very few graduates).
Two Microbiology thesis for M.Sc. in the Javeriana University, and seven undergraduate science students performed (or are performing) their degree thesis. (From the National Univ.)
The first Ph.D. student in biochemistry in Colombia started this year her degree thesis in our laboratory within the project. At least one of the graduate students is now a teacher in the National University, and three are working at other Colombian research Institutions.
We trained as well two workers from the National Service for Erradication of Malaria, one from the Universidad del Valle, faculty of Sciences and three professors from the National University, faculty of Sciences.
This year a practical course on basic molecular biology technologies will be done in october.

B. Technical Aspects.

1). Japanese experts.
The program of Japanese experts work in our laboratories was completed. In biochemical research, a first visit of the expert, Mr. Sinichi Sakamoto was performed at the begining of the program, and he gave us support on ultracentrifugation techniques. In a second visit, (november 1988) basic technology on DNA sequencing was worked on; the third visit will be on June 1989.
In immunological research, Dr. Tsuneo Kamiyama supported us for a period of two years. He did a wonderful work, with technical results and a very good educational labour on our workers. He established cellular immunology lines which will be pursued by Gloria Múnera (actually counterpart in Japan) and by others in the Institute.

A copy of Dr. Xamiyama's report to our director is anexed to this document.

2). Colombian counterparts.
In the frame of this second cooperation program 5 colombian workers have been (or are being actually) trained in Japan. Other 5 were trained by the former program. From these 10 workers only one has left the Institute and the Country. The number of counterparts means that at the end of the project 8% of the professionals working in the Section of Research, Diagnostics and Reference of this Institute were trained in Japan.
The trainees work in 4 out of 11 groups, and cooperate also with researchers from all the other groups.

3). Colombian efforts for the completion of the program.
According to the agreement, the government of Colombia took the necesary measures to ensure the completion of the program, as follows:
a) Building space:
The laboratory of Biochemistry has a constructed and well installed area of 245 m2 and the laboratory of Immunology 326 m2.
In addition a room for animal facilities of 20 m2 was assigned to immunology, and a laboratory for radioactive work and chemical synthesis of 49 m2 was given to biochemistry.
In total 640 m2 of laboratories were made available to the program.
b) Qualified personnel:
In the biochemistry laboratory, the head of the group (Principal investigador), five professionals and two auxiliars were allocated to the cooperative program.
In the Immunology group, the head of the group (principal investigador), four professionals and two auxiliars were allocated.
Under our actual salary regimen, the above workers constitute an aproximate cost of US$87.000 per annum.

The services of technical and administrative workers was obtained when required.

c) Supply of necessary materials:

The government provided an extra, exclusive budget of US$25.000 (aproximately) per year for the program. Other expenses when necessary where charged to the regular budgets of the participating groups.

The transportation of equipments donated by JICA was always done by the Institute with the minimum possible delay.

All the express for maintenance and running of the equipment were assumed by the Institute.

All the technical modifications necessary in the buildings for installation of equipment or for better isolation and care, were duly performed.

d) National trips for field studies:

All the costs of the national trips done within the program were assumed by the Institute.

4). Conditions and use of the equipments.

All the equipment has been installed and is functioning under proper conditions.

The team will perform a visual inspection.

Occasional failures have been corrected and preventive maintenance of the most delicate instruments is performed by their representatives in Bogotá.

C. Future perspectives for the use the acquired technology in Colombia.

a). Continuation of the actual research lines.

As defined previous, the application of the acquired technology to field studies must be increased. The bigger part of laboratory standardization is finished and only minor adjustments are expected, unless a very huge technical improvement will be published in the near future.

Possible improvements in sensitivity of probes could be achieved by amplification methods as PCR and Q Beta replicase, or by natural amplifications using rRNA hypervariable sequences. Those options are being actually studied in the laboratory.
Both systems the immunological and the DNA recombinant will be tried in a wide number of samples. For this purpose preliminar contacts have been done with the SEM (Service for Erradication of Malaria), institution wich can reach easily every place in the country.
A basic and important research on the biochemistry of the parasite and the mecanisms of the infection has developped in parallel to the cooperation program, due to the availability of technical facilities and expertise wich previously was out of our possibilities.

b). Application to other tropical diseases.

The application of the developped techniques to other tropical diseases depends on the succesful implementation of cooperation within the groups in the Institute. Several efforts have been done to attain this goal:

1. The study of human papilloma infections by DNA hybridization was agreed upon. One virologist worker, in the laboratory of biochemistry transformed E. coli with plasmids containing 10 different papilloma fragments. She succeded to isolate fragments, and to learn labelling and hybridization technology. Because of personal causes the worker left the Institute and the project was postponed.
2. In the efforts to erradicate polio from América, the Institute has a very important goal in characterization of the virus isolated from infections, and study the dinamics of the "virus migration" in ours and in neighbour countries. A possible method to use is the DNA probes hyoridization. For this purpose, and in the frame of the biochemistry component one worker of the virology group is actually being trained in Kaketsuken - Kumamoto. She will assigned at her return to work in the described problem of characterization of polio-virus infections.

3). Contacts have been established with the Institute of Tropical Medicine Alexander von Humboldt in Lima - Perú and with the Universidad Católica de Chile in Santiago - Chile where groups similar to ours are developing specific probes for Schigella, Salmonella and Campilobacter. They agreed to provide us with the probes. Once the probes will be available (first half of 1990) a program for verification, and use in Colombian samples will be done in a cooperation between the microbiology and biochemistry groups (already agreed upon).

4). Contacts with the groups for production of anti-venom sera took place.
During this year, the antisera group started with the collection of different venom samples and antisera, and with the characterization of the venoms using various biochemical parameters as phospholipase activity, anti-coagulation activity etc.
A further development include the cloning of cDNA from venom glands, to obtain through expression (and maybe by directed mutagenesis) better antigens.

5. Contacts have been done with the persons in charge of the quality control of vaccines and biologicals to establish in the near future the ability to check in some vaccines the presence of heterologous DNA, from the host cells, using DNA probes. This might be important, in the near future (beggining of 1990) for control of the National production of antirabies vaccines in continuous cell lines.

ANEXES

BIOMEDICA
Vol. 8, Nos. 1 y 2 - 1988

ANALISIS DE PLASMIDOS RECOMBINANTES CON INSERTOS DE ADN GENOMICO DE *Plasmodium falciparum*

FERNANDO ANGEL S.*, RAMON MANTILLA*, MOISES WASSERMAN*, **

Se describe la preparación de plásmidos pUC18 recombinantes provenientes de la construcción de una biblioteca genómica del parásito *Plasmodium falciparum* usando una modificación del método de lisis alcalina (1). La cantidad de plásmido producido es suficiente para llevar a cabo varios análisis de digestión con enzimas de restricción y electroforosis en geles de agarosa.

INTRODUCCION

Para determinar si una bacteria posee un plásmido en su interior, es necesario aislar el ADN mediante varias etapas sucesivas. El ADN cromosomal y el plasmídico son generalmente extraidos a partir de bacterias que han sido tratadas con lisozima y lisadas con un detergente. Posteriormente el ADN es liberado de ARN y de proteínas mediante tratamientos con ribonucleasa y proteasa. Después de sucesivas extracciones fenólicas, el ADN plasmídico circular es purificado en un gradiente de CsCl en presencia de bromuro de etidio (2).

Varios métodos para la preparación de plásmidos recombinantes a partir de *Escherichia coli* han sido descritos (3-8), siendo el método de la lisis alcalina uno de los más usados por su sencillez y buen rendimiento (9). Sin embargo, este método no es ideal cuando se requiere examinar un gran número de clones de una forma rápida. Con el fin de resolver estos problemas, una modificación del método de lisis alcalina fue establecida (1), permitiendo aislar plásmidos recombinantes a partir de cultivos de poco volumen y facilitando de esta forma el análisis de una gran cantidad de clones en corto tiempo.

En el presente trabajo se describe el análisis por dicho método de varios plásmidos pUC18 recombinados. Los plásmidos recombinantes provienen de una biblioteca genómica de *Plasmodium falciparum* construida en el plásmido pUC18 (10-12). La cantidad de plásmido producida por el método usado oscila entre 3 y 5 ug, lo que permite llevar a cabo entre 10 y 15 análisis electroforéticos en minigeles de agarosa, de cada plásmido extraido.

MATERIALES Y METODOS

Cultivo Bacteriano

Se utilizó la bacteria *Escherichia coli* JM83 transformada con el plásmido pUC18 recombinado (10-14). Las bacterias de la misma cepa, conteniendo el plásmido pUC18 no recombinado, fueron usadas como control.

A partir de una colonia transformada, se inoculó con un asa estéril, un volumen de 2,5 ml de medio de cultivo TB, suplementado con ampicilina en una concentración de 25 ug/ml (15). El cultivo fue incubado a 37°C durante 15 horas.

Lisis alcalina

Las células bacterianas fueron recuperadas tomando 1,3 ml del cultivo en un tubo de polipropileno de 1,6 ml por centrifugación a 1600xg durante 10 minutos a 4°C en una microcentrífuga Tomy MR 150. El sobrenadante fue desechado y 1,2 ml de cultivo fueron

* Grupo de Bioquímica. Instituto Nacional de Salud.
** Facultad de Ciencias. Universidad Nacional de Colombia.

centrifugados de la misma forma. Una vez eliminado el sobrenadante, el precipitado fue suspendido en 1 ml de tampón STE (10mM Tris HCl pH 8.0 - 100mM NaCl - 1mM EDTA) y precipitado nuevamente por centrifugación a 1600xg durante 10 minutos a 4°C. El sobrenadante fue eliminado por aspiración dejando el precipitado lo más seco posible.

El precipitado fue resuspendido en 0,2 ml de tampón de lisis (50mm glucosa - 10mm EDTA - 25mM Tris-HCl pH 8.0 - lisozima 10 mg/ml), homogenizado y mantenido 10 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, 0,4 ml de solución alcalina fría (NaOH 0,2N-SDS 1%) preparada en el momento de usar, fueron agregados a la suspensión. La solución fue mezclada por inversión del tubo y mantenida en hielo por 5 minutos. Luego fueron agregados 0,3 ml de una solución de acetato de potasio 3M (pH 4.8) (16), mezclados durante 10 segundos y la mezcla final fue incubada en hielo por 15 minutos; posteriormente fue centrifugada a 6000xg durante 10 minutos a 4°C y el sobrenadante fue transferido a un nuevo tubo, teniendo cuidado de no pasar partículas de precipitado. El volumen correspondiente al sobrenadante recuperado osciló en todos los experimentos entre 0,80 y 0,85 ml.

Una mezcla fenol-cloroformo en un volumen de 0,6 ml, fue agregada al sobrenadante y la solución resultante fue mezclada por inversión suave varias veces durante 5 minutos, a temperatura ambiente. Después de la centrifugación a 800xg durante 5 minutos, a temperatura ambiente, la fase acuosa superior fue recuperada (0,75 ml), transferida a un nuevo tubo y extraída nuevamente con 0,75 ml de una nueva mezcla fenol-cloroformo. Después de centrifugar como se describió anteriormente, la fase acuosa fue recuperada (0,6 ml) y extraída con un volumen igual de cloroformo. La fase acuosa (0,45 - 0,50 ml) fue transferida a un nuevo tubo y extraída 2 veces con igual volumen de éter etílico saturado en tampón TE (10mM Tris-HCl pH 7.5-1mM EDTA). El éter fue eliminado completamente por calentamiento a 68°C durante 10 minutos. La solución se dejó enfriar a temperatura ambiente y 0.6 volúmenes de isopropanol fueron agregados. Después de mezclar suavemente, el ADN fue precipitado a temperatura ambiente durante 5 minutos.

