

XXVII JORNADAS DE JOVENS PESQUISADORES

A ciência e a tecnologia na produção de inovação e transformação social

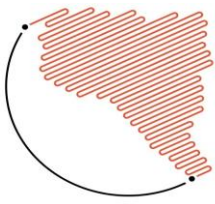
23 A 25 DE OUTUBRO DE 2019

UFSCar | Brasil | 2019

ISBN: 978-85-94099-11-2



Asociación de Universidades
GRUPO MONTEVIDEO



28. Salud Animal

Detección molecular de *Leishmania spp.* en piel de oreja de roedores sinantrópicos de la ciudad de Corrientes.

Autor: Salinas, Florencia M. E-mail: florencia.salinas.marcela@gmail.com

Co-autores: Alegre, Elsa A.; E-mail agustina_ea@hotmail.com Ramírez, Gabriela V.; E-mail aquara8@yahoo.com Ruiz, Raquel M.; e-mail raquel_monicaruz@hotmail.com.

Orientador: Ruiz, Raquel M.; e-mail raquel_monicaruz@hotmail.com

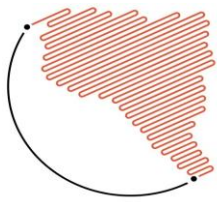
Faculdade de Ciências Veterinárias

Universidade Nacional do Nordeste

Resumo

La Leishmaniasis engloba un grupo de enfermedades parasitarias transmitidas al hombre por la picadura de flebotómicos infectados con protozoos del género *Leishmania*. Existe una amplia variedad de animales implicados como reservorios de *Leishmania*, sin embargo, no existe confirmación científica que amerite el rol que podrían cumplir las ratas sinantrópicas. La detección de *Leishmania* por técnica de Nested PCR es aconsejada en estudios epidemiológicos por su alta sensibilidad. El objetivo del presente trabajo fue realizar un estudio sobre roedores sinantrópicos que habitan la ciudad de Corrientes, Argentina, con el fin de detectar mediante técnicas de PCR, la posible presencia del parásito *Leishmania spp.* Se trabajó con muestras de piel de oreja de ratas de la especie *Rattus rattus*. Se realizó una PCR control de especie de rata, ratón y hámster que nos permitió corroborar la presencia del material genético. Para la identificación de *Leishmania spp.* se aplicó la técnica de la Nested PCR. Se trabajó con un total de 27 muestras, seleccionándose 6 muestras de ADN al azar a las que se les aplicó la técnica de PCR control de especies, revelando todas ellas bandas de 118 pb. En la Nested PCR primer round se analizaron un total de 27 muestras de las cuales 5 revelaron bandas de 520 pb las cuales fueron sometidas a una segunda PCR donde 3 resultaron detectables a bandas de 490 pb. Nuestros resultados indican una tasa de 11,11% de muestras detectables a *Leishmania spp.*, si bien no es una tasa elevada que confirme la posibilidad de convertirse en verdaderos reservorios, si se puede destacar que ninguno de ellos presentó manifestaciones clínicas combatibles.

Palabras claves: Leishmania, PCR, Roedores.



La Leishmaniasis engloba un grupo de enfermedades parasitarias de distribución mundial transmitida al hombre por la picadura de flebotomíneos infectados con protozoos del género *Leishmania*. En conjunto, las diversas formas clínicas de esta enfermedad constituyen un serio problema de Salud Pública en el mundo (Canchila Muñoz, & Contreras Gómez, 2016). En todos los casos, el establecimiento de la infección y la evolución de la enfermedad dependen de la interacción entre reservorio, parásito, vector, huésped y medio ambiente (Sáenz-Anduaga, Sánchez-Saldaña, & Chalco-Aguate, 2017).

Actualmente, la provincia de Corrientes, Argentina, se ha convertido en un área endémica para esta enfermedad, es conocido el rol que juegan los caninos en la supervivencia del parásito, sin embargo poco se conoce sobre otras especies animales que convivan en esta misma zona geográfica y que podrían jugar un rol importante. Si bien existe una amplia variedad de animales silvestres y domésticos que han sido implicados como huéspedes naturales o reservorios de *Leishmania*, no existe confirmación científica que amerite el rol que podrían cumplir las ratas sinantrópicas que habitan nuestra región geográfica. La estrecha relación que estos animales desarrollan con el hombre, su capacidad natural de infectarse de forma crónica, vivir largos

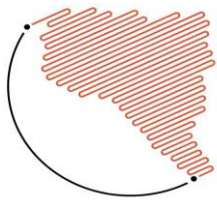
períodos de tiempo y su abundancia y dinámica poblacional hacen que sean especies animales con grandes posibilidades de ser o convertirse en verdaderos reservorios de *Leishmania*.

