



Universidad Nacional del Nordeste

Facultad de Ciencias Veterinarias

Corrientes- Argentina

TRABAJO FINAL DE GRADUACIÓN

-MÓDULO DE INTENSIFICACIÓN PRÁCTICA-

OPCIÓN: Tecnología de los Alimentos y Salud Pública

TEMA: “Detección molecular de *Leishmania sp.* en roedores sinantrópicos de la Ciudad de Corrientes”.

TUTOR EXTERNO: Ruiz, Raquel M

TUTOR INTERNO: Alegre, Elsa Agustina

RESIDENTE: Salinas, Florencia M.

E-MAIL: Florencia.salinas.marcela@gmail.com

AGRADECIMIENTOS

A mis padres por su amor, comprensión y apoyo pero sobre todo gracias infinitas por acompañarme en cada decisión que tomé. Gracias por darme la libertad de desenvolverme.

A mis hermanos por ser mis pilares todos estos años, les agradezco por estar presentes aportando siempre momentos hermosos a mi vida que fueron muchas veces mi motor.

Gracias a mis abuelas, “Mari” y Ofelia, por sus palabras de aliento y su apoyo incondicional a lo largo de estos años, gracias porque su amor por mí no conoce límites.

De manera especial quiero agradecer a mis tutoras, la Doctora Ruiz, Raquel M. y la Doctora Alegre, Elsa Agustina por haberme guiado, no solo en la elaboración de este trabajo final, sino a lo largo de mi carrera universitaria y haberme brindado el apoyo para desarrollarme no solo profesionalmente, sino también como persona. Además agradecer al equipo de Trabajo de la Cátedra de Salud Pública de la Facultad de Ciencias Veterinarias por permitirme formar parte del mismo y transmitirme día a día su pasión y conocimientos.

Por último, quisiera agradecer a la Universidad Nacional del Nordeste, a la Facultad de Ciencias Veterinarias, a todas las autoridades y docentes, por permitirme concluir con una etapa de mi vida, gracias por el acompañamiento en todos estos años de carrera.

INDICE

INDICE	3
RESUMEN.....	4
INTRODUCCIÓN	5
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y APORTES DEL PROYECTO.....	7
MATERIALES Y MÉTODOS	8
RESULTADOS y DISCUSIÓN	11
CONCLUSIÓN	14
BIBLIOGRAFÍA.....	15
ANEXO	198

RESUMEN

La leishmaniasis es una enfermedad zoonótica causada por protozoos del género Leishmania que se transmiten al hombre y los animales por la picadura de flebotominos. Esta enfermedad posee 2 presentaciones: visceral, representada por *L. chagasi* en América, cuyo reservorio es el canino, y cutánea dada por *L. braziliensis* cuyos reservorios son animales silvestres como los roedores o edentados. El presente trabajo planteó como objetivo detectar la presencia de *Leishmania sp.* en circulación periférica en piel de roedores que habitan la Ciudad de Corrientes. Para la detección de género y especie de Lesihmania se aplicaron las técnicas de Nested PCR y PCR Simple. Se analizaron un total de 33 muestras de piel de oreja de las cuales 2 resultaron positivas a la técnica de Nested PCR para detección de *Leishmania sp.* y PCR simple para detección de *L. braziliensis*. Concluimos que los roedores predominantes en la Ciudad de Corrientes, pertenecen a la especie *Rattus rattus*, de importancia en Salud Pública por el potencial zoonótico que presenta en la transmisión de enfermedades en los que se constató la infección natural a *Leishmania (Viannia) braziliensis* con asiento en tejido cutáneo perteneciente a las orejas de los roedores.

INTRODUCCIÓN

La leishmaniasis es una enfermedad zoonótica causada por protozoos del género *Leishmania* que cuenta con más de 20 especies diferentes transmitidas al hombre por picaduras de alrededor de 90 especies de flebotomínos capaces de transmitir el parásito. Se estima que cada año produce entre 700.000 y un millón de nuevos casos y entre 20.000 y 30.000 defunciones (OMS, 2017). Es endémica en 88 países de cuatro continentes y en América se presenta desde México hasta el norte de Argentina (Borda *et al.*, 2003).

El vector es un pequeño díptero nematócero de la subfamilia Phlebotominae que en América pertenece al género *Lutzomyia*, presente en la provincia y Ciudad de Corrientes (Salomón *et al.*, 2001). Antiguamente, este vector solo se encontraba en ambientes selváticos pero al transcurrir el tiempo, muchas especies se fueron adaptando a otros ambientes hasta encontrarlos actualmente en zonas rurales y urbanas (Acha & Szyfres, 2003).

Esta enfermedad posee dos presentaciones clínicas básicas, la leishmaniasis visceral, representada por *L. chagasi* en América, cuyo reservorio doméstico principal es el canino y la presentación cutánea dada por el complejo de *L. braziliensis* teniendo como reservorios principales animales silvestres, roedores o edentados. Es importante destacar que la intervención del hombre en los cambios ecológicos influyeron en la adaptación de los vectores a nuevos ambientes, que llevaron también al reemplazo de reservorios silvestres por otras especies animales que se encuentran en mayor contacto directo con el hombre (Acha & Szyfres, 2003; Cabello & Cabello, 2008).