El ADN precipitado fue recuperado por centrifugación a 7000xg por 30 minutos, a temperatura ambiente. El sobrenadante fue eliminado y el precipitado fue lavado con 0.5 ml de etanol absoluto y recuperado nuevamente por centrifugación a 12000xg durante 10 minutos, a 4°C. El sobrenadante fue eliminado y el precipitado se dejó secar colocando el tubo invertido sobre un papel absorbente. Una vez seco, el precipitado fue disuelto en 50 ul de tampón TE conteniendo ribonucleasa A en una concentración final de 50 ug/ml. La solución fue incubada por 10 minutos a 37°C e inmediatamente después analizada por electroforesis.

Electroforesis y Digestión

Con el fin de determinar la concentración de ADN plasmídico obtenido, una pequeña cantidad del preparado final (2-5ul) fue comparada con ADN plasmídico patrón, de concentración conocida, mediante electroforesis en un gel de agarosa al 1%. Alternativamente, también se usó la técnica de fluorescencia, emitida por coloración con bromuro de etidio para determinar la concentración de ADN plasmídico obtenido (16).

Una vez establecida la concentración de ADN plasmídico, se digirieron con la enzima de restricción apropiada entre 100 y 300 nanogramos del plásmido a 37°C; los fragmentos generados por la digestión fueron separados por electroforesis.

RESULTADOS

Para determinar la presencia de plásmidos recombinantes a partir de varios clones provenientes de una Genoteca de ADN de *Plasmodium falciparum*, se usó el método de minipreparación por lisis alcalina (1).

Inicialmente se hicieron ensayos omitiendo la digestión del preparado final con ribonucleasa A y precipitando el ADN plasmídico con etanol absoluto, en lugar de isopropanol. En la Figura 1 se muestra claramente la cantidad de ARN presente en los minipreparados (carriles b-k) comparados con plásmido purificado en gradiente de cloruro de cesio usado como control (carriles a, l' m).

Con el fin de eliminar el ARN, los preparados fueron incubados con ribonucleasa A como se describió en materiales y métodos. Bajo estas condiciones el ARN fue eliminado en gran parte pero no totalmente (resultados no mostrados). La precipitación con isopropanol, además de la digestión con ribonucleasa A, permitieron eliminar el ARN eficientemente como se observa en la Figura 2.

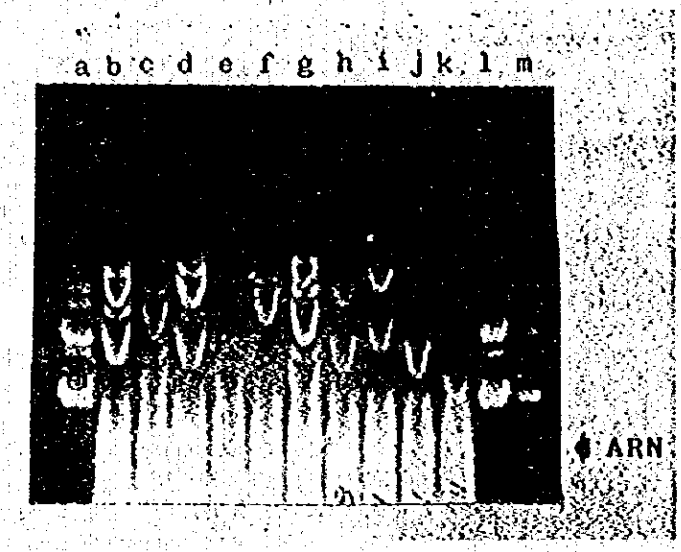


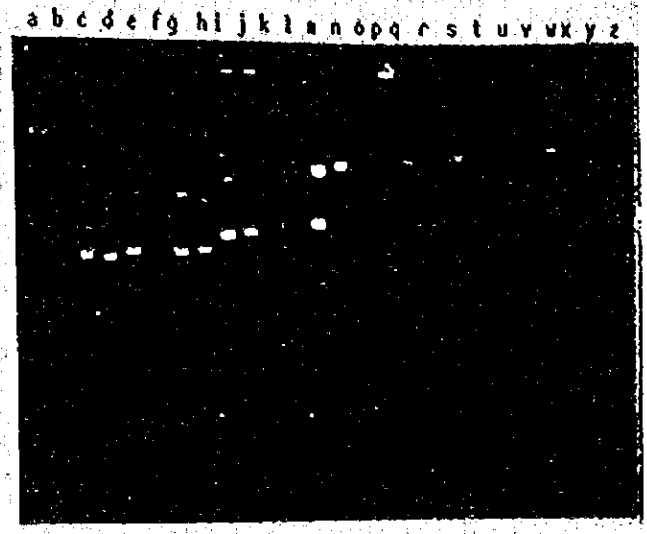
Fig. 1. Comparación de plásmido purificado por gradiente de cloruro de cesio con preparados no tratados con ribonucleasa A y precipitados con etanol. La electroforesis fue realizada como se describió en materiales y métodos. Carriles a, l, m: plásmido pUC18 purificado por gradiente de cloruro de cesio. Carriles b-k: diferentes preparados no tratados con ribonucleasa A y precipitados con etanol.

Fig. 2. Análisis electroforético de los mismos preparados de la figura 1 precipitados con isopropanol y tratados con ribonucleasa A. Carriles a-e, g-k: diferentes preparados tratados como se describió. Carril f: plásmido pUC18 purificado por gradiente de cloruro de cesio.

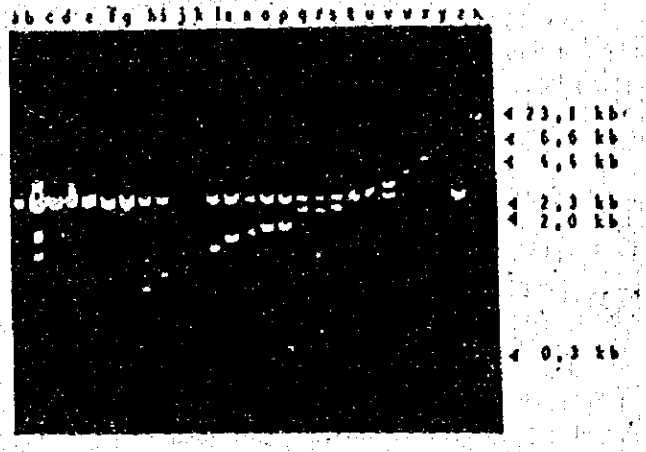
Los preparados ya libres de ARN fueron analizados por electroforesis en geles de agarosa, antes y después de digestión. Los preparados sin digerir muestran los diferentes grados de enrollamiento que presentan las moléculas de ADN circulares (Figura 3A).

Los preparados digeridos con la enzima EcoRI mostraron que el tamaño de los fragmentos clonados de ADN del parásito y analizados en este trabajo, oscila entre 0,3 Kb y 10 Kb. Además mostraron claramente que éstos están libres de contaminación por ADN bacteriano y por ARN. La eliminación total del ARN es muy importante ya que la presencia de éste enmascararía fácilmente fragmentos de bajo peso molecular como es el caso de 4 de los fragmentos analizados (Figura 3B, carriles d, e, f, g).

Fig 3. 25 diferentes preparados separados por electroforesis en gel de agarosa.



A. Preparados sin digerir
a: ADN de lambda digerido con Hind III
b: plásmido pUC18
c: mezcla de plásmidos recombinados
d-z: diferentes preparados sin digerir.



B. Los mismos preparados presentes en A después de digestión con la enzima Eco RI
a: plásmido pUC18
b: mezcla de plásmidos recombinados
c-z: diferentes preparados digeridos
λ: ADN de lambda diferido con Hind III
Los pesos moleculares son expresados en kilobases (kb).

DISCUSION

La preparación rápida y el análisis de plásmidos a partir de pequeños cultivos, es esencial en estudios de biología molecular y de resistencia de bacterias a diferentes antibióticos. Varios métodos para la preparación rápida de plásmidos, que permiten el análisis de muchas muestras en poco tiempo a partir de pequeños cultivos, han sido descritos (7-9, 17, 18), siendo el método de la lisis alcalina uno de los más usados por su sencillez y buen rendimiento (1).

Nosotros analizamos 25 plásmidos recombinantes provenientes de una genoteca de ADN de *Plasmodium falciparum* construida en el plásmido pUC18 (10-12). Las preparaciones obtenidas mostraron un alto grado de pureza, ya que se eliminó eficientemente el ARN y el ADN bacteriano, como fue verificado por electroforesis (Figura 2). La eliminación de ARN es esencial, ya que la presencia de éste hubiera imposibilitado la visualización de fragmentos de bajo peso molecular (Figura 3B, carriles d, e, f, g).

La cantidad de plásmido producido a partir de 2,5 ml de cultivo fue de 3 a 5 ug, cantidad que permite llevar a cabo de 10 a 15 electroforesis en agarosa. En el caso de producir plásmido pUC18, el rendimiento es cerca de cinco veces mayor, cuando se usa el medio TB que cuando se usa el medio LB corrientemente utilizado; este resultado ha sido recientemente informado (15) y ha sido verificado por nosotros tanto en pequeños como en grandes preparaciones de dicho plásmido.

El método de minipreparación por lisis alcalina nos permitió hacer un análisis de 25 muestras en un solo día, lo cual es una ventaja cuando se quieren analizar clones recombinantes provenientes de la construcción de una biblioteca genómica.

Los fragmentos analizados aquí deberán ser estudiados en más detalle, debido a que son elementos muy útiles para el diagnóstico de la malaria por hibridación molecular y para llevar a cabo estudios sobre la biología del parásito.

SUMMARY

We describe here the growth and preparation of pUC18 recombinant plasmids from a *Plasmodium falciparum* genomic DNA library. The protocol used is a modification of alkaline lysis method (1). This method yields a quantity of plasmid DNA that is suficient for subsequent analysis by restriction digestion and agarose electrophoresis.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue realizado con la ayuda de JICA, Japan International Cooperation Agency y el Fondo de Investigaciones Francisco José de Caldas "Colciencias".