En general, los roedores que fueron detectados con *Leishmania spp.* se presentan asintomáticos, aun cuando el patógeno está presente en la piel. En ocasiones, dependiendo del estado inmunológico del huésped y la especie de *Leishmania* implicada, pueden evidenciarse algunas clases de lesiones cutáneas en zonas con poco espesor de piel o desprovistas de pelo como lo son las orejas y base de la cola. Esto se debe a que los vectores flebotomíneos se alimentan más fácilmente en estas áreas, lo que facilita la búsqueda de este parásito en dichas zonas (Shender, *et. al.* 2014).

La detección de la *Leishmania* puede llevarse a cabo por numerosas técnicas diagnósticas entre las que se destaca la Nested PCR, técnica aconsejada en estudios epidemiológicos por su alta sensibilidad.

Objetivos

El objetivo del presente trabajo fue realizar un estudio sobre roedores sinantrópicos que habitan la ciudad de Corrientes, Argentina, con el fin de detectar mediante técnicas de PCR, la posible presencia del parásito *Leishmania spp.* en circulación periférica en muestras



de tejido de piel de orejas. Estos resultados colaborarían en el entendimiento del rol que juegan estos animales en la cadena epidemiológica de la enfermedad en nuestra región geográfica.

Materiais e Métodos

Muestras.

Se trabajó con muestras de piel de oreja de ratas de la especie *Rattus Rattus* conservadas en freezer de la cátedra Salud Publica de la Facultad de Ciencias Veterinarias.

Acondicionamiento de las muestras.

Para el acondicionamiento de las muestras se aplicó la técnica descrita por Ramirez, Ruiz, Alegre, Villordo(2018) la cual se basa fundamentalmente en cómo reducir el tejido en forma más eficiente para ser sometido posteriormente a la extracción de ADN.

Técnica de Extracción con detergente CTAB (bromuro de cetil trimetil amonio).

Para la obtención del material genético se empleó la técnica de CTAB consistente en una digestión con CTAB a baño maría por 2 horas y posterior lavado con soluciones de HCl-Isoamilico, Isopropilico y Etanol, todos ellos alternados con procesos de centrifugado.

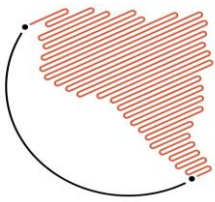
Técnica de PCR Simple Control de especie de rata, ratón y hámster.

Dado la falta de un cuantificador que corrobora la presencia de ADN de la muestra, el desarrollo de una PCR control de especie de rata, ratón y hámster nos permitió corroborar la presencia del material genético descartando de este modo la posibilidad de un falso negativo por ausencia de ADN.

Para su desarrollo se utilizó un par de oligonucleótidos cebadores que trabaja sobre una porción no codificante y conservada del genoma de rata, ratón y hámster del cual, luego de su amplificación revelan un fragmento de aproximadamente 118pb (Walker, *et al.*, 2004) Para la elaboración del master mix y el programa de ciclado, se siguieron las recomendaciones propuestas por Ruiz,Bastiani, De Biasio, Alegre, & Ramírez (2015).

Se empleó como control positivo muestras de ADN de ratas obtenidas en trabajos anteriores, y como control negativo se utilizó agua destilada.

Los productos de PCR fueron separados por electroforesis en geles de agarosa 1% en buffer TBE1x, teñidos con bromuro de etidio y visualizados por transiluminación UV.



Nested PCR Para identificación de *Leishmania sp.*

La Nested PCR es una variante de la PCR convencional que comprende dos rondas de amplificación con distintos pares de iniciadores con el fin de incrementar la sensibilidad de detección. Primero se realiza una reacción con los iniciadores externos para amplificar una región de ADN más extensa, que contiene el segmento diana. Luego, con este producto de amplificación, se ejecuta una segunda PCR con los iniciadores internos que *amplificaran la región específica*.

Para la elaboración del master mix y el programa de ciclado, se siguieron las recomendaciones propuestas por Ruiz, Bastiani, De Biasio, Alegre, & Ramírez (2015). En ambas PCR se emplearon como control positivo ADN de *Leishmania spp.* obtenidos por el mismo equipo de trabajo y controlado con controles estándar y agua destilada como control negativo.

Los productos de PCR se separaron por electroforesis en geles de agarosa al 2% y buffer TBE1X, teñidos con bromuro de etidio y visualizados por transiluminación UV.