Para el control y prevención de las enfermedades es indispensable conocer cuales son las especies de animales que juegan el papel de reservorio en diferentes ambientes, silvestres o urbanos, que van a mantener la parasitosis dentro de una cadena epidemiológica en una región determinada, sin embargo, la identificación de estos animales no es sencilla (Medina, 1996). La importancia de los roedores y su participación como reservorios en la epidemiología de la leishmaniasis ya fue demostrada por Hertig *et al.* (1957). Es por ello que muchos trabajos en Latinoamérica se han enfocado en determinar los reservorios silvestres y sinantrópicos.

Entre estos últimos, roedores de género *Rattus* se han encontrado naturalmente infectados con *Leishmania* en Brasil (Alencar *et al.*, 1960; Branda˜o-Filho *et al.*, 2003),

Colombia (Alexander *et al.*, 1998) y Venezuela (De Lima *et al.*, 2002). Existen especies de roedores silvestres tales como la especie *Trichomys apereoides*, la cual demostró poseer una alta prevalencia de infección natural a *Leishmania sp.* en Brasil, Minas Gerais (Oliveira *et al.*, 2005). En Perú, especies silvestres también fueron estudiadas comprobando la infección por *Leishmania (V) braziliensis* (Braga Vela *et al.*, 1991). Otras especies silvestres que fueron estudiadas con resultados positivos en Brasil fueron *Oryzomys subflavus*, *Galea spixii*, *Bolomys lasiurus* y *Wiedomys pyrrhorhinos*, con distintos porcentajes de prevalencia (Oliveira *et al.*, 2005). También la detección de Leishmania fue estudiada en la especie *Oryzomys*, conocida comúnmente como rata arrocera que habita zonas de cultivo en el Perú, los resultados en este caso fueron negativos, pero es importante destacar que en estos estudios la técnica de detección aplicada fue la de cultivos y posterior visualización del parásito, técnica laboriosa que no siempre tiene una alta sensibilidad (Herrer, 1999).

El roedor silvestre *Trychomis laurentius* fue estudiado experimentalmente basando el ensayo de laboratorio en estudios anteriores que describen una interacción entre caviomorpha y tripanosomas, reconociendo a esta especie como importantes huéspedes de tripanosomas en Brasil. En este trabajo se demostró la capacidad de retener la infección y amplificación del ciclo de transmisión de ambas especies de Leishmania (*L. chagasi* y *L. braziliensis*) con capacidad de invadir y mantenerse en vísceras y en piel (Rodríguez Roque *et al.*, 2010). Muchas son las especies de roedores incriminados como huéspedes naturales y algunos de ellos como reservorios naturales (Lainson *et al.*, 1981, Brandão-Filho *et al.*, 2003).

Por otro lado, se destaca la detección de *Leishmania sp.* en roedores sinantrópicos, es decir aquellos que tienen una vida en estrecho contacto con el hombre en forma intra y peri domiciliaria. Del género *Rattus*, la especie *Rattus rattus* fue una de las más estudiadas, trabajos de Olivera *et. al.* en el año 2005 demostraron una alta tasa de animales que habitan Brasil que fueron positivos a Leishmania, considerados posibles reservorios por su alto potencial zoonótico y característica epidemiológicas estudiadas que los rodea (Oliveira *et al.*, 2005).

En cuanto a las técnicas de diagnóstico, la biología molecular es una técnica de alta sensibilidad y especificidad que en el presente se encuentra muy utilizada en estudios

epidemiológicos, dada la alta sensibilidad y la importancia de poder detectar animales infectados en forma natural, ya que estos se convierten en potenciales reservorios del agente etiológico. Resultados sobre diagnósticos por PCR realizados sobre poblaciones de roedores silvestres y sinantrópicos de Brasil en zona endémica de leishmaniasis cutánea y visceral, demostraron una alta prevalencia de infección natural, con especial importancia, en la especie *Rattus rattus* para tres complejos de leishmania (*L. mexicana*, *L. braziliensis* *L. donovani*) (Oliveira *et al.*, 2005).

Planteamiento del problema y aportes del Proyecto

De los antecedentes anteriormente presentados, se desprende la importancia que los roedores ocupan en la mantención de la leishmaniasis en un área geográfica. En Argentina se conoce poco sobre el papel que juegan estos mamíferos en la epidemiología de la leishmaniasis. El equipo de investigación de la Cátedra de Salud Pública Veterinaria de la Facultad de Ciencias Veterinarias, UNNE, fue el primero en corroborar la infección natural de *Leishmania sp.* en roedores sinantrópicos de Argentina en la ciudad de Corrientes, específicamente en órganos internos, resultados que fueron publicados (Ruiz *et al.*, 2015), sin embargo, son numerosos los datos que se deben obtener y analizar para poder interpretar el rol que juegan estos animales en la cadena epidemiológica de nuestra región geográfica. La detección de los parásitos en el sistema circulatorio periférico sería uno de los estudios necesarios para complementar e interpretar datos necesarios para considerar a estos animales posibles reservorios. Sobre la base de estos interrogantes se planteó la necesidad de corroborar este aspecto específico mediante la detección por técnicas de biología molecular en muestras de piel de oreja de roedores que sería el lugar y órgano target de detección del parásito si este se encontrara circulando.

Este Trabajo forma parte de un Proyecto mayor acreditado, por lo tanto se partirá de muestras obtenidas de roedores sinantrópicos que habitan la Ciudad de Corrientes que ya fueron tomadas y almacenadas para tal fin para ser procesada con técnicas de biología molecular que ya fueron estandarizadas por el equipo de investigación de Salud Pública Veterinaria. Por otro lado tambien se sumarán muestras de nuevas captura de roedores.