BIBLIOGRAFIA

1. Isch-Horowicz D, Burke JF. Rapid and efficient cosmid cloning. Nucleic Acids Res. 1981; 9: 2989.
2. Radloff R, Bauer W, Vinograd J. A dye-buoyant density method for the detection and isolation of closed circular duplex DNA: The closed DNA in Hela cells. Proc Natl Acad Sci U.S.A. 1967; 57: 1514.
3. Meyers JA, Sánchez D. Simple gel electrophoretic method for the identification and characterization of plasmid deoxyribonucleic acid. J Bacteriol. 1976; 127: 1529.
4. Barnes WM. Plamid detection and sizing in single colony lysates. Science 1977; 195: 393.
5. Michel S, Arena V, Bauer W. Physical properties and gel electrophoresis behaviot of R12-derived plasmid DNAs. Nucleic Acids Res. 1977; 4: 1465.
6. Telford J, Boseley P. Novel screening procedure for recombinant plasmids. Science 1977; 195: 391.
7. Eckhardt T. A rapid method for the identification of plasmid deoxyribonucleic acid in bacteria. Plasmid 1978; 1: 584.
8. Klein RD, Selsing E, Wells RD. A rapid microscale technique for isolation of recombinant plasmid DNA for restriction enzyme analysis. Plasmid 1980; 3: 68.
9. Birnboin HC, Doly J. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinat plasmid DNA. Nucleic Acids Res. 1979; 7: 1513.
10. Angel F, Mantilla R, Wasserman M. Clonaje molecular del DNA de *Plasmodium falciparum* (FCB-1). II Congreso Latinoamericano de Medicina Tropical, Mayo 25-29, 1987. Bogotá (Colombia).
11. Mantilla R. Construcción de una biblioteca genómica de *Plasmodium falciparum* e identificación de clones por hibridización. Tesis Ms.Sc., Facultad de Química, Universidad Nacional de Colombia, 1988.

12. López E, Acosta H. Caracterización de fragmentos genómicos de ADN de *Plasmodium falciparum* generados con la enzima EcoRI y clonados en el plásmido pUC18. Tesis de Grado, Facultad de Química, Universidad Nacional de Colombia, 1988.

13. Viera J, Messing J. The pUC plasmids, an M13mp7 derived system for insertion mutagenesis and sequencing with synthetic universal primers. Gene 1982; 19: 259.

14. Ruther U. Construction and properties of a new cloning vehicle, allowing direct screening for recombinant plasmids. Molec Gen Genet. 1980; 178: 475.

15. Tartof KD, Hobbs CA. Improved media for growing plasmid and cosmid clones. Focus, BRL 1987; 9(2): 12.

16. Maniatis T, Fritsch EF, Sambrook J. Molecular Cloning. A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory; Cold Spring Harbor 1982.

17. Kado CI, Liu ST. Rapid procedure for detection and isolation of large and small plasmids. J Bacteriol. 1981; 141: 1365.

18. Gibson TJ, Sulston JC. Preparation of large numbers of plasmid DNA samples in microtiter plates by the alkaline lysis method. Gene Anal Techn. 1987; 4: 41.

BIOMEDICA
Vol. 8, Nos. 1 y 2 - 1988

ARTICULOS ORIGINALES

CONSTRUCCION DE UN BANCO DE CLONOS DE cDNA A PARTIR DE mRNA DE *P. falciparum*

MARIA ORFA DE ROJAS*, MOISES WASSERMAN*, **

Se aisló mRNA-poli A de parásitos de *P. falciparum* (cepa Colombiana FCB-2) con una edad entre 34-36 horas. Esta fracción de mRNA fue traducida in-vitro utilizando un lisado de reticulocitos de conejo suplementado en algunos casos con tRNA del parásito o tRNA de levadura. Los productos de la traducción in-vitro aparecen en un rango entre 20 y 200 kd mostrando una gran similitud con las proteínas sintetizadas in-vitro en cultivos altamente sincronizados del parásito.

A partir de mRNA-poli A caracterizado en ésta forma se construyó una genoteca de cDNA en el fago λ gt10. La eficiencia de clonación fue de 4.4×10^6 recombinantes por microgramo de cDNA.

INTRODUCCION

Una mejor comprensión de la biología molecular de los parásitos de malaria abre nuevas perspectivas para el control de la enfermedad.

Al igual que otros autores nosotros consideramos que la tecnología de DNA recombinante puede ser una buena vía para entender la organización genética, el proceso molecular que maneja el crecimiento y desarrollo del parásito y los productos de la expresión de genes que puedan tener importancia clínica (1, 2, 3).

Son varios los trabajos que se han reportado sobre aislamiento y caracterización tanto del DNA como del RNA del plasmodium (1, 2, 3, 4, 5) así como sobre la clonación y expresión de genes cuyos productos algunas veces han sido utilizados en estudios de inmunización de ratones o monos (6, 7) o que en general han contribuido al conocimiento molecular de los parásitos de malaria (8, 9, 10).

Como parte de nuestros estudios sobre la biología molecular del parásito se estableció la tata de síntesis de DNA, RNA y proteínas durante el desarrollo asexual del *P. falciparum* (11). Ahora en este trabajo se describe la construcción de un banco de clonos de cDNA a partir de mRNA de parásitos con una edad aproximada de 34 horas (trofozoítos maduros). Esta genoteca se está caracterizando y será utilizada para estudios de expresión genética a través del ciclo y para la investigación de genes que codifiquen para proteínas de interés.

MATERIALES Y METODOS

Cultivo y sincronización del *P. falciparum*

Parásitos de la cepa Colombiana FCB-2 se cultivaron en células rojas humanas tal como se describió (11). El cultivo se sincronizó con 5% Sorbitol dejando una población de anillos del 5%, los cuales después de 22 horas de cultivo fueron en su totalidad trofozoítos maduros.

* Grupo de Bioquímica - Instituto Nacional de Salud.
** Profesor de Bioquímica - Universidad Nacional.

Las células rojas empacadas de 300 ml de cultivo se trataron 1:1 con 0.15% de saponina en RPMI, por 15 minutos a temperatura ambiente y agitación ocasional; las células se lavaron 3 veces con RPMI a 3000 rpm y el pellet se congeló a -70°C.

Síntesis de proteínas durante el desarrollo intraeritrocítico del *P. falciparum*

Se utilizaron cultivos supersincrónicos (11), con parasitemias entre 5 y 6% de anillos. El cultivo se incubó por 30 minutos en medio RPMI-1640 libre de metionina pero suplementado con buffer HEPES 25mM, $NaHCO_3$ 32mM y 82µCi de 35 S-metionina por ml de medio (1245 Ci/mmol - NEN).

Los parásitos se liberaron de la célula roja por tratamiento con 0.15% de saponina y una mezcla de inhibidores de proteasas, consistente en PMSF 1.0mM (Phenyl methyl sulfonyl fluoride), TPCK 0.1mM (L-1 Tosylamide-2 phenyl-methyl-chloromethyl-ketone) TLCK 0.1mM (Na-P-Tosyl-Lysine Clorometyl Ketone), ácido B-amino caproico 2mM, EDTA 5mM, (ácido ethylenediamino tetracetico) y EGTA 5mM (ácido ethylenglycol bis-(B-amino eter) N.N.N.N. tetracético).

Las células, se incubaron a 37°C por 20 minutos y se sedimentaron a 15.000 rpm por 15 minutos. Los parásitos libres de la célula huésped, se lavaron con el mismo medio, se resuspendieron en 100µl de HBS, y se determinó la radioactividad por centelleo líquido.

Para el análisis electroforético de las proteínas, se marcaron 0.5ml de cultivo supersincrónico a las 12, 24 y 40 horas de edad del parásito; la marcación se hizo por períodos de una hora en las condiciones anteriormente descritas. Las muestras, se trataron en la misma forma y los parásitos liberados del eritrocito, se resuspendieron en 20µl de medio RPMI-1640 con inhibidores de proteasas y se congelaron a -20°C hasta su procesamiento. Posteriormente, se descongelaron, se resuspendieron en 25µl de buffer muestra -SDS (0.075M Tris-H_2SO_4, pH 8.3, 2% de B-mercapto-etanol) y se incubaron, por 30 minutos a 45°C y por 10 minutos a 92°C. Sobre 5µl de estas muestras se hizo una nueva determinación de la radioactividad incorporada. Las muestras, se sometieron a electroforesis en geles discontinuos en capa fina de SDS - poliacrilamida al 15%.

Como patrones de peso molecular se usaron: miosina, P.M. 205.000; B-galactosidasa, P.M. 116.000; fosforilasa B, P.M. 97.400; albúmina sérica bovina, P.M. 66.000; ovalbúmina, P.M. 45.000, y anhidrasa carbónica, P.M. 29.000. Los péptidos detectados mediante la autorradiografía, se leyeron en un densitómetro (Unicam SP 1700 Ultraviolet Spectrophotometer con Scanning Densitometer Accessory).

Aislamiento de RNA total y selección del poli A - mRNA

El pellet de parásitos liberados con saponina se trató con 3 volúmenes de solución de lisis compuesta de 100mM NaAc pH = 5.0, 10mM EDTA, 1% SDS, 100 µg/ml de heparina y 0.1M 2-mercaptoetanol a 4°C. Se hicieron 3 extracciones con fenol-cloroformo, agitando la mezcla de extracción por 5 minutos a 60°C antes de centrifugar (2000xg, 5 min).

Los ácidos nucléicos se precipitaron con 2.5V de 100% Etanol sin posterior incremento de la fuerza iónica por 2 horas a -70°C y se recuperaron por centrifugación a 20.000xg, 30 minutos a 0°C. El precipitado se disolvió en 1 ml de 10mM de hepes pH = 7.5, se mezcló con un volumen igual de 4M LiCl y se dejó 14 horas a 4°C.

El RNA total se recuperó por centrifugación a 20.000xg, 30 min. a 0°C, se disolvió en 1 ml de 2% de acetato de potasio, se precipitó con etanol y se cuantificó espectrofométricamente a 260nm. A partir del RNA total se seleccionó el poli A-mRNA utilizando oligo dT-celulosa (tipo 77F Pharmacia). La preparación de la oligo dT-celulosa y la recolección del poli A se hizo según los protocolos usuales (12, 13) pero debido a las características de la oligo dT-celulosa disponible, la muestra se absorvió sobre el material y luego se separó por centrifugación a 1600xg por 5 minutos a temperatura ambiente. La cuantificación se hizo espectrofotométricamente o por titulación con bromuro de etidio (12).

Recuperación de tRNA

La fracción soluble en LiCl se precipitó con etanol y se pasó a través de Sephadex G-100 (10mM Tris pH = 7.8, 1mM EDTA). El material recuperado por una segunda precipitación etanólica se guardó a -20°C.

Traducción in-vitro del poli A + mRNA

Se utilizó un sistema compuesto en un 50% por lisado de reticulocitos de conejo (150 Amersham) y un Coctel de traducción que contenía creatina fosfato 8mM, creatina kinasa 0.2mg/ml, ATP 1mM, DTT 2mM, espermidina 0.5mM y una mezcla de aminoácidos 30µM. Se estandarizaron las concentraciones óptimas de Mg^{++}, K^{+} y mRNA en el sistema utilizando tRNA de levadura (0.05 - 0.2µg/µl) como estimulador de la síntesis de las proteínas del parásito y 1µCi de una mezcla de aminoácidos marcados con ^{14}C (A.S. 113-523mCi/mmol). En las condiciones óptimas estandarizadas pero en presencia de 98µCi de ^{35}S-Metionina (1000Ci/mmol) se efectuó el ensayo de traducción in-vitro con 8µg de RNA total, 1µg de poli A-mRNA, 10µg de poli A⁻ suplementado en algunos casos con 0.2µg/µl de tRNA de levadura o del parásito. Como control se usó el lisado de reticulocitos suplementado con 0.2µg/µl de tRNA de levaduras.