Para la elaboración del master mix y el programa de ciclado, se siguieron las recomendaciones propuestas por Ruiz, Bastiani, De Biasio, Alegre, & Ramírez (2015). En ambas PCR se emplearon como control positivo ADN de *Leishmania spp.* obtenidos por el mismo equipo de trabajo y controlado con controles estándar y agua destilada como control negativo. Los productos de PCR se separaron por electroforesis en geles de agarosa al 2% y buffer TBE1X, teñidos con bromuro de etidio y visualizados por transiluminación UV.

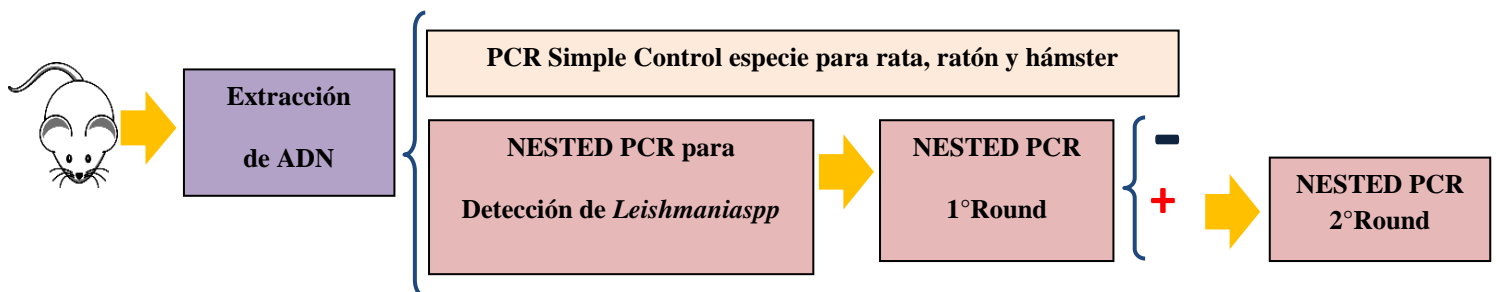
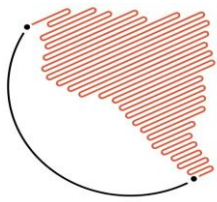


Figura 1. Metodología de trabajo para la detección de *Leishmania spp.*



Resultados e Discussão

Durante marzo 2018-marzo 2019 se trabajó con un total de 27 muestras, todas ellas pertenecientes a la especie *Rattus rattus*.

1. Técnica de Extracción con detergente CTAB. Se logró realizar la extracción del material genético de 27 muestras de piel de oreja de *Rattus rattus*.

2. Técnica de PCR Simple para Control de especie. Se seleccionaron 6 muestras al azar de ADN a las que se les aplicó la técnica de PCR control de especies. Todas ellas revelaron bandas de aproximadamente 118pb.

3. PCR anidada

3.1. Primer round. Se analizaron un total de 27 muestras de las cuales 5 revelaron bandas de 520 pb. En la figura 2 se puede observar corrida de un gel con muestras positivas, negativas, controles positivos y negativo.

3.2. Segundo round. Los productos del primer round fueron sometidos a una segunda PCR más específica donde 3 de las 5 bandas positivas en la primer ronda resultaron detectables a *Leishmania spp.* con bandas de 490pb. (**Figura 3**).

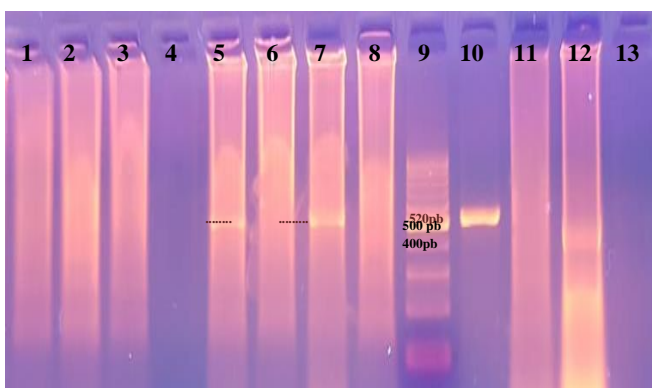


Figura 2. Nested PCR: Primer Round. Amplicón 520 pb. Calles 1-4, 6, 8, 11, 12: muestras de oreja de *Rattusrattus* sin bandas detectables. **Calles 5, 7:** muestras de oreja de ratas con bandas de valor esperado. **Calle 9:** marcador de peso molecular (Cien Marker). **Calle 10:** control (+). **Calle 13:** control (-).