Los resultados de este trabajo forman parte de aquellos obtenidos del proyecto mayor en el cual se encuadra, necesarios para sumar e interpretar el verdadero rol que

cumplen estas especies animales en nuestra región geográfica, por lo tanto los resultados cumplen en aportar un conocimiento base para los estudios de investigación epidemiológica, como también resultados que sumarían y colaborarían en una verdadera interpretación regional con respecto a esta enfermedad y a esta especie animal.

Objetivo General

- Detectar la presencia de *Leishmania sp.* en circulación periférica en piel de roedores que habitan la Ciudad de Corrientes.

Objetivos particulares

- Extraer ADN a partir de muestras de piel de orejas de roedores sinantrópicos que habitan la Ciudad de Corrientes.
- Aplicar técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para la detección de género y especie de Leishmania.

Hipótesis de trabajo

Los roedores que habitan la ciudad de Corrientes poseen infección natural con circulación de Leishmania en sangre periférica.

MATERIALES Y MÉTODOS

El trabajo se realizó en la Facultad de Ciencias Veterinarias UNNE en la Cátedra de Salud Pública y en el Laboratorio de Biología Molecular del Servicio Veterinario de Biología Molecular de la Facultad de Ciencias Veterinarias –UNNE durante el periodo 2019.

Se trabajó con un número de 30 muestras de piel de orejas de roedores de la especie *Rattus rattus* de la Ciudad de Corrientes que se encontraban almacenadas y conservadas en freezer a -20°C en el Laboratorio de la Cátedra de Salud Pública y se sumaron otras nuevas que fueron obtenidas mediante la captura de roedores y la extracción de la misma.

Captura e Identificación de roedores y toma de muestras: se realizó la colocación de trampas tipo Sherman en diferentes puntos del microcentro de la Ciudad de Corrientes,

utilizándose como cebo semilla de zapallo y/o grasa bovina. Los ejemplares capturados fueron trasladados al laboratorio de la cátedra de Salud Pública donde se procedió a la identificación en género y especie según clave Osgood (1943). Para el sacrificio de los animales se utilizó como droga eutanásica el Euthanyle® (pentobarbital sódico) en dosis de 40-50mg/kg vía intraperitoneal, procediéndose al muestreo de una pequeña porción de piel de ambas orejas (5mm^2). Las mismas fueron colocadas en tubos Eppendorf estériles y conservadas en freezer a -20C° hasta su procesamiento.

Para la detección molecular se trabajó en el laboratorio del Servicio Veterinario de Biología Molecular de la Facultad de Ciencias Veterinarias UNNE.

Técnica de Extracción de ADN: En un primer paso se realizó la extracción de ADN de las muestras utilizando digestión con detergente CTAB (Bromuro de cetil trimetilamonio) y purificación con cloroformo: alcohol isoamílico (Lodhi *et al.*, 1994). La calidad y cantidad del ADN extraído se evalúo a través de un screening por electroforesis en geles de agarosa 1% teñidos con bromuro de etidio, buffer TBE 1X y transiluminación UV.

Control de material genético obtenido: En un segundo paso se realizó el control del material genético obtenido aplicando una técnica de PCR Simple para material genético de especies de roedores. Esta técnica se aplicó a cada una de las muestras a procesar con el objetivo de realizar un control de ADN extraído, corroborando que en el caso que el resultado sea negativo este no sea por un defecto de obtención de ADN, pudiendo convertirse sin esta prueba en un falso negativo.

Para el control de material genético de los roedores se realizó una PCR control donde se aplicaron un par de primers para analizar una porción no codificante y conservada del genoma de rata, ratón y hámster que amplifica 118pb bajo las condiciones descriptas por Walker *et al.* (2004). Las reacciones de master mix se llevaron a cabo siguiendo las recomendaciones propuesto por el autor (Walker *et al.*, 2004), conteniendo las siguientes concentraciones finales de reactivos: 1X de Buffer de PCR, 1,5mM MgCl₂, 200mM de cada dNTP, 200nM de cada primer, 1,0U de Taq DNA polimerasa. Como marcador de peso molecular se empleó Cienmarker (Biodynamics) y como control negativo agua destilada esteril.

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

Detección de *Leishmania* sp. por Nested PCR: Se aplicó la técnica de Nested PCR para la detección de especies de *Leishmania*, que comprende dos rondas de amplificación para detectar ADN de protozoos del género *Leishmania* sp. En la primera ronda se utilizaron primers que amplifican bandas de 520pb bajo las condiciones descriptas por Uliana *et al.* (1994). Con el producto de amplificación de esta primera PCR se aplicó la segunda ronda para incrementar la sensibilidad del diagnóstico, en este caso se utilizaron iniciadores que amplificaron bandas de 490 pb bajo las condiciones descriptas por Savani *et al.* (2010). Como control positivo se utilizó ADN de *Leishmanias* sp. proveniente del Instituto Nacional de Parasitología “Dr. Mario Fatala Chaben”, Argentina, y agua destilada como control negativo.

Para ambas rondas se realizaron las reacciones según lo propuesto por el autor, conteniendo las siguientes concentraciones finales de reactivos: 1X de Buffer de PCR, 0,5mM MgCl₂, dNTP 0,2mM, 0,2μM de cada primer y 2,0U de Taq DNA polimerasa, en un volumen total de 20 μl. Para la primera ronda se utilizó 2 μl de ADN problema y para la segunda ronda 1μl del producto de amplificación de esta primer PCR.