Los productos de la traducción se analizaron por electroforesis en geles de SDS-poliacrilamida (10% T, 2.7% C) utilizando el volumen total de muestra y una mezcla preteñida de marcadores de alto peso molecular de BRL (rango 14 a 200 Kd). Se hizo una fluorografía del gel (Amplify - Amersham) y se expuso contra Hyperfilm - Bmax (Amersham) por 48 horas. La película se reveló con D19 por 5 minutos a 20°C.

Síntesis de cDNA

Básicamente se utilizó el método de Gubler y Hoffman (14) con las siguientes modificaciones: 10µg de poli A-mRNA aislados de parásitos con 34 horas de edad se incubaron a 42°C por 40 minutos con 30mM KCl, 10mM $MgCl_2$, 10mM DDT, 50 mM tris pH = 8.3, 2mM dNTP, 100µg/ml de oligo dT 12 - 18, 10 µCi α ^{35}SdATP (1000Ci/mmol) y 20 U de transcriptasa reversa (AMV, FPLC pure de Amersham) por µg de mRNA en un volumen de 40µl. La reacción se paró por adición de 25mM de EDTA; el producto fue extraido con fenol: cloroformo y precipitado con etanol en presencia de 2M de acetato de amonio. La cuantificación de la síntesis de la primera cadena se hizo midiendo la radioactividad insoluble en TCA.

El producto total de la reacción anterior (885ng) se procesó en 100 µl de 20mM tris. HCl pH = 7.5, 5mM $Mgcl_2$, 10mM $(NH_4)_2$ SO_4, 100mM KCl, 0.15mM B-NAD, 50µg/ml BSA, 40µM dNTP, 8.5u/ml E. coli RNase H, 230u/ml DNA polimerasa I y 10u/ml E. coli DNA ligasa. Se hicieron dos incubaciones sucesivas por 60 minutos a 12°C y por 60 minutos a 22°C. La extracción, precipitación y cuantificación de la segunda cadena se hizo en la forma descrita para la primera síntesis.

Construcción de la Genoteca

Inicialmente 1µg de DNA control y 885ng de cDNA de *P. falciparum* marcados radioactivamente con ^{35}S-αdATP, se metilaron para proteger los sitios EcoRI. Luego se adicionaron acopladores EcoRI, sobre los cuales mediante una digestión con la enzima se generaron extremos cohesivos. El exceso de acopladores se separó utilizando una columna de biogel A - 50m. Las fracciones se analizaron por centelleo líquido y se escogieron aquellas que eluyeron con el más alto conteo, teniendo en cuenta de no recoger las fracciones finales para evitar la contaminación con los adaptadores.

Las fracciones escogidas se precipitaron con etanol en presencia de 0.3M de acetato de sodio. El DNA recuperado se suspendió en buffer STE (100mM NaCl, 10mM tris pH = 7.5, 1mM EDTA). Los fragmentos de cDNA unidos a acopladores EcoRI se clonaron en el vector λgt10 siguiendo los protocolos recomendados por los fabricantes del sistema (15). 50, 100 y 150 ng de cDNA se ligaron con 1µg de brazos de λgt10 en 10µl de buffer de ligación y 2.5u de T4 DNA ligasa a 15°C por 14 horas. La mezcla total de ligación fue empaquetada in-vitro utilizando los extractos de brazos y cabezas del vector y la selección de clonos recombinantes se hizo en E. coli (cepas NM 514 y L 87). El DNA control fue un DNA proveniente de M13 mp8 digerido con Hae III compuesto de fragmentos con extremos romos en un rango de tamaño entre 69 y 2527 pb. La mezcla de empaquetamiento con el mejor título se sembró totalmente en alícuotas de 50µl sobre E. coli NM 514 (aprox. 10^4 placas/caja de 150mm de diámetro). Todas las placas fueron recogidas por tratamiento con buffer SM (0.14M NaCl, 10mM Mg SO_4. $7H_2O$, 5mm Tris pH = 7.5, 0.01% gelatina) por 16 horas a 4°C. Este extracto se trató con 5% de cloroformo, se centrifugó a 6000xg, 5 minutos a 4°C y se guardó en presencia de 0.3% de cloroformo a 4°C.

RESULTADOS

Polipéptidos sintetizados por los parásitos en sus diferentes estadios

La Figura 1, muestra las autorradiografías y densitogramas de un gel en el que se separaron los polipéptidos sintetizados por anillos de 12 horas, trofozoítos de 24 horas y esquizontes de 40 horas. Se detectaron alrededor de 20 bandas en anillos y cerca de 35 en trofozoítos y esquizontes.

No se detectó ningún péptido sintetizado exclusivamente por anillos; sin embargo, hay algunos que aunque se encuentran en todo o parte del ciclo, parecen ser preferencialmente sintetizados durante dicho estadio. Los más notables tienen pesos moleculares alrededor de 75.000, 65.000, 54.000 y 53.000.

En trofozoítos y esquizontes a pesar de existir muchas bandas comunes se ven polipéptidos que se sintetizan en forma exclusiva en uno de los estadios.

Los polipéptidos más notables sintetizados por trofozoítos y no por esquizontes, forman un patrón complejo con más de 8 bandas localizadas en una región de bajo peso molecular entre 20.000 y 34.000.

Los polipéptidos sintetizados por esquizontes exclusivamente tienen pesos moleculares de 105.000, 47.000, 41.000 y 39.000.

En la región de altos pesos moleculares parece ocurrir síntesis prefencial en el estadio de esquizontes de bandas correspondientes a 205.000, 180.000, 150.000, 135.000, 125.000 y 118.000, aunque dentro del mismo rango existe síntesis de polipéptidos con pesos moleculares similares en los estadios de trofozoítos y anillos. Polipéptidos con pesos moleculares superiores a 205.000 parecen sintetizarse de manera bastante uniforme durante todo el ciclo.

Aislamiento de RNA total y selección del poli A-mRNA

Se partió de 300 ml de cultivo de FCB - 2 incubados por 22 horas después de la sincronización con sorbitol, lo cual permitió trabajar con una población de 4.8×10^9 parásitos como trofozoítos maduros. Mediante este protocolo se logró obtener 1mg de RNA total. La relación A260/A280 para esta preparación fue de 2.3.

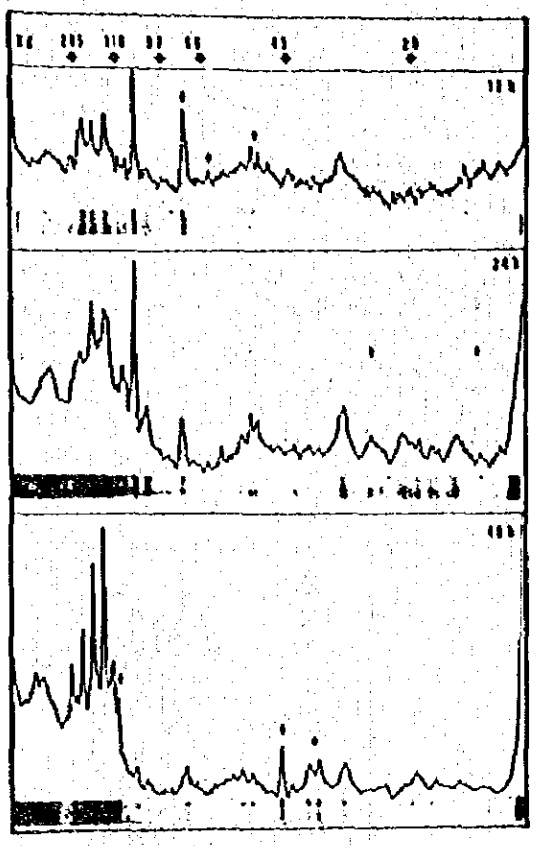


Fig. 1. Patrones electroforéticos de proteínas sintetizadas durante el ciclo eritrocítico asexual del *Plasmodium falciparum*. La figura muestra la autorradiografía producida por un gel S.D.S. poliacrilamida en el que se llevó a cabo la electroforesis de proteínas del parásito marcadas con ^{35}S-metionina a las 12, 24 y 40 horas de desarrollo. Para facilitar el análisis de las bandas obtenidas se hizo un densitograma sobre las autorradiografías. En la parte superior se indican los PM de los patrones utilizados.

A partir del RNA total y utilizando oligo dT celulosa se seleccionaron 32µg de poli A-mRNA lo cual representa un rendimiento del 61% si se tiene en cuenta que 5% del RNA total es mensajero.

Recuperación de tRNA

La fracción soluble en cloruro de litio (mezcla DNA y tRNA) después de la precipitación con etanol mostró un espectro con absorción a 260nm característico de ácidos nucleicos. El paso por sephadex G-100 pretendió separar las dos moléculas, sin embargo, en las fracciones 2, 4, 5 y 6 de la columna se observó absor-

ción a 260nm. La escogencia de la fracción que contenía el tRNA del parásito se hizo con base en los resultados de la cromatografía de tRNA de levadura en las mismas condiciones; la fracción escogida fue la número dos en la cual se detectaron 78µg de material precipitable con etanol.

Traducción in-vitro del poli A-mRNA

En los experimentos previos se fijaron como concentraciones óptimas 1mM de Mg^{++} y 100mM de K^{+}. Con estas condiciones se ensayaron diferentes cantidades de mRNA (0.5, 1.0, 1.5 y 2.0 µg) encontrándose la mayor incorporación con 1.0µg. Con la concentración más alta ensayada se presentó un descenso del 30% en la incorporación con respecto al punto máximo.

La traducción del RNA total fue similar en presencia o ausencia de tRNA exógeno (carriles 1, 2 y 3, figura 2). La comparación con el carril 3 es difícil en la autorradiografía porque se sembró menos cantidad de muestra pero la incorporación en las tres muestras fue en todas del orden de 10^6 cpm. El poli A⁺ mostró principalmente como producto de traducción una banda cercana a los 13 Kd. Tanto el RNA total como el poli A-mRNA tradujeron proteínas de alto peso molecular entre 97 y 200 Kd. Se presentó traducción también en regiones entre 25 y 27 Kd y entre 14 y 25 Kd. En todos los experimentos el control presentó una incorporación entre el 65 y 75% de la incorporación en las muestras y en la autorradiografía se ven varias bandas en regiones de bajo, mediano y alto peso molecular.