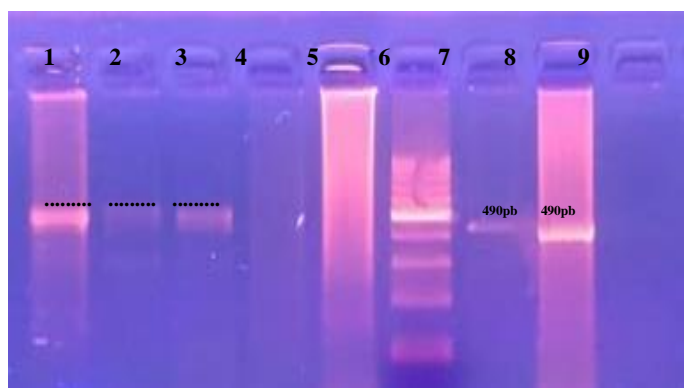
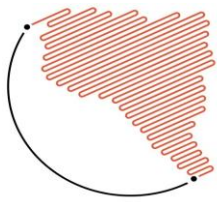


Figura 3. Nested PCR: Segundo Round. Amplicón 490 pb. Calles 1-3: muestras de *Rattusrattus* con bandas de valor esperado. **Calles 4, 5:** muestras de *Rattusrattus* sin bandas detectables. **Calle 6:** marcador de peso molecular (Cien Marker). **Calle 7:** control (+) primer Round. **Calle 8:** control (+) segundo Round. **Calle 9:** control (-).



Si bien existe una extensa literatura sobre los criterios que se deben tener en cuenta para incriminar una especie de vertebrado como reservorio de *Leishmania spp.* (Canchila & Contreras, 2016), en la práctica son pocos los estudios en los que se logra reunir toda la evidencia necesaria para confirmar esta posibilidad. En el caso de los roedores, como reservorios de esta enfermedad, numerosos estudios detectaron por diferentes técnicas infección natural en roedores silvestres a diversas especies de *Leishmania* (Bettini, Pozio, & Gradoni, 1980) (Fisa, *et al.*, 1999), no así para las especies sinantrópicas donde se cuenta con muy poca información disponible (Canchila Muñoz & Contreras Gómez, 2016).

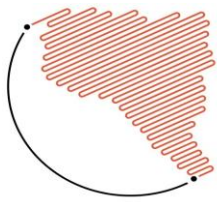
La carga parasitaria y el poder de transmisibilidad son características importantes a tener en cuenta al momento de identificar el rol de una especie animal dentro de la cadena epidemiológica. Estudios realizados por Svobodová, Votýpka, Nicolas & Volf, (2003) señalaron la importancia del pabellón auricular como sitio para la transmisión de *Leishmania* debido a ciertas características que presenta esta área que facilita la alimentación de los flebótomos. Datos que posteriormente serían confirmados por Courtenay, Carson, Calvo-Bado, Garcez & Quinnell (2014) quienes determinaron que la carga parasitaria de

Leishmania en el organismo se dispersa de tal forma que el órgano con mayor agregación de parásitos es la piel de las orejas de los roedores, comparado con la carga parasitaria presente en la medula ósea.

Si bien existen numerosas técnicas diagnósticas, la carga parasitaria puede encontrarse en muy bajas concentraciones, parámetro que debe tenerse en cuenta al momento de seleccionar la técnica de detección. En las últimas décadas, la técnica de PCR viene siendo muy utilizada por su alta sensibilidad, hecho que fue demostrado al detectar ADN de este parásito a partir de un número pequeño de estos en la región expuesta de la oreja (Kimblin, *et al.*, 2008).

Conclusões

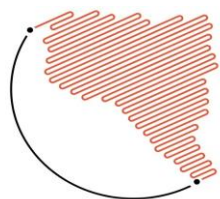
Hasta el momento nuestros resultados indican una tasa de 11,11% de muestras detectables a *Leishmania spp.* en piel de orejas de roedores sinantrópicos, si bien no es una tasa elevada que confirme la posibilidad de convertirse en verdaderos reservorios, hay que destacar que ninguno de ellos presentaron manifestaciones clínicas aparentes de la enfermedad cualidades que junto a la abundancia poblacional de estos individuos, su alta longevidad, el estrecho contacto con el vector hacen



estos roedores posibles reservorios de *Leishmania*, con su implicancia en la mantención de la enfermedad en nuestra región geográfica.