Detección de *Leishmania braziliensis* por PCR Simple: en aquellas muestras que dieron bandas visibles a *Leishmania* sp. se les aplicó la Técnica de PCR Simple para determinar si las mismas correspondían a la especie *L. braziliensis*.

La técnica consta de una desnaturalización inicial a 94°C, luego de 35 ciclos de desnaturalización a 95°, para continuar con dos extensiones y una incubación. Se utilizaron iniciadores que amplificaron bandas de 103pb (Da Costa Lima *et al.*, 2009). Como control positivo se utilizó el ADN de *Leishmania braziliensis* proveniente del Centro Nacional de Parasitología y Enfermedades Tropicales de la ciudad de Corrientes (CENPETROP) y como control negativo agua tridestilada estéril.

Siguiendo las recomendaciones del autor, las concentraciones finales de reactivos para un volumen de 25μl: 1X de Buffer de PCR, 0,2mM MgCl₂, de cada dNTP 0,2mM, 0,25μM de cada primer, 2,0U de Taq DNA polimerasa y 2 μl de ADN de muestra.

Los productos de PCR fueron revelados por electroforesis horizontales en geles de agarosa en buffer TBE (Tris- Ácido bórico- EDTA) 1X, teñidos con bromuro de etidio y visualizados por transiluminación UV. Se utilizó un marcador de peso molecular (Ladder 100) para la comparación de tamaños de los fragmentos amplificados.

Para la interpretación de resultados, se aplicó un análisis estadístico con medidas descriptivas de tendencia central y dispersión. La significación de las diferencias entre grupos se indagó por la prueba de Chi cuadrado, para el análisis se utilizó el sistema EPIDAT 3.0 (OPS-OMS).

RESULTADOS y DISCUSIÓN

Se analizaron 33 muestras de tejido de punta de orejas de los roedores, tres de ellas pertenecieron a nuevas capturas que fueron incorporadas al muestreo, que ya se encontraban almacenadas previamente.

Las muestras ya almacenadas pertenecían a la especie *Rattus rattus rattus* y las muestras de nuevas capturas también pertenecieron al mismo género y especie de roedor.

Se aplicó la técnica de Nested PCR, primer round, en el total de las muestras, de las cuales cinco revelaron bandas visibles de 520 pb (**Figura 1**).

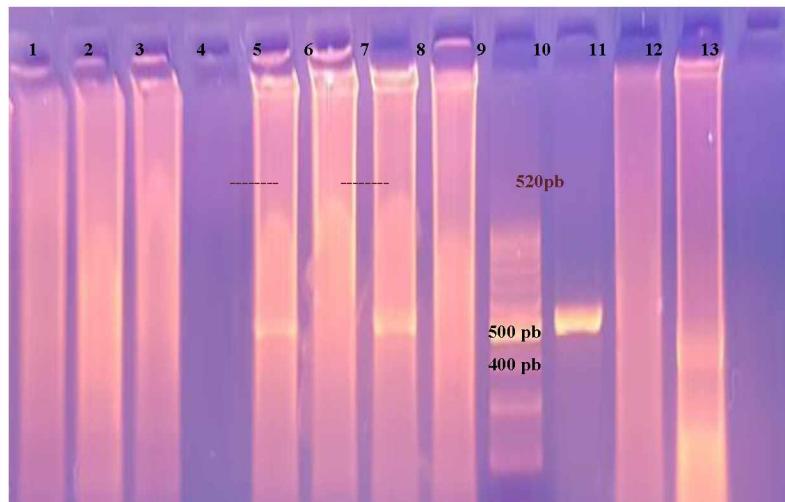


Figura 1. Nested PCR: Primer Round. Amplicón 520 pb. Calles 1-4, 6, 8, 11, 12: muestras de oreja de *Rattus rattus* sin bandas detectables. Calles 5 y 7: muestras de oreja de *Rattus rattus* con bandas de valor esperado. Calle 9: marcador de peso molecular (Cien Marker). Calle 10: control (+). Calle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

Luego las muestras fueron sometidas a una segunda ronda de PCR más específica donde se obtuvo como resultado la amplificación de bandas de 490 pb en dos de las 5 muestras que resultaron positivas en el primer round (**Figura 2**).

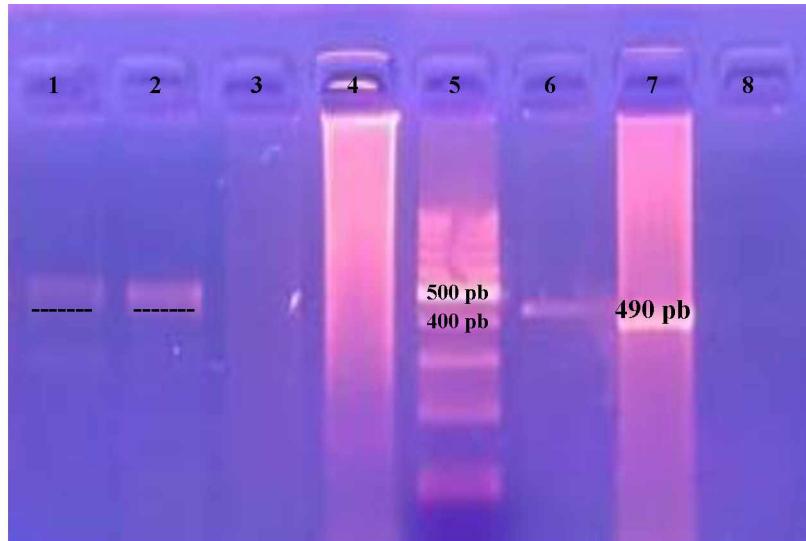


Figura 2. Nested PCR: Segundo Round. Amplicón 490 pb. Calles 1 y 2: muestras de *Rattus rattus* con bandas de valor esperado. Calles 3 y 4: muestras de *Rattus rattus* sin bandas detectables. Calle 5: marcador de peso molecular (Cien Marker). Calle 6: control (+) primer Round. Calle 7: control (+) segundo Round. Calle 8: control (-).