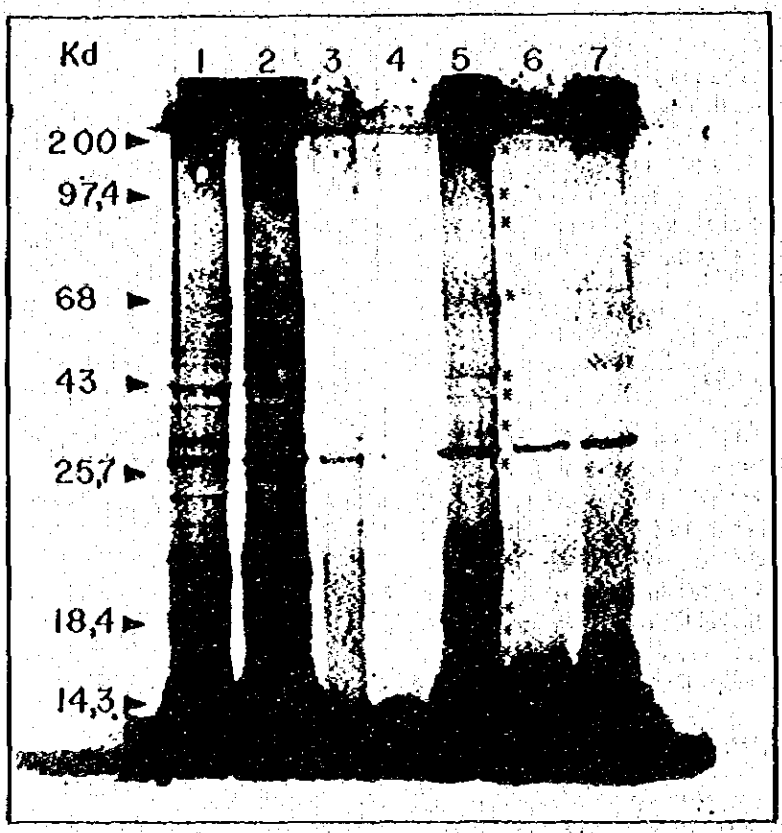


Fig. 2. Productos de la traducción in-vitro de mRNA de *Plasmodium falciparum*

1. RNA total
2. RNA total + tRNA de levadura
3. RNA total + tRNA de *P. falciparum*
4. RNA total + tRNA de *P. falciparum*
5. mRNA - poli A de *P. falciparum* + tRNA de *P. falciparum*
6. RNA poli A(-)
7. Lisado de reticulocitos + tRNA levadura

Tiempo de exposición 48 horas.

síntesis de cDNA

Para la síntesis de la primera cadena (ss cDNA) se partió de 10μg de poli A mRNA; se obtuvieron 672ng, lo cual significa un rendimiento del 7% con respecto al material inicial.

A partir de este material se sintetizaron 885ng de cDNA de doble cadena, es decir el rendimiento fue del 66% con respecto a la cantidad teórica esperada.

Construcción de la Genoteca

El cDNA paralelamente con un DNA control fueron preparados para unirlos a los brazos del vector mediante acopladores EcoRI. Para evitar unión del vector con el acoplador mismo, se separó el exceso mediante filtración en biogel A50m. Para el cDNA del parásito se logró recuperar el 91% del material aplicado a la columna(fracciones 3, 4 y 5) mientras que para el DNA control sólo hubo una recuperación del 29% (fracciones 3, 4). Los resultados se muestran en la tabla 1. Utilizando diferentes cantidades de cDNA con extremos cohesivos y una cantidad constante de brazos del vector, se encontró que la relación óptima de ligación entre los extremos del cDNA a los brazos del vector fue de 50ng de cDNA por 1μg de brazos con la cual se encontró una eficiencia de clonación de 4.4×10^6 recombinantes/μg de cDNA.

Los datos para los controles y las diferentes relaciones usadas aparecen en la tabla 2.

TABLA 1

SEPARACIÓN DEL cDNA DEL EXCESO DE ACOPLADORES EcoRI

MUESTRA	FRACCIÓN No.	CPM	RECUPERACIÓN % DNA
DNA CONTROL	1	74	
	2	85	
	3	143	
	4	254	290
	5	90	
	6	69	
	7	210	
	8	256	
	9	130	
	10	84	
cDNA	1	78	
	2	79	
	3	4214	
	4	6727	
	5	3012	805
	6	787	
	7	372	
	8	130	
	9	140	
	10	80	

TABLA 2

CLONACIÓN DE cDNA DE *P. falciparum* EN λ gt^{-10}.

λ DNA	INSERTO	ufp/μg BRAZOS λ DT	ufp/μg BRAZOS DE SIN	λ DT/DE SIN	RECOMB. AJUSTADO	RECOMB. TOTALES ufp/ml	EFICIENCIA CLONACIÓN RECOMB/μg DNA
λ_{gt} 10	—	2.8×10^8	2.8×10^5	400	—	—	—
λ_{gt} 10 BRAZOS EcoRI	—	2.5×10^7	6.5×10^4	384	—	—	—
λ_{gt} 10 BRAZOS EcoRI	25 ng DNA CONTROL	2.6×10^8	2.2×10^7	118	6.8×10^6	2.5×10^7	2×10^6
λ_{gt} 10 BRAZOS EcoRI	50 ng cDNA	2.7×10^7	2.9×10^5	93	7×10^4	2.2×10^5	4.4×10^4
λ_{gt} 10 BRAZOS EcoRI	100 ng cDNA	6.4×10^6	6.8×10^4	94	1.7×10^4	5.5×10^4	5.5×10^3
λ_{gt} 10 BRAZOS EcoRI	150 ng cDNA	4.4×10^6	3.6×10^4	122	1.1×10^4	2.3×10^4	1.5×10^3

RECOMBINANTES AJUSTADO = λ DT / (λ DT/DE SIN) BRAZOS λ_{gt}10

EFICIENCIA CLONACIÓN = RECOMBINANTES AJUSTADO / μg DNA

ufp = UNIDADES FORMADORAS DE PLACAS

DISCUSION

El principal objetivo de este trabajo fue obtener un mRNA lo más intacto y puro posible para ser utilizado en estudios de traducción in-vitro y en síntesis de cDNA para propósitos de clonación. Para preservar la calidad del mRNA se tuvieron en cuenta varias cosas:

a) La separación de células blancas del cultivo del parásito mediante el lavado de la sangre con ficoll-paque, disminuyendo la contaminación con DNA humano en las preparaciones posteriores.

b) El protocolo de extracción. Se escogió el método del fenol caliente puesto que mediante su aplicación se han obtenido mensajeros intactos a juzgar por el tamaño de los productos de la traducción in-vitro (2, 3). Por otro lado además de ser un método que da buena reproducibilidad al aplicarlo al *P. falciparum* permite remover la mayoría del DNA gracias a la alta temperatura de utilización del fenol (3).

c) La inhibición de RNAasas durante el proceso mismo de extracción utilizando heparina, 2-mercaptoetanol y EDTA.

d) La inhibición de RNAasas provenientes tanto del material como de las soluciones, los cuales fueron tratados con DPC (dietil pirocarbonato). Teniendo en cuenta las consideraciones anteriores se obtuvieron 0.2pg RNA/parásito. Wallach obtiene 0.1pg/parásito (2) y Zolg 0.04pg/parásito (3), otros autores no reportan estos datos; esta discrepancia puede encerrar varias causas una de ellas la sincronía y edad de los parásitos y otra la limpieza del cultivo en lo que a células blancas se refiere.

Los datos obtenidos en nuestro laboratorio están afectados por la contaminación con células blancas ya que de 10.000 clonos hibridizados con DNA total del parásito y con DNA humano, el 50% de los que dieron señal positiva corresponden a DNA humano (datos no mostrados).

Esto indica que el procedimiento de separación de células blancas con Ficoll-Paque no es muy efectivo, pero los clonos contaminantes (RNA de leucocitos) se pueden descartar muy fácilmente en una búsqueda preliminar al hibridizar la genoteca contra DNA humano. Por otro lado este trabajo fue hecho utilizando una población de parásitos muy sincrónicos y en un estado de desarrollo (34h) en que hay máxima síntesis de RNA (11). Wallach, utilizó una mezcla de trofozoítos y esquizontes y Zolg habla de predominio de trofozoítos. Vale la pena recordar que en esquizontes la síntesis de RNA disminuye notoriamente (11).

La relación A260/A280 fue de 2.3 lo cual puede ser un indicativo de un buen grado de pureza en cuanto a contaminación con DNA se refiere. No se hicieron otras comprobaciones puesto que en la selección del mensajero con Oligo-dT celulosa se espera que a pesar de que el DNA del parásito es muy rico en AT (81%) no sea seleccionado por ser un DNA de doble cadena. A pesar de estas consideraciones han encontrado que la hidrólisis con NaOH de poli A-mRNA seleccionado en ésta forma deja un residuo no hidrolizable; además se ha mostrado la contaminación de poli A-RNA con secuencias de DNA, hibridizado con ^{3}H-poli U antes y después de la hidrólisis con NaOH, encontrándose que un 15% del material es resistente al alkali en condiciones en que un control de Poli A puro es completamente degradado. Los autores sugieren que la extracción fenólica descubre en el DNA regiones de simple cadena ricas en AT que pasan a la fase acuosa y pueden ser captadas por poli dT celulosa (3).

En nuestro caso la separación del RNA y el DNA se hizo con fenol caliente con el cual se remueve la mayoría del DNA y después se hizo una precipitación selectiva con LiCl, con el fin de eliminar no sólo el DNA restante sino RNAas pequeños como el tRNA. En los experimentos de traducción in-vitro no se obtuvieron diferencias al adicionar tRNA exógeno, bien del mismo parásito o de levadura (fig. 2 carriles 2, 3 y 4). La literatura informa sobre la necesidad de suplementar el sistema para estimular la traducción del mRNA del parásito, aduciendo que el tRNA disponible en el lisado de reticulocitos no cumple con los requerimientos del mRNA plasmodial por estar adaptado preliminarmente a la síntesis de globina (3, 16). En nuestro caso el tRNA recuperado de la fracción precipitable en cloruro de litio estaba mezclado con DNA del parásito ya que al pasarlo por Sephadex G-100 sale muy rápidamente (fracción 2) en otras palabras no se separa del DNA contaminante. Inicialmente se creyó que ésto no presentaría interferencias en el ex-

perimento de traducción, pero ahora es posible pensar que la pureza del tRNA es importante y que quizás es necesario separarlo mejor mediante otro tipo de Sephadex (G-200 por ejemplo).

En cuanto a los tRNA heterólogos utilizados se mencionan los provenientes de otras especies de Plamodium o de germen de trigo o de hígado de ternera pero no sobre tRNA de levadura. El que se utilizó era puro, sin embargo, no mejoró la traducción, quizás por no ajustarse a las exigencias del mensajero del parásito.

De todas maneras como lo muestra la figura 1 carril 6, fue posible visualizar productos de traducción de bajo, medio y alto peso molecular; quizás el hecho más importante es que muestran una gran similitud con las proteínas sintetizadas in-vivo en cultivos altamente sincronizados del parásito. La comparación de las figuras 1 y 2 muestra que tanto en la síntesis in-vivo en parásitos sincronizados con 24 horas de edad, como en la traducción in-vitro hay bandas comunes alrededor de 20, 30, 45, 66, 97, 100 y 205Kd. Se puede afirmar que por el hecho de obtener proteínas en todo el rango de peso molecular esperado, la calidad del mensajero aislado es buena. Quizás se puedan obtener señales más intensas estimulando la síntesis con tRNA puro del parásito.