Referências Bibliográficas

1. Bettini, S., Pozio, E., & Gradoni, L. (1980). Leishmaniasis in Tuscany (Italy): (II) *Leishmania* from wild Rodentia and Carnivora in a human and canine leishmaniasis focus. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 74(1), 77-83.
2. Canchila Muñoz, L., & Contreras Gómez, M. J. (2016). Prevalencia de anticuerpos frente a *leishmania* spp. En roedores sinantrópicos de un foco mixto de leishmaniasis en el área urbana del municipio de Ovejas, Colombia.
3. Courtenay, O., Carson, C., Calvo-Bado, L., Garcez, L. M., & Quinnell, R. J. (2014). Heterogeneities in *Leishmania infantum* infection: using skin parasite burdens to identify highly infectious dogs. *PLoS neglected tropical diseases*, 8(1), e2583.
4. Fisa, R., Gállego, M., Castillejo, S., Aisa, M. J., Serra, T., Riera, C., Gallego, M. P., & Portus, M. (1999). Epidemiology of canine leishmaniasis in Catalonia (Spain): the example of the Priorat focus. *Veterinary parasitology*, 83(2), 87-97.
5. Kimblin, N., Peters, N., Debrabant, A., Secundino, N., Egen, J., Lawyer, P., Fay, M. P., Kamhawi S. & Sacks, D. (2008). Quantification of the infectious dose of *Leishmania major* transmitted to the skin by single sand flies. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(29), 10125-10130.
6. Ramirez G. V., Ruiz R.M., Alegre E.A., Villordo G. (2018) Estandarización de una técnica de extracción de ADN de piel de rata (*Rattus rattus*) para su utilización en la detección de *Leishmania* spp. por técnicas de Biología molecular. II Congreso Internacional de Zoonosis y XI Congreso Argentino de Zoonosis-Alimentos y Zoonosis: Desafíos del Siglo XXI” organizado por la Asociación Argentina de Zoonosis. 5 al 7 de junio de 2018 en CABA.
7. Ruiz, R. M., Bastiani, C. E., De Biasio, M. B., Alegre, E. A., & Ramírez, N. N. (2015). Detección de *Leishmania* sp. en *Rattus rattus* de la ciudad de Corrientes, Argentina. *Archivos de medicina veterinaria*, 47(3), 401-407.
8. Sáenz-Anduaga, E., Sánchez-Saldaña, L., & Chalco-Aguate, M. (2017). Leishmaniasis tegumentaria: una revisión con énfasis en la literatura peruana. *dermatología peruana*, 27(4), 196.



9. Savani, E. S. M. M., de Almeida, M. F., de Oliveira Camargo, M. C. G., D'Auria, S. R. N., Silva, M. M. S., de Oliveira, M. L., & Sacramento, D. (2010). Detection of *Leishmania* (*Leishmania*) *amazonensis* and *Leishmania* (*Leishmania*) *infantumchagasi* in Brazilian bats. *Veterinary parasitology*, 168(1-2), 5-10.
10. Shender, L. A., De Los Santos, M., Montgomery, J. M., Conrad, P. A., Ghersi, B. M., Razuri, H., Lescano A. G., & Mazet, J. A. (2014). Native rodent species are unlikely sources of infection for *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis* along the Transoceanic Highway in Madre de Dios, Peru. *PloSone*, 9(7), e103358.
11. Svobodová, M., Votýpka, J., Nicolas, L., & Volf, P. (2003). *Leishmaniatropica* in the black rat (*Rattus rattus*): persistence and transmission from asymptomatic host to sand fly vector *Phlebotomussergenti*. *Microbes and infection*, 5(5), 361-364.
12. Uliana, S. R., Nelson, K., Beverley, S. M., Camargo, E. P., & Floeter-Winter, I. M. (1994). Discrimination amongst *Leishmania* by polymerase chain reaction and hybridization with small subunit ribosomal DNA derived oligonucleotides. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 41(4), 324-330
13. Walker, J. A., Hughes, D. A., Hedges,

D. J., Anders, B. A., Laborde, M. E., Shewale, J., & Batzer, M. A. (2004). Quantitative PCR for DNA identification based on genome-specific interspersed repetitive elements. *Genomics*, 83(3), 518-527.

Agradecimentos

Autoridades del Laboratorio de Biología Molecular de la Facultad de Ciencias Veterinarias.

Financiamento

El presente trabajo se desprende de un proyecto mayor denominado Detección de Infección natural de diferentes especies de *Leishmanias* y *Leptospira* en muestras de animales domésticos mediante técnicas de Biología molecular acreditado por la Secretaría General de Ciencia y Técnica UNNE (Código: PI:17B013).