Las muestras positivas al género Leishmania fueron sometidas a una PCR simple donde se pudo evidenciar en ambas muestras bandas de 103 pb, coincidente con la especie *Leishmania (Viannia) braziliensis* (**Figura 3**).

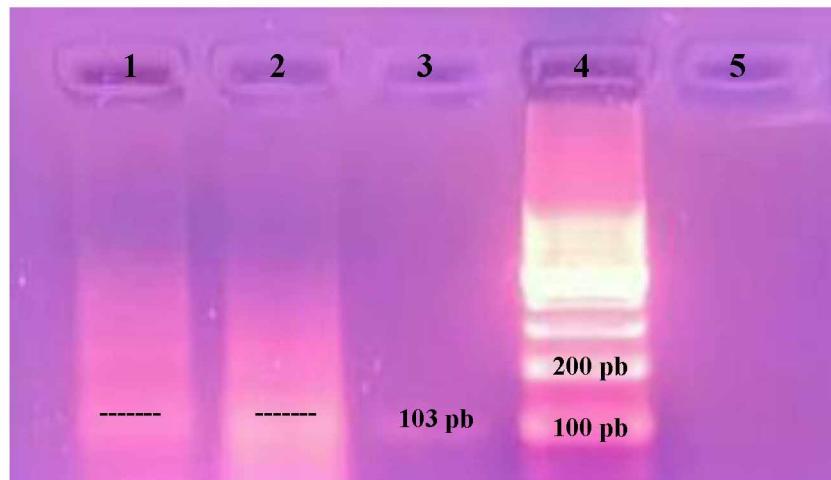


Figura 3. PCR Simple para detección de *Leishmania braziliensis*. Amplicón: 103 pb. Calles 1 y 2: muestras de *Rattus rattus* con bandas de valor esperado. Calle 3: control (+). Calle 4: marcador de peso molecular (Cien Marker). Calle 5: control (-).

De los resultados obtenidos podemos deducir, en cuanto a los roedores, que la especie capturada es la de mayor prevalencia en la Ciudad de Corrientes, hechos que concuerdan con trabajos realizados por diversos autores en la misma área urbana de la ciudad (Marder *et al.*, 2008; Merino *et al.*, 2008; Ruiz *et al.*, 2015). En la Ciudad de Buenos Aires, en cambio, la prevalencia poblacional de roedores sinantropicos tiene a la especie *Rattus norvegicus* como predominante en dicha área geográfica (Arango *et al.*, 2001). Cabe destacar la importancia que posee la identificación de la especie, debido a que las características generales de su biología y comportamiento son diferentes, por lo tanto, estas disimilitudes podrían influir en el mayor o menor contacto con el vector del parásito y también con el hombre. Aquí debemos remarcar la implicancia del hábitat, alimentación y espacios de desplazamiento de estos animales que le confieren mayor o menor capacidad de transmitir la leishmania al hombre o a otros animales domésticos a través de vectores presentes.

Por otro lado, se sabe que está estimado que una prevalencia del 20% o mayor a esta, de individuos de una especie detectados con infección natural, ya es un fuerte indicativo de poder considerar a esa población potenciales reservorios de Leishmania con importancia epidemiológica en el área geográfica donde se desplazan. En nuestro caso si bien la prevalencia hallada no fue alta (prevalencia del 6%), debemos considerar que estos resultados son parte de una sola clase de muestra pertenecientes a tejido de orejas, y que, como lo mencionáramos en la introducción, son muchos los aspectos o características a tener en cuenta a la hora de realizar un análisis general. Cabe aclarar que los resultados obtenidos de estos mismos animales, pero de otros tejidos como bazo y piel de base de cola, no perteneciente a esta Tesina, resultaron con prevalencia mayores al 20% (Ruiz *et al.*, 2015; Ramirez *et al.*, 2018). En este caso podríamos estimar que la circulación del parásito y el asiento del mismo en diferentes órganos y tejidos varían en una misma especie animal, por lo tanto, la afinidad podría depender de la especie animal como también de la especie del parásito.

Por último, si tenemos en cuenta que de los individuos que dieron positivos a la PCR Simple, el 100% dio detectable a la especie *Leishmania (Viannia) braziliensis*, podríamos inferir que la prevalencia de esta especie de parásito con respecto a las otras especies es alta, sin embargo, sabemos que deberíamos aumentar el número de muestras para analizar esta situación.

El desarrollo y obtención de los resultados presentados en esta tesina fue premiado como reconocimiento a mejores producciones de trabajos científicos dentro del ámbito de la Universidad Nacional del Nordeste, en las presentaciones Científicas y Tecnológicas del año 2019.

CONCLUSIÓN

-También se pudo constatar la infección natural al género Leishmania de baja prevalencia en el tejido estudiado si lo comparamos con el mayor asentamiento del parásito en otros tejidos del mismo individuo.

-Se logró identificar en los animales positivos al género Leishmania la especie *Leishmania (Viannia) braziliensis* con asiento en tejido cutáneo perteneciente a las orejas de los roedores.