En el carril 7 se muestra la traducción de la fracción correspondiente al poli A^+ y aparece marcadamente una banda alrededor del 14Kd. Este hecho sugiere la posibilidad de que en el *P. falciparum* haya síntesis de polipéptidos dirigida por Poli A^+. En *P. yoelii* se había encontrado que poli A^+ dirigía la síntesis de proteínas aún con pesos moleculares superiores a 150 Kd, sin embargo, como los autores mismos lo anotan no se puede descartar la posibilidad de que estos mRNA aislados como poli A^+ tengan algún pedazo muy corto de poli A en el extremo 3' o que por algún fenómeno poco usual la estructura secundaria de ese mensajero haya prevenido la accesibilidad de las secuencias poli A a la oligo dT (18).

En el carril 8 se muestran los productos de la traducción del lisado mismo suplementado con tRNA de levadura. Como se puede apreciar a pesar de haber escogido un lisado comercial, desprovisto de aminoácidos endógenos la síntesis fue muy alta comparada con la de las muestras. (70% en el control y 30% en las muestras).

Este fue el principal criterio tenido en cuenta para juzgar la calidad del mRNA y una vez comprobada se pasó a sintetizar el cDNA para poderlo clonar. El método de síntesis se escogió cuidadosamente pensando en obtener copias completas de la plantilla utilizada. El método de Gubler y Hoffman combina la síntesis clásica de la primera cadena (12) con la síntesis novedosa de la segunda cadena introducida por Okayama (7), utilizando RNAsa H y DNA polimerasa I. La ventaja de este método es que suprime el clivaje con nucleasa S1 del gancho que aparece en la síntesis de la primera cadena el cual puede remover parte del CAP. del mensajero, y además no utiliza el sistema tan elaborado del vector iniciador de la síntesis propuesto por Okayama; por otro lado sí ha permitido obtener genotecas de cDNA preparadas con este protocolo con una alta eficiencia de clonación (10^6 clonos/ µg de cDNA).

Los experimentos mostraron rendimientos en la síntesis de las dos cadenas dentro de lo esperado teóricamente (7% para la primera y 66% para la segunda). Como vector de clonación de usó el fago λgt10, básicamente porque tiene una alta eficiencia de empaquetamiento in-vitro, lo cual es importante cuando la disponibilidad del material a clonar depende de la disponibilidad del parásito. Además este vector puede aceptar insertos hasta de 7.6 Kb, rango de tamaño aceptable para los mensajeros del parásito.

El cDNA fue necesario prepararlo para ser ligado a los brazos EcoRI del vector escogido. En este procedimiento el único hecho notorio fue la baja recuperación del DNA control en la separación del exceso de adaptadores. El DNA control contenía fragmentos muy pequeños (69, 98, 100, 102, 117, 158, 169, 214, 236, 309, 311, 341, 849 pb) que al salir en las últimas fracciones podrían seguir mezclados con los acopladores, por lo tanto sólo se trabajó con las primeras fracciones que se supone estaban separadas del contaminante.

Después del empaquetamiento in-vitro se pasó a seleccionar los clonos recombinantes. El sistema de selección biológica está basado en el hecho de que el λgt10 contiene un solo sitio EcoRI en el gen represor

cI dentro del cual se inserta el cDNA. La función del gen cI en el ciclo de vida normal del fago es escoger entre la vía lítica y la lisogénica; la célula bacterial sobrevive la infección lisogénica y no produce partículas de fago. Un fago parental favorece la vía lisogénica puesto que su gen cI está activo y produce placas turbias en una cepa de E. coli silvestre como la L87. Sobre una mutante de E. coli con una alta frecuencia de lisogenia tal como la NM514, el fago es forzado a entrar en la vía lisogénica y no produce lisis celular ni partículas de fago. Cuando se inserta un cDNA en el sitio EcoRI el gen cI se inactiva, el fago recombinante favorece la vía lítica y se producen placas claras; esto hace distinguir visualmente con mucha claridad entre el fago recombinante y el parental. Cuando la cepa lleva la mutación de alta lisogenia (NM514) y es infectada por fago parental es reprimido tan eficientemente que la formación de placas se suprime. Si en esta cepa se siembra el fago recombinante hay formación de placas en una forma normal y muy eficiente. Es decir al sembrar la genoteca en este tipo de mutante se eliminan eficientemente los fagos parentales.

Para analizar los resultados del experimento de clonación se hicieron varios controles (tabla 2). Se sembró λgt10-DNA en la cepa L87 con lo cual se perseguía conocer la eficiencia de la reacción de empaquetamiento in-vitro; teóricamente debe ser mayor de $2x10^8$ ufp/μg (15). La relación de este título en L87 (huésped no selectivo) y NM514 (huesped selectivo) da una indicación del grado de selección biológica. Esta relación debe ser mayor de 100, generalmente muy cercana a 1000 (15). Experimentalmente se obtuvo una relación igual a 400, lo cual nos indica que la selección no fue tan extricta y posiblemente muchos de los clonos no poseen inserto.

Un segundo control fue λgt10-brazos EcoRI: su título en L87 confirma que los brazos y la T4-DNA ligasa trabajaron eficientemente; el título obtenido fue de $2.5x10^7$ ufp/μg de brazos indicando que la ligación fue buena pues se esperaba un título de 10^7 ufp/μg de brazos (15). Un último control se llevó a cabo con el DNA de M13mp 8 ligado a los brazos del vector con el fin de verificar el funcionamiento del sistema completo de clonación. Si en este caso la clonación es efectiva se asegura que el sistema empleado es correcto y si hay fallas al trabajar con el cDNA posiblemente el problema podría estar en él; sin embargo, la eficiencia de clonación con el cDNA fue de $4.4x10^6$ recombinantes/μg de cDNA. Con sólo 50ng de cDNA se obtuvieron $1.1x10^5$ recombinantes, cantidad que representa suficientemente la población de mensajeros del parásito.

Como conclusión se puede afirmar que el protocolo utilizado para extracción de RNA de *P. falciparum* permitió obtener mensajeros de buena calidad; este hecho facilitó la obtención del cDNA cuyo tamaño será evaluado mediante el análisis de algunos clonos positivos para *P. falciparum*.

Además el sistema de clonación de Amersham permitió obtener los resultados previstos por los fabricantes.

Esta genoteca se está caracterizando actualmente y será utilizada en estudios de expresión de genes y de análisis de frecuencia de aparición de genes.

SUMMARY

Poly A mRNA was isolated from *P. falciparum* (Colombian strain FCB-2). The parasites were 34-36 hours old trophozoites. The messenger RNA was translated in a rabbit reticulocyte cell-free system and ^{35}S-methionine labelled proteins were analized with S. D. S. PAGE.

The translation products range were betwen 20 and 200 Kd and correlate closely with the in-vivo labelled protein, using stringent synchronous cultures.

A cDNA library has been constructed in phage λgt10 from poly A mRNA. Cloning efficency was $4.4x10^6$ recombinant per μg cDNA.

AGRADECIMIENTOS

A Colciencias. Este trabajo forma parte del proyecto No. 2104 - 05 - 005 - 85 financiado por el Fondo Colombiano de Investigaciones Científicas y Proyectos Especiales "Francisco José de Caldas" - COLCIENCIAS.

- Al señor Jaime Vega por el trabajo fotográfico.

BIBLIOGRAFIA

1. Hyde JE, Zolg JW, Scaife DG. Isolation and characterization of ribosomal RNA from the human Malaria parasite *P. falciparum*. Mol Biochem Parasitol. 1981; 4: 283

2. Wallach M. Efficient extraction and translation of *P. falciparum* messenger RNA. Mol Biochem Parasitol. 1981; 6: 335.

3. Hyde JE, Goman M, Hall Roger, Osland Arve, Hope IA, Langsley G, Zolg JM, Scife JG. Characterization and translation studies of messenger RNA from the human malaria *Plasmodium falciparum* and construction of a cDNA library. Mol Biochem Parasitol. 1984; 10: 269.

4. Hough BR, Evans, Howard J. Genome size and DNA complexity of *P. falciparum*. Bioch. Bioph. Acta. 1982; 698: 56.

5. Langsley G, Hyde J, Goman M, Scaife JG. Cloning and characterization of the rRNA genes from human malaria parasite *P. falciparum* Nucl Ac Res 1983; 11: 8703.

6. Lustigman S, Crewther PE, Murray L, Andres RF, R. I. Coppel GV, Brown. Synthesis, fate and post translational processing of *P. falciparum* antigens. 3rd international conference on malaria and Babesiosis. Sept. 1987 ANNENCY - FRANCE pag. 217.

7. Hap A, Delplace P, Dubremets SF, Weber S, Camus D. *P. falciparum*: immunization of mice with a recombinant protein from P 126. 3rd international conference on malaria and Babesiosis. Sept. 1987 ANNENCY - FRANCE pag. 211.

8. Dame JB, Williams JL, Cutchan TF, Weber JL, Wirtz RA, et al. Structure of the gene encoding the immunodominant surface antigen on the sporozoite of the human malaria parasite *P. falciparum*. Science, 1984; 225: 593.

9. Ellis EV, Zabala JF, Arnot DE, Asavanich A, Masuda A, Quakyi I, Nussenzweig RS. DNA cloning of *P. falciparum* circumsporozoite gene: amino acid sequence of repetitive epitope. Science, 1984; 225: 628.

10. Eichnges DJ, Arnot DE, Nussenweig V, Enez V. Circumsporozoite proteins of *P. vivaxhei* gene cloning and identification of the immunodominant epitopes. Mol Cell Biol, 1986; 6: 3965.

11. De Rojas M Orfa, Wasserman M. Supersincronización del crecimiento in-vitro del *P. falciparum*. Biomédica 1987; 7: 75.

12. Maniatis T, Fritsch EF, Sambrook J. Molecular cloning. A laboratory manual. Cold spring Harbor Laboratory 1987; pag. 197.

13. Davis LG, Dibner MD, Battey JF. Basic methods in molecular biology. Elsevier Science Publishing Co Inc 1986; pag. 139.

14. Gubler U, Hoffman BJ. A simple and very efficent method for generating cDNA libraries. GENE 1983; 25: 263.

15. Amersham. cDNA cloning system -λgt10. Amersham. International plc 1986.

16. Wallach M, Kilejian A. The importance of tRNA for the in-vitro cell free tanslation of messenger RNA isolated from the malaria parasite *Plasmodium lomphurae*. Mol and Bioch Parasitol. 1982; 5: 245.

17. Okayama H, Berg P. High efficiency cloning of full length cDNA. Mol Cell Biol 1982; 2: 161.

18. Vaidya AB, Schleif WA, Masarian WR, Daly TM, Taylor DW, Long CA. Analysis of mRNA coding for blood stage antigens of a rodent malaria parasite, *P. yoelii*: mRNA coding for a possible protective antigen purify as poly A⁺. J Immunol 1984; 132: 3126.

Plasmodium falciparum: in vitro massive invasion during short periods of time[1].

JEAN-PAUL VERNOT[2] and MOISES WASSERMAN[2,3]

2 Grupo de Bioquímica
Instituto Nacional de Salud
Bogotá - Colombia

3 Facultad de Ciencias
Universidad Nacional
Bogotá - Colombia

Correspondence to :

Dr. Moises Wasserman
Head, Group of Biochemistry
Instituto Nacional de Salud
Av. El Dorado Carrera 50
Bogotá - Colombia

ABSTRACT

A method is described, to obtain a massive merozoite invasion of Plasmodium falciparum into human erythrocytes during short periods of time. Erythrocytes infected using this procedure show multiple invasions (2-4 merozoites per erythrocyte), amplifying thus, several times, the effects of parasite entry into host cells. The procedure would yield synchronous cultures (two-hour age range) with parasitemia as high as 15 %. It would be possible to reach parasitemia of 50 % or higher allowing a six hour invasion period.

The establishment of a system for long term cultivation of Plasmodium falciparum erythrocytic stages (4), has been a major advance towards the development of antimalarial drugs, malaria vaccines and for the elucidation of molecular mechanisms involved in the growth and the multiplication of the parasite.

However, in this culture system, growth is always asynchronous and parasitemia rarely reaches values higher than 15 %. This fact limits the usefulness of the culture; modifications of the erythrocyte due to invasion are barely detectable because of the big number of uninfected cells masking any variation.

One of us reported (6) 40-50 % parasitemias after a five-hour invasion period. In those experiments, mature parasites were concentrated using Plasmagel (2) and set back to culture with fresh erythrocytes.

The experiments could be reproduced neither with a knobless variant of the FCR3-Gambia strain nor with the FCB1-Colombia strain, both concentrated by isopycnic Percoll centrifugation. In these cases for the same time of invasion, parasitemia was two to three times lower than that reached with the knobby variant (this report and Vernot unpublished results).

Here we are presenting an easy procedure to attain high invasion rates in short periods of time. The procedure has been used by us to study the modifications induced by merozoite entry, in the erythrocyte membrane proteins.

MATERIALS AND METHODS

Cultures : The FC81 strain from Colombia was maintained in continuous culture according to the method of Trager and Jensen (4), in human O(+) erythrocytes at a hematocrit of 5 %. The culture medium was RPMI 1640 supplemented with 25 mM Hepes, 32mM $NaHCO_3$, 50 mg/l gentamycin, 0.2 mM hypoxanthine, 1 mg/l reduced glutathione and 10-15 % heath inactivated human serum.

Synchronization : Cultures were synchronized either by sorbitol treatment (1) or by Percoll 90 % (3) or 65 % (5) isopycnic centrifugation. Debris (ghosts, free parasites and pigment) remaining after sorbitol treatment were separated with a Percoll gradient (5) and discarded.

Parasite concentration and invasion assays : Synchronized cultures, with 8-10 % parasitemia were followed up until most parasites reached the schizont stage and a few of them (about 2 %) ruptured to release merozoites; the parasites were then concentrated by Percoll gradient centrifugation, and the preparation containing 90 % schizonts and segmenters was diluted with fresh erythrocytes. Two sets of experiments were performed :

1) The total parasitemia was fixed at 10 % and different hematocrits (0.5, 1.0, 1.5, 2.0 and 2.5 %) were tested.
2) The hematocrit was fixed at 1 % and parasitemia of 2.5, 5, 10, 15 and 20 % were tested. The invasion was evaluated after a three-hour incubation.

Once established the optimal conditions, a third set of experiments was designed; the parasites were concentrated as described, washed 3 times with culture medium and resuspended to 0.25 % - 0.5 % hematocrit in the same medium. These suspensions were preincubated for a period of three to five hours in the absence of fresh erythrocytes; at the end of this period the medium was carefully aspirated and replaced with an erythrocyte suspension (0.25 - 0.5 %) in warm culture medium. Invasion was allowed to proceed during 2, 3, 4, or 6 hours according to the requirements of the experiment. The ring-form parasitemias obtained by this procedure were compaired with those obtained by directly setting the concentrated schizonts in invasion conditions, without preincubation. All experimental points were performed at least twice and in duplicate.

RESULTS AND DISCUSION

As can be seen in figure 1, the invasion was clearly favored by setting the culture at low hematocrits and high schizont parasitemias. Nevertheless, we were not able to detect any increase in invasion rates when parasitemias were higher than 25 %. In these very high infections the free merozoites aggregate both within themselves and with the pigment and membranes. The conditions found to work better in our experiments were a suspension of 0.5 % hematocrit with 20 % parasitemia. All subsequent experiments were performed under these conditions.

Pre-incubation of concentrated schizonts at low hematocrits, prior to the addition of erythrocytes was compared with the mixing of schizonts directly after concentration with fresh erythrocytes. The results are shown in figure 2. In all cases, experiments where schizonts were preincubated, show a higher invasion. In some experiments the increments in invasion were three to four times the value reached without pre-incubation. It was possible to routinely reach parasitemias around 15 % in two-hour invasion periods and between 40-55 % when parasites were allowed to invade for six-hours.

It is not clear, whether pre-incubated parasites release more viable merozoites or if schizonts are damaged during Percoll centrifugation, taking several hours to recover. The fact that very high parasitemias could be obtained without pre-incubation using the knoby strains and Plasmagel concentration (6), argue in favor of the second hypothesis.

Sedimentation in Plasmagel is performed at 37° C, 5 % CO_2 atmosphere and 1xg, whereas Percoll centrifugation requires several thousands xg and is performed under normal atmosphere and 20° C.

The procedure described here, allows us to obtain very high levels of invasion in short periods of time. Moreover, about 50 % of the erythrocytes are invaded by more than one (two to four) parasites. This fact might be of particular relevance when the effects of the parasite on the host membrane are to be studied. Other experiments, such as metabolic-time-course studies and assay of inhibitors of growth or invasion, can be facilitated by the very synchronous culture obtained here.

We used satisfactorily the system to study the effect of erythrocytic protein kinase C activation on malarial invasion (in preparation).

LITERATURE CITED

1. Lambros, C. & Vanderberg, J.W. 1979. Synchronization of Plasmodium falciparum erythrocytic stages in culture. J. Parasitol., 65: 418-420.

2. Pasvol, G., Wilson, R.J., Salley, M.E. & Brown, J. 1978. Separation of viable schizont-infected red blood cell of Plasmodium falciparum from human blood. Ann. Trop. Med. Parasitol., 72: 87-88.

3. Rivadeneira, E., Wasserman M. & Espinal C. 1983. Separation and concentration of schizonts of Plasmodium falciparum by Percoll gradients. J. Protozool., 30: 367-370.

4. Trager W. & Jensen, J.B. 1976. Human malarial parsites in continuous culture. Science, 193: 673-675.

5. Trager, W. & Lanners, H.N. 1984. Initial extracellular development in vitro of merozoites of Plasmodium falciparum. J. Protozool., 31 : 562-567.

6. Vernot, J.P. & Heidrich, H.G. 1984. Time-course of synthesis, transport and incorporation of a protein identify in purified membranes of host erythrocytes infected with a knob-forming strain of Plasmodium falciparum. Mol. Biochem. Parasitol., 12: 337-350.

Foot-note: (1) This work was supported by the Fondo Colombiano de Investigaciones Científicas y Proyectos Especiales "Francisco José de Caldas" COLCIENCIAS and by JICA (Japan International Cooperation Agency).

LEGEND TO FIGURES.

Figure 1.

Mature parasites were concentrated by 65 % Percoll centrifugation; A parasitemia of 90 % was obtained. Schizonts were diluted with fresh erythrocytes in culture medium and invasion was stopped after three-hours by Sorbitol treatment. (------) Parasitemia of schizonts was changed while hematocrit was maintained constant at 1 %. (———) Parasitemia was set up at 10 % and hematocrit was varied between 0.5 and 2.5 %.

Figure 2.

Each point represents an independent experiment. Incubations were all performed at high parasitemia (15-20 %) and low hematocrit (0.5-1.0 %). (▲) Mature schizonts were concentrated and then set back in culture without erythrocytes. Preincubation was done for 3 to 5 hours depending on the degree of parasite development as determined by Giemsa-stained smears.(⊙) Mature parasites were immediately mixed with fresh erythrocyte and returned back to culture. Invasion was allowed during the indicated lapses of time and ring-form parasitemia was evaluated.

Figure 3.

Microphotograph of infected erythrocytes (ring forms) after a massive invasion of four-hours. The parasitemia reached in this experiments was about 50 % as determined by Giemsa-stained smears.

FIGURE 1

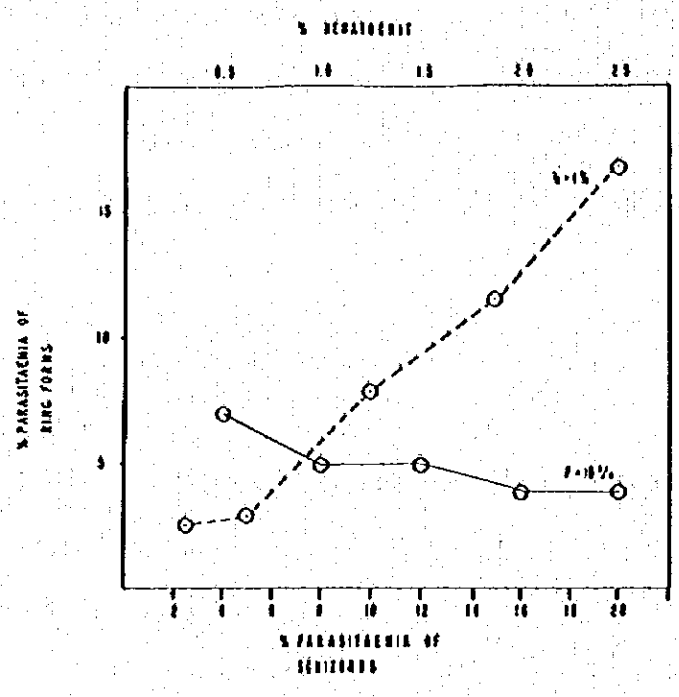


FIGURE 2

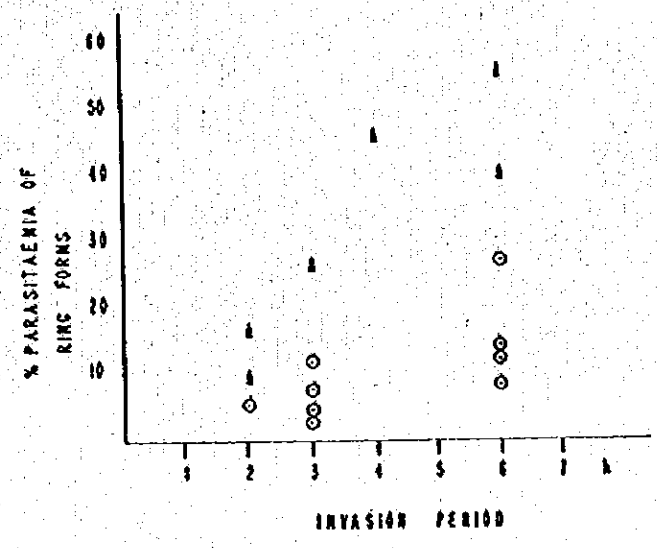
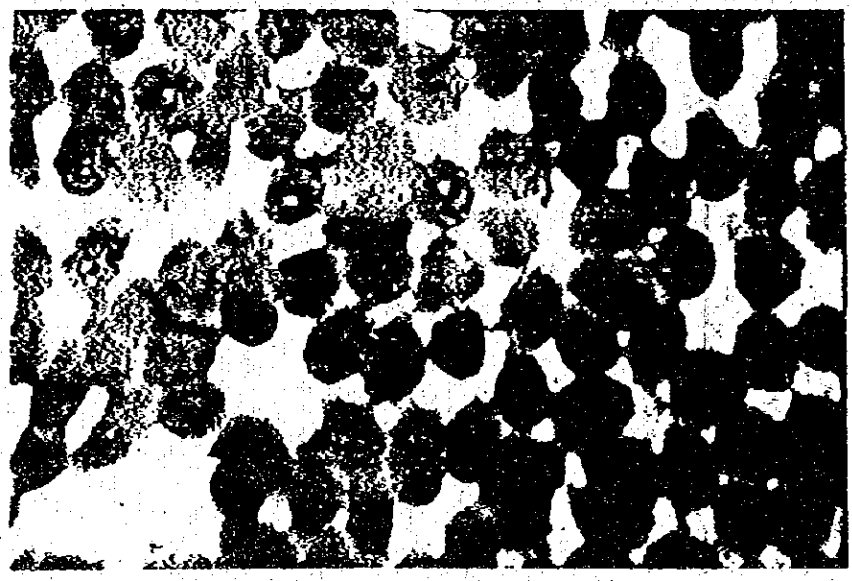