-Los resultados obtenidos suman datos de importancia para el Proyecto general del cual se desprendió el presente trabajo, para el análisis e interpretación general de la situación actual y regional de la leishmaniasis con respecto a pequeños mamíferos en ambientes urbanos.

-Debido a datos bibliográficos a nivel Nacional e Internacional donde se menciona los escasos trabajos sobre este tema específico en Argentina, los resultados del presente proyecto aportan avances en el conocimiento regional en el área de la Salud Pública y la Salud Pública Veterinaria.

-Podemos concluir que la especie de roedores predominantes en la Ciudad de Corrientes, pertenece a la especie *Rattus rattus*, de importancia en Salud Pública por el estrecho

contacto con el hombre y por el potencial zoonótico que presenta en la transmisión de numerosas enfermedades.

BIBLIOGRAFÍA

1. Acha, P.N.; Szyfres, B. 2003. Zoonosis y enfermedades transmisibles al hombre y a los animales domésticos. Tercera edición. Organización panamericana de la salud, oficina regional de la OMS, 525 Twenty-third Street, Washington, DC 20037, EUA. Volumen III. Pág. 283, pp 27-36 y pp 53-73.
2. Alencar, J.E., Pessoa, E.P., Fontenele, Z.F. 1960. Infecção natural de *Rattus rattus alexandrinus* por Leishmania (provavelmente *L. braziliensis*) em zona endêmica de leishmaniose tegumentar do Estado do Ceará, Brasil. Nota prévia. Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo 2, 347–348.
3. Alexander, B., Lozano, C., Barker, D.C., McCann, S.H.E., Adler, G.H. 1998. Detection of *Leishmania (Viannia) braziliensis* complex in wild mammals from Colombian coffee plantations by PCR and DNA hybridization. Acta Trop. 69, 41–50.
4. Arango J, Cittadino E, Agostini A, Dorta G, Álvarez C, Colusi M, Koval A, Cabrera A, Kravetz F. 2001. Prevalencia de leptospirosis en *Rattus rattus* y *Rattus norvegicus* en el Gran Buenos Aires, Argentina. Ecología Austral 2001; 11: 25-30.
5. Borda, C. E.; Rea, M. J. F.; Rosa, J. R.; Mosqueda, L. A. 2003. Nuevo brote epidémico de leishmaniasis tegumentaria americana en Bella Vista (Corrientes, Argentina) Universidad Nacional Del Nordeste Comunicaciones Científicas y Tecnológicas 2003.
6. Braga Vela J, García Martínez E, Viena del Aguila M, Braga Ribeiro R. 1991. Aislamiento de *Leishmania braziliensis braziliensis* en *Proechimys sp.* capturado en el río Napo, Loreto – Perú. Folia Amazonica IIAP Vol. N° 3:129-138.
7. Brandão-Filho SP, Brito ME, Carvalho FG, Ishikawa EA, Cupolillo E, Floeter-Winter L and JJ Shaw. 2003. Wild and synanthropic hosts of *Leishmania (Viannia) braziliensis* in the endemic cutaneous leishmaniasis locality of Amaraji, Pernambuco State, Brazil. Trans R Soc Trop Med Hyg. 97(3):291-296.

8. Cabello C y Cabello F. 2008. Zoonosis con reservorios silvestres: Amenazas a la salud pública y a la economía Rev Méd Chile. 136: 385-393.
9. DaCosta Lima M.S., Andreotti R., Cavalheiros M.E., Teruya O.E., Gutiérrez O.A., Cepa M.F. 2009. Identificação de espécies de *Leishmania* isoladas de casos humanos em Mato Grosso do Sul por meio da reação em cadeia da polimerase. Rev Soc Bras Med Trop 42: 303-308
10. De Lima, H., De Guglielmo, Z., Rodríguez, A., Convit, J., Rodriguez, N. 2002. Cotton rats (*Sigmodon hispidus*) and black rats (*Rattus rattus*) as possible reservoirs of *Leishmania spp.* in Lara State. Venezuela. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 97, 169–174.
11. Herrer, Arístides. 1999. La Leishmaniasis Tegumentaria en el Alto Tambopata, Departamento de Puno, Perú. *Rev. perú. med. exp. salud pública*, vol.16, no.1-2, p.15-24.
12. Hertig, M., Fairchild, G.B., Johnson, C.M. 1957. Leishmaniasis transmission-reservoir project. Ann. Rep. Gorgas Mem. Lab. 9–11.
13. Lainson, R, Shaw JJ , Ready PD, Miles MA and Próvoa M. Leishmaniasis in Brazil: XVI: Isolation and identification of *Leishmania species* from sandflies, wild animals and man in north Pará State, with particular reference to *L. braziliensis guyanensis* causative agent of “pian bois”. Trans.of the Royal Soc. of Trop. Med. and Hyg. 75: 530 -536, 1981.
14. Marder, G., Ruiz, R. M., Bottinelli, O. R., Peiretti, H. A., Zorzo, L., Merino, D. E., & Czernik, G. E. 2008. Prevalencia de leptospirosis en roedores sinantrópicos de la Ciudad de Corrientes, Argentina. Período mayo 2005–junio 2008. Revista Veterinaria. Volumen 19-Nº2: 150-153.
15. Medina R. 1996. Leishmaniasis Experimental en Animales Silvestres. Dermatología Venezolana. Cátedras de Medicina Tropical y Dermato-Sifilografía. 5:91-119. Disponible en: <http://svcd.org.ve/revista//1966/Web/DV-1-1966-leishmaniasis.pdf>
16. Merino, D., Marder, G., Seijo, A., Lotero, D., Ulon, S., Machuca, L. R., ...& Bottinelli, O. 2008. Leptospirosis en Corrientes, Argentina. Revista de la Facultad de Medicina. Volumen 27-Nº1: 5-7.
17. Lodhi MA, Guang Y, Weeden NF, Reisch BI. 1994. A simple and efficient method for DNA extraction from grapevine cultivars, vitis species and ampelopsis. *Plant Molec Biol Rep* 12: 6-13.