% PARASITAEMIA OF
RING FORMS
60
50
40
30
20
10
1
2
3
4
5
6
7
8
INVASION PERIOD

FIGURE 3



NATIONAL INSTITUTE OF HEALTH
10-35, 2-Chome, Kamiosaki, Shinagawa-ku, Tokyo, Japan
Cable Address: KOKURITSUYOKEN
Telephone: (441) 2181

REPORT

PROJECT ON THE RESEARCH AND DEVELOPMENT OF A DIAGNOSTIC TECHNOLOGY FOR MALARIA AND OTHER TROPICAL DISEASES IN COLOMBIA

March 13, 1989

Dr. Jorge Michelsen,
Director General,
Instituto Nacional de Salud,
Bogota,
The Republic of Colombia

The above project started on October 1, 1986, for a period of three years as a program of co-operation between the governments of the Republic of Colombia and Japan. The Project took over from the former one (The Project of the National Institute of Health of Colombia, 1983-1986) with the purpose of strengthening the research capability of the Instituto Nacional de Salud (INS) with special emphasis on the development of a diagnostic technology for infection with Plasmodial parasites and other tropical diseases, and thus contributing to the promotion of public health in Colombia.

I was seconded by the National Institute of Health of Japan (NIH) and the Japan International Cooperation Agency (JICA) to INS as an advisory expert for the Project for two years, between March 27, 1987 and March 21, 1989.

On terminating my attachment, I am reporting the results and progress of the Project obtained during my stay.

NATIONAL INSTITUTE OF HEALTH
10-35, 2-Chome, Kamiosaki, Shinagawa-ku, Tokyo, Japan
Cable Address: KOKURITSUYOKEN
Telephone: (444) 2181

1. ITINERARY

I spent most of the working time at INS, Bogota. During the stay, however, I went abroad once for an official trip to Tokyo in February, 1988, and 3 times for private ones, and left Bogota several times for official and private trips in Colombia.

2. PROJECT ACTIVITIES

The Project consisted of two parts, one dealing with nucleic acid and one immunology, according to the major methodologies used for diagnosis of malaria. I have been working on the immunology part in cooperation with the staff in the Immunology Group. However, these two parts have been closely connected with each other in both research and research-supportive activities.

2.1. Research Activity in The Immunology Part

The majority of the work was done on the development of serological methods for the diagnosis of malaria. For this purpose, efforts have been made to improve the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) to detect anti-malarial antibodies, to develop a sandwich- ELISA for the detection of malaria antigen, and to study the immunological responsiveness of malaria patients to specific antigens or to nonspecific mitogens.

Human blood samples used in the series of experiments were collected by the Malaria Group of INS, Servicio de Eradicacion de la Malaria in Bogota, and through field studies.

All the studies described below were carried out by a large number of the members of the Immunology, Malaria, Biochemistry and Entomology Groups. In particular, Zuleima Rubio, Gladys Cortes and Gloria Munera greatly contributed to the progress of the study. Z. Rubio and G. Cortes were trained in my laboratory in Japan between 1985 and 1986, and G. Munera is going to Japan to receive further training in immunological techniques in my laboratory for one year, from 1989 to 1990.

NATIONAL INSTITUTE OF HEALTH
10-35, 2-Chome, Kamiosaki, Shinagawa-ku, Tokyo, Japan
Cable Address: KOKURITSUYOKEN
Telephone: (444) 2181

2.1.1. Detection of antimalaria antibodies by an ELISA

An improved ELISA method was successfully tested by using avidine and biotine labeled reagents. For this, schizont rich fractions were obtained from cultured P. falciparum infected erythrocytes or peripheral blood of P. vivax patients and used as antigens. The method was simple and able to detect antibodies in 0.01 ml of the patient's blood.

2.1.2. Production of monoclonal antibodies

Monoclonal antibodies with a variety of specificities have been obtained by hybridyzing SP/2 myeloma and mouse spleen cells. further work will focus on the production of monoclonal antibodies against P. vivax.

2.1.3. Detection of malaria antigen by a sandwich-ELISA

The monoclonal antibodies obtained were utilized as capture antibodies in a sandwich-ELISA to diagnose falciparum malaria. At present, a promising method is being developed. Although, at the present moment, the sensitivity of the method is about the same as that of microscopic observation, improvement of the test is envisaged.

2.1.4. Cellular response of malaria patients

Peripheral blood lymphocytes from falciparum malaria patients were tested for their responsiveness to P. falciparum parasites. Although the patients' lympholcytes responded specifically to the antigen, no clear-cut relationship was shown between the degree of the response and the history of the patients. Thus, the diagnostic significance of the response remains to be studied.

Lymphocytes from the majority of P. vivax patients responded only slightly to a variety of non-specific mitogens. This low responsiveness seemed to be reflected by the suppressive effect of T-lymphocytes and macrophages. In some patients, however, the lymphocytes themselves also showed poor responsiveness to the mitogens.

2.1.5. Sporozoite detection by a sandwich-ELISA

I had the opportunity to make use of a sandwich-ELISA kit which is able to detect P. falciparum sporozoite antigens in the infected mosquitos. This was developed by Dr. R. A. Wirtz, Walter Reed Army Institute of Research, Washington D.C., USA, and was donated by him to the Project on the condition that the data obtained in the Project be notified to him as a part of a world wide epidemiological study.

The kit has been evaluated using mosquitos infected experimentally with P. falciparum, and is considered a useful tool for the epidemiological study of the malaria vector. The result will be compared with those obtained in a DNA hybridization technique which is being developed in the Biochemistry Group.

2.1.6. Field studies

Epidemiological studies were conducted on a small scale to evaluate the usefulness of the serological diagnostic methods described above and the DNA hybridization method. A total of 752 blood samples were collected at Tolu, Departamento de Sucre, and Villavicencio, Acacias, San Martin and Granada, Departamento de Meta.

Anti-falciparum antibodies of these sera were determined by the ELISA method. Significant antibody titers were seen in the 18 % and 34 % of sera from Tolu and the Departamento de Meta, respectively.

2.2. Research-Supportive Activity

2.2.1. Provision of machinery, equipment and general supplies

Equipment, general supplies, reagents and other materials needed to conduct the above research were provided by the two organizations, INS and JICA.

Most of the new machinery, equipment and general supplies were purchased by JICA in Tokyo and shipped to Bogota. However, their delivery at the Project laboratories was always far behind schedule, and thus the research plan has to be changed frequently. These delays were caused mainly by inefficiency in JICA Headquarters, the Colombian Customs, and INS. Improvement of these administrative procedures seems essential for the effective conduct of this kind of time-limited cooperative project.

However, I am pleased to report that all of them have been received safe without serious damage. They have been maintained in satisfactory conditions and are functioning efficiently for the purpose of the Project.

Necessary reagents were purchased from companies in the USA and England with a direct contract between them and the Project. This system ensured a constant supply of fresh and quality controlled reagents and met the requirements of the research activity.

2.2.2. Training of Colombian personnel in Japan

Since the former project started, the staff of INS who have visited Japan to receive training in techniques or to exchange views total 8 individuals in all. They have made a great contribution to the Project.

With the similar purposes, another two individuals are to be sent to Japan for 6-12 months between 1989 and 1990.

3. COMMENTS AND SUGGESTIONS FOR THE FUTURE

It can be considered that the Project has been managed well on the whole. As a consequence of this project and the former one, the laboratories of the Immunology and Biochemistry Groups have been equipped to the standard accessory to be able to conduct research at a level higher than before the Project started. I hope this enhanced activity will make a contribution to the anti-malarial effort in Colombia.

In this country, however, there still remain a large number of public health problems to be solved. It seems to be necessary to take measures to meet the situation. Plans of which I am aware and which I think important are those designed to combat infectious diseases.

Thus, my primary suggestion is that the program of cooperation continue and be expanded as much as possible to deal with the remaining public health problems, especially those caused by infectious diseases. The promotion of programs of co-operation for the improvement of the systems of production and distribution of vaccines might contribute a great deal in this. Achievements and experiences obtained through the present and the former projects may contribute to a more effective conduct of any future program.

NATIONAL INSTITUTE OF HEALTH
10-35, 2-Chome, Kamiosaki, Shinagawa-ku, Tokyo, Japan
Cable Address: KOKURITSUYOKEN
Telephone: (444) 2181

4. GENERAL IMPRESSIONS OF INS AND COLOMBIA GAINED DURING MY STAY

INS is regarded as a well-structured organization. The laboratory staff work and study well and impressed me favorably. Sometimes, however, inefficiency was evident in the system. In particular, office routines and the laboratory-supportive sections did not always seem to work efficiently. Improved administration of these sections may improve the research capability even more.

Finally, I received great hospitality from the people in INS and other Project related places where I worked, and I would like to express my deep thanks to all of them. I especially received a great deal of help and support from Dr. Moises Wasserman, Dr. Miguel Guzman and the staff of the Immunology, Biochemistry and Malaria Groups and did not experience any problems with the language barrier. I certainly believe that the results obtained in the Project will contribute to the promotion of activity of INS, and thus INS and my friends there will continue to play an outstanding role in the betterment of public health in their country.

During my stay in Colombia I have learned a great deal, but now I have to leave for Japan feeling that my heart has been left behind.

Adios and Sayonara.

神山恒夫

Tsuneo Kamiyama, D.V.M., Ph.D.
National Institute of Health,
Tokyo, Japan

c.c./Dr. Moises Wasserman, INS, Bogota
Dr. Miguel Guzman, INS, Bogota
The National Planning Department of Colombia, Bogota
JICA Colombia Office, Bogota
The Embassy of Japan, Bogota
Dr. Thoru Tokunaga, NIH, Tokyo
Dr. Akira Oya, NIH, Tokyo
Dr. Takaaki Ohashi, The Chemo-Sero-Therapy Institute, Kumamoto
The Headquarters of JICA, Tokyo

JICA