18. Oliveira FS, Pirmezb C, Piresa MQ, Brazilc RP and Pachecoa, RS. 2005. PCR-based diagnosis for detection of *Leishmania* in skin and blood of rodents from an endemic area of cutaneous and visceral leishmaniasis in Brazil. *Vet. Parasitol.* 129: 219-227.
19. OMS. 2017. Nota descriptiva de Leishmania. *Leishmaniasis*.
20. Osgood, D, W. H. 1943. The mammals of Chile. Chicago: Field Museum of Natural History. *Zoology Series*.
21. 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.
22. Rodrigues Roque AL, Cupolillo, E, Marchevsky RS and Jansen AM. 2010. *Thrichomys laurentius* (Rodentia; Echimyidae) as a Putative Reservoir of *Leishmania infantum* and *L. braziliensis*: Patterns of Experimental Infection. *PLoS Negl Trop Dis.* 4(2): e589.
23. 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. *Revista Archivos de Medicina Veterinaria.* Volumen 47-Nº3: 401-407.
24. Salomón, O.D.; Sosa Estani, S.; Rossi, G.; Spinelli, G. R. 2001. Presencia De *Lutzomyia longipalpis* Y Situación De La Leishmaniosis Visceral En Argentina. *Medicina (Buenos Aires)* Vol. 61(2): 174-178.
25. Savani, E.S.; Almeida, M.F.; de Oliveira Camargo, M.C.; D'Auria, S.R.; Sodre Silva, M.M.; de Oliveira, M.L, 2010. Sacramento D. Detection of *Leishmania (Leishmania) amazonensis* and *Leishmania (Leishmania) Infantum chagasi* in Brazilian bats. *Veterinary Parasitology* 168, 5-10.
26. Uliana, S.R.B.; Nelson, K.; Beberley, S.M.; Camargo, E.P.; Floeter-Winter, L.M. 1994. Discrimination amongs *Leishmania* by polymerase chain reaction and hibridization with small subunit ribosomal DNA derived oligonucleotides. *J. Euk. Microbiol.* 41 (4): 324-330.
27. Walker, J.A.; Hughes, D.A.; Hedges, D.J.; Anaers, B.A.; Laborde, M.E.; Sheware, J.; Sinha, S.K.; Batzer, M.A. 2004. Cuantitative PCR for ADN identification base dan genome-specific interspersed repetitive elements. *Genomics.* 83 (3):518-527.

ANEXO

ANEXO 1: Imágenes

❖ *Rattus rattus*. Esta especie se diferencia de otras por características morfométricas tales como:

- Orejas grandes y prominentes que prácticamente carecen de pelo.
- Longitud de la cola mayor a la suma de la longitud de cabeza y cuerpo, uniformemente oscura y con un anillado muy marcado.
- Ojos grandes y prominentes y hocico puntiagudo.
- No presenta manos ni pies palmeados.
- Pelaje liso y suave. El mismo varía de tonalidad dorsal desde el negro absoluto hasta el marrón leonado, siendo posible hallar poblaciones locales con diferentes intensidades de gris o marrón. Ventralmente, las posibilidades comprenden el gris metálico, el gris perla o café y el blanco puro.

La captura de estos roedores se realiza a través de trampas tipo Sherman.



- La identificación de los roedores sinantrópicos y su diferenciación entre *Rattus rattus*, *Rattus norvergicus* y *Mus musculus*, se realizó en el laboratorio de la Cátedra de Salud Pública a través de la necropsia de los ejemplares capturados, previa anestesia y posterior eutanasia.



- Se tomaron muestras de diferentes órganos (punta de oreja, piel de cola, medula ósea y bazo) para realizar la técnica correspondiente de biología molecular. Para este trabajo final se utilizaron las muestras de punta de oreja.



- Las muestras obtenidas fueron colocadas en Tubos Eppendorf de 1,5 ml libres de ADN, identificadas y colocadas en grillas para su almacenamiento en freezer hasta su procesamiento (Imagen superior).
- Luego de aplicar la Técnica de Extracción de ADN con Detergente CTAB, el material genético fue colocado y almacenado en tubos Eppendorf de 1,5 ml libres de ADN para posterior aplicación de Técnicas de Biología Molecular (Imagen inferior).



- Para la extracción del material genético por Técnica de ADN con Detergente CTAB se aplicaron los reactivos: Agua destilada, Solución de homogenización conteniendo CTAB, Cloroformo: Alcohol Isoamílico, Alcohol Isopropílico y Alcohol Etílico.



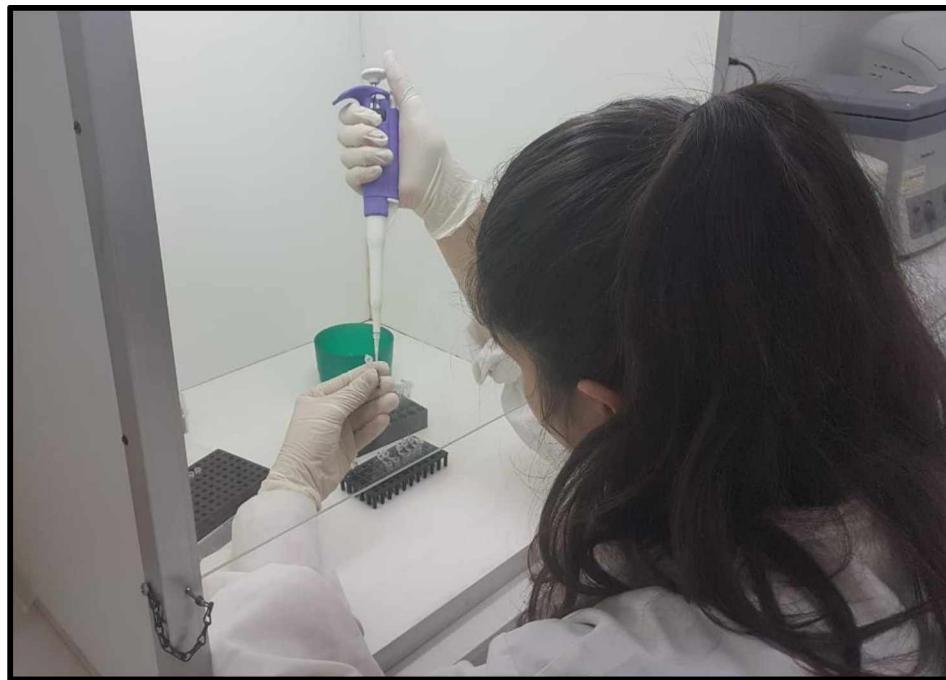
- Los tips empleados en cada paso de la técnica fueron depositados en frasco con agua lavandina para su posterior eliminación.



- ◆ Cabinas de Trabajo. En la primer cabina se realiza el Master mix, donde se trabaja con los reactivos: Buffer de PCR, Mg Cl², dNTP, primer y Taq DNA polimerasa. Además de encontrarse con los elementos necesarios como micropipetas de 1000 µl, 100 µl y 20 µl y tips.



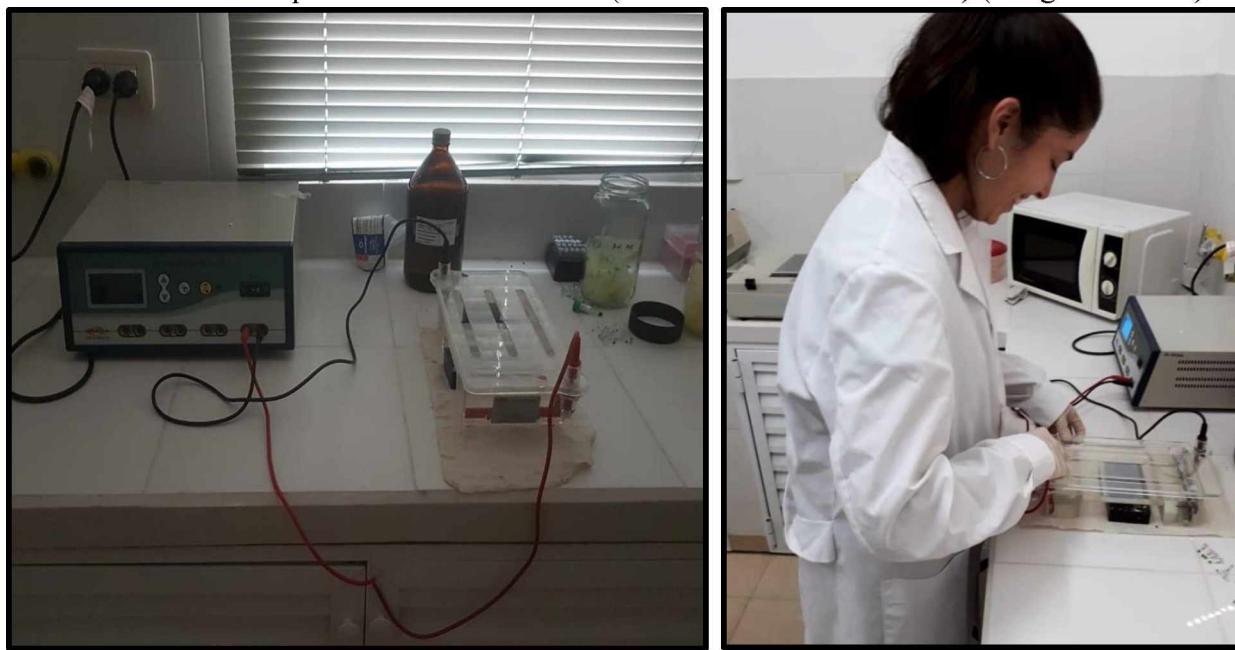
- ◆ En la segunda cabina se trabaja con el material genético de cada muestra.



- Termociclador. Identificación del Programa de ciclado, de acuerdo a la Técnica empleada.



- Corrida electroforética horizontal, para la cual se necesitó de una fuente de poder y una cuba electroforética con dos electrodos (Imagen izquierda). El gel de agarosa se colocó dentro de la cuba que contenía buffer TBE (Tris- Ácido bórico- EDTA) (Imagen derecha).



- Visualización de la corrida electroforética en geles de agarosa a través de transiluminación UV donde se observan las bandas visibles, los controles positivos y negativos y el marcador de peso molecular utilizado.

